

# Thèse de Doctorat

**Joudy ALAMEDDINE**

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

Soutenue le 17 mars 2017  
Thèse N°

École doctorale : Biologie Santé  
Discipline : Biologie Médecine Santé  
Spécialité : Immunologie  
Unité de recherche : INSERM, UMR 1232 CRCINA

**Lymphocytes T régulateurs induits par *Faecalibacterium prausnitzii* :  
Modalités de leur induction et signification fonctionnelle.**

## JURY

**Président du jury/ Examineur**  
Nadine GERVOIS, Professeur, INSERM UMR 1232

**Rapporteurs**  
Hervé BLOTTIERE, Directeur de Recherche, INRA UMR 1319 Micalis  
Lionel APETOH, Chargé de Recherche, INSERM UMR 866

**Directeur de Thèse**  
Frédéric ALTARE, Directeur de Recherche, INSERM UMR 1232

**Co-directeur de Thèse**  
Jacques LEPENDU, Directeur de Recherche, INSERM UMR 1232

**Encadrante**  
Francine JOTEREAU, Professeur Émérite, INSERM UMR 1232

## Dédicace

*A mes très chers parents qui ont tout sacrifié pour me voir réussir. Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je leur porte. Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour de votre tendresse, de longs jours d'apprentissage.*

*A mon frère, mes sœurs, mes charmants neveux et mes adorables nièces, en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*A "Ahmad"*

*A toute ma famille.*

*Je dédie ce travail .....*

*Ce que l'on te reproche, cultive-le ! C'est Toi ...*

*J. Cocteau*



## Remerciements

Ce travail de recherche marque l'aboutissement d'années de travail, enrichissant et de moments difficiles inoubliables, qui n'aurait pu aboutir sans la participation et la collaboration de près ou de loin de nombreuses personnes que je tiens à remercier sincèrement.

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse, Monsieur **Frederic Altare** et mon co-directeur, Monsieur **Jacques Lependu**, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et permis de réaliser cette thèse.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à professeur **Francine Jotereau**, qui a accepté de diriger mon travail et surtout pour sa patience et sa disponibilité. Elle m'a toujours accordée généreusement le temps nécessaire pour partager avec moi ses idées et sa grande expérience. J'ai particulièrement apprécié sa confiance qu'elle a su garder en ma capacité à mener ce projet à terme, ainsi que le temps consacré pour avoir corrigé patiemment ce document. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Un grand merci à **Guillaume Sarrabayrouse**. Je lui exprime également toute ma gratitude pour son formidable aide au début de ma thèse. Il a su initier mes travaux avec beaucoup d'intérêt et de disponibilité tout en m'encourageant à trouver mon cheminement personnel.

Je tiens également à remercier les ingénieurs du plateau Technique de cytométrie, SFR Santé-Université de Nantes. Merci pour votre disponibilité, votre aide et vos conseils avisés.

Je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble de mes collègues de travail : Emmanuelle, Euloge, Adrian qui par leur amitié m'ont épaulé tout au long de ces années. Un grand remerciement s'adresse à ma chère collègue Grace ADA DA SILVA. Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble et pour l'aide que vous avez pu m'apporter.

Je souhaite aussi exprimer mes sincères remerciements à mes cher(e)s amis proches et lointains, que ce soient les stagiaires ou les chercheurs du laboratoire, ou mes ami(e)s hors du laboratoire qui m'ont soutenu durant ce parcours doctoral. Je m'abstiens de les nommer car la liste est tellement longue. Je vous remercie pour tous les agréables et inoubliables moments passés ensemble, je nommerai tout de même mes ami(e)s Sara, Mays, Louwana, Rana, Mohamad.... Une pensée encore plus particulièrement à Ahmad, en Saudi Arabia, pour son soutien moral et psychologique indispensable tout au long de mon séjour en France ; il m'a aidé à retrouver des choses importantes lorsque je les ai perdu: mon sourire, l'espoir et le courage.

Mes plus vifs, sincères et profondes pensées s'adressent à toute ma famille. Merci à mes chers parents, à mes soeurs et ses familles et mon frère qui ont su croire en moi et qui m'ont apporté toute leur aide et leurs conseils quand j'en ai eu besoin. Ce mémoire leur est dédié à 200%. Malgré la distance qui nous sépare, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et toute ma gratitude.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et je remercie tous ceux et celles qui me connaissent et qui me permettent de me sentir exister.

***Merci à Toutes et à Tous***

## Résumé

Comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie des muqueuses est un enjeu majeur pour prévenir ou traiter les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Mon équipe d'accueil a montré la présence dans la muqueuse colique et le sang de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) sécréteurs d'IL-10 induits par la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*). De plus, ces Treg sont diminués dans la muqueuse colique et le sang des patients atteints de MICI. Ces données, et la diminution de *F prau* observée dans ces pathologies, suggèrent l'existence d'un lien entre la diminution de *F prau* et celle des Treg spécifiques, et un rôle de ces cellules dans la prévention de l'inflammation. Mon projet de thèse a consisté à rechercher comment *F prau* induit des Treg et à mieux caractériser et quantifier les PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*, afin de questionner leur signification fonctionnelle. Nous montrons que l'exposition des cellules dendritiques (DC) à *F prau* pendant leur différenciation induit la sécrétion d'IL-10 et d'IDO-1, une résistance à la maturation, la non sécrétion de TNF $\alpha$  et IL-12 en réponse au LPS et favorisent le priming de lymphocytes sécréteurs d'IL-10 par ces cellules. Tous ces effets de *F prau* ne sont pas partagés par des bactéries proches de *F prau* suggérant que l'effet dominant de *F prau* dans l'induction des Treg DP8 $\alpha$  dépend de sa capacité unique à tolérer les DC via l'induction de molécules immuno-modulatrices dont plusieurs ont été identifiées par PCR quantitative et puces affymétrie. Par ailleurs, nous montrons que plusieurs récepteurs de chimiokines et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  marquent les PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*. Ces lymphocytes représentent une fraction variable des PBL DP8 $\alpha$  eux-mêmes en proportion très variable et augmentant avec l'âge, entre les individus. Malgré cela, la fréquence des DP8 $\alpha$  totaux semble diminuée dans la spondylarthrite, les MICI et les cancers coliques. La quantification plus précise des Treg DP8 $\alpha$  originaires du colon dans le sang des patients, grâce aux marqueurs identifiés, permettra de rechercher la valeur pronostique de cette fréquence et sa corrélation avec le niveau de *F prau* dans le microbiote fécal.

**Mots clés :** Lymphocytes T régulateurs; Cellules dendritiques; Microbiote; *Faecalibacterium prausnitzii*; maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## Abstract

Understanding mechanisms underlying mucosal homeostasis represent a critical step towards prevention and treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). My host laboratory has shown the presence, in colonic mucosa, of IL-10-producing regulatory T cells (Treg) CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) induced by the commensal bacteria *F prau*. Moreover, these Treg are less frequent in the colonic mucosa as well as in the blood of IBD patients. These data, together with the fact that *F prau* is reduced in these diseases, suggest a link between the decrease of *F prau* and of specific Treg as well as a role for these cells in containing inflammation. My thesis project consisted in understanding how *F prau* induces Treg and in further characterizing and quantifying *F prau* specific PBL to define their function. Here we show that *F prau* exposure during dendritic cell (DC) differentiation induces IL-10 and IDO-1 production, and a poor maturation including a lack of TNF $\alpha$  and IL-12 secretion in response to LPS. We also show that *F prau*-conditioned DC prime CD4 T cells towards an IL-10-producing phenotype. These *F prau*-mediated effects are not all shared by other close bacteria, suggesting that the critical role for *F prau* in inducing DP8 $\alpha$  Treg depends on its unique ability to tolerize DC. This tolerization could happen via induction of immunoregulatory molecules identified by qPCR and affymetrix gene array. Also, we show that several chemokine receptors as well as  $\alpha 4\beta 7$  identify *F prau*-specific PBL-derived DP8 $\alpha$  cells. Indeed, these lymphocytes represent a variable fraction of DP8 $\alpha$  cells, the inter-individual frequency of which considerably fluctuates and increases with age. Nonetheless, frequency of total DP8 $\alpha$  cells seems diminished in spondyloarthritis, IBD and colorectal cancers. Accurate quantification of DP8 $\alpha$  Treg originating from the colon in patients' blood, using identified markers, should allow to study their prognosis value as well as their correlation with *F prau* levels within fecal microbiota.

**Key Words :** Regulatory T cells; Dendritic cells; Microbiota; *Faecalibacterium prausnitzii*; Inflammatory Bowel diseases.

# Table de matières

## I. Introduction

## II. Synthèse bibliographique

### 1. Cellules dendritiques

- 1.1 Généralités
- 1.2 Grandes sous populations et caractéristiques générales
  - 1.2.1 pDC
  - 1.2.2 cDC
  - 1.2.3 Obtention des DC in vitro
- 1.3 Récepteurs et fonctions majeures des cDC
  - 1.3.1 Reconnaissance et capture des antigènes
    - 1.3.1.1 TLR
    - 1.3.1.2 NLR
    - 1.3.1.3 CLR
  - 1.3.2 Apprêtement antigénique
  - 1.3.3 Migration et maturation
  - 1.3.4 Activation des lymphocytes T
- 1.4 Les cellules dendritiques tolérogènes
  - 1.4.1 Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles
  - 1.4.2 Modalités d'obtentions *in vitro*
    - 1.4.2.1 Facteurs inducteurs biologiques
    - 1.4.2.2 Agents inducteurs pharmacologiques
    - 1.4.2.3 Bactéries commensales

### 2. Lymphocytes T régulateurs

- 2.1 Généralités
- 2.2 LT régulateurs d'origine thymique (tTreg)
  - 2.2.1 Découverte et distribution
  - 2.2.2 Développement
  - 2.2.3 Marqueurs
  - 2.2.4 Activités suppressives des LTreg
    - 2.2.4.1 Perturbations métaboliques
    - 2.2.4.2 Cytokines
    - 2.2.4.3 Cytolyse
    - 2.2.4.4 Action sur les CPA
  - 2.2.5 Rôles physiologiques majeurs des tTreg
- 2.3 LT régulateurs d'origine périphérique
  - 2.3.1 pTreg Foxp3+
  - 2.3.2 iTreg Foxp3+
  - 2.3.3 Tr1
  - 2.3.4 Th3
- 2.4 LT régulateurs d'origine thymique (tTreg)

### 3. Microbiote et homéostasie intestinale

- 3.1 Anatomie et structure de l'intestin
- 3.2 Formations lymphoïdes
- 3.3 Epithélium intestinal

- 3.4 Lamina propria
  - 3.4.1 Cellules myéloïdes
  - 3.4.2 ILC « Innate lymphoïde cells »
  - 3.4.3 IgA
  - 3.4.4 Lymphocytes T
- 3.5 Microbiote intestinal
  - 3.5.1 Développement et composition
  - 3.5.2 Microbiote et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
  - 3.5.3 Fonctions du microbiote
  - 3.5.4 Rôle du microbiote dans l'homéostasie intestinale
    - 3.5.4.1 Induction de LTreg
    - 3.5.4.2 Induction de Th17
    - 3.5.4.3 Autres mécanismes impliqués dans l'homéostasie

#### 4. Lymphocytes doubles positifs (DP)

- 4.1 Concept
- 4.2 Origine et différents phénotypes doubles positifs
- 4.3 Distribution et fréquence des lymphocytes T DP périphériques
- 4.4 Fonctions des lymphocytes T DP
- 4.5 Les Lymphocytes T régulateurs CD4CD8 $\alpha$  humains spécifiques de la bactérie *F prau*
  - 4.5.1 Les lymphocytes DP8 $\alpha$  de la lamina propria du colon
  - 4.5.2 Les lymphocytes DP8 $\alpha$  du sang
  - 4.5.3 Hypothèses sur le rôle des Treg DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*

#### 5. Contexte et objectifs de ma thèse

### III. Résultats

#### 1. Recherche des modalités d'induction de Treg DP8 $\alpha$ par la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*

- 1.1 Article 1: *Faecalibacterium prausnitzii* alters dendritic cell functions and promotes the differentiation of IL-10-producing T cells
- 1.2 Résultats complémentaires non intégrés à l'article
  - 1.2.1 Matériels et méthodes
    - Origine des monocytes et différenciation des iDC
    - Essais d'induction de DP8 $\alpha$  in vitro
    - Préparation des ARNm par les Q-PCR
  - 1.2.2 Recherche des effets de *F prau* sur les DC
  - 1.2.3 Recherche des récepteurs CLR engagés par *F prau*
  - 1.2.4 Etude de l'effet des autres bactéries sur l'induction de CD tolérogènes
  - 1.2.5 *F prau* induit la transcription par les DC immatures (36-40h) de molécules inductrices de Treg ou anti-inflammatoires
  - 1.2.6 Etude de l'effet de *F prau* sur l'induction de DP8 $\alpha$

#### 2. Caractérisation et rôle physiologique des lymphocytes T CD4CD8 $\alpha$ circulants réactifs à la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii*

2.2 Article 1: *Faecalibacterium prausnitzii* alters dendritic cell functions and promotes the differentiation of IL-10-producing T cells

2.3 Résultats complémentaires non intégrés à l'article

2.3.1 Matériels et méthodes

2.3.2 Expression de récepteurs de homing dans l'intestin (CCR et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ ) par les PBL DP8 $\alpha$  et CD4

2.3.3 Recherche d'anomalies de la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  dans différentes pathologies

#### **IV. Discussion et Perspectives**

#### **V. Références Bibliographiques**

# I. INTRODUCTION

Au cours de l'évolution des Vertébrés, un système de défense complexe s'est mis en place pour surveiller et maintenir l'intégrité. Il s'agit du système immunitaire (SI). La fonction principale du SI est de détecter les situations de danger et de défendre l'organisme contre les agressions potentielles qu'elles proviennent du milieu extérieur (microorganismes, substances toxiques ou autres) ou qu'elles résident déjà dans l'organisme (constituants du «soi» modifiés : cellules infectées ou tumorales, stress cellulaire) par le développement de réponses immunitaires sophistiquées. L'efficacité de ces réponses les rend dangereuses pour le soi, ce qui a impliqué la mise en place d'une composante régulatrice importante encore incomplètement comprise.

D'une manière générale le SI est constitué de deux composantes fonctionnelles. **L'immunité innée** est basée sur un ensemble de mécanismes de défense non spécifique présents dès la naissance et génétiquement hérités. Il permet à l'organisme de se défendre rapidement lors d'une infection par les nombreux microorganismes quotidiennement rencontrés. Elle fait intervenir des barrières naturelles de l'organisme (peau, muqueuses, et leur sécrétions : larmes, salive, mucus) et des cellules (phagocytes, granulocytes, et Natural killer (NK)) qui vont sécréter des cytokines et des chimiokines conduisant à une réaction inflammatoire. Lorsque l'infection n'est pas contrôlée par ces mécanismes, **l'immunité adaptative** qui se caractérise par un très haut degré de spécificité se met en place. Elle favorise une élimination plus efficace et devient plus rapide en cas de réinfection. Les principaux composants du SI adaptatif sont les lymphocytes T et B, produits dans les organes lymphoïdes primaires (OLP) et activés dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et les anticorps.

Les réponses immunitaires innées et adaptatives interagissent, se complètent et peuvent prendre place dans toutes les parties du corps grâce la capacité de beaucoup de cellules immunocompétentes et des anticorps à circuler via le sang et la lymphe et à rejoindre les tissus agressés, marqués par la réaction inflammatoire. De plus, ces composantes immunitaires effectrices sont étroitement régulées par des mécanismes de tolérance immunitaire pour maintenir une homéostasie et une physiologie normale. Pendant mes 3 années de thèse j'ai eu la chance de travailler sur une question majeure mais encore mal connue: le rôle du microbiote intestinal dans la mise en place d'une tolérance immunitaire au niveau de la muqueuse du colon et au niveau systémique. J'ai abordé cette question en étudiant une population de lymphocytes T régulateurs (Treg) induits par la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*), identifiée par mon laboratoire d'accueil (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). Ces lymphocytes sont caractérisés par la co-expression de CD4 et de faibles niveaux de CD8 $\alpha$  et de ce fait ont été appelés double-positifs  $\delta$ alpha (DP $\delta$ alpha). Les données de mon laboratoire ont montré que ces lymphocytes sont abondants dans la Lamina propria (LP) de la muqueuse colique et sont présents aussi, en proportions plus

faibles, dans le sang. Ces lymphocytes reconnaissent la bactérie *F prau* et possèdent *in vitro* des propriétés de Treg. De plus, mon laboratoire a rapporté que ces cellules sont diminuées dans le colon et le sang des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Pendant ma thèse j'ai abordé quatre questions concernant ces lymphocytes T régulateurs 1/ l'influence de l'âge et de maladies associées à une diminution de *F prau* dans le microbiote fécal sur la fréquence des lymphocytes DP8 $\alpha$  circulants ; 2/ l'existence de marqueurs des lymphocytes T régulateurs DP8 $\alpha$  circulants, originaires de la muqueuse colique ; 3/ la capacité de *F prau* à induire des cellules dendritiques tolérogènes (DCtol) et 4/ les conditions de l'induction de lymphocytes DP8 $\alpha$  producteurs d'IL-10 par la bactérie *F prau*.

Dans l'introduction de ma thèse je résumerai essentiellement les connaissances majeures concernant deux composantes majeures de la tolérance : les DCtol et les Treg, plus particulièrement ceux présents dans l'intestin, et leurs rôles dans le maintien de la tolérance. Je résumerai de plus, rapidement, les connaissances sur les lymphocytes T qui de façon non conventionnelle co-expriment les corécepteurs CD4 et CD8 appelés double positifs. Je décrirai également les avancées récentes des recherches sur l'impact du microbiote intestinal sur notre santé et plus particulièrement son impact sur l'homéostasie de la muqueuse colique.

## II. Synthèse bibliographique

### 1. Cellules dendritiques

#### 1.1 Généralités

Les cellules dendritiques (DC) ont été décrites pour la première fois en tant que cellules aux formes irrégulières et à longs prolongements cytoplasmiques «dendrites» au niveau de l'épiderme en 1868 par Paul Langerhans. Elles furent nommées cellules de Langerhans (LCs) et décrites alors comme des neurones intradermiques représentant 2 % à 4 % de la population des cellules épidermiques. Ce n'est que près d'un siècle plus tard, que les DC ont été véritablement découvertes par Ralph Steinman dans les tissus lymphoïdes de rats et de souris. Les travaux de ce chercheur récompensés en 2011 par un prix Nobel ont ensuite permis de distinguer les DC des autres types de cellules myéloïdes comme les monocytes et les macrophages, en montrant leur rôle majeur dans la présentation des antigènes et dans l'activation des lymphocytes T naïfs ou « priming » et dans l'induction des réponses immunitaires adaptatives (Steinman *et al.*, 1974; Romani *et al.*, 1989). Essentielles donc, dans l'induction et la polarisation des réponses immunitaires effectrices (anti-infectieuse ou anti-tumorale), les DC jouent un rôle également fondamental dans la tolérance immunitaire (Steinman *et al.*, 2003).

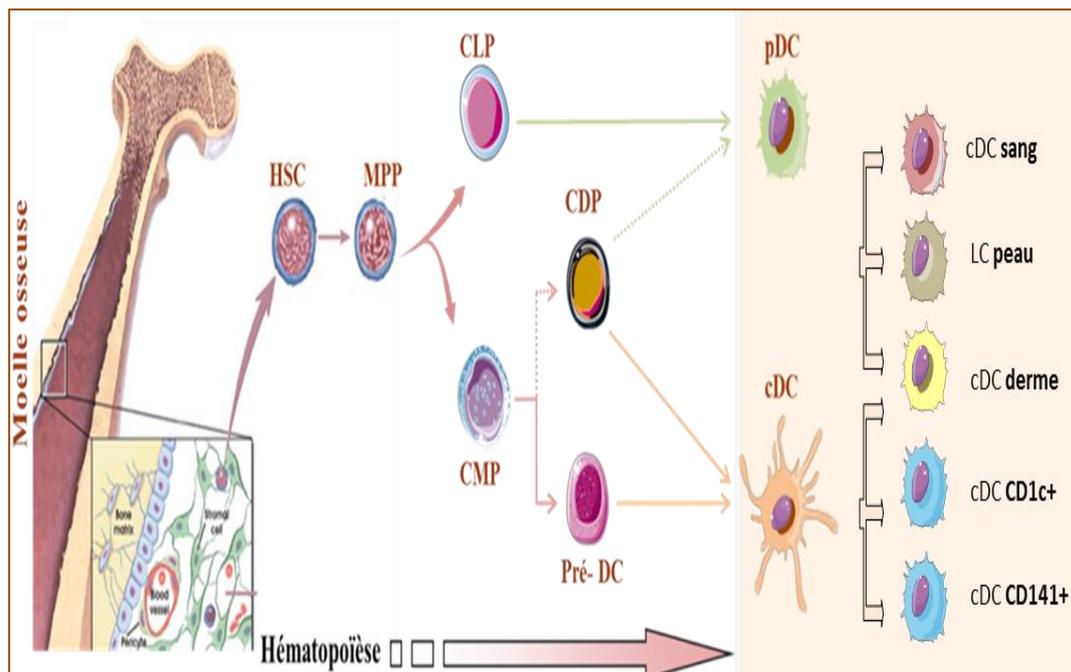
Les DC sont donc des cellules myéloïdes possédant des caractéristiques uniques. Il s'agit notamment de:

- Leur distribution large (elles sont localisées aussi bien au niveau des tissus que dans les zones T des organes lymphoïdes I et II) (Trombetta, 2005)
- Leur grande efficacité à capturer et apprêter et présenter les antigènes peptidiques
- Leur capacité (pour certaines) à présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8 (par présentation croisée)
- Leur capacité (pour certaines) à migrer dans les organes lymphoïdes et à y transférer les antigènes à d'autres DC
- Leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs (Steinman, 1997) et à orienter les réponses immunitaires en fonction de l'environnement.

Elles développent ces fonctions très différentes grâce à leur passage successif par deux formes : la forme immature dans laquelle elles expriment de très nombreux « Pattern recognition receptors » (PRRs) et la forme mature, dans laquelle elles expriment des complexes complexe d'histocompatibilité de classe (CMH)-peptides et des cytokines qui leur permettent d'induire les réponses T appropriées aux besoins ou la tolérance.

La compréhension des mécanismes de la différenciation des DC est récente et toujours d'actualité. Chez l'Homme, leur origine hématopoïétique (CD34+) a été décrite en 1979 par Katz et al, montrant qu'au cours de l'hématopoïèse un précurseur multipotent (MPP) donne naissance à deux types de précurseurs, l'un myéloïde (CMP) et l'autre lymphoïde (CLP) qui peuvent être à l'origine de sous-types des DC (**Fig. 1**). Ces précurseurs migrent via le sang de la moelle osseuse, où ils sont produits, à la périphérie, où ils subissent une différenciation terminale (Boltjes *et al.*, 2014). De plus, une hypothèse récente avance l'existence d'un progéniteur commun aux cellules dendritiques, appelé CDP (common-Dendritic Cell Progenitor) (Naik *et al.*, 2007) qui génère les deux grandes catégories de DC: les DC conventionnelles appelées aussi myéloïdes et les DC plasmacytoïdes, cellules que je désignerai par les abréviations cDC et pDC, respectivement. Les cDC et pDC diffèrent par leur profil cytokinique, leurs molécules de surface, les facteurs pouvant moduler leur différenciation et leur activation et bien sûr par leur rôle.

Les DC représentent moins de 1% du total des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) (Hart *et al.*, 1997). Leur pourcentage est similaire dans d'autres tissus. On les retrouve dans tout le corps humain, y compris les organes lymphoïdes : thymus, ganglions et rate (Segura *et al.*, 2012 ; McIlroy *et al.*, 2001; Velásquez-Lopera *et al.*, 2008), dans la peau (Richters *et al.*, 1994), le sang (Dzionek *et al.*, 2000), les poumons (Sertl *et al.*, 1986) et les muqueuses (Iwasaki A, 2007). La multiplicité des sous-populations de DC identifiées chez la souris et l'homme par de nombreux marqueurs rend extrêmement complexe leur description. De ce fait, j'ai choisi de décrire en détail uniquement les cDC humaines et plus particulièrement les cDC tolérogènes et leur mode d'obtention *in vitro*.



**Figure 1** : Origine hématopoïétique des cellules dendritiques et différentes sous populations.

## 1.2 Grandes sous-populations et caractéristiques générales

Chez la souris la diversité fonctionnelle des cDC a pu être identifiée grâce à l'expression des molécules CD4 ou CD8a. Cependant, chez l'homme, il n'existe pas de marqueur équivalent, les cDC et pDC sont souvent identifiées sur la base de l'absence d'expression de marqueurs des autres lignées hématopoïétiques (lineage neg ou Lin-): T (CD3), B (CD19 et CD20) et NK (CD56) (Williams *et al.*, 1994). Elles sont identifiées aussi par une forte expression de CMH-II (Nussenzweig *et al.*, 1981), en particulier HLA-DR chez l'homme (Hart *et al.*, 1988).

### 1.2.1 pDC

Les pDC ont un phénotype plus homogène que les cDC. Elles peuvent être purifiées sur la base de leur absence d'expression du CD11c et de l'expression de CD123 et ILT7. Elles représentent moins de 0.4% des PBMCs, l'équipe de Dzionek a simplifié leur obtention à partir du sang grâce à l'identification de marqueurs spécifiques qui sont BDCA-2/CD303<sup>+</sup> (lectine C de type II) et BDCA-4/CD304<sup>+</sup> (récepteur Neuropilin-1 NP-1) (Dzionek *et al.*, 2000). Elles ont été dénommées initialement «cellules productrices d'interféron», en référence aux fortes quantités d'interférons de type 1 (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\lambda$ ) qu'elles sécrètent en réponse à une stimulation virale (Gilliet *et al.*, 2008). Contrairement aux cDC, elles sont caractérisées par un répertoire limité de Toll-like receptors (TLRs) endosomaux (TLR7 et TLR9) ce qui leur confère une réponse limitée et spécifique de certains microbes essentiellement les virus (Kadowaki *et al.*, 2001). Elles sont reconnues pour leur rôle effecteur dans l'immunité antivirale en inhibant la réplication virale et en activant les cellules impliquées dans les réponses T ou B antivirales. Les pDC auraient également des activités dans la lutte anti-tumorale.

### 1.2.2 cDC

A la différence des pDC, les cDC ont un phénotype CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>low</sup>. Elles expriment un grand nombre de récepteurs pour la reconnaissance des motifs bactériens et viraux « les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) » (Wu, 2007) que nous décrivons dans le paragraphe suivant. Elles regroupent toutes les caractéristiques nécessaires pour l'activation de plusieurs sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, elles sont également connues pour leur forte capacité de sécrétion d'IL-12, permettant notamment la polarisation des cellules Th1 (Ueno *et al.*, 2007).

Les différentes sous-populations de cDC ont traditionnellement été définies selon le caractère résident ou migratoire et l'expression différentielle de certains marqueurs. On distingue les cDC migratoires, localisées dans les tissus, comme la peau et les muqueuses (Wu *et al.*, 2007) et les cDC résidentes, qui sont localisées dans les organes lymphoïdes

(thymus, rate, cortex interfolliculaire des ganglions lymphatiques et plaques de Peyer) (Inaba *et al.*, 1994).

Deux sous-populations de cDC ont été identifiées dans le sang, les cDC CD1c<sup>+</sup> qui expriment le BDCA-1 et les cDC BDCA-3<sup>+</sup>/CD141<sup>+</sup>. Des sous-populations semblables ont été identifiées dans les tissus. On distingue (Patel and Metcalf, 2016) (**Fig. 1**) :

- Les cDC CD141<sup>+</sup>, présentes dans les amygdales et les ganglions lymphatiques, ainsi que dans certains tissus non lymphoïdes tels que les poumons, le foie et la peau. Elles expriment CXCR1, DNGR1 (CLEC9a) ainsi que les TLR 1, 2, 3, 6, 7 et 8.
- Les cDC CD1c<sup>+</sup> sous-population majeure des ganglions lymphatiques, de la rate et présente dans les tissus non lymphoïdes, caractérisée par l'expression de CD1c, CD11c, CD11b et Sirpα. Elles expriment les différents TLR: 1-10 ainsi que divers autres récepteurs de reconnaissance de motifs microbiens tels que les récepteurs des motifs fongiques Dectin 1 et 2 (Harman *et al.*, 2013; Lundberg *et al.*, 2013).
- Les cDC CD14<sup>+</sup> ou cDC du derme, phénotypiquement elles ressemblent aux monocytes sanguins, mais expriment des taux plus élevés de CMH-II et de CD11c. Elles expriment des molécules de macrophages, telles que CD163 et CX3CR1, les TLR 1 à 9 et sont CD209<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> et CD207<sup>-</sup>.
- Les (LC) cellules de Langerhans, présentes dans l'épiderme. Elles sont caractérisées par une forte expression de la molécule du CMH-I non classique (CD1a), par une expression faible de CD11c et par l'expression de CD207, associée à des vésicules intracytoplasmiques caractéristiques, les granules de Birbeck. Ce phénotype permet de les distinguer des DC CD14<sup>+</sup> et CD1c<sup>+</sup> également trouvées dans la peau.

### 1.2.3 Obtention des DC *in vitro*

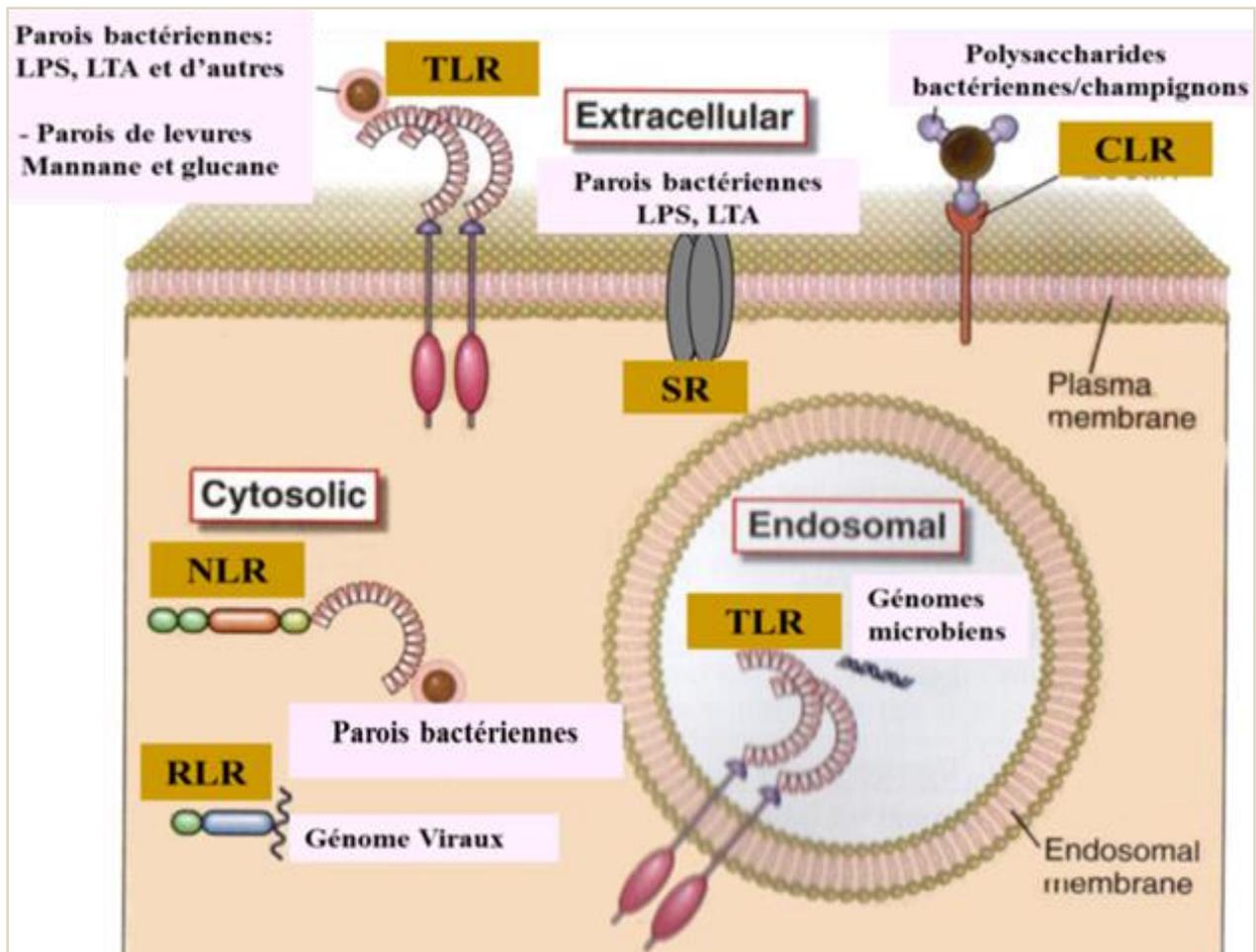
Bien qu'il existe des DC dans le sang, leur fréquence très faible rend difficile leur utilisation (Fong *et al.*, 2001). De ce fait, les études sur les DC humaines utilisent le plus souvent des DC différenciées *in vitro* à partir de monocytes ou de progéniteurs médullaires CD34<sup>+</sup>. Les DC dérivées des monocytes restent la stratégie de production la plus utilisée, grâce à la facilité d'obtention des monocytes (5 à 15% des PBMCs), et par l'ajout de combinaisons cytokiniques : GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et IL-4 ou GM-CSF et IL-13 ou IL-15. Ces facteurs déclenchent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures (iDC) dont la maturation peut être obtenue 5 à 6 jours plus tard par l'application d'un stimulus de maturation comme le LPS (lipopolysaccharide) ou un mélange de prostaglandine E2, TNF-α IL-1b et IL-6 ou de TNFα et de Poly I:C (polyinosinic:polycytidylic acid) (Romani *et al.*, 1994 ; Sallusto *et al.*, 1994).

## 1.3 Récepteurs et fonctions majeures des cDC

Les DC exercent des fonctions sentinelles dans l'organisme. Elles sont omniprésentes dans un état immature en périphérie, majoritairement regroupées au niveau de portes d'entrée privilégiées des microorganismes. Elles ont une capacité importante à éliminer une agression par l'induction de la réaction inflammatoire et/ou l'initiation d'une réponse adaptative effectrice spécifique (Medzhitov *et al.*, 1999; Merad *et al.*, 2013) ou d'induire une réponse régulatrice.

Cette capacité est favorisée grâce à l'expression d'un vaste répertoire de récepteurs des signaux de dangers (PRRs). Ces récepteurs reconnaissent un ensemble assez diversifié de motifs conservés associés ou non aux pathogènes: respectivement les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et les DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). Ces derniers, sont des composants ou des protéines du soi normalement séquestrées dans les cellules comme les acides nucléiques, les HSP (Heat-Shock Protein).

On peut distinguer deux groupes fonctionnels de PRRs (**Fig. 2**) : Le premier groupe (Scavengers Receptors (SR) et C-type Lectin Receptors (CLR)) permet aux cellules de capter les microorganismes en vue de les phagocyter, mais aussi pour certains CLR d'induire une signalisation. Le second groupe (Nod like receptors (NLR), Toll like receptors (TLR) et RIG-1 like receptors (RLR)) permet une activation cellulaire grâce à la transduction de signaux et à l'intervention des facteurs comme NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) et IRF. (Pétrilli *et al.*, 2007; Franchi *et al.*, 2010; Barton *et al.*, 2003).



**Figure 2 :** Les principales familles de PRRs, leur localisation cellulaire et les principaux PAMP reconnus. LPS : lipopolysaccharide, LTA : acide lipoteichoïque (adapté d'après Abbas *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Reconnaissance et capture des antigènes

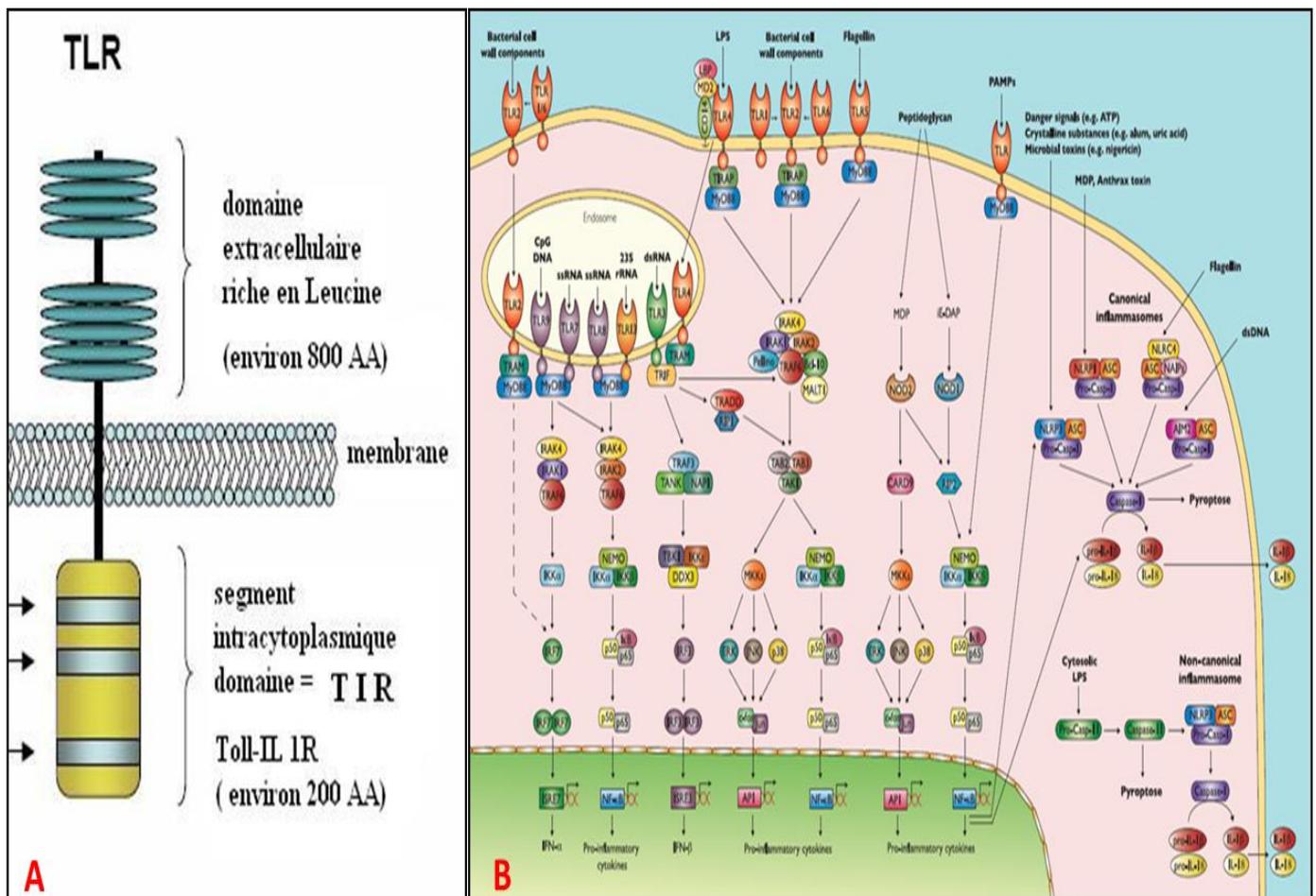
#### 1.3.1.1 TLR

Ce sont de protéines transmembranaires de type I (Kawai *et al.*, 2011), Leur domaine extracellulaire contient une région riche en leucines (LRR : Leucin-Rich Repeats) impliquée dans la reconnaissance de motifs conservés des microbes, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique ou TIR similaire à celui du récepteur de l'IL-1. Le domaine TIR joue un rôle dans l'activation et dans la transduction de signaux (Akira, 2004) (**Fig. 3**). Ces TLR sont exprimés par de nombreuses populations leucocytaires mais également par des cellules épithéliales et d'autres types cellulaires. Les DC en expriment le plus grand nombre et un assortiment différent selon les sous-populations, ce qui contribue de façon majeur à leurs rôles spécialisés.

Selon leur localisation et le ou les motifs qu'ils reconnaissent, les TLR sont divisés en 2 groupes. Le premier groupe est constitué de TLR 1, 2, 4, 5 et 6 exprimés à la membrane

plasmique, reconnaissent des motifs microbiens exogènes tels que des composés protéiques ou lipidiques (Hopkins, 2005 ; Takeda, 2003). Tandis que les TLR du second groupe (TLR-3, 7, 8 et 9), localisés à la membrane des endosomes ou des lysosomes, reconnaissent des acides nucléiques (Hopkins *et al.*, 2005).

Lorsque le TLR se fixe à son ligand, une cascade de signalisation est initiée afin de déclencher l'expression des gènes de l'immunité innée. Deux voies de signalisation sont initiées par l'activation des protéines intracellulaires adaptatrices. La voie majeure utilise l'adaptateur Myd88 (myeloid differentiation primary response 88) qui conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et AP1 (activator protein 1). Cette voie induit la sécrétion de cytokines inflammatoires et des facteurs anti-microbiens. La seconde voie dite Myd88-indépendante, passe par l'adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) et conduit à l'activation des gènes des interférons de type I et de chimiokines (Medzhitov, 1997). Le TLR4 est le seul TLR qui peut activer ces 2 voies de signalisations (Kawai, Akira., 2011).

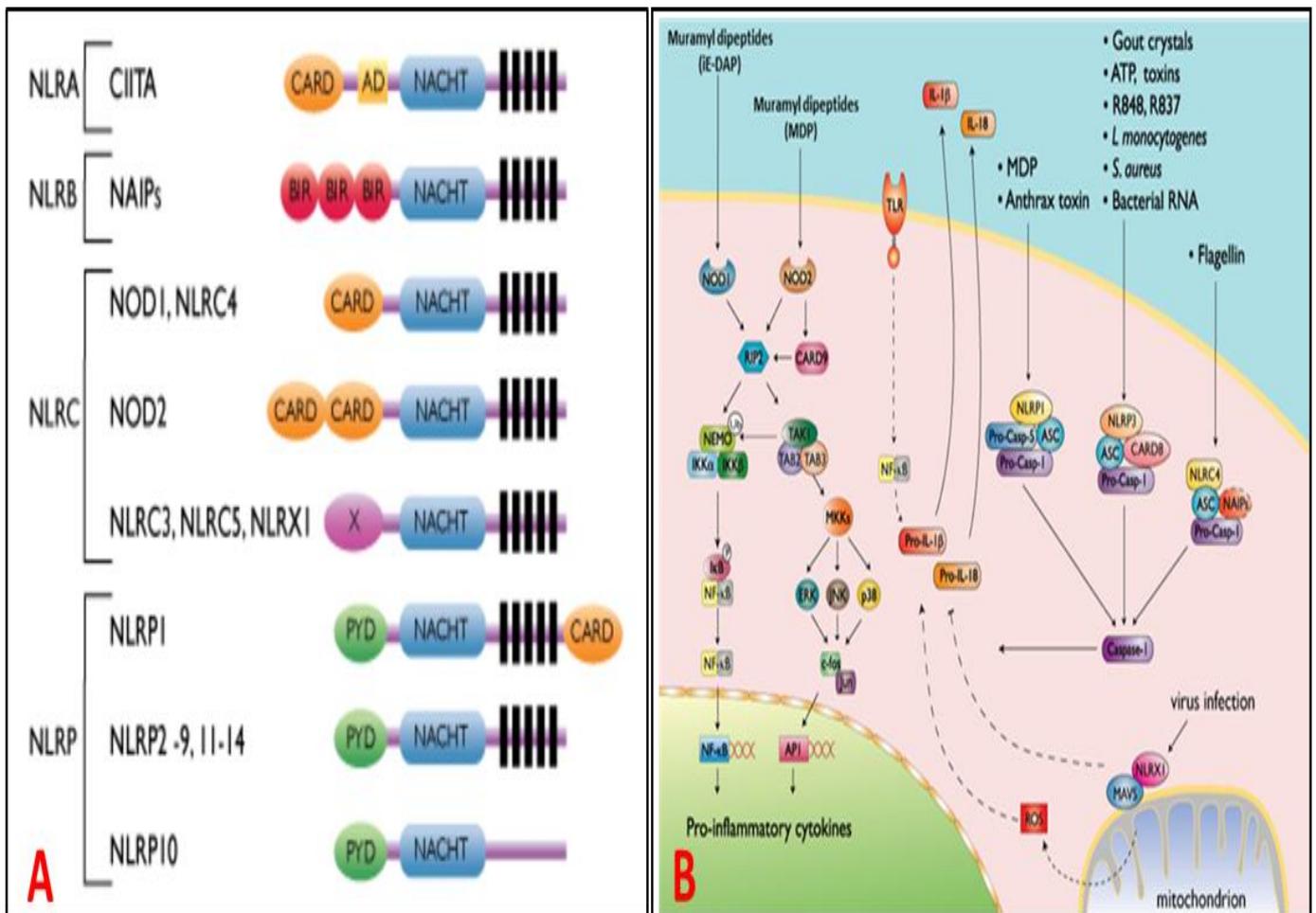


**Figure 3** : Les différentes sous-familles de TLR. **A**, Leur structure. **B**, les différents PAMPS et la signalisation de chacun (d'après Invivogene).

### 1.3.1.2 NLR

Il s'agit d'un groupe de récepteurs solubles intracellulaires, dont 22 ont été identifiés chez l'homme. Structuralement, ces NLR se composent d'un domaine N-terminal impliqué dans la signalisation, un domaine commun d'oligomérisation (NACTH) et un domaine C-terminal de liaison riche en leucine (LRR) (**Fig. 4**).

Sur la base de variabilité de leur domaine N-terminal, qui peut être CARD (Caspase activation and recruitment domains), PYD (pyrindomains), BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) et le AD (acidic transactivation domain) on peut distinguer quatre sous-familles de NLR, les : NLRA, NLRB (NAIP), NLRC (anciennement dénommées NOD, y compris NOD1 et NOD2) et NLRP (ou NALP). Certains NLRs fonctionnent en recrutant et en activant des caspases inflammatoires dans des inflammasomes, d'autres déclenchent l'inflammation par l'intermédiaire de voies alternatives comprenant le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, IRF et MAPK. Le rôle crucial des NLRs dans le développement et la physiologie est démontré par leurs implications claires dans les maladies humaines (Zhong *et al.*, 2013).



**Figure 4** : Les différentes sous-familles de NLR. **A**, Leur structure. **B**, les différents PAMPs et la signalisation de chaque NLR (d'après Invivogen).

### 1.3.1.3 CLR

Comme les autres PRRs, l'expression de ces récepteurs n'est pas limitée aux DC mais ces cellules sont celles qui en expriment le plus grand nombre. Ces CLR partagent un ou plusieurs CRD (carbohydrate-recognition domains), un domaine impliqué dans la reconnaissance des motifs glucidiques des glycoprotéines du soi et des pathogènes (virus, fongiques et bactéries). 17 membres de CLR membranaires ou solubles ont été identifiés (Hammer and Ma, 2013).

De plus selon les motifs de signalisation cytoplasmique CLR et le type des adaptateurs (kinases ou phosphatases), les CLR peuvent être subdivisés en quatre groupes (Sancho *et al.*, 2012) (**Fig. 5**), tel que:

- Des CLR activateurs couplés à Syk et qui signalisent directement via un seul motif à base de tyrosine (hemITAM). Exemples : (Dectin-1, CLEC-2, DNGR-1 and SIGN-R3).
- Des CLR activateurs par l'intermédiaire des adaptateurs Fc de la chaîne  $\gamma$  du récepteur (FcR $\gamma$ ) ou du DAP-12, qui portent des motifs classiques de Syk-recrutement ITAM. Exemples : Dectin-2, hBDCA-2, mDCAR, mDCAR1, Mincle and MDL-1
- Les CLR pourvus d'un motif ITIM qui peut recruter des phosphatases SHP-1 et SHP-2. Exemples : CLEC4a ou CLEC12a.
- Les CLR indépendants d'ITAM-ITIM qui ne signalisent pas par Syk ou par des phosphatases bien qu'ils puissent contenir des motifs à base de tyrosine impliqués dans l'endocytose (fig x). Exemples : DEC-205, DC-SIGN, SIGNR1, Langerin, hMGL, mMgl1, mMgl2, CLEC-1, DCAL-1, MCL, LOX-1 and LSEctin.

Ces multiples CLR modulent les fonctions inflammatoires ou anti-inflammatoires des DC en régulant la transcription des gènes. Ces effets peuvent aboutir à des fonctions endocytaires, phagocytaires ou dans la modulation de la fonction de stimulation des lymphocytes T effecteurs de différents sous-types ou régulateurs.

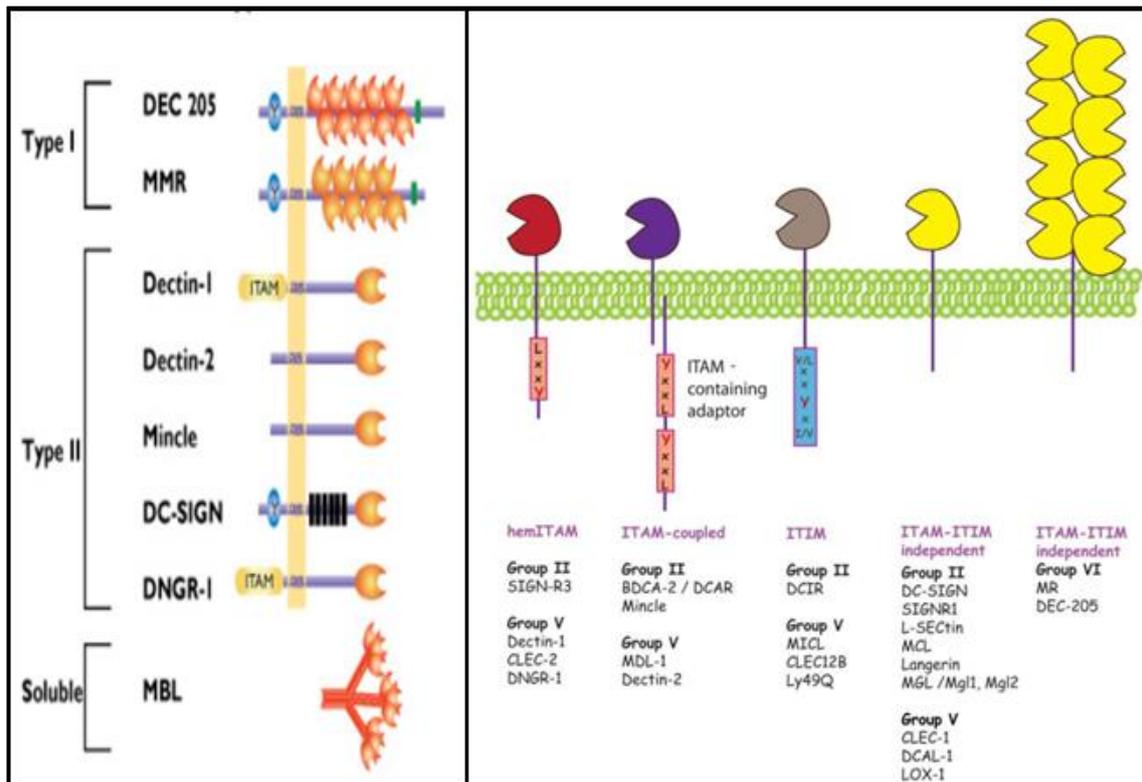


Figure 5. la signalisation de différents types de CLR (d'après Sancho *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Apprêtement antigénique

Une fois les antigènes internalisés, par endocytose ou phagocytose, la capture par les DC diminue. Les antigènes entrent alors dans différents processus d'apprêtement pour être présentés sous forme de complexes CMH-I-peptides ou CMH-II-peptides aux lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement. Les Antigènes d'origine exogène sont capturés dans—par les vésicules endosomales par endocytose ou phagocytose. Une fusion entre ces vésicules et les lysosomes aboutit à la dégradation des Ag en peptides grâce aux protéases lysosomales. Les vésicules contenant les peptides fusionnent avec des vésicules contenant des molécules du CMH-II nouvellement synthétisées et dont le sillon peptidique, constitué par les domaines alpha des chaînes alpha et beta, est occupé par la chaîne invariante (Ii). Cette chaîne est dégradée par les protéases acides laissant seulement en place le peptide CLIP de la chaîne Ii, enfoncé dans le sillon peptidique. Ces molécules rencontrent alors les molécules HLA-DM qui catalysent l'échange entre le peptide CLIP et les peptides exogènes de séquence appropriée. Les complexes peptide-CMH II sont ensuite transportés à la surface de la cellule et présentés aux LT CD4+.

Les peptides dérivés des Ag exogènes peuvent s'associer aux molécules CMH de classe I dans les DC pour permettre l'activation des T CD8 C'est le processus de présentation croisée, qui est essentiellement réalisé par les DC. Certains récepteurs d'endocytose tels que le récepteur au mannose favorise ce type de présentation tandis que d'autres induisent uniquement la présentation sur les CMH-II. Les voies suivies par la protéine exogène et le

lieu de son découpage et de l'association des peptides aux molécules du CMH-I dans les DC restent mal connus (Banchereau *et al.*, 2000). Certains signaux induits par les PRR vont aussi déclencher la maturation et la migration des DC.

### 1.3.3 Migration et maturation

Pour migrer, les DC se détachent de leur support tissulaire en diminuant les molécules d'adhésion, sécrètent des protéases, subissent une réorganisation cytoplasmique pour former de nombreux prolongements et expriment le CCR7 qui leur permettra de se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). CCR7 est un récepteur qui oriente leur mouvement le long d'un gradient de concentration croissante des chimiokines CCL19 et CCL21 (Sallusto and Lanzavecchia, 2000) produites par les cellules stromales des OLS. Les DC pénètrent dans les OLS par la lymphe et se localisent dans les zones T par où recirculent les lymphocytes T naïfs et mémoires.

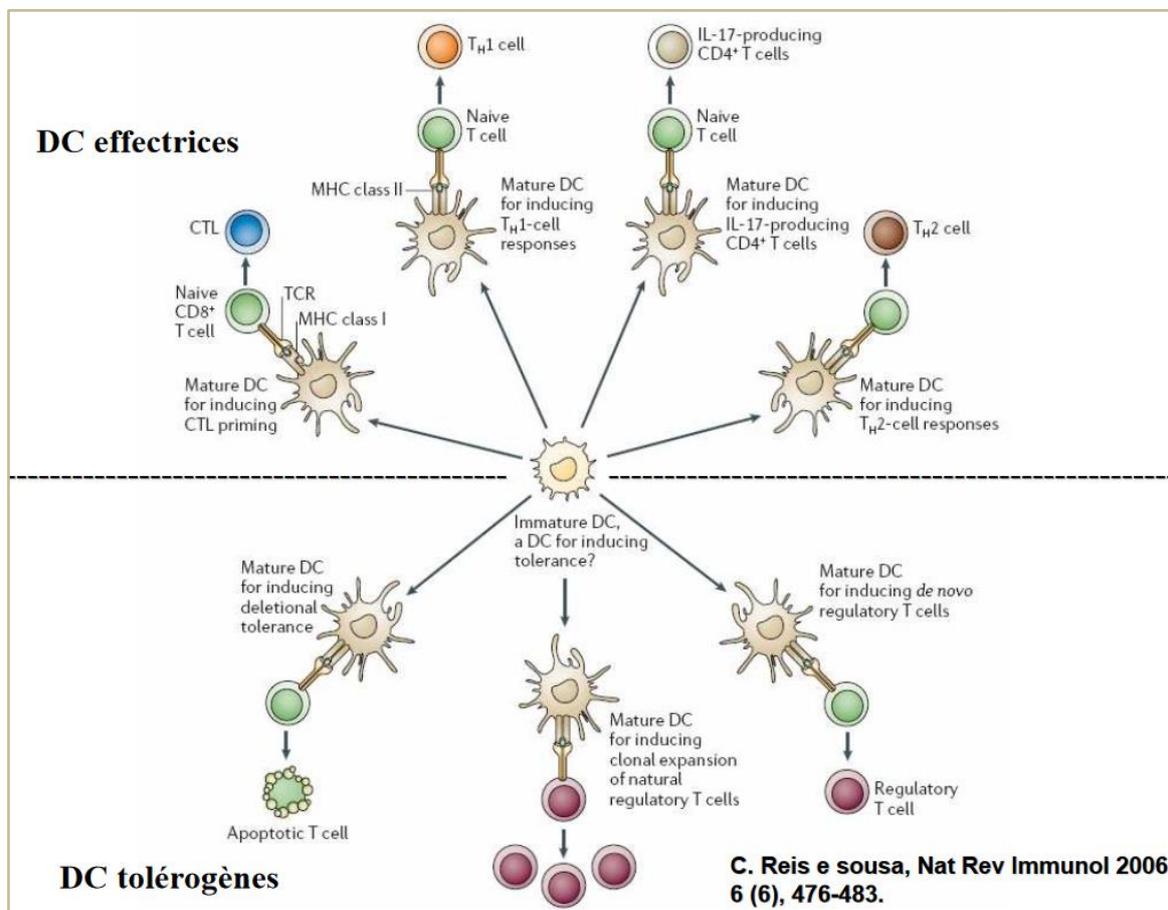
En réponse à différents signaux des pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS), les DC en migration subissent une maturation. Phénotypiquement, elles augmentent leur niveau d'expression des molécules CD40, CD80, CD86 et HLA-DR ainsi que de molécules d'adhérence et acquièrent l'expression de CD83. Ce dernier appartient à la superfamille des immunoglobulines et a été décrit comme une molécule de surface caractéristique des DC matures. Cependant elle est présente à l'état de trace sur les autres cellules présentatrices d'antigènes et les DC immatures, et est exprimée sur LT et LB activés. Sa fonction est mal connue et ses ligands restent encore indéterminés. Des études ont montré que sa présence sur les DC participe à l'activation des cellules T, par contre la forme soluble CD83 a des effets inverses immunomodulateurs (Dudziac *et al.*, 2005). Une activation des sous-unités de NF- $\kappa$ B et des facteurs de réponse aux interférons (IRF) (Meylan and Tschopp, 2006; Salter and Watkins, 2009) est déclenchée. Ces facteurs sont impliqués dans la sécrétion par les DC matures d'un ensemble de cytokines qui modulent la différenciation et les fonctions de cellules T telles que : IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 (Banchereau *et al.*, 2000), IFN de type I et IFN de type II (Fukao *et al.*, 2000). De plus les DC matures diminuent leur expression de l'IL-10R, ce qui les rend insensibles à la fonction immunosuppressive de cette cytokine (Steinbrink *et al.*, 1999; Thurner *et al.*, 1999). Les DC matures modifient également leur niveau d'expression de certaines intégrines et récepteurs de chimiokines (Germain *et al.*, 1994), nécessaires pour accéder aux vaisseaux lymphatiques locaux et pour migrer vers puis dans les organes lymphoïdes secondaires ou elles deviennent entièrement matures, pour rencontrer, stimuler et initier la différenciation des cellules T en cellules effectrices.

Parallèlement à la maturation, les activités endocytiques et phagocytiques des cellules dendritiques commencent à diminuer, pour devenir quasiment indécélables (Sallusto *et al.*, 1995). Les DC matures subissent de plus une redistribution dramatique des molécules du CMH. Les molécules du CMH-II quittent les lysosomes dans des vésicules pour s'accumuler sur la membrane cellulaire où leur densité augmente de façon durable du fait

d'une diminution de leur dégradation par l'ubiquitine ligase MARCH-1 (membrane associated ring-CH-type finger 1) (Shin *et al.*, 2006) ce qui favorise la présentation stable d'un grand nombre de complexes CMH- peptides (Inaba *et al.*, 2000).

### 1.3.4 Activation des lymphocytes T

Les DC matures ont acquis toutes les propriétés pour stimuler efficacement les lymphocytes T naïfs. Elles peuvent délivrer les 3 signaux qui sont nécessaires à cette activation. Le signal 1 correspond au stimulus antigénique fourni au TCR par le complexe CMH- peptide. Le signal 2 est fourni par l'interaction des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 avec le récepteur CD28 présent sur les LT. En l'absence de ce signal les cellules T deviennent anergiques (Falb *et al.*, 1996). Un signal 3 d'immunomodulation est fourni par les facteurs solubles et les cytokines produites par les DC ou d'autres sources du microenvironnement (Cronin and Penninger, 2007). En fonction de l'affinité et de l'avidité de l'interaction TCR/CMH-peptide et des cytokines sécrétées par les DC les CD4 naïfs se différencient en Th1, Th2, Th17 ou Tfh (Constant *et al.*, 1997)(**Fig. 6**). Outre leur capacité à induire une réponse immune effectrice, les DC participent aussi au maintien de la tolérance immunitaire en induisant la différenciation de LT naïfs en Treg. Ces DC sont appelées tolérogènes ou régulatrices (**Fig. 6 et 7**)



**Figure 6.** Orientation de la réponse TCD4<sup>+</sup> par les DC.

## 1.4 Cellules dendritiques tolérogènes

Les DC tolérogènes (tolDC) constituent un lignage d'activation particulière, nécessaire dans des conditions normales ou pathologiques. Ces sont des cellules dendritiques matures ou semi matures qui préviennent les réponses inflammatoires. Elles participent à l'homéostasie périphérique en régulant l'excès d'une RI effectrice et en favorisant la tolérance contre les auto-antigènes et les antigènes fournis par l'alimentation et le microbiote. Les cDC et pDC peuvent acquérir des fonctions tolérogènes. Pour des raisons de synthèse, nous nous restreindrons ici aux cDC, en décrivant leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles et les voies moléculaires qui contrôlent leur développement.

### 1.4.1 Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles

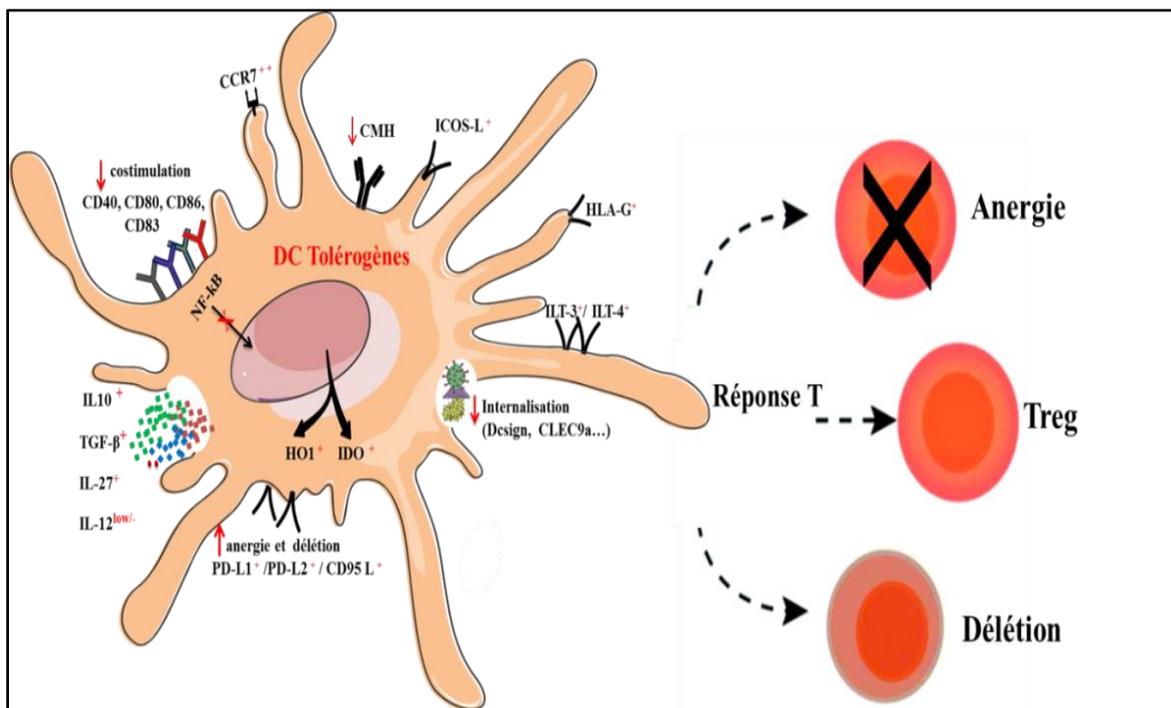
Contrairement aux DC immunogènes, les tolDC présentent une résistance à la maturation, même en présence d'un signal inducteur. Elles capturent et traitent les antigènes mais n'induisent pas une différenciation optimale des lymphocytes T naïfs en T effecteurs. Au lieu de cela, elles favorisent la tolérance en inhibant la réponse T pro-inflammatoire ou en induisant : l'anergie ou la délétion des lymphocytes T ou la différenciation et l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Steimle *et al.*, 2016) (**Fig 7**). Par ailleurs les DC immatures ont elles-mêmes des propriétés tolérogéniques. La stimulation répétée de lymphocytes CD4 naïfs par ces cellules induit des CD4 régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Jonuleit *et al.*, 2000).

Les tolDC ont surtout été étudiées à partir de modèles différenciés *in vitro*. Elles partagent beaucoup de propriétés avec les DC immatures. Leurs caractéristiques majeures illustrées par la **Fig 7** sont :

- Une expression faible des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80, CD86, CD83, accompagné ou non d'un niveau faible de CMH-II (Steinman *et al.*, 2003)
- Une réduction de la sécrétion de cytokines inflammatoires: IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$  et autres et par contre une production accrue de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- $\beta$  (Steinman *et al.*, 2003) et IL-27(Awasthi *et al.*, 2007), qui favorisent la différenciation des Treg.
- Une augmentation de la synthèse de molécules immuno-suppressives comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou l'hème oxygénase-1 (HO-1). L'enzyme IDO hydrolyse le tryptophane, ce qui induit la différenciation de ce LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Brenk *et al.*, 2009), via l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin-like transcript) sur les DC. L'appauvrissement du tryptophane altère également les mécanismes du cycle cellulaire et favorise l'apoptose des lymphocytes T (Fallarino *et al.*, 2002). L'enzyme HO-1 dégrade l'hème et inhibe les réponses pro-inflammatoires induites par les DC en limitant l'expression des molécules de co-stimulation CD83 et des cytokines pro-

inflammatoires de façon dépendante de la production du monoxyde de carbone (CO) (Remy *et al.*, 2009).

- Une expression de récepteurs membranaires, impliqués dans l'induction de la tolérance comme ICOS-L, ILT3, ILT4 (ILT: Immunoglobulin-like transcript) (Vlad *et al.*, 2003) et HLA-G (Ristich *et al.*, 2005)
- Une expression des molécules d'induction de mort cellulaire programmée comme PD-L1 et des molécules qui favorisent la mort par apoptose des LT activés exprimant les récepteurs correspondants comme CD95L ou TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) (Morelli and Thomson., 2007).



**Figure 7.** Exemples de molécules impliquées dans la fonction toléroène des DC.

#### 1.4.2 Modalités d'obtentions *in vitro*

A cause de la rareté des DC *in vivo* et le problème de leur accessibilité dans les tissus, peu d'études ont été réalisées sur les tolDC humaines *ex vivo*. La compréhension de leur fonction et des facteurs inducteurs potentiels de ces cellules a été déduite principalement d'études *in vitro*. Trois grands types d'agents permettent d'induire des tolDC à partir de cellules humaines *in vitro* : des facteurs biologiques comme les cytokines suppressives IL-10 et TGF-β, des agents pharmacologiques et des bactéries commensales. Je résumerai ici les principaux travaux sur ce sujet.

##### 1.4.2.1 Facteurs inducteurs biologiques (fig. 8)

L'IL-10, une Cytokine immunosuppressive produite par différentes populations

immunitaires, joue un rôle essentiel dans la tolérance périphérique en régulant les DC. Les DC différenciées en présence d'IL-10 acquièrent des propriétés tolérogènes représentés par une expression faible de molécules de costimulation (Banchereau *et al.*, 2000), un profil cytokinique anti-inflammatoire IL-10<sup>+</sup> et (IL-12, IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ )<sup>-low</sup> (Murray *et al.*, 2005) et elles expriment les molécules d'inhibition (ILT2 et ILT4, HLAG et HO-1) (Ricchetti *et al.*, 2004). Fonctionnellement, elles sont capables d'inhiber la réponse T, d'induire l'anergie ou des Treg (Steinbrink *et al.*, 1997 ; Zheng *et al.*, 2004)

Ces effets ont été montrés soit lorsque les DC immatures sont exposés à l'IL-10 (Zheng *et al.*, 2004), soit lorsque les DC sont maturées en présence d'IL-10 (Steinbrink *et al.*, 1997). L'effet tolérogène induit par la ligation de IL-10 à son récepteur sur les DC active la voie JAK/STAT, par une phosphorylation sur tyrosine de Tyk2/Jak1, ce qui entraîne l'activation en aval et une homodimérisation de STAT3 qui sera transloqué dans le noyau (Murray, 2006), où il est considéré comme un facteur de transcription essentiel pour la régulation de gènes anti-inflammatoires (Finbloom and Winestock, 1995; Ding *et al.*, 2003).

Quelques gènes sont spécifiquement induits par l'IL-10, y compris SOCS3 (*Suppressor of signaling 3*) et SLAM (*Signaling lymphocytic activation molecule*). SOCS3 régule négativement la production de cytokines inflammatoires (Croker *et al.*, 2003) en particulier l'IL-6. SLAM active SHP1 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*) qui inactive les molécules de co-stimulation par déphosphorylation de leur queue cytoplasmique (Akdis, and Blaser, 2001).

Dans le contexte de la maturation des DC, divers stimuli activent les cascades MAPK et la signalisation dépendante de PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B ou MyD88. Une stimulation simultanée des DC par l'IL-10 inhibe les molécules clés impliquées dans ces voies, ce qui conduit à une abrogation des processus de transcription et de post-traduction et ainsi à un défaut d'expression des gènes associés à la maturation et à l'immunogénicité des DCs (Moore *et al.*, 2001). L'un des mécanismes d'action de l'IL-10 consiste à inhiber la voie NF- $\kappa$ B en induisant la formation d'homodimères de p50 capables d'inhiber l'activité de transcription (Driessler *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que l'effet inhibiteur de l'IL-10 sur la voie NF- $\kappa$ B résulte aussi d'une inhibition de la translocation nucléaire de la sous unité p65 (Bhattacharyya *et al.*, 2004).

**TGF- $\beta$**  est une cytokine potentiellement immunosuppressive produite par les Treg et d'autres cellules. Elle montre des fonctions pléiotropes *in vitro*, sur certains types de DC. Sa ligation à son récepteur conduit à une hétérodimerisation de Smad2 et Smad4, facteurs qui peuvent réguler l'expression de certains gènes. Les conséquences en aval semblent similaires à celles de l'IL-10 et comprennent l'inhibition de la maturation par blocage de la signalisation dépendante de NF- $\kappa$ B (Karlsson *et al.*, 2005 ; Fainaru, *et al.*, 2007) .

Plusieurs autres facteurs, tels que les œstrogènes, (le peptide intestinal vaso-actif (VIP), la protéine immunoglobuline de liaison (BiP), la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), le GM-CSF, la prostaglandine (PG) E2 et le TNF $\alpha$ , peuvent également favoriser une aptitude des DC à induire de Treg (Liu *et al.*, 2015 ; Delgado *et al.*, 2006).

#### 1.4.2.2 Agents inducteurs pharmacologiques

Les études sur la modulation des DC par des agents pharmacologiques sont majeures. La dexaméthasone, la vitamine D3 et la rapamycine, conjointement avec le GM-CSF et l'IL-4, sont les réactifs les plus utilisés pendant la différenciation ex-vivo des monocytes en ToIDC. Ces agents sont capables de déclencher des signalisations par différents facteurs de transcription (par exemple, GILZ, mTOR) qui activent l'expression de la protéine associée aux ToIDC (Naranjo-Gomez *et al.*, 2011).

La **Dexamethasone (DEX)** est un glucocorticoïde immunosuppresseur largement utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes et le rejet de greffe. Elle est impliquée dans l'induction d'activité tolérogène des DC. Un traitement des DC par la DEX (DEXC-DC), pendant ou après la différenciation, inhibe différents aspects de leur maturation, particulièrement en réponse aux agonistes de TLR4 (LPS) (Piemonti *et al.*, 1999). Ces DEXC-DC maintiennent l'expression du CD14 et de CD16, diminuent l'expression des molécules impliqués dans la costimulation et la migration. En revanche, les molécules impliquées dans la capture d'Ag (récepteur de mannose, CD32) dans l'adhésion cellulaire (CD11 / CD18, CD54) et un certain nombre de gènes de chimiokines anti inflammatoires sont régulées à la hausse. Ces cellules montrent une sécrétion faible des cytokines pro-inflammatoire IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL12 et une production importante d'IL-10 (Xia *et al.*, 2005). Fonctionnellement, les cellules T stimulées par ces DC sont hypo-répondeuses. La réponse T peut être restauré par l'addition du surnagent de DC matures ou par application d'un signal d'activation (anti-CD28) ou par blocage d'IL-10 (Woltman *et al.*, 2006). L'interaction de DEX avec son récepteur touche certains facteurs impliqués dans la tolérogénicité de DC, en particulier GILZ. Ce facteurs de transcription (GILZ) favorise la différenciation de Treg et capable d'inhiber les réponses CD4 et CD8 (Hamdi *et al.*, 2007)

La **Rapamycine (RAPA) (ou Sirolimus)** est une molécule isolée en 1975 à partir d'une bactérie filamenteuse, caractérisée par des effets immunosuppresseurs et anti-prolifératifs (Shegal, 1998). Elle prévient le rejet de greffe chez la souris (Monti *et al.*, 2003 ; Altman and Plataniias, 2008). Les DC générées en présence de RAPA pendant la différenciation ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de toIDC (Taner *et al.*, 2005). Son effet tolérogène sur les DC peut être induit par l'inhibition de la signalisation en aval de TLR4 et du GM-CSF via le blocage de mTOR (mammalian target of rapamycin) . L'exposition des DC à la rapamycine *in vivo*, diminue la production d'IL-12 et de TNF $\alpha$  en réponse à IL-4 ou en réponse à une stimulation de CD40 et peut induire la prolifération de Treg Foxp3 (Hackstein *et al.*, 2003; Turnquist *et al.*, 2007).

L'**Aspirine** est un anti-inflammatoire non stéroïdien. Elle inhibe la maturation et les fonctions des cellules dendritiques humaines de façon indépendante de la cyclo-oxygénase (Matasic *et al.*, 2000). Le traitement par l'aspirine des DC Humaines pendant leur différenciation réduit l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86), augmente l'expression d'ILT3 et PDL-1, et réduit la sécrétion d'IL-12 en bloquant NF-kB. Les DC traitées par l'aspirine ont une diminution de leur capacité d'allostimulation (Matasic *et al.*, 2000; Buckland *et al.* 2006).

La **Vitamine D3** (vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub> D3) est une hormone stéroïde. Elle favorise un phénotype tolérogène des DC humaines différenciées en sa présence (**cf. tableau 1**) (Penna *et al.*, 2007). Cet effet est médié par la voie PI3K/Akt/mTOR. Les tolDC obtenues favorisent la différenciation de lymphocytes T suppresseurs/régulateurs, qui sont capables de prévenir le rejet de greffe et d'inhiber le développement de maladies auto-immunes (Ferreira *et al.*, 2014; 2015).

	<b>Vitamine D3</b>
<b>Phénotypes</b>	
<b>Marqueurs de co-stimulation et de maturation</b>	Diminués
<b>Récepteurs d'endocytose</b> CCR7	Augmenté
<b>Molécules d'inhibition</b>	
ILT3	Augmentée
ILT4 et PD-L1	Non modifiable
<hr/>	
<b>Fonctions</b>	
<b>Cytokines</b>	
IL-1/IL-6/IL-12/IL23	Diminuées
IL-10	Augmentée
<b>Chemokines</b>	
CCL2- CCL17- CCL20- CXCL10	Diminuées
CCL18- CCL22	Augmentées
<b>Signalisations</b>	
Translocation nucléaire de NF-kBp65	Diminuée
Expression d'IRF-4	Diminuée
<b>Réponse de cellule T auto ou allo</b>	Diminuée

**Tableau 1** : Caractéristiques des DC tolérogènes induites *in vitro* par la vitamine D3

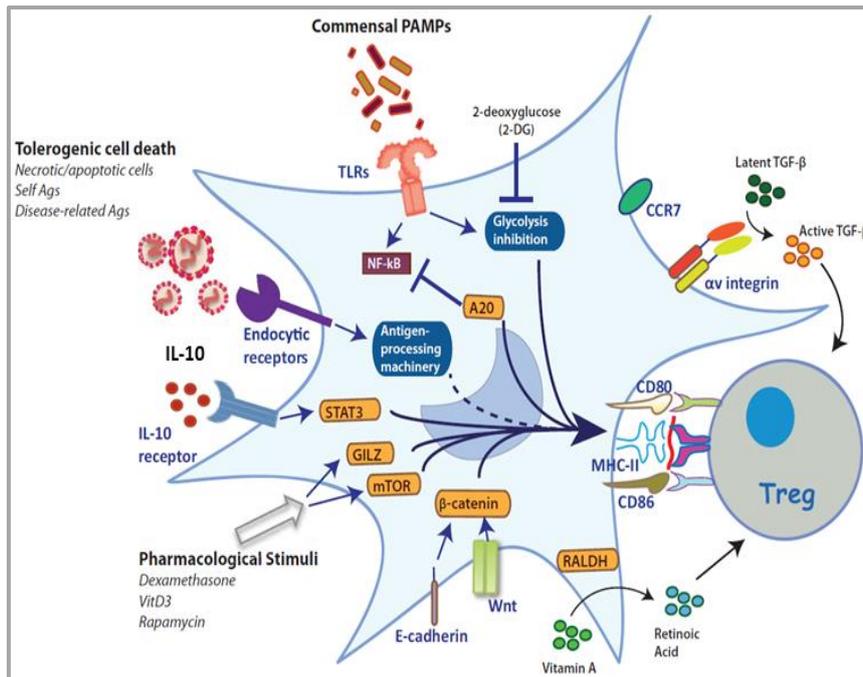
Beaucoup d'autres agents ont été décrits comme capables d'induire des TolDC tels que : la cyclosporine (Woltman *et al.*, 2000; Tajima *et al.*, 2003) et l'acide rétinoïque. L'effet de l'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A, intervient dans des conditions physiologiques, l'expression de l'enzyme de synthèse (RALDH2) par les DC permet sa synthèse. L'acide rétinoïque et le TGF- $\beta$  contribuent à l'induction de DC tolérogènes *in vivo* dans l'intestin grêle (Mucida D *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.3 Bactéries commensales

Le microbiote digestif contribue au développement de la muqueuse colique elle-même et de son système immunitaire ainsi qu'à son homéostasie. Cependant, les mécanismes impliqués restent en grande partie inconnus. Pour aborder cette question de nombreux groupes ont étudié *in vitro* l'influence de bactéries commensales, sélectionnées le plus souvent comme des probiotiques potentiels, sur la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes en culture. La plupart de ces études rapportent que ces bactéries induisent des propriétés de DC tolérogènes lorsqu'elles sont ajoutées aux DC en même temps qu'un agent de maturation. Ainsi, ***L. reuteri* 5289** une souche de *lactobacilli* a montré une capacité à réduire la sécrétion d'IL-12 et à augmenter celle d'IL-10, via une phosphorylation prolongée signalisation de la voie MAP kinase ERK (Amar *et al.*, 2015). De façon similaire une autre étude récente a comparé différentes souches de *Faecalibacterium prausnitzii* (*Fprau*) et quelques autres bactéries commensales humaines du groupe des Clostridi, ainsi qu'un lactobacille, pour leur capacité à induire différentes cytokines pro- et anti- inflammatoires par des DC humaines et murines et pour leur capacité à moduler la colite inflammatoire chez la souris. Les auteurs rapportent une capacité supérieure de la souche **A2-165** de, *F prausnitzii*, comparée aux autres bactéries, à stimuler la sécrétion d'IL-10 mais pas d'IL12 en réponse au LPS par les DC *in vitro* et à réduire l'inflammation chez la souris dans un modèle de colite chronique induite par le TNBS (Rossi *et al.*, 2015). Ces données confortent d'autres évidences indirectes des propriétés anti-inflammatoires de la souche A2-165 de *F prau* mais n'établissent pas la capacité de cette bactérie à induire des DC tolérogènes.

De plus une étude effectuée par Li *et al.*, en 2014 montrent un membre important pour maintenir l'homéostasie intestinale qui est ***Clostridium Leptum*** (CL). Les DC générées *in vitro* en présence de cette bactérie ont des propriétés tolérogènes : expression diminuée des marqueurs de costimulation et profil cytokinique anti-inflammatoire représenté par la sécrétion d'IL-10<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup> IL-12p40<sup>+</sup> mais pas d'IL-6. Ces DC favorisent la différenciation de Treg et atténuent l'activation des populations T effectrices (Li *et al.*, 2014).

Enfin d'autres études ont montré que l'interaction des DC immatures via DC-SIGN avec certains *Lactobacillus* favorise l'induction de lymphocytes T régulateurs producteurs d'IL-10 (Smits *et al.*, 2005). La protéine SLpA (surface (S) layer A protein) de *L. acidophilus* a été identifiée comme un ligand de ce CLR (Konstantinov *et al.*, 2008).



**Figure 8.** Facteurs et mécanismes impliqués dans l'induction de ToIDC (D'après Osorio *et al.*, 2015).

## 2. Lymphocytes T régulateurs

### 2.1 Généralités

A la différence des CD8, les lymphocytes T CD4 représentent un ensemble de populations lymphocytaires de fonctions très variées auxiliaires et régulatrices. Les lymphocytes auxiliaires ou helper ont eux-mêmes une grande diversité de fonctions. En 1986, Mosmann *et al.*, ont mis en évidence deux de ces sous-populations effectrices et leurs fonctions majeures respectives les Th1 et les Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Plus récemment ont été identifiées les sous-populations Th17 (Langrish *et al.*, 2005 ; Weaver *et al.*, 2006), Th9 (Veldhoen *et al.*, 2008) et Tfh (Hale and Ahmed, 2015).

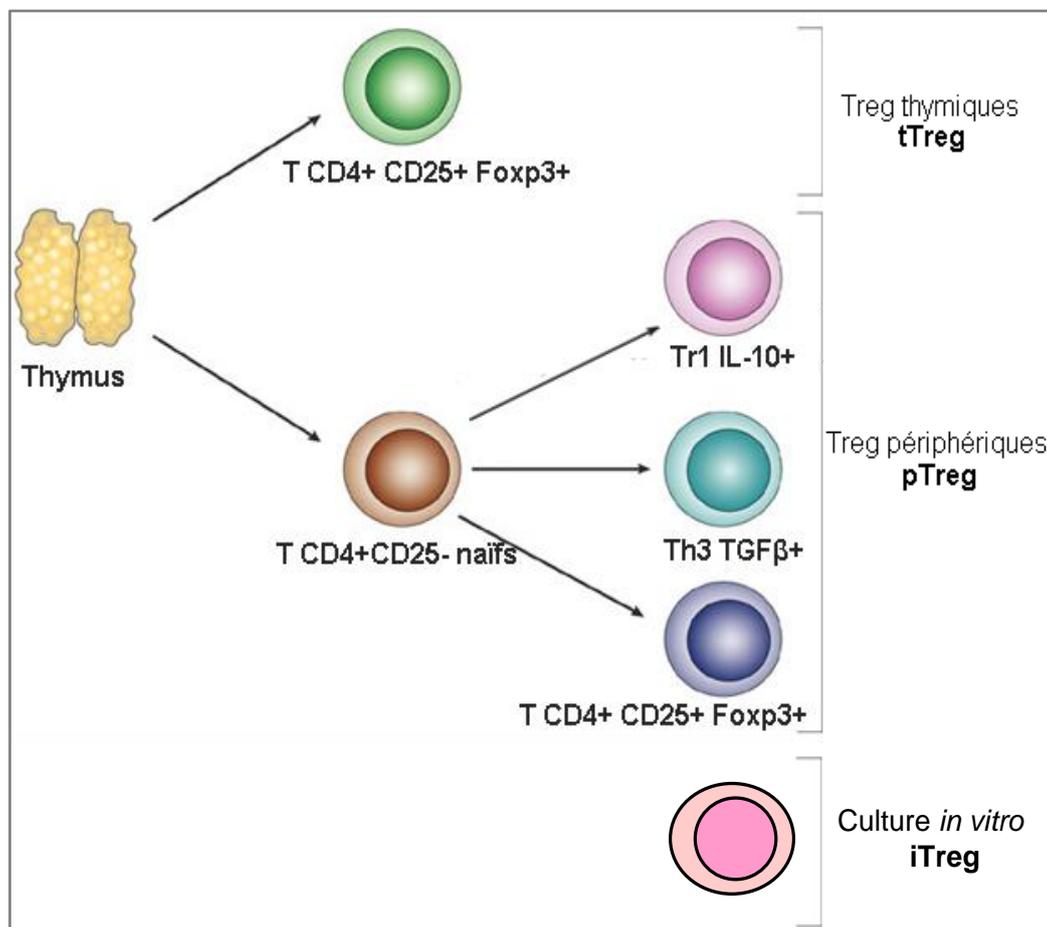
C'est également au cours des années 80 que les premières sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs ont été identifiées, Ce sont de lymphocytes spécifiquement dédiés au contrôle des réponses immunitaires excessives ou indésirables, impliquées dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, par l'inhibition des réponses T effectrices et de la présentation des antigènes par les DC. Cette découverte a élargi le concept du rôle majeur des DC et a ouvert de nouveaux défis pour l'immuno-modulation dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques.

L'existence de lymphocytes T suppresseurs a été longtemps suspectée avant d'être démontrée (Gershon *et al.*, 1974). Une fois identifiées ces cellules ont été rebaptisées lymphocytes régulateurs. La preuve de leur existence a été apportée par les travaux de Sakaguchi qui avaient pour but de préciser le rôle du thymus dans le système immunitaire, plus particulièrement de comprendre les mécanismes qui pourraient être impliqués dans le maintien de l'homéostasie et la tolérance centrale et périphérique. Un développement de maladies auto-immunes (thyroïdite, diabète de type1...) a été observé chez des souris (adultes et nouveau-nées) thymectomisées dans les 3 jours suivant la naissance ou thymectomisées plus tardivement puis irradiées à doses sub-létales. Ces désordres pouvant être réglés par la greffe d'un thymus syngénique ou par le transfert des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> d'animaux normaux (Sakaguchi *et al.*, 1982) (Greiner *et al.*, 1987), ces données ont établi la présence d'une population de lymphocytes T CD4 d'origine thymique, douée de propriétés immuno-régulatrices. De nombreux efforts de recherche ont alors été réalisés pour mieux identifier ces cellules et pour les caractériser.

Suite à cette découverte majeure, de nombreuses autres sous-populations de Treg de phénotypes et de fonctions distinctes ont été découvertes. Les trois plus étudiées sont les Treg Foxp3 induits en périphérie, en particulier dans l'intestin, et les sous-populations n'exprimant pas le Foxp3 : Tr1 et Th3, dont le lieu d'origine n'est pas clairement établi (**Fig. 9**).

Mon équipe d'accueil a décrit en 2014 une quatrième population de pTreg qualifiée

de Double Positive CD4CD8 $\alpha\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) et montré que cette population est induite dans le colon par une bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii*. Toutes ces populations de Treg expriment le CD4. Elles seront le sujet de cette introduction. Il faut préciser que des lymphocytes T régulateurs CD8ab existent aussi, y compris des cellules exprimant Foxp3. Les Treg CD8 sont moins bien caractérisées que les CD4 et j'ai donc choisi de ne pas en parler. Pour homogénéiser la désignation des sous-populations de Treg, une nomenclature a été proposée (Abbas *et al.*, 2013). Elle différencie les lymphocytes T régulateurs d'origine thymique (tTreg Foxp3<sup>+</sup>) des Treg induits dans les tissus périphériques (pTreg) : pTreg Foxp3<sup>+</sup>, Tr1, Th3 et DP8 $\alpha$  et des Treg induits *in vitro*, communément appelés iTregs (Fehervari and Sakaguchi, 2004). Je décrirai dans les paragraphes suivants les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles majeures de ces grandes sous-populations de Treg CD4 et leur rôle physiologique lorsque celui-ci est connu.



**Figure 9.** Différentes sous populations des lymphocytes T régulateurs.

## 2.2 LT régulateurs d'origine thymique (tTreg)

### 2.2.1 Découverte et distribution

La caractérisation de tTreg naturels par l'équipe de Sakaguchi remonte à l'année 1995. Découvertes chez la souris par la stratégie de thymectomie et lymphodéplétion, ces cellules correspondent à une population CD4<sup>+</sup> caractérisée par l'expression constitutive de CD25, produites dans le thymus ou ils deviennent matures et exprimant un répertoire de TCR de haute affinité pour les complexes CMH-peptides du soi (Sakaguchi *et al.*, 1995).

Chez l'homme ces lymphocytes sont générés spontanément dans le thymus au cours des premiers stades de développement fœtal (semaine de gestation 14) (Cupedo *et al.*, 2005) et échappent à la délétion thymique par la reconnaissance de peptides du soi avec une affinité importante (Lim *et al.*, 2006). Chez la souris, les tTreg sortent du thymus à partir du 4<sup>ème</sup> ou du 5<sup>ème</sup> jour post-partum. Ils circulent ensuite par le sang et la lymphe et sont présents dans les OLS et les tissus en particulier l'intestin, en représentant 5 à 10% des cellules T (Asano *et al.*, 1996).

### 2.2.2 Développement

Au cours de la différenciation des lymphocytes T qui est un processus intrathymique réalisé tout au long de la vie d'un individu, les précurseurs de cellules T qui présentent un TCR de forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi sont généralement supprimés par délétion clonale. Cependant un certain nombre de thymocytes exprimant un TCR d'affinité intermédiaire pour ces complexes semble échapper à ce sort et se réorienter dans le lignage régulateur Treg Foxp3<sup>+</sup> (Stritesky *et al.*, 2012).

L'induction de Foxp3 est l'étape initiale de cette différenciation. L'expression de ce facteur de transcription est essentielle pour la spécification du lignage. Il est impliqué dans l'activation et l'inhibition de plusieurs gènes aboutissant à des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles définissant les Treg.

**Rôle du TCR et de la costimulation.** Les tTreg se différencient sur la base d'une affinité suffisante pour les Ag du soi. Les signaux dépendants du TCR (fonction de la durée et de l'affinité/avidité de son interaction avec le ligand) sont des déterminants centraux dans cette orientation (Li and Rudensky, 2016). L'augmentation relative des marqueurs d'activation (CTLA4, CD25,...) est le premier signe suggérant que les cellules tTreg sont exposées à des signaux TCR. La co-stimulation CD28 joue un rôle important dans la différenciation de tTreg. Elle contribue à l'induction de Foxp3. Une diminution importante de la fréquence des Treg en périphérie est observée chez la souris déficientes à la fois en CD28 ou en CD80/CD86-sur les CPA (Salomon *et al.*, 2000). De plus, le domaine cytoplasmique liant la kinase Lck de CD28 est important pour l'expression de Foxp3 (Tai *et al.*, 2005). D'autres facteurs en aval de la

signalisation TCR/CD28 sont également nécessaires dans cette différenciation, y compris la signalisation constitutive de NF $\kappa$ B, AP-1, NFAT et d'autres... (Long *et al.*, 2009 ; Polansky *et al.*, 2008).

**Rôle de cytokines.** Outre le signal TCR, les cytokines intra-thymiques qui appartiennent à la famille des cytokines « gamma c-dépendantes » comme l'IL-2, l'IL-21, et à un moindre niveau l'IL-5 et l'IL-7, sont également nécessaires à la spécification et à la survie du lignage Treg thymique. Un défaut d'IL-2 entraîne une diminution de moitié de la proportion des cellules T Foxp3<sup>+</sup>, alors que la perte d'IL-15 ou d'IL-7 seul ne perturbe pas leur nombre. Cependant, un manque combiné de ces 3 cytokines aboutit à des souris dépourvues totalement des thymocytes Foxp3 dans le thymus et de Treg Foxp3<sup>+</sup> en périphérie (Fontenot *et al.*, 2005 ; Vang *et al.*, 2008)

D'un point de vue mécanistique, des travaux ont proposé qu'une signalisation fonctionnelle du TCR conduit à l'expression importante de CD25 et à une augmentation de la sensibilité des cellules aux signaux IL-2 qui facilitent l'induction de Foxp3 grâce à l'activation de STAT5, suggérant qu'elle peut changer les caractéristiques de la chromatine au locus Foxp3. (Burchill *et al.*, 2008). De plus, l'activation de STAT5 peut entraîner une expansion des Treg et maintenir le nombre de ces cellules en absence d'IL-2 (Burchill *et al.*, 2003)

D'autres études ont montré le rôle d'une autre cytokine, le TGF- $\beta$  dans le développement des Treg (Chen *et al.*, 2003) en particulier dans le maintien de l'expression de Foxp3 (Li *et al.*, 2006). Les souris déficientes en TGF- $\beta$  ou TGF- $\beta$ -R développent un syndrome lymphoprolifératif similaire aux souris déficientes en Foxp3 (Shull *et al.*, 1992 ; Marie *et al.*, 2006). De plus, le blocage de la signalisation conduit à une sensibilité accrue à l'apoptose qui a également été observée lorsque des thymocytes provenant de souris déficientes en TGF- $\beta$ R ont été stimulés *in vitro* avec un anti-CD3 (Ouyang W, *et al.*, 2010).

Récemment en étudiant le rôle de régions régulatrices du locus Foxp3, en particulier les 3 régions non codantes nommées (Conserved Noncoding Dna Sequences (CNS), les chercheurs ont réussi à distinguer les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des tTreg et des pTreg (**Fig. 10**). La différenciation de tTreg est initiée par une forte interaction du TCR de certains thymocytes avec les Ag du soi qui active NF $\kappa$ B et déclenche la translocation nucléaire du facteur de transcription REL. Chez la souris REL et d'autres facteurs de transcription se lient alors à la séquence CNS3. Les souris CNS3<sup>-/-</sup> sont caractérisées par une diminution importantes des tTreg, tandis que les pTreg sont intacts. La stabilisation des tTreg requière une déméthylation de la région CNS2 dépendante de STAT5, induit en aval de l'activation du récepteur à l'IL-2 par la signalisation d'IL-2. Cette déméthylation permet la liaison au CNS2 de Foxp3 et RUNX1 peuvent alors la fixation des facteurs de transcription RUNX1 et Foxp3 ce qui stabilise l'expression de Foxp3 par le lymphocyte (Tanoue *et al.*, 2016 et **Fig. 10**).

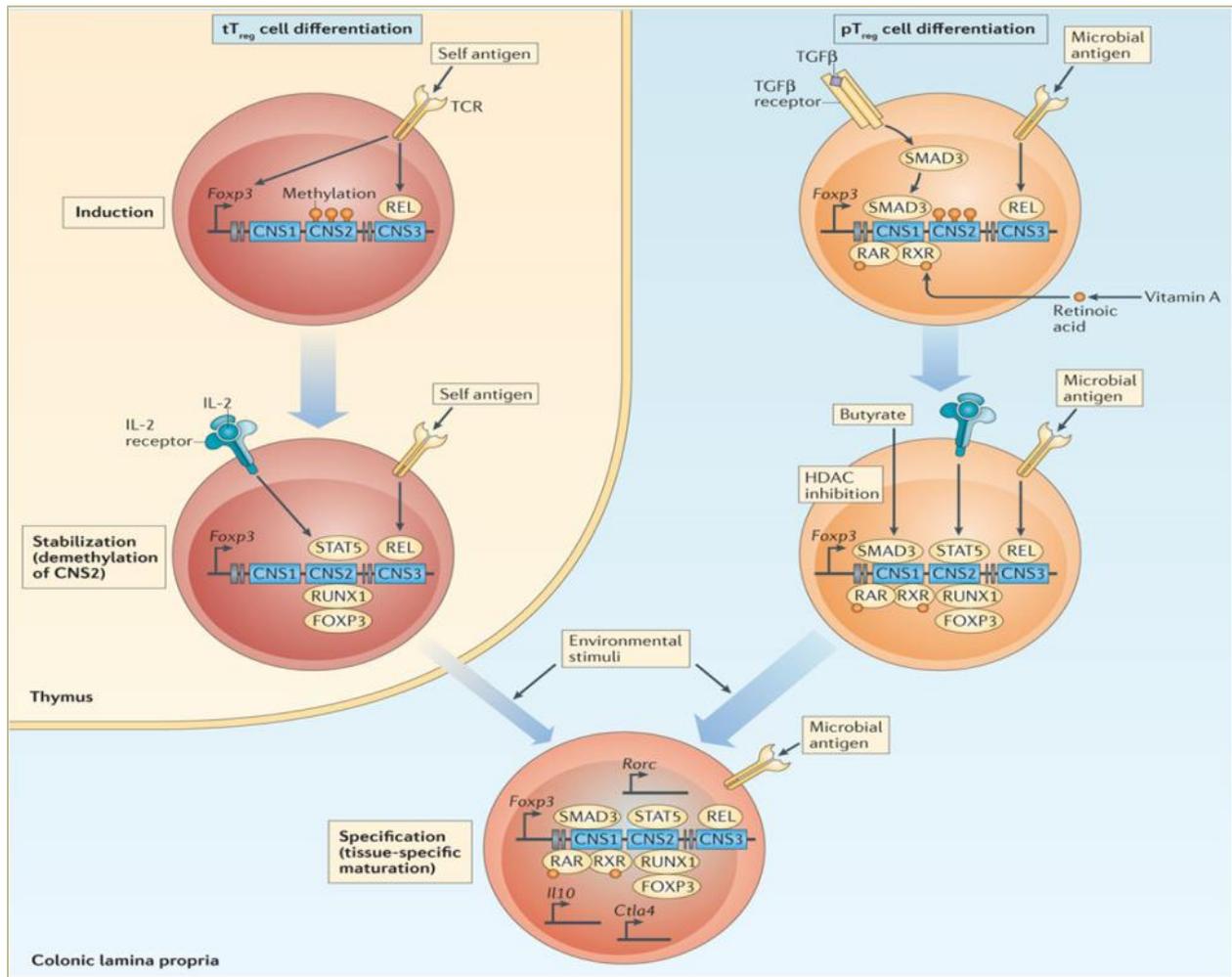


Figure 10. Modalité d'induction des pTreg et des tTreg (Tanoue *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Marqueurs

Le premier marqueur des tTreg identifié est le **CD25**. Il correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. L'IL-2 est un facteur de croissance important pour l'expansion clonale de lymphocytes T. Son importance pour les Treg a été démontrée par le développement chez les souris déficientes en IL-2 ou CD25 de maladies auto-immunes, associées à des réponses T excessives, une lymphoprolifération massive, lympho-adénopathie et splénomégalie et mort par excès d'inflammation en 6-8 semaines (Willerford *et al.*, 1995). Ceci a suggéré que les cellules  $CD4^+ CD25^+$  régule la réponse inflammatoire et que l'IL-2 est indispensable au maintien de ces cellules. L'expression stable de CD25 permet de différencier la population de lymphocytes tTreg (mais aussi pTreg) des autres populations T. Mais CD25 reste un marqueur non spécifique, puisqu'il est aussi exprimé par les T effecteurs activés mais à un niveau moins important que par les lymphocytes T régulateurs (Kuniyasu *et al.*, 2000).

La recherche d'un marqueur unique et pertinent a donc été poursuivie et a montré que les tTreg expriment de façon stable d'autres molécules de surface dont la plupart sont aussi des marqueurs d'activation des lymphocytes T : tels que CTLA-4 (Vignali *et al.*, 2008), LAG-3 (Huang *et al.*, 2004), ICOS (Burmeister, *et al.*, 2008), CD39 (Borsellino *et al.*, 2007), GITR (McHugh *et al.*, 2002), certains TLR (Caramalho *et al.*, 2003). Différentes molécules accessoires d'adhésion, des récepteurs de homing et de chimiokines ont été également identifiés, tels que le CD45RB, CD44, CD54, CD11a/CD18, CD62L. Les récepteurs de homing et de chimiokines permettent le recrutement des tTreg vers les sites d'inflammation et les lésions pour contrôler les réponses immunitaires (Hori *et al.*, 2003 ; Iellem, 2001). Cependant, des études ont montré que l'utilisation de ces marqueurs pour purifier les lymphocytes Treg est inadaptée puisqu'elle n'exclue pas les T conventionnels activés.

**Forkhead box transcription factor (Foxp3)** est le facteur de transcription nécessaire à la différenciation des thymocytes en tTreg et au maintien de leurs capacités immunosuppressives (Sakaguchi *et al.*, 2008; Fontenot *et al.*, 2003). Son expression dans d'autres populations est presque indétectable chez la souris (cellules B,  $T\gamma\delta$ , NK, CPA) (Brunkow *et al.*, 2001 ; Fontenot *et al.*, 2005 ; Wan *et al.*, 2005), mais certaines cellules T CD8<sup>+</sup> l'expriment, de même chez l'homme que tous les T effecteurs dans les 24h ou 48h de leur activation. Foxp3 fonctionne en régulant un ensemble de gènes requis pour l'activité suppressive des Treg, pour leur prolifération et leur métabolisme, en réprimant des voies alternatives de différenciation (Brunkow, 2001). La déplétion de Foxp3 dans les cellules effectrices ne change pas leurs caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques (Hsieh *et al.*, 2006). Afin d'optimiser l'identification de ces Treg chez l'homme, d'autres marqueurs doivent être combinés au CD25 et/ou Foxp3. L'un des plus utilisés est un niveau d'expression faible du CD127 (Liu *et al.*, 2006).

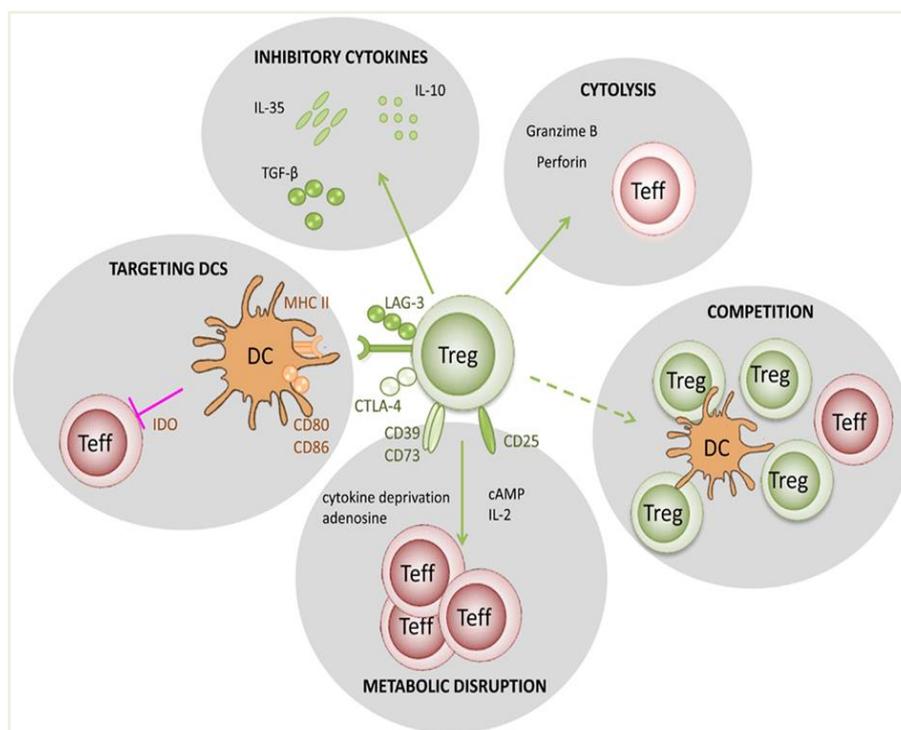
**CD127** est la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7. Son expression dans les lymphocytes T est inversement corrélée à celle de Foxp3 (Seddiki *et al.*, 2006). De ce fait la plupart des CD4 conventionnels l'expriment mais perdent cette expression après activation (Mazzucchelli *et al.*, 2007). La perte de CD127 est aussi une caractéristique de Tfh, qui fournit une aide pour les cellules B, dans les amygdales humaines. Donc une faible expression de CD127 seule ne permet pas de discriminer avec précision les cellules Treg des T conventionnels activés (Aerts *et al.*, 2008). Finalement, il existe aussi chez la souris une sous population de CD4 non régulatrice, qui est Foxp3<sup>low</sup>, CD127<sup>low-inter</sup> et qui ne possèdent pas d'effet suppresseur *in vitro*, et sécrètent les cytokines inflammatoires IL-2, IFN- $\gamma$  et IL-17 (Miyara *et al.*, 2007). La sélection stricte des Treg sur la base de leur phénotype reste donc globalement délicate chez l'homme.

Des différences entre les tTreg et les pTreg ont été identifiées par l'étude de leur signature transcriptionnelle. Deux gènes sont plus exprimés par les tTreg: Hélios et neuropillin1 (Sugimoto *et al.*, 2006)

**Helios** (*Ikzf2*) est un facteur de transcription de la famille d'Ikaros. Il est souvent considéré comme l'un des gènes appartenant à la signature de cellules Treg d'origine thymique. Helios est exprimé par la majorité des cellules T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> du sang périphérique humain, par les tTreg thymiques et spléniques des souris saines, mais pas par les cellules iTreg (Thornton *et al.*, 2010). Contrairement à Foxp3 qui est nécessaire aux fonctions des Treg, helios n'affecte pas la capacité suppressive des tTreg puisque *in vitro*, les Treg déficients en helios peuvent encore supprimer la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Une étude ultérieure conclut cependant que l'expression d' helios ne peut pas être utilisée pour distinguer tTreg et iTreg, dans la mesure où l'expression de ce marqueur est induite transitoirement par l'activation, quelle que soit la population de cellules T analysée (Akimova *et al.*, 2011). Il en va de même pour Neuropilin 1, protéine de surface ayant des implications dans les fonctions des Treg (Sarris *et al.*, 2008).

### 2.2.4 Activités suppressives des LTreg

La manipulation de la fonction Treg est un objectif important de l'immunothérapie, les molécules qui médient leur activité suppressive sont en cours d'études. Cependant un ensemble de mécanismes d'immunosuppression potentiels ont été identifiés *in vitro*, qui se traduit par des signaux d'atténuation et de suppression des réponses effectrices (inhibition de prolifération, apoptose, limitation de présentation antigénique et maintien d'un microenvironnement suppresseur). Nous pouvons les regrouper en quatre «modes d'actions» de base : **1)** Les perturbations métaboliques. **2)** La sécrétion des cytokines immunosuppressives. **3)** La cytolysse. **4)** L'action sur les cellules dendritiques en modulant leur maturation et/ ou leur fonction (**Fig. 11**).



**Figure 11.** Principaux mécanismes de suppression associés aux Treg.

#### 2.2.4.1 Perturbations métaboliques

C'est par exemple : la privation du facteur de survie IL-2. Les lymphocytes T régulateurs ne sont pas capables de synthétiser l'IL-2 mais expriment constitutivement son récepteur un haut niveau. Par contre, les lymphocytes T conventionnels lors de leur activation sécrètent de l'IL-2 et expriment son récepteur ce qui leur permet de proliférer. La consommation d'IL-2 par les Treg qui est importante pour leur survie et fonction, dépend donc de l'IL-2 sécrété par les Tconv (Almeida, 2002). Lié à leur forte expression du CD25 les Treg peuvent épuiser cette cytokine dans leur microenvironnement, et ainsi inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Ces lymphocytes vont alors mourir par expression de facteurs pro-apoptotiques Bim (Pandiyan *et al.*, 2007)

Un autre exemple d'un tel mécanisme dépend de **l'expression membranaire des ectoenzymes** CD39 et CD73 par les Treg. Ces deux ectoenzymes hautement exprimées sur la membrane de certains Treg participent à la suppression des réponses à médiation cellulaire en catalysant la transformation de l'ATP en adénosine. L'enzyme CD39 transforme l'ATP en AMP et CD73 convertit l'AMP en adénosine. La fixation de l'adénosine sur son récepteur A2A inhibe directement la prolifération des cellules T effectrices, mais affecte également négativement la fonction des cellules dendritiques (Deaglio *et al.*, 2007). L'AMPc déclenche un signal anti-inflammatoire et pro-apoptotique (Bopp T *et al.*, 2007).

#### 2.2.4.2 Cytokines

En plus de ces molécules membranaires, les Treg peuvent sécréter trois **cytokines immunosuppressives** IL-10, l'IL-35 et le TGF- $\beta$ , identifiées dans des études d'expression génique. Cependant, la mesure dans laquelle ces 3 cytokines sont utilisées par les Treg dans des contextes pathogènes ou homéostatiques distincts diffère, ce qui suggère une fonction non chevauchante. J'ai déjà défini dans le chapitre DC certains rôles immunosuppresseurs de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  en mentionnant le fait que ces 2 cytokines agissent sur les cellules myéloïdes en leur conférant des propriétés anti-inflammatoires.

*In vitro*, le blocage de **l'IL-10** n'altère nullement les fonctions des tTreg et sa production par ces cellules en présence d'IL-2 n'inhibe pas la prolifération de cellules T conventionnelles (Shevach *et al.*, 2002). Cependant, *in vivo* de nombreuses études montrent l'inverse, de sorte que l'IL-10 est considérée comme l'une des molécules clés impliquées dans l'immunosuppression d'une façon dépendante ou indépendante de la présence de Foxp3 (cas de Tr1) (O'Garra *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2004). Ces résultats, apparemment contradictoires, des études *in vitro* et *in vivo* peuvent s'expliquer en partie par l'existence de deux sous-population de Treg Foxp3 tTreg et pTreg d'origine et de fonctions différentes et en particulier par le fait que la majorité des tTreg ne sécrètent pas d'IL-10 chez la souris (Maynard, 2007). L'ablation sélective de l'IL-10 dans les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> a révélé que sa production est essentielle pour maintenir la réponse immunitaire en échec aux interfaces environnementales telles que le côlon et les poumons et dans ce cas, c'est sans doute par

des pTRreg. (Rubtsov *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été établi que certaines formes de pathologies immunes telle que la colite peuvent être supprimées par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> (Asseman *et al.*, 1999; Suri-Payer, 2001), tandis que d'autres, comme la gastrite (Shevach, *et al.*, 2002), peuvent être supprimées indépendamment de l'IL-10. Ces données suggèrent que les lymphocytes Treg ont plusieurs modes d'action qui peuvent dépendre du microenvironnement dans lequel ces cellules sont activées ou des sous-types de Treg en présence. Une sécrétion locale d'IL-10 a été validée dans de nombreux autres désordres immuns: EAE, greffe (Kingsley *et al.*, 2002) et dans les infections mycobactériennes (Kursar *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats révèle un rôle essentiel de l'IL-10 produit par les Treg dans la régulation immunitaire et plus particulièrement au niveau des muqueuses.

**TGF-β** Certaines études réalisées *in vitro*, en neutralisant le TGF-β ont suggéré que cette cytokine n'est pas nécessaire à la fonction des Treg (Takahashi *et al.*, 1998; Piccirillo *et al.*, 2002). Cependant, d'autres études *in vivo* et *in vitro* suggèrent l'inverse (Nakamura *et al.*, 2001). En effet, le TGF-β peut contrôler la réponse immunitaire lors d'infections par M tuberculosis, supprimer des réponses allergiques et prévenir la colite dans un modèle de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Kursar *et al.*, 2007; Joetham *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

**L'IL-35** est une cytokine immuno-suppressive sécrétée par certains Treg identifiée plus récemment (Collison *et al.*, 2007). Cette cytokine est un nouveau membre de la famille des cytokines IL-12. Ce sont des hétérodimères composés de deux chaînes, IL1-2α (p35) qui se couple soit avec la p40 pour former IL-12p70 soit avec l'IL-27β (Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) pour former l'IL-35. EBi3 peut aussi se coupler avec la p28 pour former l'IL-27 (Schrader, 2002). Ebi3 semble être une cible en aval de Foxp3 expliquant en partie l'expression préférentielle d'IL-35 par des cellules Treg Foxp3 en comparaison aux T effecteurs activés ou au repos. Son expression ectopique confère une activité régulatrice à ces cellules. *In vitro*, l'IL-35 recombinant seul supprime la prolifération de TCD4 (Gavin *et al.*, 2007; Collison *et al.*, 2007). De plus, les Treg Ebi3<sup>-/-</sup> et IL12α<sup>-/-</sup> ont une activité régulatrice réduite et ne peuvent pas contrôler la prolifération homéostatique ni guérir les MICI chez la souris (Collison *et al.*, 2007).

#### 2.2.4.3 Cytolyse

Les mécanismes cytolytiques sont considérés comme des fonctions essentiellement restreintes aux cellules tueuses naturelles (NK) et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL) (Lieberman, 2003). Cependant, les CD4 peuvent acquérir ces fonctions, particulièrement les cellules tTreg pour médier la suppression des cellules effectrices. L'expression de granzyme A par les lymphocytes T régulateurs humains activés avait suggéré cette hypothèse. Il a ensuite été montré que la destruction de cellules cibles par des Treg dépend en effet du

granzyme A mais aussi de la perforine et d'une adhérence via le CD18 (Grossman *et al.*, 2004).

L'activité cytolytique des Treg a été confortée par des études montrant que les cellules Treg peuvent tuer les cellules B d'une manière dépendante de granzyme B et partiellement dépendante de la perforine ou de l'interaction Fas/FasL (Zhao *et al.*, 2006. Janssens *et al.*, 2003). Plus récemment, il a été montré que les Treg diminuent l'immunité anti-tumorale en inhibant la capacité des cellules NK et des CTL (CD8) à tuer les cellules cancéreuses d'une manière dépendante du granzyme B et de la perforine (Cao *et al.*, 2007)

De plus, il a été suggéré que les galectines exprimées par certains Treg peuvent médier la cytolyse de manière indépendante des granzymes et de la perforine (Toscano *et al.*, 2007). Les cellules Tregs déficientes en galectine-1 sont caractérisées par une activité suppressive moindre (Vignali *et al.*, 2008).

Finalement le Fibrinogène-2 (FLG-2) a été décrit dans les Treg avec des effets pro-apoptotiques sur les cellules T effectrices, mais également sur la prévention de la maturation des cellules dendritiques qui est une étape essentielle au déclenchement des réponses lymphocytaires T (Shalev *et al.*, 2009).

#### 2.2.4.4 Action sur les CPA

Un certain nombre d'autres mécanismes de suppression par les Treg *in vitro*, ont été proposés qui semblent affecter principalement la fonction de présentation des antigènes par les cellules dendritiques. Des études avaient d'abord montré que les Treg pouvaient réguler négativement l'expression de molécules co-stimulatrices *in vitro* sur des DC humaines et de souris. Un rôle dans cet effet du CTLA-4, déjà connu pour sa capacité à limiter les réponses T (Bachmann *et al.*, 1999) a ensuite été démontré. L'interaction de CTLA-4, exprimés constitutivement sur les cellules Treg, avec les molécules CD80 et CD86 exprimées sur les DC est une voie importante par laquelle les cellules Treg exercent leurs fonctions suppressives (montré *in vitro* et *in vivo*) (Wing *et al.*, 2008). Des études chez la souris ont montré que le blocage de CTLA-4 conduit à des désordres auto-immuns similaires à ceux d'une déplétion des lymphocytes Tregs (Wing *et al.*, 2008). La capacité de suppression réduite des cellules Treg déficientes en CTLA-4 est due à leur incapacité à réguler à la baisse l'expression de CD80 et CD86 par les DC.

Un mécanisme impliqué dans la régulation négative de l'expression de CD80 et CD86 par CTLA-4 est la trogocytose (N. Misra *et al.* 2004 ; Qureshi *et al.*, 2011). L'interaction de CTLA4/CD80 et 86 induit la sécrétion d'IDO-1, une molécule régulatrice puissante qui induit le catabolisme du tryptophane, inhibant ainsi à la fois les lymphocytes T auxiliaires (Th) et cytotoxiques (Tc) (Vignali *et al.*, 2008; Grohmann *et al.*, 2002).

Des études récentes ont suggéré que LAG3, molécule d'activation exprimée stablement par les Treg Foxp3, et ligand du CMH-II peut également intervenir dans le blocage de la maturation des DC (Workman *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2004). Elle se lie avec une forte affinité avec les molécules du CMH-II présentes sur l'iDC, et supprime leur maturation et leur capacité d'immunostimulation, grâce à l'activation d'ITAM (Liang *et al.*, 2008). Le blocage de LAG3 par un anticorps suffit à abroger l'effet suppresseur des lymphocytes tTreg. De plus, puisque les lymphocytes T humains activés peuvent exprimer le CMH de classe II, la ligation du LAG-3 des Treg avec les CMH-II des effecteurs pourrait également favoriser la suppression (Baecher-Allan *et al.*, 2006).

Enfin, une étude effectuée en 2003 a montré que les cellules tTreg expriment sélectivement plusieurs membres de la famille TLR, comme TLR4. Une stimulation *in vitro* de ces Treg par une forte concentration de LPS même en absence de CPA a suscité leur prolifération, prolongé leur survie et augmenté leur activité suppressive (Caramalho *et al.*, 2003).

### 2.2.5 Rôles physiologiques majeurs des tTreg

L'importance des Treg exprimant Foxp3 est bien montrée par l'observation qu'un défaut génétique de l'expression de ce facteur de transcription entraîne une diminution du nombre et de la fonction des T régulateurs, associée à des altérations majeures de la tolérance immunitaire à l'origine de deux syndromes auto-immuns sévères chez l'homme nommés XLAAD (X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome) et IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) (Bennett *et al.*, 2001). De même, les souris scurfy (X-linked recessive mouse mutant) (ayant une mutation entraînant une perturbation de l'expression du gène Foxp3) développent une maladie lymphoproliférative mortelle et meurent dans les 4 semaines suivant la naissance (Brunkow *et al.*, 2001). On considère que les tTreg Foxp3<sup>+</sup> sont nécessaires pour prévenir l'activation excessive des lymphocytes T et B ce qui maintient l'homéostasie immunitaire et limite les risques d'auto-immunité (Josefowicz *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont rapporté l'existence de sous-populations de Treg Foxp3 exprimant les facteurs de transcription Tbet ou Gata-3 chez la souris et l'homme. Il a été suggéré que ces expressions traduisent des spécialisations fonctionnelles des Treg similaires à la spécialisation des effecteurs auxiliaires pendant les réponses inflammatoires (Campbell, Koc 2011; Zhao *et al.*, 2011). De plus, plusieurs études ont établi que certaines Treg sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et montré un que cette cytokine joue un rôle essentiel dans la fonction régulatrice de ces Treg (Koenecke *et al.*, 2012). Très récemment une étude du groupe d'Ed Palmer a suggéré l'existence chez la souris de deux sous-populations de tTreg différant par leur phénotype et leurs fonctions. Ces deux populations ont été différenciées par leur niveau d'expression de CD25, GITR et PD1 élevé : cellules Triple<sup>high</sup> ou faible : cellules Triple<sup>low</sup>. Ces tTreg ont pour ligands des peptides du soi d'affinités différentes et des fonctions différentes. Les auteurs suggèrent que les Treg Triple<sup>high</sup> contrôlent la prolifération homéostatique des

lymphocytes dans les ganglions lymphoïdes périphériques tandis que les Treg plus faiblement auto-réactifs “Triple<sup>low</sup>” facilitent la génération de Treg induits nécessaires au maintien de l’homéostasie du colon (Wyss *et al.*, 2016).

## 2.3 LT régulateurs d’origine périphérique

D’autres populations de Treg, exprimant ou non Foxp3, sont générées en périphérie à partir de CD4 naïfs conventionnels, lors de leur activation dans certaines conditions telle qu’en présence de TGF- $\beta$ . Ces cellules sont qualifiées de pTreg (Chen *et al.*, 2003). Plusieurs populations de pTreg ont été identifiées : les pTreg CD4+CD25+Foxp3+, les Tr1 et les Th3.

### 2.3.1 pTreg Foxp3+

La différenciation des pTreg est initiée comme celle des tTreg par une activation du TCR dépendant d’antigènes de l’environnement, tels que les Ag du microbiote et, au moins dans certains tissus, par une signalisation dépendante du TGF- $\beta$  et de l’acide rétinoïque. Ces signaux favorisent la translocation et la liaison de REL sur CNS3 et de SMAD3 sur CNS1 de Foxp3. De façon similaire aux cellules tTreg, les cellules pTreg établissent leur caractère de cellule Treg et se stabilise par une déméthylation de CNS2, qui est induite par la signalisation IL-2 via STAT5. Le butyrate dérivé du microbiote contribue au remodelage de la chromatine et à l’engagement de la lignée par son activité inhibitrice de l’histone désacétylase (HDAC). Sous l’influence de facteurs environnementaux les pTreg acquièrent encore des fonctions spécialisées telles que l’expression du récepteur d’orphelin lié à RAR  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t, codé par Rorc), la capacité à sécréter l’IL-10, l’expression de CTLA4 et la stabilisation de l’expression de Foxp3 (Tanoue *et al.*, 2016; **Fig. 10**).

Malgré leur différence d’origine et de conditions de différenciation, les tTreg et les pTreg Foxp3 partagent beaucoup de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Comme discuté plus haut les marqueurs différentiels sont helios et neuropilin-1 mais aussi TIGIT. L’environnement intestinal constitue un site clé pour l’induction de pTreg, en raison des niveaux élevés des antigènes alimentaires, et de ceux dérivés du microbiote commensal et de ses métabolites (Lathrop *et al.*, 2011; Tanoue *et al.*, 2016) et aussi du fait de l’abondance de molécules induisant des APC tolérogéniques et la différenciation de Treg. Ainsi, les DC CD103+ et les macrophages CX3CR1 de la lamina propria et les DC des ganglions mésentériques en présence de TGF- $\beta$  ou d’acide rétinoïque contribuent au développement des T naïfs en pTreg et induisent l’expression par ces cellules de récepteurs de homing intestinaux de type CCR ou intégrine (Coombes *et al.*, 2007; Jaensson *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007; Denning *et al.*, 2007). L’induction de pTreg peut être initiée également lors d’une infection chronique (Wohlfert *et al.*, 2008), lors d’inflammations tissulaires (Curotto de Lafaille *et al.*, 2008), dans les tumeurs (Liu *et al.*, 2007) et dans les tissus transplantés (Cobbold *et al.*, 2004)

### 2.3.2 iTreg Foxp3+

*In vitro*, l'induction de Treg Foxp3 à partir de CD4 naïfs murins et humains a pu être obtenue par une stimulation adéquate du TCR en présence d'agents inducteurs de l'expression de Foxp3. Ces facteurs peuvent être le TGF- $\beta$ , l'acide rétinoïque ou la rapamycine. Les cellules pTreg obtenues exercent des fonctions immunosuppressives et sont capables de supprimer l'inflammation dans un modèle expérimental d'asthme (Chen et al. 2003). La présence d'IL-2 participe à la conversion de CD4 naïves en pTreg Foxp3<sup>+</sup>. Contrairement aux tTreg, la costimulation CD28 inhibe la différenciation des pTreg (Benson et al., 2007).

### 2.3.3 Tr1

Cette population régulatrice a été décrite d'abord comme un sous-ensemble de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inhibant la réponse spécifique d'Ag des cellules T et contribuant à la prévention de la colite (Roncarolo *et al.*, 1997).

L'étude du transcriptome de clones de Tr1 différenciés *in vitro* a conduit à décrire LAG3 et CD49b comme 2 marqueurs spécifiques de ces cellules chez l'homme et chez la souris. Les Tr1 sont donc connus chez l'homme et chez la souris comme des lymphocytes CD4<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> (Gagliani *et al.*, 2013). Une expression aussi de niveaux élevés des marqueurs et de molécules régulatrices a été décrite, tels que : GITR, OX40, CD134, TNFA A RSF9, et ICOS (Roncarolo *et al.*, 2014), CD40L, CD69, CD28, CTLA-4, PD-1 (Akdis, 2008) HLA-DR et d'autres. Elles ont été différenciées classiquement des autres Treg par : 1) Leur manque d'expression constitutive de Foxp3 (Groux H, *et al.*, 1997). Une expression transitoire de Foxp3 peut être détectée après une activation (Brun *et al.*, 2011). 2) Leur forte capacité de sécrétion d'IL-10. Cependant les pTreg Foxp3 du colon de souris en produisent aussi. Les Tr1 sécrètent aussi-d'autres cytokines : TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 et un peu d'IL-2 (Bacchetta *et al.*, 2002).

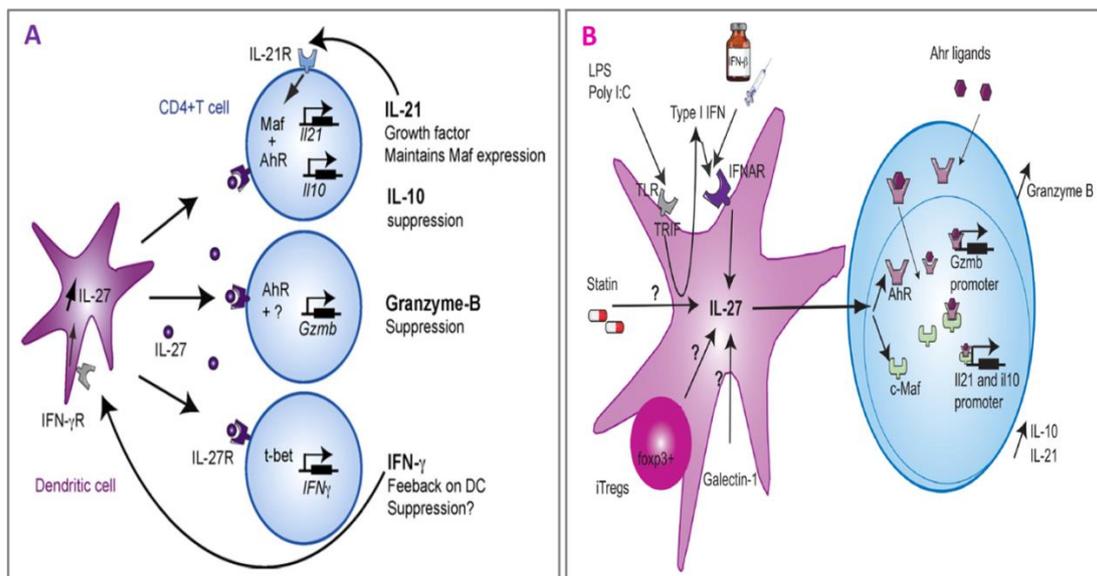
Le lieu et les modalités de développement spontané *in vivo* de cellules Tr1 n'est pas clairement établie. Les protocoles originaux conçus pour générer de Tr1 *in vitro* impliquent une stimulation répétée de cellules T naïves par un antigène en présence d'une forte concentration d'IL-10 exogène.

La première description de ces cellules par Groux et al (1997) a montré que la stimulation de PBMC ou de cellules T CD4 humaines ou murines, par des monocytes allogéniques en présence d'IL-10 génère des cellules anergiques et des précurseurs de Tr1 producteurs d'IL-10. Les mécanismes précis de l'induction des Tr1 via l'IL-10 restent cependant inconnus. Outre l'IL-10, d'autres cytokines comme l'IL-27 induisent des Tr1. De même l'IL-6, en combinaison avec le TGF- $\beta$  ou l'IFN $\alpha$ . Dans les lymphocytes CD4 de souris l'IL-6 augmente la transcription de l'IL-10 de façon dépendante de l'IL-2 et de l'IL-21. La signalisation induite par l'IL-6 augmente l'expression des facteurs de transcription c-

maf (avian musculoaponeurotic fibrosarcoma v-maf), AhR (Aryl hydrocarbon receptor) et IRF4, critiques pour la sécrétion d'IL-10 et la différenciation des Tr1 (Jin *et al.*, 2013).

L'IL-27 est un membre de la famille des cytokines IL-12, constitué des sous-unités p28 et EBi3. L'IL-27 a récemment été identifié comme une cytokine suppressive des Th17 et inductrice de Tr1 (Fitzgerald *et al.*, 2007 ; Awasthi *et al.*, 2007). La signalisation induite par l'IL-27 conduit à l'expression des facteurs de transcription c-Maf et AhR, qui se lient ensemble pour transactiver les promoteurs de l'IL-21 et de l'IL-10 (Fig. 12).

L'IL-21 maintient l'expression de ces 2 facteurs tandis que IL-10 est essentielle pour la fonction suppressive de Tr1 (Apetoh *et al.*, 2010; Pot *et al.* 2011). L'IL-27 peut induire l'expression de Granzyme-B, essentielle à la fonction suppressive de Tr1. L'IL-27 sécrété par les DC peut induire l'expression du T-bet qui conduit à la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Cette cytokine agit sur les DC pour augmenter l'expression de l'IL-27 et favorise de nouveau la différenciation des cellules Tr1 (Fig. 12 A).



**Figure 12.** Mécanismes moléculaires qui induisent les Tr1 par IL-27 (d'après Pot *et al.*, 2011).

De plus, l'interaction d'IFN de type I exogène ou endogène sécrété sous l'influence du ligand LPS ou d'autres agents avec son récepteur IFNAR, augmente l'expression de IL-27. La galectine-1 ainsi que les iTreg Foxp3 favorisent la sécrétion d'IL-27 par des mécanismes encore inconnus (Ilarregui *et al.*, 2009). Et finalement l'addition de ligand d'AhR (métabolite de tryptophane) se lie à l'AhR cytoplasmique et les deux passent dans le noyau. Ces complexes nouvellement formés augmentent l'expression du Granzyme B et se lient à c-Maf pour transactiver les promoteurs de l'IL-10 et de l'IL-21 (figure 11 B).

Des allo-stimulations répétées par des iDC ou des DC tolérogènes telles que les DC10 (DC différenciées en présence d'IL-10) peuvent induire des Tr1 (Bacchetta *et al.*, 2010; Gregori, 2011). Cette induction est dépendante de l'IL-10 et de l'expression de HLA-G et

d'ILT4 sur les DC. La neutralisation de ces facteurs empêche complètement cette induction (Gregori *et al.*, 2010).

Les Tr1 peuvent supprimer des réponses T effectrices et prévenir l'autoimmunité. Elles semblent exercer leur fonction suppressive principalement par la production élevée d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . La sécrétion locale de ces 2 cytokines peut agir à la fois sur les cellules T et sur les CPA (Groux, 2003). La signalisation dépendante de l'IL-10 diminue l'expression des molécules du CMH, de co-stimulation, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par les CPA, et inhibe directement la sécrétion d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  par les CD4 (Pestka *et al.*, 2004). De plus, certaines études ont montré que l'IL-10 augmente l'expression des récepteurs ILT3, ILT4 et HLA-G sur les DC. Ces molécules inhibent la maturation des DC et induisent la tolérance des lymphocytes.

Des rôles similaires ont été attribués au TGF- $\beta$ . Le blocage de cette cytokine par addition d'anticorps neutralisant a inversé les effets suppressifs de Tr1 (Bacchetta *et al.*, 1994 ; Levings *et al.*, 2005). A noter que d'autres mécanismes (déjà détaillés dans la partie tTreg) ont été impliqués également dans la fonction des Tr1 comme : la cytotoxicité des APC via la production de Granzyme B et de perforine, et via les interactions cellulaires CTLA4/CD80 et CD86 CD2/CD58 et CD226/CD155, la régulation métabolique dépendante de l'expression de CD39 et de CD73 et l'expression des molécules inhibitrices telles que CTLA-4, PD-1, et ICOS (Rancarolo *et al.*, 2014).

### 2.3.4 Th3

Il est maintenant bien établi que l'administration d'antigènes par voie orale induit une tolérance à cet antigène particulièrement au niveau intestinal. Un des mécanismes de cet effet est l'induction de Treg, qui dépend d'une faible dose d'Ag (Chen *et al.*, 1994). Les Treg impliqués dans ce phénomène sont qualifiés de Th3. Les Th3 ont été retrouvés chez l'homme. Ils sont caractérisés par un phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> et par une forte sécrétion de TGF- $\beta$  ainsi que de quantités variables d'IL-10 et d'IL-4. Ces cellules ont été décrites chez des souris rendues tolérantes par administration par voie orale de MBP (protéine basique de la myéline) (Miller *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1994). Elles préviennent l'induction d'encéphalite auto-immune (EAE) d'une manière dépendante du TGF- $\beta$  (Fukaura, *et al.*, 1996), l'ajout d'un anti- TGF- $\beta$  inhibe l'effet de Th3.

De plus, il a été montré que le TGF- $\beta$  est une cytokine essentielle à la génération et à la fonctionnalité des Th3. En fait, l'addition de TGF- $\beta$  à des cultures de précurseurs de cellules T murines favorise l'induction de Th3 et leur expansion peut encore être renforcée par la présence d'IL-4 et d'IL-10 (Weiner *et al.*, 2001).

Les lymphocytes Th3 participent à la production des IgA et elles inhibent la prolifération et l'activation des lymphocytes Th1 et Th2. Cet effet est dépendant de TGF- $\beta$ . Le fait que le TGF- $\beta$  puisse inhiber la réponse T effectrice *via* la modulation de plusieurs types

de cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques montrent que les Th3 sécrétant du TGF- $\beta$  peuvent jouer un rôle important dans la régulation et dans l'homéostasie de la réponse immunitaire (Weiner *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2003).

### 3. Microbiote et homéostasie intestinale

Les mammifères hébergent des écosystèmes microbiens très divers appelés microbiote, dont l'importance a longtemps été ignorée. Leur composition et leur rôle font l'objet d'études intensives menées par des consortiums internationaux pourvus de gros budgets. C'est le microbiote intestinal qui est de loin le plus abondant et a le plus d'influence sur notre santé. L'étude des souris axéniques a permis d'identifier les nombreux rôles de ce microbiote, non seulement dans la nutrition mais aussi dans la régulation de l'immunité, du comportement et dans la prévention de nombreuses maladies. La composition du microbiote intestinal humain est étudiée en particulier par le consortium MetaHIT, par des approches de métagénomique. Ces études ont montré que sa composition varie énormément chez l'homme sain en fonction de son régime alimentaire. Néanmoins, des anomalies de sa composition ou dysbioses ont été détectées dans de nombreuses maladies suggérant qu'elles en sont la cause ou la conséquence. Les modèles murins montrent que les dysbioses peuvent jouer un rôle causal dans certaines maladies comme l'obésité le diabète et les MICI. Néanmoins les mécanismes de l'impact de la composition du microbiote dans ces maladies restent peu clairs. Les études récentes de reconstitution d'un microbiote intestinal défini, par transfert de bactéries chez les souris.

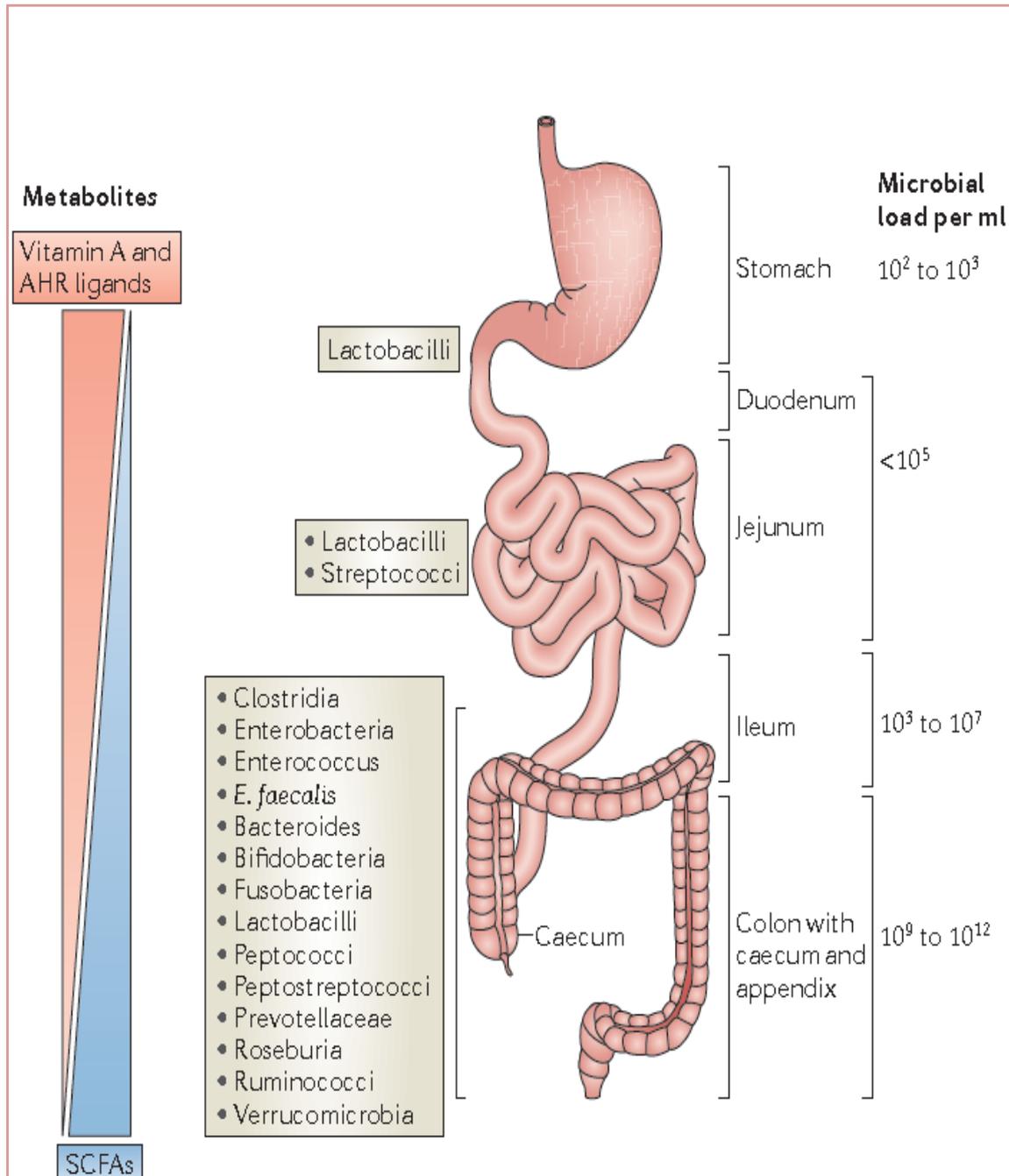
Dans cette partie de mon introduction de thèse je décrirai tout d'abord l'organisation tissulaire et les cellules immunitaires de l'intestin. Je résumerai ensuite les connaissances sur la composition du microbiote intestinal et les expériences qui ont permis de comprendre comment certaines bactéries affectent l'homéostasie du colon en particulier via l'induction de lymphocytes T régulateurs.

#### 3.1 Anatomie et structure de l'intestin

L'intestin comporte deux grandes régions très différentes par leur longueur, leur organisation tissulaire et leur fonction : l'intestin grêle et le gros intestin ou colon. Ces 2 compartiments forment un tube continu, doublé intérieurement par une monocouche de cellules épithéliales qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus. L'intestin grêle est caractérisé par son aspect villositéux. Il atteint une taille de 5 à 6m et comporte trois segments principaux : le duodénum qui fait suite à l'estomac, le jéjunum puis l'iléon. A la sortie de l'intestin grêle, où les villosités se commencent à être absentes, se trouve le caecum (partie initiale du colon), suivi de 3 segments : côlon ascendant (proximal), transverse, et distal puis du rectum, se terminant à l'anus (**Fig. 13**).

La paroi de l'intestin est constituée de 4 tuniques fonctionnelles qui sont de l'extérieur vers la lumière : la séreuse, la musculuse, la sous muqueuse et la muqueuse. La muqueuse comprend un épithélium unistratifié et un tissu conjonctif : la lamina propria. La paroi intestinale comporte également de nombreuses formations lymphoïdes.

La muqueuse est en permanence au contact de nombreux antigènes, alimentaires dans l'intestin grêle et microbiens dans le gros intestin. Cette muqueuse a donc du développer des mécanismes de tolérance à ces antigènes inoffensifs. La découverte de ces mécanismes a nécessité d'une part l'étude des cellules immunitaires très abondantes dans ce tissu et l'étude de l'influence sur ces cellules de différents composants du microbiote.



**Figure 13.** Intestin, structure et distribution des microorganismes et des facteurs environnementaux (d'après Mowat *et al.*, 2014).

## 3.2 Formations lymphoïdes

L'intestin est un organe connu pour ses fonctions digestives et métaboliques mais également immunitaires. 70 à 80% de sa population cellulaire sont des cellules immunitaires qui se distribuent non seulement dans des **structures lymphoïdes** mais aussi dans l'épithélium et la lamina propria de la muqueuse (Coombes, 2007). L'intestin contient également de grandes quantités d'anticorps de type IgA.

L'intestin contient de nombreuses structures lymphoïdes :

- Les **agrégats lymphoïdes sous-épithéliaux** de la muqueuse riches en cellules dendritiques. Ils sont associés à un épithélium contenant les cellules M qui capturent les antigènes luminaux particuliers et les transportent aux cellules dendritiques.
- Les **plaques de Peyer** (PP) sont des structures non encapsulées présentes au niveau de l'intestin grêle. Leur taille et densité augmentent du jéjunum à l'iléon. Très abondantes dans l'iléon distal elles sont rares dans le duodénum. Elles possèdent de nombreux follicules B entourés d'une zone T réduite. Les follicules contiennent en permanence un centre germinatif montrant l'existence d'une stimulation antigénique permanente. Elles sont le lieu de production des plasmocytes à IgA de l'intestin grêle.
- Des structures macroscopiques équivalentes, appelées **cryptopatches**, associées à des cellules M, sont présentes tout du long du colon et du rectum. Ces structures sont impliquées dans le priming des T et dans la génération des plasmocytes à IgA en réponse aux Ag administrés par voie rectale.
- Des structures plus petites appelées **follicules lymphoïdes isolés** solitaires (**SILT**) ou plus matures (**ILF**). Ils comportent essentiellement des zones B, pourvues de centres germinatifs sans zone T et représentent le site principal de la commutation isotypique, indépendante des lymphocytes T. La densité des ILF augmente considérablement du colon ascendant au rectosigmoïde où elle est maximum chez l'homme, atteignant 0,6 follicules par cm de longueur. L'activation de nod-1 par les peptidoglycanes bactériens dans les cellules stromales contribue à la maturation des follicules lymphoïdes isolés de l'intestin grêle en stimulant la sécrétion de CCL20 par les cellules stromales ce qui induit le recrutement des lymphocytes B CCR6+. Les DC des SILT expriment CXCL13 qui contribue aussi au recrutement des B exprimant le récepteur CXCR5. Au contraire, dans le colon, la maturation des SILT est indépendante de CCL20 et CXCL13. De même, alors que le développement des ILF de l'intestin grêle dépend de RANKL (TNFA A SF11) ceux du colon n'en dépendent pas.
- Les **ganglions lymphatiques** drainant l'intestin sont très volumineux, comparés à ceux des autres régions du corps, ce qui reflète l'exposition permanente de l'intestin à des antigènes de l'environnement (alimentaires dans l'intestin grêle et du microbiote dans le colon). Chez l'homme les ganglions duodéno-pancréatiques drainent le duodénum. Les

ganglions para-aortiques drainent le colon descendant et le rectum et le reste de l'intestin est drainé par les ganglions mésentériques. Des études récentes suggèrent cependant un drainage du colon par les ganglions caudaux et iliaques (Veebergen *et al.*, 2016).

- De nombreuses cellules immunitaires intestinales se localisent à l'extérieur des formations lymphoïdes dans les deux composantes de la muqueuse : l'épithélium et la lamina propria. Ces cellules contribuent de façon majeure et de mieux en mieux connue à l'homéostasie de l'intestin sous l'influence d'interactions avec le microbiote.

### 3.3 Epithélium intestinal

L'épithélium intestinal constitue une barrière physique et biochimique contre la pénétration des microbes, considérée comme un constituant de l'immunité innée. Il contient de nombreux types cellulaires épithéliaux, endocriniens et lymphocytaires (**Fig. 14**). On distingue :

- **Les cellules souches épithéliales** localisées au fond des cryptes (dites de Lieberkühn dans l'intestin grêle). Elles assurent le renouvellement nécessairement rapide des cellules épithéliales.
- **Les entérocytes**, cellules majoritaires, responsables de l'absorption, favorisée par leur surface d'échange importante : la bordure en brosse, à l'apex des cellules, et par la sécrétion d'hydrolases. Les entérocytes sont appelés colonocytes dans le gros intestin.
- **Les cellules de Paneth**, présentes uniquement dans l'intestin grêle et concentrées au niveau de l'iléon. Ces cellules produisent des facteurs de croissance pro-épidermiques qui aident à maintenir une activité normale des cellules souches et des peptides anti-microbiens tels que les lysozymes, défensines et autres... (Ouellette *et al.*, 2010 ; Clevers *et al.*, 2013). L'inactivation de gènes codant ces molécules rend les souris sensibles au microbiote, et augmente le risque d'inflammation spontanée. (Liu *et al.*, 2013).
- **Les cellules caliciformes** ou «goblet cells». Elles participent à la protection, en formant une barrière riche en mucus. Cette barrière atteint son épaisseur maximale dans l'iléon terminal et dans le côlon. Cette différence provient de l'abondance de ces cellules atteignant au moins 25% des cellules épithéliales dans le côlon distal, comparativement à 10% ou moins dans l'intestin grêle supérieur. Il existe une seule couche de mucus dans l'intestin grêle et deux dans le colon. Ces couches de mucus jouent un rôle important dans la protection contre l'infection et l'inflammation (Hansson *et al.*, 2012). Un défaut de la synthèse du mucus conduit à une pénétration des bactéries commensales dans la muqueuse du colon provoquant une sensibilité accrue à la colite et au cancer du côlon (Velcich *et al.*, 2002).
- **Les cellules M** «microfold cells», spécialisées dans la capture et le transport

d'antigènes particuliers de la lumière au dome sous-épithélial, riche en cellules dendritiques, qui présentent les antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. Les cellules M sont aussi une porte d'entrée de nombreux pathogènes intestinaux (Mabbott, 2013).

- **Les cellules endocriniennes**, représentent environ 1% des cellules de l'épithélium intestinal. Elles sont impliquées dans la sécrétion d'hormones.
- **Les IEL « lymphocytes intra-épithéliaux »**. Ils s'intercalent entre les entérocytes à une fréquence allant de 10 à 15 pour 100 cellules épithéliales (Ferguson, 1977). Leur répartition est variable le long de l'intestin (**Fig. 15**). Selon le type de TCR, les IEL sont partagés en 2 sous types : conventionnels et non conventionnels. Chez la souris des IEL de l'intestin grêle co-exprimant le CD4 et le CD8 $\alpha$  ont un rôle régulateur (Das G *et al.*, 2003). Les IEL ont un large éventail d'activités régulatrices et effectrices (Sheridan & Lefrancois, 2010; Cheroutre *et al.*, 2011). Chez la souris environ 25% des IEL de l'intestin grêle sécrètent de l'IL-10, d'après une étude réalisée sur des souris exprimant un gène rapporteur de l'IL-10 (Maynard *et al.*, 2007) (**Fig. 19**).

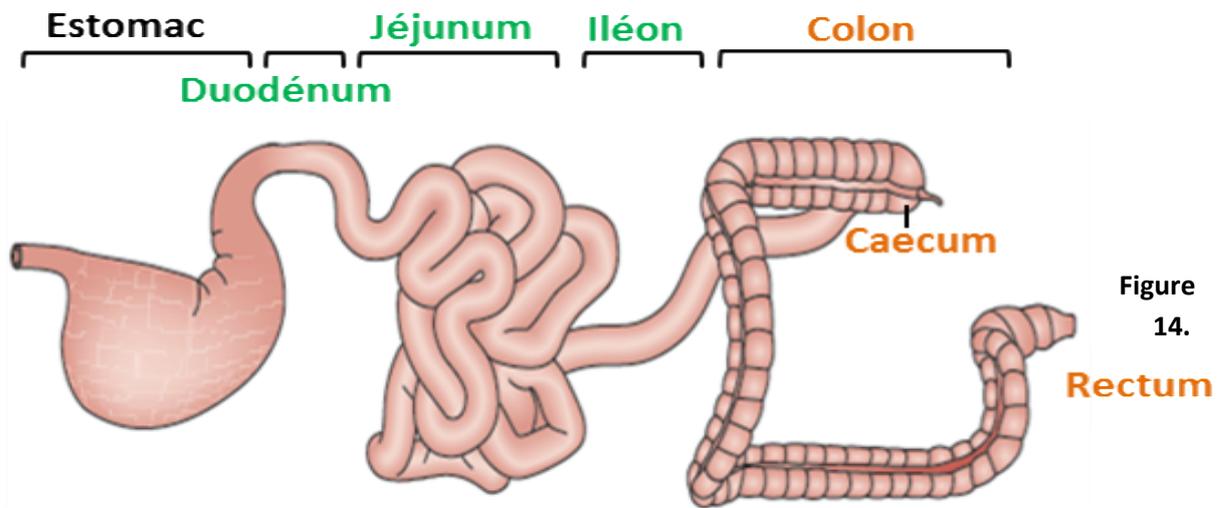
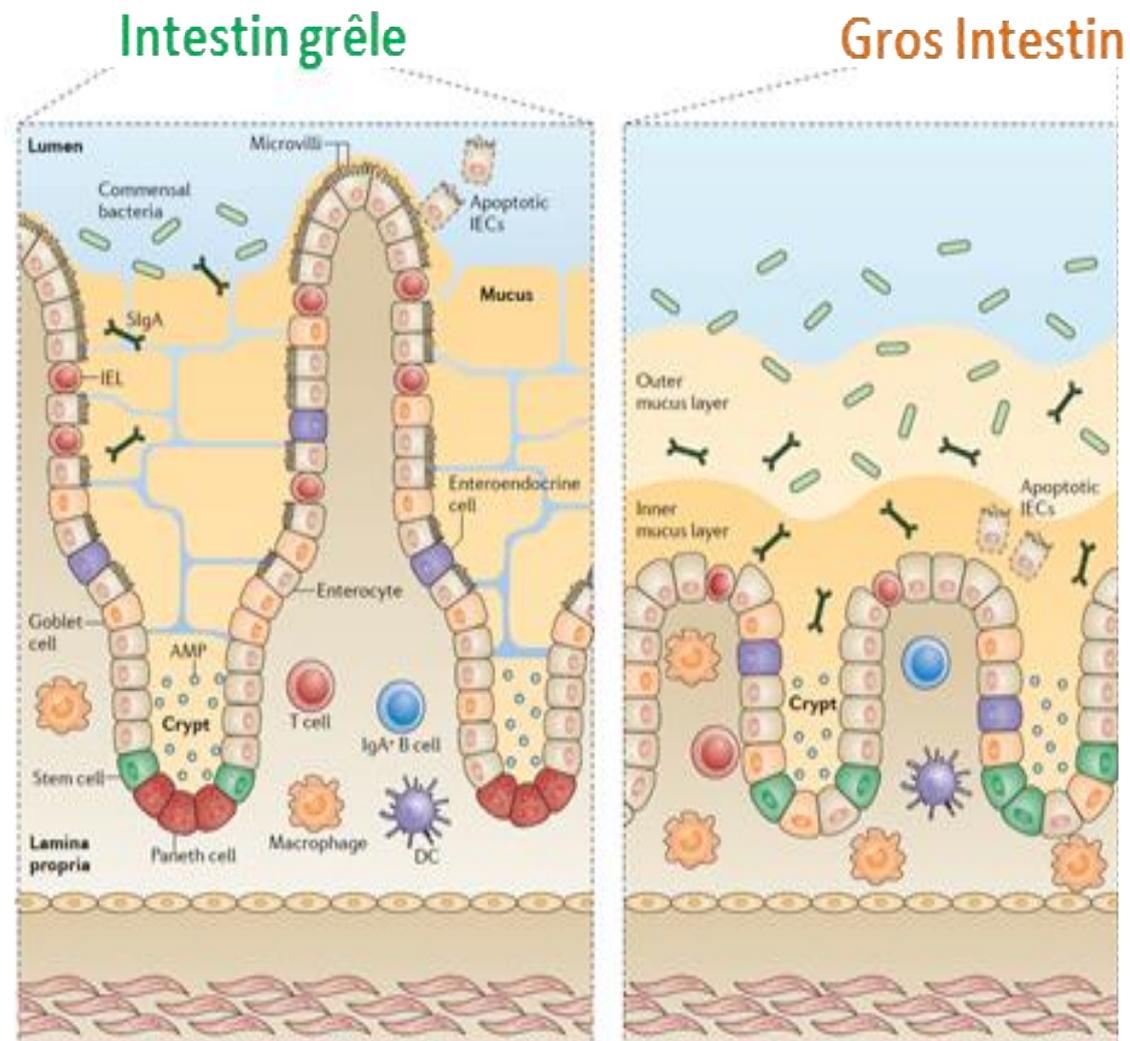


Figure 14.



Différentes cellules épithéliales de l'intestin (d'après Mowat *et al.*, 2014).

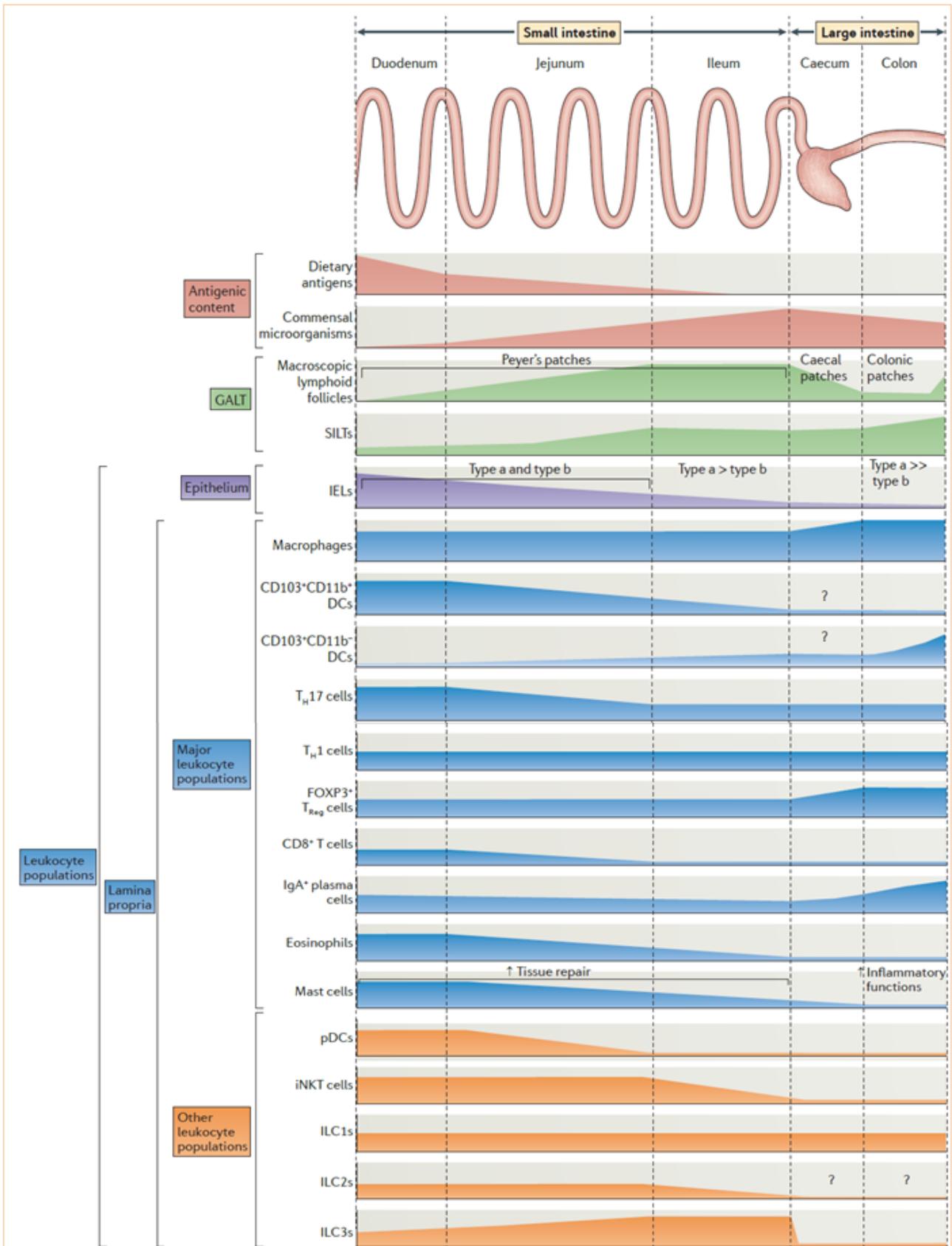
### 3.4 Lamina propria

Elle est constituée de cellules stromales et contient une grande variété de cellules immunitaires qui coopèrent avec l'épithélium pour renforcer la barrière intestinale. La fonctionnalité de l'ensemble de ces cellules est dépendante des signaux provenant du microbiote et est étroitement régulée pour permettre à la fois l'instauration d'une tolérance aux antigènes des aliments et du microbiote, présents en permanence, et le développement de réponses effectrices rapides contre les agents pathogènes. La répartition de ces cellules n'est pas homogène dans les différents compartiments intestinaux. La densité, la fonction et la proportion de certaines cellules dépendent de l'environnement, en particulier du microbiote (**Fig. 13 et 14**).

#### 3.4.1 Cellules myéloïdes

On distingue principalement les DC et les macrophages. Chez l'homme il semble exister au moins 3 sous-types de DC intestinales CD11c<sup>+</sup> CMH-II<sup>+</sup>: les DC CD103<sup>-</sup>/Sirpα<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>/Sirpα<sup>-</sup> et CD103<sup>+</sup>/Sirpα<sup>+</sup> (Bernardo *et al.*, 2016). Ces cellules adaptent leur fonction aux signaux reçus du microenvironnement intestinal, notamment *via* des bactéries du microbiote. Certaines DC possèdent de longs prolongements cytoplasmiques capables d'atteindre la lumière en traversant l'épithélium (Rescigno *et al.*, 2001) et pourraient donc être capables de capturer les antigènes directement dans la lumière de l'intestin. L'accès des antigènes luminaux peut se faire également par transcytose ou endocytose via les cellules M ou les entérocytes respectivement (Snoeck *et al.*, 2005). Les DC CD103<sup>+</sup> expriment l'intégrine αβ8 qui convertit le TGF-β latent en sa forme active. En conséquence la population DC CD103<sup>+</sup> favorise la génération des cellules Treg dans la muqueuse intestinale.

Les macrophages sont plus abondants dans le colon que dans l'intestin grêle (Nagashima *et al.*, 1996). Quelle que soit leur localisation, ils sont caractérisés par l'expression de CD163, de CD68 et de CMHII. Malgré quelques différences de marqueurs, aucune différence fonctionnelle n'a été observée entre les macrophages de l'intestin grêle et coliques. Ils sont impliqués dans l'homéostasie en : phagocytant les cellules apoptotiques et les microorganismes, et en produisant des médiateurs impliqués dans le renouvellement des cellules épithéliales. Ils sont connus également chez la souris par leurs propriétés anti-inflammatoires associées au phénotype CX3CR1 (Carlsen *et al.*, 2006) et à la sécrétion d'IL-10 qui peut maintenir la fonctionnalité et la survie des Treg Foxp3<sup>+</sup> (Murai *et al.*, 2009; Hadis *et al.*, 2011) et réduit le contexte inflammatoire (Ueda *et al.*, 2010). De plus ils répondent à l'IL-10 local. Les souris qui ont eu un blocage de la signalisation IL10/IL-10R dans les macrophages développent une colite (Zigmond *et al.*, 2014 ; Shouval *et al.*, 2014).

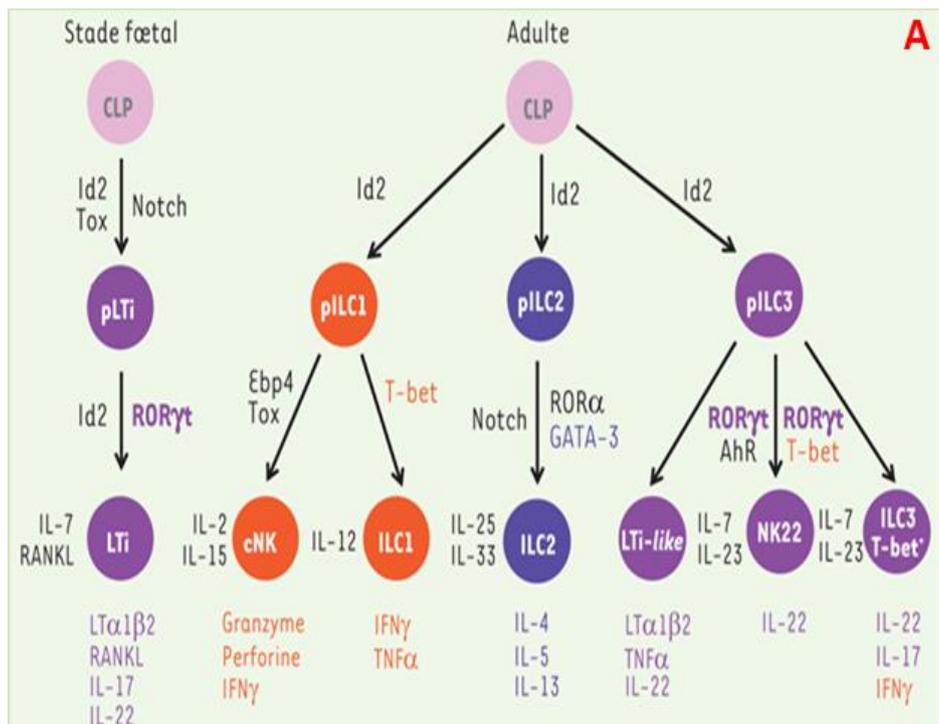


**Figure 15.** Distribution des cellules immunitaires dans les différents compartiments intestinaux (chez la souris) (d'après Mowat *et al.*, 2014).

### 3.4.2 ILC «Innate lymphoide cells»

Elles partagent certaines caractéristiques avec les cellules B et T, mais n'expriment pas de récepteur spécifique d'Ag. On pense qu'ils jouent un rôle central dans les réponses immunitaires innées précoces dans la muqueuse intestinale et sans doute comme régulateurs de la réponse adaptative.

Trois sous types principaux d'ILC ont été décrits selon leur profil de sécrétion cytokinique et selon le type du facteur de transcription qu'ils expriment (Spits *et al.*, 2013). Ils peuvent être issus d'un progéniteur commun (**Fig. 16**). Leur différenciation est dépendante de (IL-2R $\gamma$ c) et de l'inhibiteur de la liaison à l'ADN Id2 (Mjösberg *et al.*, 2012). Les **ILC1** expriment Tbet et sont définis par leur capacité à produire l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Ils dérivent d'un précurseur d'IL-C1 qui donne aussi naissance aux cellules NK. Les **ILC2** produisent des cytokines associées aux lymphocytes T helper 2 (Th2), IL-5 et l'IL-13 et expriment le facteur de transcription gata3. Les ILC2 humaines produisent de l'IL-4, mais pas ceux de souris *in vivo*. Les **ILC3** produisent des cytokines associées aux cellules Th17 (IL-17 et IL-22) et expriment le facteur de transcription de ces lymphocytes ; ROR $\gamma$ t. Ils sont eux-mêmes subdivisés en trois sous-populations : les lymphoid tissue inducers (LTi-like), les NK22 qui sécrètent uniquement l'IL-22 et les ILC3 qui expriment aussi Tbet. Une répartition distincte de ces populations d'ILC dans les compartiments intestinaux a été décrite (**Fig. 15**).

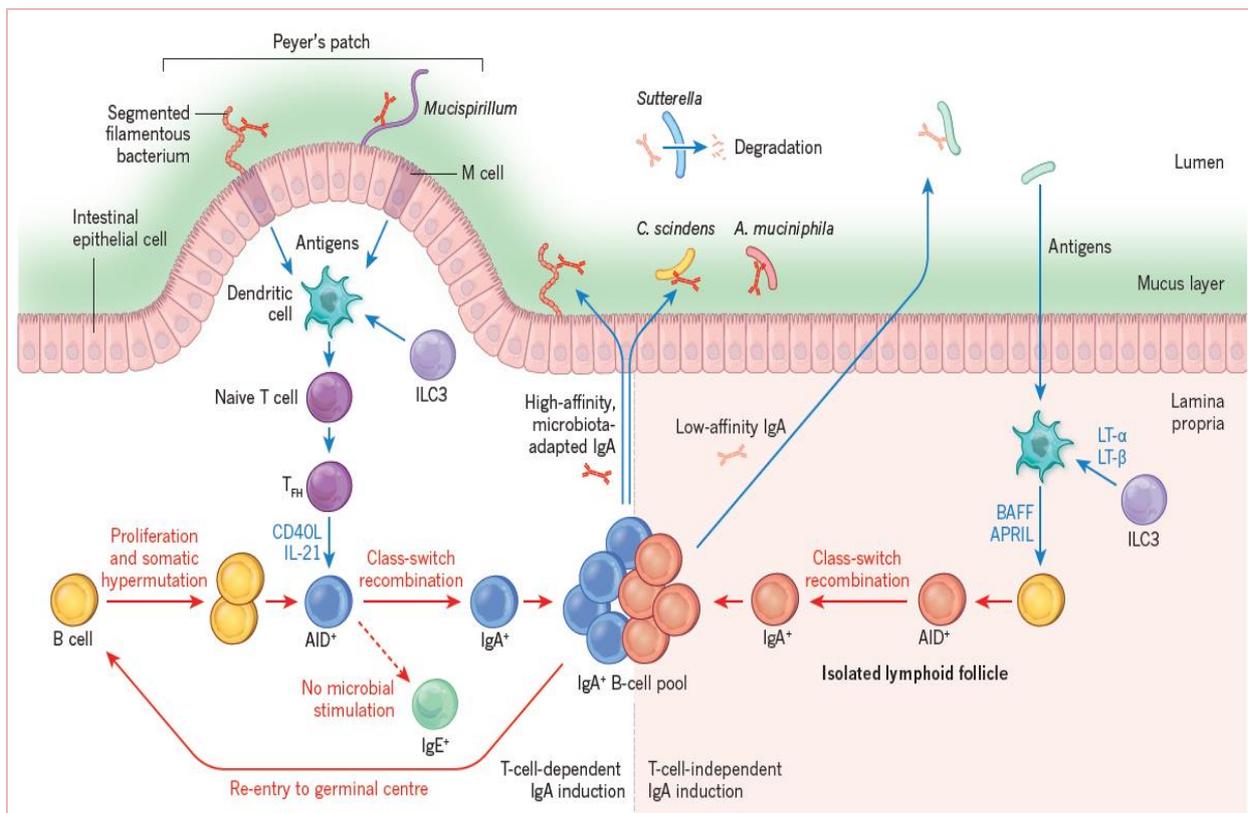


**Figure 16.** Différentes sous populations d'ILC (cytokines et facteurs de transcription) (D'après Cherrier, 2014)

### 3.4.3 IgA

Ces sont des immunoglobulines sécrétées majoritairement dans la muqueuse intestinale. Chaque molécule IgA est formée de deux molécules d'IgA monomérique. Elles sont reliées entre elles, au niveau de leur fragment constant Fc, par la chaîne de jonction J, d'origine plasmocytaire, et par le composant sécrétoire CS. Ce dernier, d'origine entérocytaire, permet le transport Trans épithélial des IgA et les protègent de la protéolyse dans la lumière intestinale. Leur distribution n'est pas homogène dans l'intestin (**Fig. 15**). Suite à un contact antigénique luminal, les LB s'activent et se différencient en plasmocytes et produisent des IgM. Ils subissent ensuite une commutation isotypique, induisant la production d'IgA. Cette commutation est, ou non, dépendante des cellules T en coopération avec les ILC, les DC et les cellules épithéliales (**Fig. 17**) (Honda and Littman, 2016).

La commutation dépendante des lymphocytes T a été décrite au niveau des PP où les DC induisent la différenciation des CD4 naïfs en TFH  $CD40L^+$  et  $IL-21^+$ . Ceux-ci induisent l'expression d'AID (activation-induced cytidine desaminase) par les cellules B et favorisent la production d'IgA1 (Pabst, 2012 ; Cao *et al.*, 2015). Cependant, la génération d'IgA indépendante des lymphocytes T prédomine dans la lamina propria et les ILF. Dans ce cas les facteurs BAFF et APRIL sécrétés par les DC stimulent l'expression d'AID par les lymphocytes B (Kruglov *et al.*, 2013).



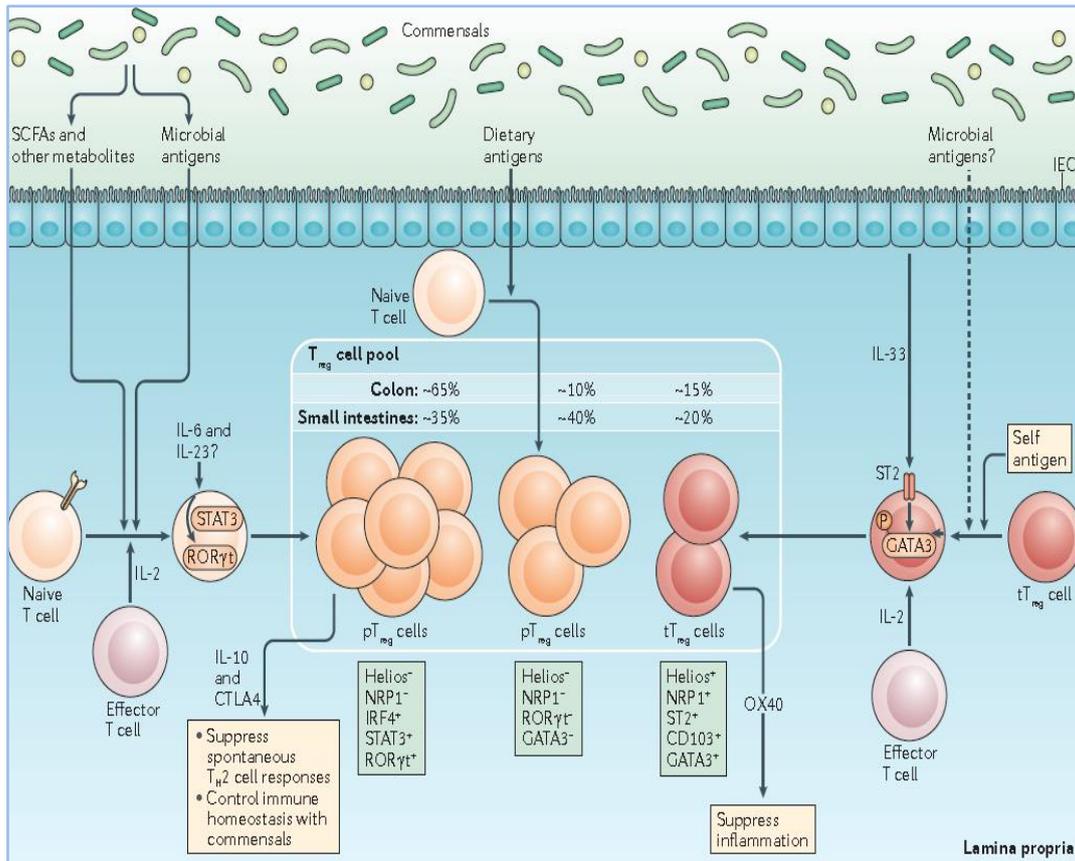
**Figure 17.** Modalité d'induction des IgA dans la muqueuse (D'après Honda and Littman, 2016).

### 3.4.4 Lymphocytes T

Les lymphocytes CD4 sont majoritaires dans la lamina propria. Ce sont des lymphocytes effecteurs (Th1, Th2, Th17, ...) et des lymphocytes régulateurs. Une proportion adéquate de ces différents types lymphocytaires est essentielle au maintien d'une physiologie intestinale normale. La fréquence des populations **Th1 et Th2** ne semble pas varier considérablement le long de l'intestin humain (**Fig. 15**).

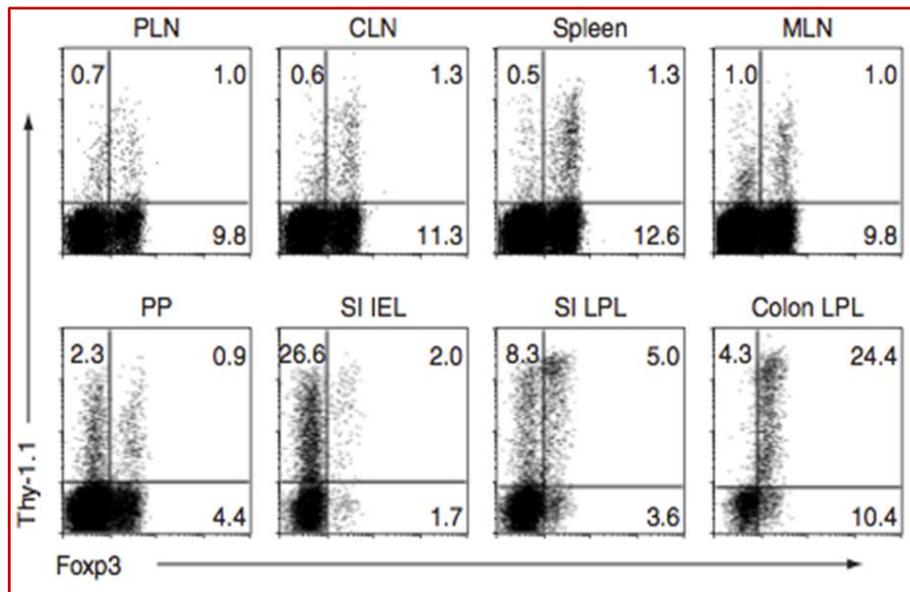
**Les Th17**, sont une population abondante dans la Lamina propria colique humaine (Sathaliyawala, *et al.*, 2013), où ils représentent 30 à 40% des cellules T mémoires (Ivanov *et al.*, 2008). Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22. Le facteur de transcription ROR $\gamma$ T est nécessaire et suffisant pour leur différenciation. Les Th17 partagent certaines voies de développement avec les lymphocytes T régulateurs Foxp3+, c'est le cas du TGF- $\beta$ .

Les **T CD4 régulateurs Foxp3<sup>+</sup>** sont classés en 3 sous populations sur la base de l'expression du facteur ROR et de GATA3 qui sont (**Fig. 18**) : les pTregFoxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ <sup>+</sup>, les tTregFoxp3<sup>+</sup> GATA3<sup>+</sup> et les pTreg Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ <sup>-</sup> et GATA3<sup>-</sup>. La majorité des Treg coliques (65%) et 35% des Treg intestinaux sont des pTreg FOXP3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ <sup>+</sup> (Yang *et al.*, 2016 ; Lochner *et al.*, 2011 ; Sefik *et al.*, 2015), elles disparaissent chez la souris axénique, suggérant que le microbiote contribue à leur différenciation. Ces cellules expriment IRF4 et CTLA4, produisent de l'IL-10, et sont capables d'inhiber une réponse Th2 excessive. Des travaux suggèrent également qu'elles peuvent supprimer les réponses Th1 et Th17, grâce à l'expression de CXCR3<sup>+</sup> et Tbet<sup>+</sup> et CCR6 respectivement (Ohnmacht *et al.*, 2015 ; Sefik *et al.*, 2015). Les tTreg Foxp3<sup>+</sup> GATA3<sup>+</sup> représente 15% des Treg coliques et 20% des Treg intestinaux (Wohlfert *et al.*, 2011). Leur origine thymique est suggérée pour 2 raisons : elles expriment hélios, et leur % n'est pas affecté en cas d'absence de microbiote. L'IL-33 secrétée par les cellules épithéliales est impliquée dans l'expression de GATA3. L'IL-2 contribue à la maintenance et à la prolifération des Treg (Schiering, *et al.*, 2014). Ces Treg peuvent supprimer l'inflammation grâce à l'expression d'Ox40. L'induction de la population pTreg Foxp3 ROR $\gamma$ <sup>-</sup> et GATA3<sup>-</sup> est induite par les antigènes alimentaires. Cette notion est cohérente avec leur abondance dans l'intestin grêle (40%) par contre dans le colon, elles sont autour de 10% (Kim *et al.*, 2016). Cette population joue un rôle dans la suppression des réponses contre les antigènes alimentaires.



**Figure 18.** Différentes sous populations des Treg Foxp3<sup>+</sup> (d'après Tanoue *et al.*, 2016)

**Chez l'homme,** De façon remarquable la proportion des Treg Foxp3 présents dans la lamina propria du colon semble très faible (moins de 5%) comparé au colon de souris (Tauschmann *et al.*, 2013). Les travaux de mon équipe d'accueil ont montré la présence dans ce compartiment de Treg non Foxp3 sécréteurs d'IL-10 et spécifiques d'une bactérie *Clostridium Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*). Ces lymphocytes ont été repérés par leur co-expression de CD4 et de niveaux faibles de CD8, phénotype qualifié de double positif alpha (DP8α). Ces lymphocytes représentant en moyenne 10% des CD4 de la lamina propria colique. Ils y sont donc plus abondants que les Foxp3. Ces données nous ont conduits à poser l'hypothèse que les Treg DP8α du colon sont les homologues fonctionnels des pTreg du colon de souris (Sarrabayrouse *et al.*, 2015). Des différences de composition entre les micro-environnements du colon de souris et humains tels que le taux de TGF-β ou d'IL-27 pourraient en effet conduire à l'induction de Treg de types différents en réponse à des bactéries similaires.



**Figure 19.** Quantification chez la souris des lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup> et Foxp3<sup>-</sup> sécrétant de l'IL-10 (Thy1.1+) dans différents OLS et dans différents compartiments de l'intestin. Dans les OLS peu de lymphocytes Foxp3<sup>+</sup> et Foxp3<sup>-</sup> expriment l'IL-10 à l'exception des plaques de Peyer dans lesquelles 2,3% de lymphocytes Foxp3<sup>-</sup> en expriment. Ces cellules correspondent vraisemblablement à des Treg Tr1-like. Dans l'intestin grêle l'épithélium est très riche en Lymphocytes T CD4 sécréteurs d'IL-10 grêle

Comme il est mentionné dans le chapitre 2 et présenté ici également, les Treg IL-10<sup>+</sup> peuvent être FoxP3<sup>+</sup> ou FoxP3<sup>-</sup>. Chez la souris Les Treg Foxp3<sup>+</sup> de l'intestin grêle représentent un peu moins de 10% des CD4 dont 2/3 environ produisent de l'IL-10. Cependant un pourcentage similaire de Foxp3 neg sécrètent de l'IL-10 dans l'intestin grêle et pourraient représenter des Treg Tr1-like. Dans le colon, environ 35% des CD4 expriment Foxp3 et les 2/3 d'entre eux sécrètent de l'IL-10 (Maynard *et al.*, 2007). La majorité de ces derniers n'expriment pas les marqueurs hélios et neuropilline et sont donc considérés être des pTreg, d'autant qu'ils sont absents chez les souris axéniques et induit par transfert de bactéries des groupes *Clostridium IV XIIVa et XVIII* (Atarashi 2011). L'étude de Maynard et al montre par ailleurs la quasi absence de lymphocytes sécréteurs d'IL-10 parmi les lymphocytes non Foxp3 de la lamina propria du colon de souris, suggérant l'absence de Treg Tr1-like dans ce compartiment (**Fig. 19**).

## 3.5 Microbiote intestinal

Microbiote du grec « petit » et « vie », désigne une énorme communauté de micro-organismes qui nous habite et que notre système immunitaire tolère. Il se distribue sur toutes les surfaces du corps : peau et muqueuses, mais il est de très loin le plus abondant au niveau du gros intestin. Il est constitué en majorité de bactéries dont il existe plus d'un milliard d'espèces mais aussi de microorganismes minoritaires : virus, champignons et protozoaires (Young *et al.*, 2008). Collectivement, ces microorganismes surpassent en nombre les cellules du corps humain dans un ratio de 10 :1 (Ley *et al.*, 2006a ; Qin *et al.*, 2010), pèsent de 1 à 3 kilogrammes du poids adulte (NIH, 2012) et représentent 40% du poids des selles. Les gènes du microbiote, appelés « microbiome », correspond à cent cinquante fois plus de gènes que ceux de nos cellules (Ley *et al.*, 2006).

Des anomalies de la composition du microbiote sont associées à de nombreuses maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité, le diabète, les allergies et le cancer du côlon. Il reste souvent difficile de déterminer si ces anomalies contribuent au risque de ces maladies ou si elles en sont la conséquence. Cependant de nombreuses données chez l'animal montrent qu'un déséquilibre du microbiote peut être à l'origine de diverses pathologies locales et systémiques telles que les MICI (Manichanh *et al.*, 2006; Cho and Blaser, 2013) et les désordres métaboliques comme le diabète de type II (Larsen *et al.*, 2010) et l'obésité (Armougom *et al.*, 2009).

Des évidences croissantes montrent que les bactéries intestinales sont vitales pour notre santé. Outre leur rôle dans la nutrition (digestion et extraction des nutriments et fabrication des vitamines), des données récentes montrent qu'elles contribuent à d'autres fonctions biologiques majeures telles que l'immunité (Honda K *et al.*, 2012). Après une brève description de sa mise en place de sa composition et de sa distribution, je reviendrai sur ces rôles majeurs, plus particulièrement l'impact sur le développement du Système immunitaire intestinal et sur le maintien de la tolérance dans cet organe.

### 3.5.1 Développement et composition

**Les bébés** naissent avec un tractus digestif stérile, rapidement colonisé dès l'accouchement par des bactéries, selon un processus qui débute dès la naissance, et conduit à une composition relativement simple du microbiote. Les premiers colonisateurs de l'intestin néonatal sont principalement des bactéries aérobies. Elles sont en grande partie apportées par la voie vaginale de la mère lors de naissance par voie naturelle. En cas de césarienne par contre, les bactéries qui s'installent en premier proviennent de l'air de la salle d'opération ou de la peau de la mère (Dominguez-Bello *et al.*, 2010).

Outre le mode d'accouchement de nombreux facteurs conditionnent ensuite la colonisation microbiologique contribuant à la variabilité inter-individuelle du microbiote, tels

que : la génétique de l'hôte et les facteurs environnementaux : l'allaitement ou non et sa durée, régime alimentaire et gain de poids maternels, stress, l'alimentation et utilisation d'antibiotiques. (Collado *et al.*, 2010; Fouhy *et al.*, 2012; Zijlmans *et al.*, 2015). Après la colonisation, le microbiote devient mature, complexe et plus stable au plan fonctionnel à l'âge de 2 à 3 ans, qui est considéré comme l'âge adulte. Les bactéries anaérobies strictes qui dominent à l'âge adulte sont les colonisateurs tardifs (comme les eubactéries et les clostridies) (Stark, 1982; Palmer *et al.*, 2007).

Cinq phylums bactériens dominants ont été identifiés : en première ligne *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Mariat *et al.*, 2009), suivis *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* (ou actinomycètes) et *Fusobacteria* qui sont moins abondants (Zoetendal *et al.*, 2008). La proportion de ces différents phylums varie entre les individus ce qui a conduit à décrire trois grands types de distribution ou Entérotypes qui diffèrent aussi les uns des autres par la composition en genres de certaines bactéries bien particulières (Arumugam *et al.*, 2011).

- L'enterotype 1 dominé par *Ruminococcus*, semble être associé à une alimentation riches en parois cellulaire de végétaux.
- L'enterotype 2 dominé par les *Prevotella*, similaire au *Ruminococcus* par leur source énergétique, Fréquente chez les végétariens, associée à une alimentation riche en glucides complexes et capable de produire de la vitamine B1 et d'autres composés.
- L'enterotype 3 dominé par les Bactéroïdes, associé à une alimentation protéique (viande) et riche en graisses. La fermentation de sucres est sa source d'énergie.

Les bactéries constituent 90% du notre microbiote intestinal. On a estimé leur nombre entre  $10^{14}$  et  $10^{15}$ . Cependant une analyse récente suggère que ce nombre est surestimé et que le microbiote intestinal humain contient environ  $3.8 \cdot 10^{13}$  bactéries (Ron Sender *et al.*, 2012). Par ailleurs on estime que le microbiote humain comporte au moins 500 espèces différentes (Savage, 1977; Sekirov *et al.*, 2010). La répartition de ces bactéries varie le long de l'intestin de façon croissante (figure 12) (O'Hara, 2006 ; Ley et al., 2006). L'estomac se caractérise par un PH acide et la présence d'Oxygène. Ces 2 facteurs sélectionnent des bactéries acido-tolérantes et anaérobies facultatives. L'intestin est colonisé par des bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et des anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. L'écosystème bactérien du colon est complexe et dominé par des bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Bifidobacterium*) (Hu *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Microbiote et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Des anomalies de la composition du microbiote sont associées à de nombreuses maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité, le diabète, les allergies et le cancer du côlon. Il reste souvent difficile de déterminer si ces anomalies contribuent au risque de ces maladies ou si elles en sont la conséquence. Cependant de nombreuses données chez l'animal montrent qu'un déséquilibre du microbiote peut être à l'origine de diverses pathologies locales et systémiques telles que les MICI (Manichanh C *et al.*, 2012; Cho and Blaser, 2013), mais également les désordres métaboliques comme le diabète de type II (Larsen *et al.*, 2010) et l'obésité (Armougom *et al.*, 2009).

Les MICI, résultent de l'inflammation chronique intermittente ou continue, d'une partie du tube digestif induite par une réponse immunitaire mal contrôlée au microbiote. Elles regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces maladies constituent un problème majeur de santé publique car elles affectent des individus jeunes, sont invalidantes et leur fréquence va en augmentant, notamment dans les pays industriels occidentaux (Molodecky *et al.*, 2012). Les facteurs environnementaux, la susceptibilité génétique, la perte d'homéostasie immunitaire et un déséquilibre dans la composition du microbiote sont des acteurs principaux intervenant dans la physiopathologie des MICI.

Cent soixante-trois locus génétiques de susceptibilité aux MICI sont connus. Ce sont des gènes impliqués dans la fonction des LT, la modulation de production des cytokines et les réponses innées induites par les PRR. NOD2, est le récepteur qui est majoritairement étudié dans ce contexte. Considéré comme un acteur principal dans l'immunité grâce à sa capacité de reconnaissance du MDP (muramyl dipeptide) présent sur les bactéries Gram+ et -. La perte fonctionnelle de NOD2 favorise une inflammation accrue suite à la perte de la sécrétion d'IL-10. Les anomalies génétiques du récepteur à l'IL-10 induisent des MICI précoces (Kuhn *et al.*, 1993 ; Glocker *et al.*, 2009). D'autres gènes de susceptibilité des MICI conduisent à un défaut de l'autophagie effectué par les cellules épithéliales ou un défaut de la production des peptides antimicrobiens (défensines) (Wehkamp *et al.*, 2005). La protéine CARD9 et l'inflammasome NRPL3 sont 2 autres exemples gènes de susceptibilités aux MICI.

Des anomalies quantitatives et qualitatives du microbiote sont des caractéristiques majeures des MICI. Une abondance accrue des : *Bacteroidetes* et de *Proteobacteria* accompagnée d'une diminution de *Firmicutes* en particulier *F. prau* (Sokol *et al.*, 2008 ; Pascal *et al.*, 2017) ont été identifiées chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

### 3.5.3 Fonctions du microbiote

Le microbiote a été considéré par certains comme un « organe » caché ou virtuel (Evans, *et al.*, 2013), à part entière, lié à la multitude de ses fonctions physiologiques démontrées en grande partie par l'étude des souris axéniques (élevées en condition stérile, dépourvues artificiellement de microbiote). Ses principaux rôles connus sont (**Fig. 20**) :

- La régulation du **développement et de la maturation du tube digestif** en particulier: l'épaisseur de la muqueuse, la taille des villosités et des bordures en brosse, la production de mucus, la vascularisation épithéliale et l'activité enzymatique de la muqueuse. Une altération structurale de ces facteurs est observée chez les souris axéniques.
- Des **fonctions métaboliques** essentielles à la digestion. Une proportion de nos aliments n'est pas digérée à la sortie de l'intestin grêle et subit des processus de fermentation par les bactéries commensales dans le colon. Ces processus engendrent des gaz et de nombreux métabolites parmi lesquelles, les acides gras à chaîne court (SCFAs : acétate, propionate et butyrate). Le propionate est un sous-produit de la voie succinate produit par les *Bacteroidetes*. L'acétate est produit par les bactéries entériques et acétogènes. Le Butyrate est produit à partir de deux molécules acétyl-CoA à un niveau élevé par *F. prau* et d'autres *Clostridium IV et XIVa* sont les espèces reconnues par leurs productions élevées de butyrate. Ces trois acides sont abondants dans le côlon surtout au niveau proximal. Dans le sang, seul l'acétate reste en concentration relativement élevée. Ces SCFAs, en particulier le butyrate, représentent de véritables nutriments pour les colonocytes, sont impliqués dans la récupération énergétique (Gill *et al.*, 2006) mais également dans l'homéostasie (détaillé ci-dessous).
- La constitution d'une **barrière de défense** contre l'invasion des pathogènes, en s'opposant à la multiplication et à l'implantation de ceux-ci par des phénomènes de compétition pour les nutriments et les niches écologiques (Buffie *et al.*, 2013), et par la production de composés antimicrobiens ce qui va permettre de limiter l'impact du LPS et du peptidoglycane (Alakomi *et al.*, 2000). Ainsi, il peut moduler l'impact des toxines produites par les pathogènes soit en les dégradant, soit en agissant sur leur synthèse, soit en modifiant la sensibilité des entérocytes à ces toxines. Il régule également la formation des mucines et la mise en place des couches de mucus qui limitent en grande partie le contact du microbiote avec la paroi intestinale, et ainsi l'effet pro-inflammatoire de certains composés et la capture d'antigènes (Vyas, 2012).
- Contribution essentielle **au développement et la maturation du système immunitaire** intestinal. Les formations lymphoïdes intestinales (PP, ILF...) se développent après la naissance en réponse aux signaux du microbiote (Bouskra *et al.*, 2008 ; Lecuyer *et al.*, 2014), comme l'ont montré des études réalisées sur des souris axéniques. La

comparaison des structures de ces souris avec des souris classiques normales montrent de nombreuses altérations au niveau des composants immunitaires intestinaux : hypoplasie des PP, nombre des lymphocytes intraépithéliaux (Bandeira *et al.*, 1990), production de cytokines limitée, sécrétion intestinale IgA réduite et déficit en certaines populations lymphocytaires (ILC...).



**Figure 20.** Les principaux rôles connus du microbiote intestinal.

### 3.5.4 Rôle du microbiote dans l'homéostasie intestinale

Actuellement, l'existence d'une spécialisation régionale des réponses immunitaires au niveau intestinal (intestin et gros intestin) est devenue claire. Cette diversité de réponse dépend en grande partie de la différence du contenu luminal entre ces deux régions. Des études chez la souris ont révélé que l'homéostasie des deux régions dépend de la présence en proportions adéquates de populations lymphocytaires effectrices (Th17) et régulatrices. Les populations régulatrices étant nécessaires pour maîtriser l'inflammation que peuvent induire les lymphocytes effecteurs.

Les bactéries commensales, leurs métabolites, mais également les antigènes d'origine alimentaire jouent des rôles majeurs dans l'induction et l'accumulation équilibrée des Th17 et des Treg. Ces composantes antigéniques peuvent influencer le profil fonctionnel des DC, cellules épithéliales, ILC3 et macrophages pour induire une telle population T (Treg ou Th17). Chez la souris le développement des Treg de l'intestin grêle dépend de DC CD103+

et qui sont rendues tolérogènes par deux molécules abondantes dans cette muqueuse : l'acide rétinoïque (AR) métabolisé à partir de la vitamine A par ALDH (Aldéhyde déshydrogénase) et les ligands du récepteur AhR provenant des aliments. Cependant, ces molécules ne semblent pas pouvoir jouer le même rôle dans le gros intestin car elles y sont peu présentes (*Hall et al, 2011; Lampen et al., 2000*). A la place, des composants du microbiote et leurs métabolites jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie du colon (*Mowat et al., 2014*). Outre les antigènes impliqués, les conditions d'induction des Treg diffèrent semble-t-il entre colon et intestin grêle. L'induction des Treg de l'intestin grêle a été la plus étudiée et les résultats sont souvent présentés comme valables pour le colon (*Veenbergen et al., 2012*).

#### 3.5.4.1 Induction de LTreg

##### **Chez la souris au niveau de l'intestin grêle**

Une double fonction a été rapportée à l'acide rétinoïque : En présence de cytokine inflammatoire IL-15, l'acide rétinoïque active un profil de DC immunogène abroge la tolérance aux Ag alimentaires (*DePaolo et al., 2011*). Au repos et en présence de TGF- $\beta$ , Il induit des Treg (*Coombes et al., 2007 ; Sun et al., 2007*)

- La liaison du 1,25-dihydroxyvitamine D3, un métabolite de la Vitamine D3 d'origine alimentaire sur son récepteur nucléaire au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> favorise l'expression de FOXP3 (*Kang et al., 2012*). De plus, la fixation de l'acide folique un dérivé d'origine alimentaire, mais également des bactéries commensales, sur son récepteur maintient la survie des Treg colique en régulant à la hausse le facteur anti-apoptotique BCL-2, il a été montré qu'une déficience en acide folique, réduit les Treg coliques accompagné d'une grande susceptibilité au colite expérimentale (*Kinoshita et al., 2012*)

- La kynurénine convertit à partir du tryptophane par l'activité d'IDO dans les IEC et les DC et contribue au développement des cellules Treg à travers le récepteur AhR (*Mezrich et al., 2010*). De plus, Niacin (vitamine B3) un autre métabolite de tryptophane connu par leur capacité anti-inflammatoire (*Zandi-Nejad et al., 2013*), interagit avec un récepteur couplé aux protéines G (GRP109A) présente sur les DC et les macrophages qui permet la différenciation de Treg et de Tr1 au niveau du colon (*Singh et al., 2014*). Les souris qui sont Niac1-/- (gène codant au Niacin) développent une colite (*Singh et al., 2014*).

##### **Chez la souris, au niveau du colon (Fig. 21)**

Des résultats obtenus sur les souris axéniques montrent une forte réduction du nombre de Treg coliques. D'autres études ont montré l'effet des bactéries commensales sur l'accumulation des T régulateurs (tableau). Des bactéries des groupes IV et XIVa de

Clostridium et leurs métabolites, les SCFAs, induisent la différenciation et/ou la multiplication de Treg Foxp3 spécifiquement dans la lamina propria colique, apparemment par la promotion d'un environnement riche en TGF- $\beta$  ou par la sécrétion d'IDO par l'épithélium (Atarashi *et al.*, 2011 ; 2013 ; Furusawa *et al.*, 2013) et ces Treg sont essentielles

### **Chez la souris, au niveau du colon (Fig. 21)**

Des résultats obtenus sur les souris axéniques montrent une forte réduction du nombre de Treg coliques. D'autres études ont montré l'effet des bactéries commensales sur l'accumulation des T régulateurs (tableau). Des bactéries des groupes IV et XIVa de Clostridium et leurs métabolites, les SCFAs, induisent la différenciation et/ou la multiplication de Treg Foxp3 spécifiquement dans la lamina propria colique, apparemment par la promotion d'un environnement riche en TGF- $\beta$  ou par la sécrétion d'IDO par l'épithélium (Atarashi *et al.*, 2011 ; 2013 ; Furusawa *et al.*, 2013) et ces Treg sont essentielles à la prévention de colites expérimentales (Atarashi *et al.*, 2011).

Plusieurs travaux ont montré que l'administration d'eau contenant des SCFAs mime les résultats obtenus lors de la colonisation par des *clostridium* c'est à dire augmente la fréquence des Treg IL-10+ dans la lamina propria colique (Arpaia *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013). Les SCFAs médient partiellement leurs effets par des récepteurs couplés aux protéines G (GPR41, GPR43 interagissent avec différents SCFAs alors que GPR109A n'interagit qu'avec le butyrate (Singh *et al.*, 2013). Cette interaction contribue à l'accumulation et/ou à l'induction des Treg. Chez la souris, l'interaction du propionate avec le GPR43 exprimés par les Treg du côlon et de l'intestin grêle favorise leurs expansions via une inhibition de HDAC, par régulation épigénétique au niveau du CNS1. L'expansion de Treg Foxp3+ est obtenue avec l'acétate mais d'une manière indépendante de GPR43. Le butyrate est l'inducteur le plus puissant des Treg coliques. Furusawa *et al.*, en 2013, ont montré que la fréquence des Treg est plus importante chez des souris nourries avec une régime enrichie en amidons butyrylés que chez celles nourries avec une régime contenant des amidons propinylés ou acétylés. Le butyrate a des effets similaires pour favoriser les Treg, en agissant directement sur les T (via GPR43) ou en modulant la fonction des DC en interagissant avec les GPR109a. L'expression de ce récepteur n'est détectée que sur les DC et les macrophages mais pas sur les T. Le rôle du GPR109a dans ces effets est controversé. Les travaux de Singh *et al.* ont montré que les DC spléniques Gpr109a – ne pouvaient pas induire de différenciation de Treg en réponse au butyrate (Singh *et al.*, 2013) . Par contre Arpaia *et al.* ont rapporté que les DC Gpr109a – prétraités au butyrate permettent la production de Treg *in vitro* (Arpaia *et al.*, 2013) .

De plus, l'induction des Treg a été montrée également par des bactéries n'appartiennent pas aux clostridiens. Des nombreux Bactéroides ont démontré une accumulation ou une induction de Treg foxp3, le *Bacteroides Fragilis* est l'un des premiers exemples décrits. PSA, l'un de ses composants un composant est libéré dans des vésicules



dans le colon. Elle appartient au groupe des *Clostridium IV* ou *Clostridium leptum*. Il a été rapporté que *F prau* a des propriétés anti-inflammatoires en partie dues à l'induction de la sécrétion d'IL-10 par les leucocytes (Sokol *et al.*, 2008).

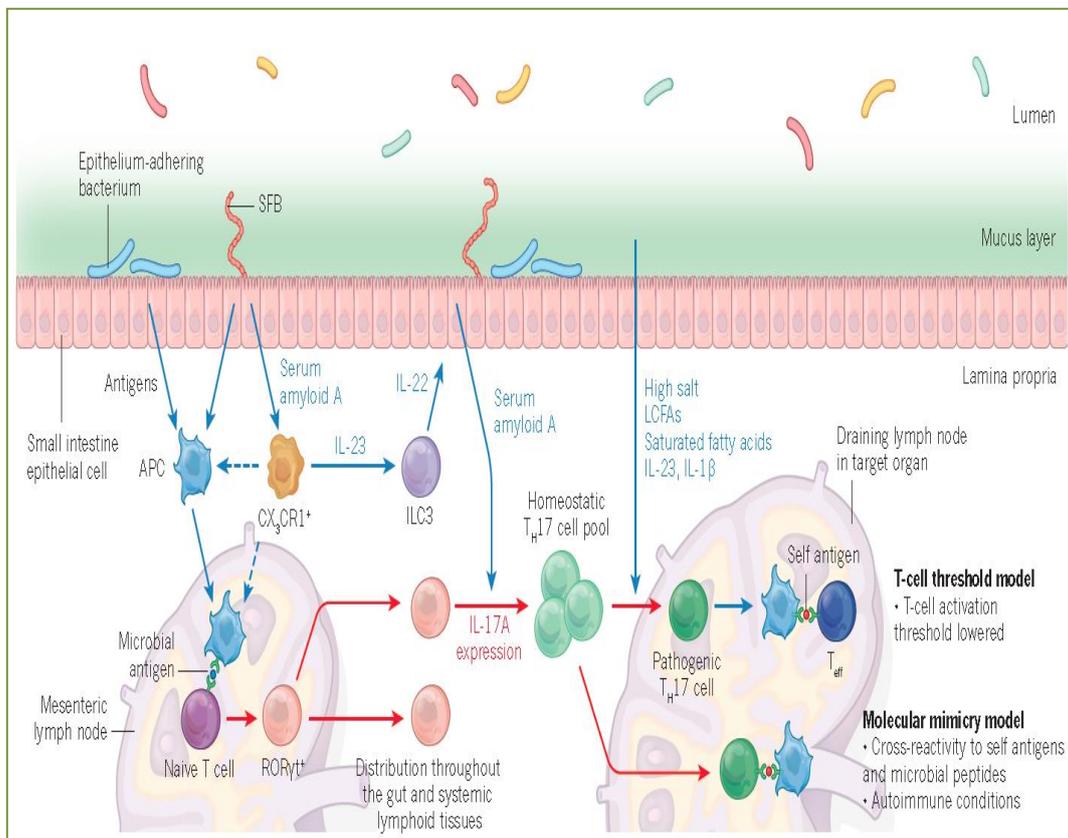
Par ailleurs, les données obtenues par Maynard et al chez les souris exprimant un gène rapporteur de l'IL-10 ont établi que tous les lymphocytes sécréteurs d'IL-10 du colon de souris expriment Foxp3. Ces données indiquent que des Treg non Foxp3, équivalents des Treg DP8 $\alpha$ , ne sont pas présents dans le colon de souris (Maynard *et al.* 2007). La parenté étroite des bactéries qui induisent les Treg Foxp3 dans le colon de souris et de *F prau* suggèrent que les Treg DP8 $\alpha$  peuvent être des homologues fonctionnels des Treg Foxp3 du colon de souris ou alors que ces clostridiiums pourraient induire chez l'homme deux types de Treg : Foxp3<sup>+</sup> et DP8 $\alpha$  ayant des rôles distincts. Cependant, nous n'avons pas observé jusque-là de réactivité des Treg Foxp3 du colon humain à *F prau*. Par contre, des *Clostridiiums* humaines mais pas *F prau* peuvent induire des Treg Foxp3 dans le colon de souris germ free. Il reste difficile de trancher entre les deux options dans la mesure où il n'existe pas de marqueurs permettant de distinguer à coup sûr chez l'homme les Treg Foxp3 thymiques des Treg induits en périphérie (Shevach 2014).

#### 3.5.4.2 Induction de Th17

Chez les souris axéniques, les cellules TH17 sont rares dans la lamina propria de l'intestin grêle (Ivanov *et al.*, 2008). Des bactéries adhérentes à l'épithélium induisent ces Th17ROR $\gamma$  à travers un antigène qui n'est pas connu (Fig. 22). Les SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) sont des bactéries filamenteuses connues par leur capacité à induire les Th17ROR $\gamma$  de façon TCR dépendante. Ces cellules polarisées TH17 s'accumulent et se différencient en cellules TH17 homéostatiques exprimant l'IL-17 dans le LP de l'intestin grêle. Ces TH17 homéostatiques stimulent les cellules épithéliales pour améliorer l'intégrité de cette barrière de la muqueuse intestinale (Weaver *et al.*, 2013). L'adhérence des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) provoque un programme unique d'expression génique dans les cellules épithéliales, y compris la régulation à la hausse de l'amyloïde sérique A. L'amyloïde A sérique des cellules épithéliales semble fonctionner comme une cytokine et il module l'expression de CXCR3 sur les cellules qui sont dérivées de monocytes pour produire IL-23, cytokine qui stimule la sécrétion d'IL-22 par les ILC3. Les cellules dendritiques qui expriment le CD11b et CD103 ont également été impliquées dans l'expansion et le maintien des cellules TH17 (non représentées). La population Th17 devient pathogène lorsqu'elle est stimulée par : IL-23 (McGeachy *et al.*, 2009), l'IL-1 $\beta$  (Coccia, *et al.*, 2012), une concentration importante de sel, ou des acides gras à longue chaîne (LCFA) et acides gras saturés.

Les cellules TH17 pathogènes peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques drainants des organes cibles, où elles contribuent aux maladies auto-immunes par la réactivité croisée de leur TCR spécifiques de peptides microbiens avec les auto-antigènes.

Tandis que, les cellules TH17 spécifiques de bactéries migrent vers les ganglions lymphatiques, ils abaissent le seuil d'activation des cellules T auto-réactives telles que les cellules Teff (Harkioliaki *et al.*, 2009).



**Figure 22.** Induction de Th17 par certains composants du microbiote (Tanoue *et al.*, 2016).

### 3.5.4.3 Autres mécanismes impliqués dans l'homéostasie

L'induction des IgA par certaines bactéries du microbiote telles que : Les *SFB* et les *Mucispirillum* (Bunker *et al.*, 2015). Par leurs effets pléiotropes, les IgA sont impliqués dans la prévention de stimulations potentiellement nocives du SI et dans la régulation de la composition du microbiote en : 1) affectent la séquestration des microorganismes luminaux non inflammatoires (Cerutti, 2008) et la neutralisation des toxines. 2) Régulant négativement des épitopes pro-inflammatoires sur les bactéries commensales (Peterson *et al.*, 2007) et en sécrétant un biofilm qui favorise la croissance des commensaux. 3) Dirigant des bactéries lumineuses vers les cellules M (Mantis *et al.*, 2002, Favre *et al.*, 2005) ce qui permet leur présentation par les Dc et l'induction de Treg ou de Th17. 4) Induisant la maturation des DC (Geissmann *et al.*, 2001) et la production de IL-10 (Pilette *et al.*, 2010). 5) participant à la suppression des RI par FcαRI.

Outre leur rôle dans l'induction de Treg par les DC, les ILC3 contribuent significativement au confinement des bactéries commensales *via* la formation des structures lymphoïdes associées à l'intestin et la production d'IL-22. IL-22 peut être sécrétée en

réponse aux IL-23 produits par les DC et les macrophages respectivement. Elle joue un rôle protecteur vis-à-vis de la barrière intestinale, en stimulant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 qui prévient la mort des cellules épithéliales intestinales par apoptose et la production de peptides antimicrobiens RegIII $\alpha$ , RegIII $\beta$  et des  $\beta$ -défensines par les cellules épithéliales (Fig. 21).

Finalement, même en l'absence de l'engagement d'un PRR (TLR ou DC-SIGN), les DC sont capables de d'induire des Treg. Le cas de la  $\beta$ -caténine, un facteur de transcription capable de régler l'expression de l'acide rétinoïque, de TGF- $\beta$  et d'IL-10. L'ablation sélective  $\beta$ -caténine réduit les Treg Foxp3<sup>+</sup> dans l'intestin (Manicassamy *et al.*, 2010). De plus, l'interaction du SIRP $\alpha$  un maqueur caractéristique des DC intestinales, avec des récepteurs exprimés sur les cellules épithéliales comme CD47, active une signalisation JAK-STAT3 dans les DC. STAT3 à son tour conduit à une sécrétion accrue d'IL-10 par les DC, il favorise donc à des propriétés tolérogènes dans l'intestin (Toledano *et al.*, 2013). Chez la souris il a été montré qu'une perte de STAT3 aboutit à la perte de tolérance (Cheng *et al.*, 2003) (Fig. 23)

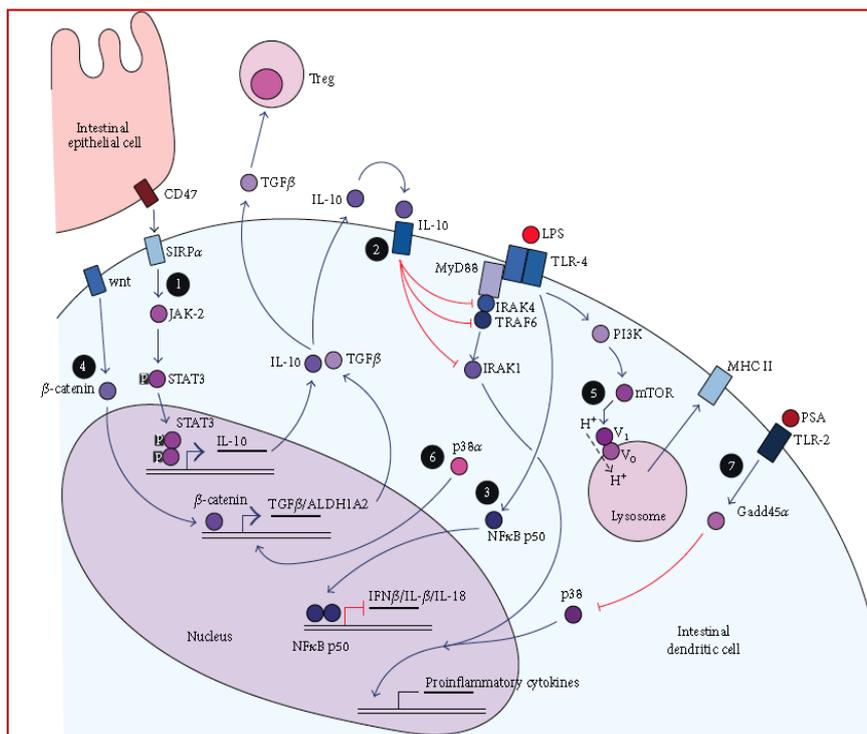


Figure 23. Certains mécanismes moléculaires favorisent des DC régulatrices (Steimle *et al.*, 2016).

## 4. Lymphocytes doubles positifs (DP)

### 4.1 Concept

Le thymus est le siège de l'éducation et de la maturation des lymphocytes T (Miller, 1961). Ceux qui ont une affinité trop faible ou trop forte pour les complexes CMH/peptides du soi y sont éliminés dans des étapes de sélection positive, puis négative. Les lymphocytes T constituent une population hétérogène qui regroupe plusieurs sous-populations ayant des fonctions différents : les lymphocytes  $T\alpha\beta$  classiques, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  et les lymphocytes NKT.

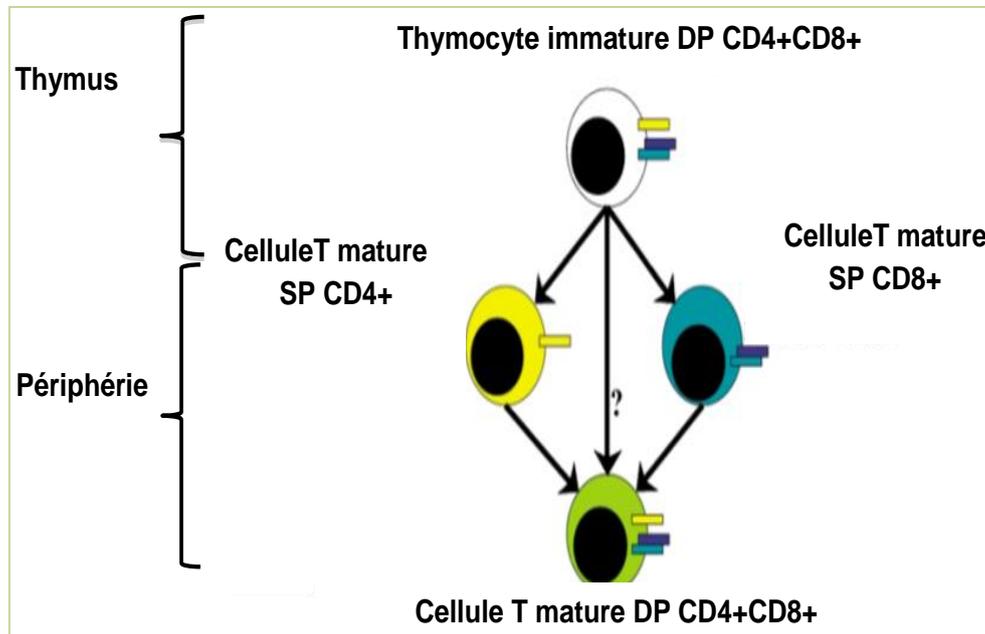
Les molécules CD4 et CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes  $T\alpha\beta$ . Elles sont importantes dans les processus de sélection intra-thymiques, dans l'activation des LT en stabilisant l'interaction CMH/TCR et participent à la signalisation intracellulaire en aval, en recrutant des kinases de type lck. Contrairement au monomère CD4 qui définit les LT CD4 restreints CMH-II, le corécepteur CD8 existe sous 2 formes l'une hétérodimérique  $\alpha\beta$  et l'autre homodimérique  $\alpha\alpha$ . Les lymphocytes T CD8 conventionnels restreints CMH-I expriment les deux mais certaines populations non conventionnelles expriment seulement le CD8 $\alpha\alpha$ . Le rôle du CD8 $\alpha\alpha$  reste controversé y compris chez la souris où des modèles sophistiqués sont pourtant disponibles.

Les thymocytes doubles positifs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sont un stade du développement de tous les lymphocytes T dans le thymus. La transition des thymocytes DP en lymphocytes T simple positifs (SP CD4 ou SP CD8) est régulée par un réseau complexe et interactif de facteurs trans-régulateurs. Pour le moment, ThPOK et Runx3 occupent la place de choix comme facteurs de transcription spécifique, qui orientent le développement des lignages adéquats CD4 ou CD8 respectivement, définis par la restriction CMH. Ils agissent tous les deux, au moins en partie, en supprimant l'expression des gènes qui régulent la différenciation vers l'autre voie. Ainsi ThPOK, inhibe l'expression des gènes qui maintiennent la différenciation de CD8, incluant Runx3. De même le rôle de Runx3 dans la détermination du lignage CD8 repose en grande partie sur sa capacité à réprimer l'expression subséquente du facteur de transcription ThPOK, médiateur clé dans l'engagement vers le lignage CD4.

Bien que l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 $\alpha\beta$  soit généralement exclusive sur des lymphocytes T (SP) matures après l'achèvement de la différenciation thymique, des lymphocytes double positifs (DP) exprimant à la fois le CD4 et les dimères CD8 $\alpha\beta$  ou  $\alpha\alpha$  ont été décrits dans le sang et différents tissus chez l'homme, ainsi que dans différentes espèces animales (Blue *et al.*, 1985; Periwal, 1999) (**Fig. 24**). L'origine de ces populations mais aussi leur fonction restent obscures.

Dans cette quatrième partie de mon introduction je résumerai les données concernant les phénotypes, la localisation, la fréquence et les fonctions connues ou supposées des différentes sous-populations des DP identifiées chez l'homme. Je terminerai

par la description de la sous-population régulatrice induite par la bactérie commensale *Fprau*, récemment identifiée par notre équipe dans la muqueuse colique et dans le sang humains (Sarrabayrouse G *et al.*, 2014 ; Sarrabayrouse *et al.*, 2015).



**Figure 24.** Représentation schématique de l'origine des cellules T doubles positifs (DP) CD4+CD8+ (Extrait de Parel, C. Chizzolini., 2004).

## 4.2 Origine et Différents phénotypes doubles positifs

La mise en évidence d'une diversité phénotypique de lymphocytes DP périphériques a conduit certains auteurs à suggérer qu'ils pourraient avoir des origines différentes, thymiques ou extra-thymiques. Ces DP sont issus de la conversion de lymphocytes SP en périphérie (Paliard *et al.*, 1988). A l'heure actuelle rien n'indique que de telles cellules puissent se développer indépendamment du thymus.

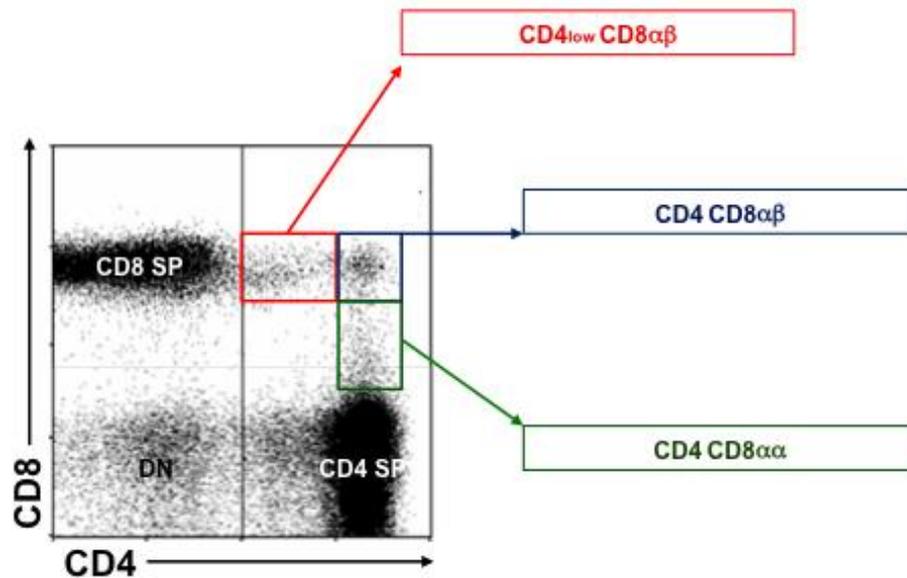
Selon le niveau d'expression de CD4 et de CD8 et selon le type de dimère CD8 exprimé, on distingue au moins trois populations distinctes de lymphocytes T $\alpha\beta$  double positifs (Parel and Chizzolini, 2004) (**Fig 25**) :

1) Des lymphocytes **CD8 $\alpha\beta$ <sup>high</sup>**, restreints CMH-I, exprimant transitoirement de faibles densités de **CD4** en réponse à une activation *in vitro*.

2) Des lymphocytes **CD4<sup>high</sup>**, restreints CMH-II, co-exprimant de faibles densités de **CD8 $\alpha\alpha$** .

3) Des lymphocytes **CD8 $\alpha\beta$ <sup>high</sup>**, restreint CMH-I co-exprimant stablement, à un niveau faible ou élevé le co-récepteur **CD4**. Ces cellules sont présentes à basses fréquences dans le sang périphérique des individus normaux et à des fréquences plus élevées dans

certaines maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques (Chizzolini *et al.*, 2003). On les trouve aussi dans les mélanomes (Desfrancois *et al.*, 2010), les cancers du sein (Desfrancois *et al.*, 2009) et du côlon (Sarrabayrouse *et al.*, 2011) où ces cellules sont enrichies en lymphocytes réactifs aux cellules tumorales autologues.



**Figure 25.** Analyse cytofluorimétrique montrant la présence dans le sang de lymphocytes T $\alpha\beta$  DP exprimant des niveaux différents de CD4 et de CD8 $\alpha\beta$  ou CD8 $\alpha\alpha$ .

### 4.3 Distribution et fréquence des lymphocytes T DP périphériques

Ces lymphocytes, présents dans la circulation et dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et les ganglions lymphatiques) ont d'abord été décrits chez l'homme par Blue (Blue *et al.*, 1985). Dans le sang, la fréquence moyenne des lymphocytes DP totaux est autour de 1 à 2% des lymphocytes pour les individus sains (Blue *et al.*, 1985). Les CD4<sup>high</sup> CD8 $\alpha\alpha$ <sup>low</sup> représentent 0,2 à 8,2%, les CD4<sup>low</sup> CD8 $\alpha\beta$ <sup>high</sup> et les CD4<sup>high</sup> CD8 $\alpha\beta$ <sup>high</sup> représentent 0,15 à 0,9% et 0,09% respectivement des LT périphériques chez les individus sains (Nascimbeni *et al.*, 2004; Parel *et al.*, 2007).

Leur présence a ensuite été rapportée dans diverses autres espèces, y compris la souris, le rat, le poulet, les singes, les chiens ainsi que les porcs. La fréquence des LT DP varie en fonction des espèces (Zuckermann, 1999). Ils sont rares chez l'homme et la souris par rapport aux porcs, aux poulets et singes. Leur pourcentage très élevé (60%) chez les porcs suggère qu'ils ont un rôle original et majeur chez ces animaux.

Plusieurs facteurs tels que l'état de santé et l'âge peuvent affecter leur fréquence. Cette fréquence augmente avec l'âge chez l'homme (Laux *et al.*, 2000) et chez le singe (Lee *et al.*, 2003). Inversement, le nombre de lymphocytes T DP semble diminuer avec l'âge des

rats (Kenny *et al.*, 2000 ; Jimenez *et al.*, 2002).

Finalement, une découverte surprenante sur la distribution des lymphocytes DP humains est l'abondance de ces cellules dans certains tissus : foie (Nascimbeni *et al.*, 2011) et muqueuse intestinale (4 à 13%) (Sarrabayrouse *et al.*, 2014) d'individus sains, suggérant une séquestration ou une génération locale des LT DP dans ces tissus et leur implication fonctionnelle dans le maintien d'homéostasie.

#### 4.4 Fonctions des lymphocytes T DP

Malgré la difficulté à préciser leur mode de développement, les DP ont été considérés comme une sous-population lymphocytaire distincte et la question de leur fonctionnalité a été posée.

La variation accrue de leur fréquence sanguine ou tissulaire a été détectée dans plusieurs pathologies. En se basant sur la fréquence de DP, les chercheurs postulent leur participation fonctionnelle à des événements pathologiques. Par ailleurs, trois fonctions différentes des DP ont été décrites : une fonction cytotoxique régulatrice et plus récemment « **helper** ». Mais en fait, jusqu'à aujourd'hui, la fonction précise de la majorité des populations étudiées reste très mal connue.

**Dans le contexte tumoral**, une fréquence importante de lymphocytes DP  $CD4^{high}CD8^{low}$  a été d'abord décrite dans le cas de lymphome, où ils sont caractérisés par des fonctions cytotoxiques (Bago *et al.*, 1998). Desfrancois et al ont ensuite décrit dans les cancers du sein une population de DP de phénotype  $CD4^{low}CD8\alpha\beta^{high}$ . Ces lymphocytes sécrètent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et partagent avec les CD8 conventionnels un potentiel cytotoxique dépendant de l'expression de perforine et de granzyme, suggérant des fonctions anti-tumorales (Desfrancois *et al.*, 2009). Des observations similaires ont été réalisées ensuite par la même équipe dans les mélanomes (Desfrancois *et al.*, 2010). Plus récemment l'étude du transcriptome de ces cellules a montré qu'ils surexpriment l'IL-9R et que cette cytokine contribue à leur survie et à leur fonction (Parrot et al 2016). Une analyse plus approfondie de ces DP (Parrot *et al.*, 2016) a de plus montré qu'ils surexpriment le CD40L quand ils sont activés, ce qui a conduit les auteurs à leur attribuer une fonction helper (Parrot *et al.*, 2016). Enfin dans les cancers colorectaux, mon équipe (Sarrabayrouse et al 2011) a décrit la présence d'une population de lymphocytes double positifs de phénotype légèrement différent de ceux des deux cancers précédents. Ces lymphocytes co-expriment le CD4 et le CD8ab à de hauts niveaux ( $CD4^{high}CD8\alpha\beta^{high}$ ). Ces auteurs ont montré que ces lymphocytes ont une fréquence plus élevée aux stades avancés des cancers colorectaux, qu'ils sont enrichis en lymphocytes réactifs aux cellules tumorales autologues, de façon MHC class I restreinte, expriment le marqueur CD103 et sécrètent préférentiellement les cytokines l'IL-4 et l'IL-13 (Sarrabayrouse *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données,

particulièrement la forte production d'IL-13, a conduit ces auteurs à suggérer que ces lymphocytes DP pourraient exercer un rôle **immunorégulateur**.

**Dans le contexte intestinal non pathologique** des lymphocytes T CD4<sup>high</sup>CD8α<sup>low</sup> régulateurs ont été décrits chez la souris, dans l'épithélium de l'intestin grêle (Das et al). Ces auteurs ont montré que ces lymphocytes préviennent les MICI en inhibant l'inflammation intestinale induite par les Th1 via la sécrétion d'IL-10, de TGF-β et d'IFNγ (Das *et al.*, 2003).

Des lymphocytes T CD4<sup>high</sup>CD8α<sup>low</sup> régulateurs ont plus récemment été décrits aussi chez l'homme par mon équipe. Ces lymphocytes appelés DP8AAa sont abondants dans la lamina propria du colon mais peu dans l'épithélium de ce compartiment et leur présence dans l'intestin grêle n'a pas été étudiée. Ces lymphocytes sont par ailleurs spécifiques de la bactérie *Clostridium IV : Faecalibacterium prausnitzii*, montrant que cette bactérie est impliquée dans leur induction. De plus, suggérant un rôle de ces lymphocytes dans la prévention des MICI leur fréquence est diminuée dans la lamina propria de la muqueuse colique et le sang des patients atteints de MICI qui présentent aussi des taux diminués de la bactérie (Sarrabayrouse *et al.*, 2014).

Outre le rôle régulateur, un potentiel cytotoxique a aussi été rapporté pour des lymphocytes DP présents dans l'épithélium intestinal de la souris. Mucida et al, ont montré que ces cellules proviennent de la conversion des cellules CD4 en cellules CD4<sup>high</sup> CD8α<sup>low</sup>, associée à une perte d'expression du facteur de transcription ThPOK et à une augmentation de celle de Runx3 accompagnée d'un gain des propriétés cytotoxiques (granzyme B<sup>+</sup>, perforine<sup>+</sup>). Dans des conditions physiologiques normales, le rôle de ces cellules dans l'homéostasie intestinale n'est pas établi, cependant lors de l'inflammation, ces DP augmentent le processus inflammatoire en recrutant d'autres populations et en détruisant les tissus (Mucida *et al.*, 2013).

Comme rapporté plus haut les études récentes du groupe du Professeur Nadine Gervois dans notre Unité suggèrent que les lymphocytes DP infiltrant les mélanomes pourraient avoir plutôt une fonction helper via leur forte expression de CD40L.

D'autres études des DP suggèrent aussi l'existence de DP de fonction helper chez l'homme dans le cadre de la sclérose en plaques (Parel *et al.*, 2007) et chez la souris, dans le cadre d'immunisations orales (Fujihashi *et al.*, 1993).

## 4.5 Les lymphocytes T régulateurs CD4CD8 $\alpha$ (DP8 $\alpha$ ) humains spécifiques de la bactérie *F prau*

### 4.5.1 Les lymphocytes DP8 $\alpha$ de la lamina propria du colon (DP8 $\alpha$ LPL)

Notre équipe a identifié récemment la présence dans la muqueuse colique saine de LT $\alpha\beta$  exprimant à la fois les co-récepteurs CD4 et CD8 $\alpha$ . Ces lymphocytes ont été baptisés Double Positifs CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ). Cette population est plus nombreuse dans la Lamina Propria (5,3% +/- 3,6 des LPL CD3) que dans l'épithélium colique (1,5% +/- 0,3). (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). De plus dans la lamina propria du colon une majorité de ces cellules sont spécifiques de la bactérie *F prau* suggérant que cette bactérie contribue localement à leur différenciation. De plus, ces lymphocytes expriment ex-vivo des marqueurs de lymphocytes T régulateurs CD25, CTLA-4, GITR et LAG-3 et, une fois établis en lignée, montrent in vitro les fonctions régulatrices décrites pour les Treg Foxp3: sécrétion d'IL-10, inhibition de la maturation des cellules dendritiques et de la prolifération des lymphocytes T.

Notre équipe a de plus montré que ces lymphocytes sont diminués dans la lamina propria des patients atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), comparés à leur fréquence dans des muqueuses coliques saines. Ces données suggèrent l'existence d'une connexion entre la diminution de la bactérie *F prau* décrite chez les patients MICI et la diminution des lymphocytes DP8 $\alpha$  régulateurs. Associé à la valeur pronostique de la diminution de *F prau* chez les patients atteints de maladie de Crohn's (Sokol *et al.*, 2009), la diminution des Treg DP8 $\alpha$  associée à la maladie suggère que ces cellules régulatrices jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie du colon et donc dans la prévention des MICI. A l'appui de cette hypothèse des bactéries très proches de *F prau* induisent chez la souris le développement de Treg qui protège l'animal de la colite expérimentale (Atarashi 2011). Cependant, à la différence des DP8 $\alpha$ , ces Treg du colon de souris induites par des bactéries *Clostridium* sont des Foxp3.

On peut considérer que les DP sont des lymphocytes Tr1-like, en raison de non expression de Foxp3 et de leur production d'IL-10. Néanmoins, ils présentent des différences significatives avec les lymphocytes régulateurs Tr1 décrits par le groupe de Roncarolo (Groux *et al.*, 1997. Gagliani, 2013). En particulier, les DP $\alpha$  expriment stablement l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ , le CD25 et le facteur de transcription GATA-3, et n'expriment pas le récepteur PD1, considéré comme un marqueur canonique des cellules Tr1. Cette différence se traduit également au niveau fonctionnel, la fonction des lymphocytes T régulateurs (Tr1 et Th3) est largement dépendante de l'IL-10 ou du TGF- $\beta$  respectivement, par contre la capacité fonctionnelle des DP8 $\alpha$  in vitro semble peu dépendante de ces 2 molécules. Il est donc possible de distinguer les Treg DP8 $\alpha$  induites par le microbiote des autres sous-groupes de Treg Tr1 et Th3.

#### 4.5.2 Les lymphocytes DP8 $\alpha$ du sang (DP8 $\alpha$ PBL)

En 2014, après avoir étudié les lymphocytes T DP8 $\alpha$  de la muqueuse colique mon équipe d'accueil a confirmé la présence dans le sang de lymphocytes de phénotype CD4CD8 $\alpha$ <sup>low</sup>. La fréquence de ces lymphocytes a été évaluée dans le sang de donneurs sains et de patients IBD. La fréquence de ces lymphocytes semble donc diminuée chez les patients MICI (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). A la différence des LPL, ces PBL n'expriment pas les molécules régulatrices CD25, CTLA-4, LAG-3 et GITR *ex vivo* mais les acquièrent après une activation par *F prau in vitro*. Mon équipe a de plus montré que 10% en moyenne des PBL DP8 $\alpha$  partagent la spécificité des LPL pour *F prau* et, une fois établis en lignées, expriment les mêmes marqueurs et fonctions régulatrices que ces derniers. Ces données suggèrent que ces PBL DP8 $\alpha$  spécifique de *F prau* sont des lymphocytes qui recirculent à partir de la muqueuse colique.

Le reste des PBL DP8 $\alpha$  ne sont pas spécifiques de *F prau* mais semblent posséder néanmoins des fonctions régulatrices une fois établies en lignées. Mon équipe a donc suggéré que ces cellules peuvent être induites par des composants microbiens présents dans des muqueuses autres que l'intestin: la muqueuse pulmonaire ou génitale par exemple ou au niveau de la peau (Sarrabayrouse *et al.*, 2014 ; 2015).

#### 4.5.3 Hypothèses sur le rôle des Treg DP8 $\alpha$ spécifiques de *F prausnitzii*

La bactérie *Clostridium IV* induit donc dans le colon humain des Treg DP8 $\alpha$  et ces cellules ainsi que la bactérie sont diminuées chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Ces données suggèrent que les Treg DP8 $\alpha$  jouent un rôle dans la prévention des MICI. A l'appui de cette hypothèse les bactéries *Clostridium IV* et XIVa induisent dans le colon de souris des Treg spécifiques et le rôle de ces cellules dans la prévention des MICI a été établi. Cependant, les Treg induites chez la souris sont des Foxp3 alors que les DP8AAa sont des Tr1-like. De ce fait, on pourrait envisager que deux types de Treg sont induites par des bactéries proches et contribuent de façon différente mais complémentaire à l'homéostasie du colon. A l'encontre de cette hypothèse des études ayant utilisé des souris exprimant un gène rapporteur IL-10 ont montré l'absence de cellules Tr1-like dans le colon de souris (Maynard *et al.*, 2007). Par ailleurs, les Treg Foxp3 sont peu abondantes dans le colon humain (environ 5% des CD4), contrairement au colon de souris où elles représentent au moins environ 35% des CD4. Ces données nous ont donc conduit à suggérer que les Treg DP8 $\alpha$  du colon humain sont les équivalents fonctionnels des Treg Foxp3 du colon de souris (Sarrabayrouse *et al.*, 2015). Si cette hypothèse est vérifiée les Treg DP8 $\alpha$  pourraient alors, comme leurs homologues Foxp3 de la souris, jouer un rôle dans la tolérance systémique (Atarashi, 2011).

## 5. Contexte et objectifs de ma thèse

Une collaboration bidirectionnelle, symbiotique étroite entre les bactéries et les populations cellulaires immunitaires qui sont hébergées dans le microenvironnement intestinal a été bien établie. Un déséquilibre de composition ou l'altération fonctionnel inter et/ou intra ces deux composantes pourraient contribuer à la pathogenèse des nombreuses maladies en touchant la tolérance immunitaire digestive.

Les évidences de l'impact du microbiote sur l'immunité restent indirectes chez l'homme. Ce sont essentiellement l'observation que des anomalies de composition du microbiote sont associées aux maladies impliquant le SI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), allergies, arthrites, diabète, cancer du côlon, obésité. Cependant aucun lien de causalité n'a été établi même si un tel lien existe chez la souris pour le diabète, certaines MICI et l'obésité.

Des études chez la souris révèlent que des bactéries particulières contribuent à la tolérance dans la muqueuse digestive en induisant le développement dans celle-ci de populations de lymphocytes T effectrices et régulatrices de tailles adaptées. Une population régulatrice de taille suffisante est en effet nécessaire pour maîtriser l'inflammation que peuvent induire les lymphocytes effecteurs du fait de l'abondance des antigènes microbiens ou alimentaires dans l'intestin. C'est dans ce contexte que les précédents travaux de recherche menés au sein de notre équipe ont permis l'identification chez l'homme une population lymphocytaire DP8 $\alpha$  (CD4CD8 $\alpha\alpha$ ) régulatrice, colique, spécifique à *F prau*. Ces DP8 $\alpha$  ont été identifiés également dans le sang, où un faible pourcentage de ces cellules est spécifique au *F prau*. De plus ces Treg sont diminués dans la muqueuse colique et dans le sang des patients atteints de MICI, comparés respectivement à des muqueuses saines de patients atteints de cancers coliques et à des donneurs sains. De façon remarquable, une diminution de la bactérie *F prau* dans le microbiote fécal et dans la muqueuse digestive est une caractéristique fréquente des patients MICI, diabétiques, obèses, arthrites...

Une question importante soulevée par la découverte des DP8 $\alpha$  est de déterminer le mécanisme de leur induction, pour envisager de corriger les pathologies associées à leur déficit fonctionnel. Donc nos objectifs ont été : **i)** Déterminer les modalités d'induction de Treg DP8 $\alpha$  à partir de lymphocytes T CD4 naïfs *in vitro* par différentes stimulations utilisant *F prau* et d'identifier l'impact de cette bactérie et de SCFA sur des CD suggérant qu'elles peuvent contribuer à l'induction des Treg DP8 $\alpha$ . **ii)** Caractériser les DP8 $\alpha$  spécifique à *F prau* présentant les marqueurs de recirculation du tube digestif. **iii)** Recherche d'un rôle possible de DP8 $\alpha$  dans différentes pathologies associées à des dysbioses.

## III. Résultats

### 1. Recherche des modalités d'induction de Treg DP8 $\alpha$ par la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*

1.3 Article 1: *Faecalibacterium prausnitzii* alters dendritic cell functions and promotes the differentiation of IL-10-producing T cells

*Faecalibacterium prausnitzii* alters dendritic cell

Functions and promotes the differentiation of IL-10-producing T cells

Joudy Alameddine<sup>1</sup>, Emmanuelle Godefroy<sup>1</sup>, Guillaume Sarrabayrouse<sup>2</sup>, Chantal Bridonneau<sup>3</sup>, Karina Yazdanbakhsh<sup>4</sup>, Frédéric Altare<sup>1</sup>, Harry Sokol<sup>3,5,6</sup> and Francine Jotereau<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup> Vall d'Hebron Institute of Research, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup> New York Blood Center, LFK Research Institute, New York, NY, USA

<sup>5</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École normale supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France

<sup>6</sup> Laboratoire des Biomolécules, Département de chimie, École normale supérieure, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, PSL Research University, 75005 Paris, France

# lead contact

\* Corresponding author:

Francine Jotereau

CRCINA-UMR 1232 INSERM/Université de Nantes,

IRS2

22, Bd Benoni Goullin

44200 Nantes

mail : francine.jotereau@inserm.fr

Tel: 00 33 (0)2 28 08 02 72

Running Title: *Faecalibacterium prausnitzii* affects T cell priming

## SUMMARY

The mechanism whereby the microbiota influences gut homeostasis and IBD susceptibility is not understood. We have reported the presence, in the human colon, of IL-10-secreting Treg characterized by the co-expression of CD4 and CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) as well as a skewed TCR specificity for *Faecalibacterium prausnitzii* (*Fprau*), demonstrating a role of this bacterium in their induction or expansion. Here we showed that DC exposed to *Fprau* secreted IL-10 and then poorly up-regulated co-stimulation markers and failed to secrete TNF $\alpha$  and IL-12 (p70, p35 and p40) in response to maturation agents. Moreover, they efficiently primed IL-10-secreting CD4 T cells. In contrast, DC exposed to related clostridia, poorly secreted IL-10, significantly matured and poorly primed IL-10+ CD4 T cells. These effects, also observed with IBD patients' dendritic cells, may account for the immuno-modulatory role of *Fprau in vivo* and its dominant contribution to the induction of DP8 $\alpha$  Treg in the human colon.

## KEYWORDS

Microbiota, Dendritic cells, Regulatory T cells, Tolerance, *Faecalibacterium prausnitzii*, T cells

## HIGHLIGHTS

- The commensal *Faecalibacterium prausnitzii* induces tolerogenic dendritic cells (DC)
- *Faecalibacterium prausnitzii*-exposed DC prime IL-10-producing CD4 T cells
- Other related bacteria fail to induce tolerogenic DC
- This mechanism may underlie how *Faecalibacterium prausnitzii* induces colonic Treg

## eTOC BLURB

Alameddine *et al.* report on how *Faecalibacterium prausnitzii*-exposed dendritic cells poorly mature in response to LPS and prime IL-10-producing CD4 T cells. These effects may account for the immunomodulatory role of *Faecalibacterium prausnitzii in vivo* and may explain its dominant contribution to the induction of Treg in the human colon.

## INTRODUCTION

The colon mucosa is permanently exposed to a wealth of harmless antigens from the microbiota. Thus, active mechanisms have been developed to prevent unnecessary immune reaction. Indeed, unrestrained inflammatory responses to resident commensal microbiota are the main cause of inflammatory bowel diseases (IBD) (Knights et al., 2013; Kostic et al., 2014). Recent data in mice have shown that the microbiota itself contributes to local homeostasis, through the induction of IL-10-secreting regulatory T cells (Treg) by selected bacteria (Tanoue et al., 2016). Especially, *Clostridium* strains belonging to the cluster IV, are potent inducers of colonic interleukin (IL)-10-producing Foxp3 Treg, which play key roles in the prevention of colitis (Atarashi et al., 2011).

In humans, the clostridium IV member *Faecalibacterium prausnitzii* (*Fprau*) is the most abundant gut bacterium in healthy subjects. Suggesting its role in gut homeostasis, *Fprau* exhibits anti-inflammatory properties *in vitro* (Miquel et al., 2013). Moreover, its relative level is decreased in IBD (Joossens et al., 2011; Machiels et al., 2014; Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009) and may in some cases predict relapse (Sokol et al., 2008). In accordance with this role, we have identified, in the colon lamina propria and blood, *Fprau*-specific IL-10-secreting Treg characterized by a double positive CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) phenotype and by a lack of Foxp3 expression. Strikingly, these cells were decreased in IBD patients compared with control subjects (Sarrabayrouse et al., 2014). Altogether, these data suggest that IL-10 producing DP8 $\alpha$  Treg contribute to human colon homeostasis and that *Fprau* is a major inducer of these cells (Sarrabayrouse et al., 2015).

How *Fprau* contributes to IL-10-secreting Treg induction and whether it exerts a dominant role in this induction, while panels of different *Clostridium* species and clusters are required to induce colonic Treg in mice (Atarashi et al., 2013; Atarashi et al., 2011; Tanoue et al., 2016), remain unknown.

A number of data has established that specialized populations of dendritic cells (DC) exist in the intestine, which favor regulatory responses (Coombes and Maloy, 2007). Indeed, DC can promote tolerance in the periphery through Treg induction (Steinman et al., 2003). Characterization of these tolerogenic DC (ToIDC) has mainly been studied *in vitro* using DC differentiated in the presence of a variety of tolerogenic agents such as: IL-10 (Steinbrink et al., 1997), Vitamin D3 (Anderson et al., 2008; Unger et al., 2009) dexametasone (Escobar et al., 2014; Garcia-Gonzalez et al., 2016; Unger et al., 2009). Their most common characteristics are a limited up-regulation of co-stimulation markers and secretion of an increased IL-10/IL-12 ratio in response to maturing agents (Unger et al., 2009). Moreover, ToIDC may express immunomodulatory molecules known to be relevant *in vivo* for tolerance such as IL-10, IL-27, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Munn et al., 2002) or heme-oxygenase-1 (HO-1) (Chauveau et al., 2005). Although to a lesser extent, DC immunomodulation has also been induced by commensal bacteria such as *Lactobacillus* (Amar et al., 2015; Konstantinov et al., 2008; Smits et al., 2005), *Bifidobacteria* (Davies et al., 2009) and *Fprau* (Rossi et al., 2016).

We analyzed here the phenotype and function of DC exposed during their differentiation to *Fprau* and to other *Clostridium* strains that contribute to colonic Treg induction in Germ Free (GF) mice. Our data identifies the induction of ToIDC by *Fprau* as one of the mechanisms that may explain the unique anti-inflammatory role of this bacterium.

## RESULTS

### ***Fprau*-exposed DC prime IL-10-secreting T cells**

Purified VPD-stained naïve CD4<sup>+</sup> T cells were primed using allogeneic LPS-matured DC exposed (**DCF**) or not (**DC**) to *Fprau* at the beginning of their differentiation. Ten days later, alloreactive VPD<sup>low</sup> cells were tested for their ability to produce cytokines. CD4<sup>+</sup> T cells primed by DCF produced more IL-10, less IFN- $\gamma$  and less IL-13 than T cells primed with control DCs (Fig. 1a-c). These results suggest that *Fprau* affects DC function leading to the preferential priming of T cells secreting IL-10, compatible with the cytokine profile of DP8 $\alpha$  Treg (Sarrabayrouse et al., 2014). Moreover, DCF induced a lower proliferation of allogeneic CD4 T cells than DC, similar to immature DC (**iDC**) (Supplementary Fig. 1).

### ***Fprau* alters DC maturation and cytokine secretion**

To understand the *Fprau*-dependent underlying mechanism responsible for the development of IL-10<sup>+</sup> T cells, DCF were first tested for their expression of co-stimulation markers following LPS stimulation. Interestingly, expression of CD40, CD80, CD86 and CD83, were inhibited in DCF compare to control DC (Fig. 2a-d).

The metabolite butyrate, highly produced by *F prau*, conveys anti-inflammatory properties and in mice contributes to the induction of Treg differentiation (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013). Butyrate addition to differentiating DC had no effect on the expression of CD83 and CD86 and inhibited the expression of CD80 at a lower level than *Fprau*. Moreover, butyrate did not modulate the inhibition of these markers by *Fprau* (Fig. 2b-d). Therefore, *Fprau* inhibits DC maturation independently of butyrate.

Addition of *Fprau* to differentiating iDC at bacteria: DC ratios: 5:1 (Fig. 3a), 1:1 or 1:5 (data not shown) promoted IL-10 production by these cells. Butyrate alone poorly induced the secretion of this cytokine and did not increase the secretion induced by the bacteria (data not shown).

At variance with its induction by *Fprau* in differentiating iDC, IL-10 secretion induced by LPS was similar for DC and DCF exposed or not butyrate (Fig.3b). In contrast, TNF- $\alpha$  and IL-12p70 secretion were completely inhibited in DCF (Fig. 3c-d). Since IL-12p70 secretion relies on the induction of two subunits, p35 and p40, regulated by distinct pathways, we analyzed their production by intracellular cytokine staining in DC exposed or not to *Fprau*. The production of both chains was inhibited in DCF (Fig. 3e-f).

Therefore, DC exposure to *Fprau* at the beginning of their differentiation profoundly alters their function in terms of co-stimulation, maturation abilities, as well as secretion of cytokines involved in the commitment of helper T cells. In addition, this effect appears independent on the major anti-inflammatory metabolite butyrate produced by the bacterium.

## **Clostridium bacteria that contribute to colonic Foxp3 Treg induction in mice have a lower tolerogenic effect on DC than *Fprau***

We previously reported that DP8 $\alpha$  lymphocyte lines isolated from the colon lamina propria recognized *Fprau* but not a panel of other clostridia (Sarrabayrouse et al., 2014), among which four had been reported to contribute to the induction of Foxp3 colonic Treg in GF mice (Atarashi et al., 2013). We asked whether two of these bacteria: *Clostridium ramosum* (M88) and *Clostridium symbiosium* (M89) affected DC maturation and functions as *Fprau* did. At variance with DCF, DC exposed to M88 did not prime IL-10<sup>+</sup> T cells above the level induced by control mDC, and DC exposed to M89 primed these cells at a significantly lower level than DCF did (Fig. 4a). Moreover, M88 and M89 induced less IL-10 secretion than *Fprau* by differentiating iDC (Fig. 4b), and upon LPS stimulation failed to inhibit significantly CD40 and CD83 expression (Fig. 4c). In contrast, similarly to DCF, DC exposed to M88 and M89 poorly expressed IL-12p35 and p40 chains (Fig. 4d-e) and showed unaltered IL-10 secretion (data not shown) in response to LPS, a ligand of TLR4. Nonetheless, IL-12p70 inhibition was not complete and highly variable between donors in these DC as measured by ELISA (Fig. 4d), at variance with the complete inhibition systematically observed with DCF (Fig. 4f).

Therefore, M88 and M89 lack some *Fprau*-mediated tolerogenic properties such as the induction of IL-10 secretion by immature DC and the inhibition of DC maturation in response to TLR4 triggering and importantly DC exposed to these bacteria poorly induced IL-10 secreting T cells. However, these bacteria shared with *Fprau* a strong ability to inhibit IL-12 production by DC.

### ***Fprau*-dependent mechanisms inhibiting DC maturation and IL-12 secretion**

Since DC differentiated in the presence of IL-10 acquire tolerogenic properties (Corinti et al., 2001; Steinbrink et al., 1997), and because *Fprau* fueled IL-10 production by iDC for at least two days (Fig. 3a and data not shown), we gauged the effects of blocking IL-10 on DC properties shown to be affected above. Upon IL-10 blockade, CD40 and CD83 expression levels were partially restored (Fig. 5a). In contrast, it had no effect on IL-12 production (Fig5.b). Triggering of a variety of PRR by microbial ligands, often in a synergistic manner, has been reported to induce IL-10 and/or modulate DC functions (Li et al., 2012; Monteleone et al., 2008; Re and Strominger, 2004). *Fprau* has been shown to express TLR2 but not TLR4 ligands (Rossi et al., 2016). Moreover, as most gram<sup>+</sup> bacteria, it is expected to express fucosylated ligands of DC-SIGN that may induce IL-10 (Gringhuis et al., 2009). In support of this, DC-SIGN was strongly down-regulated from the surface of iDC exposed to *Fprau* for 24-48h. This down-regulation barely occurred in DC exposed to M88 or M89 (Supplementary Figure 3b), suggesting it is *Fprau*-specific. We used anti-TLR2 and TLR4-blocking antibodies and recombinant DC-SIGN protein to investigate a role for these receptors. While blocking TLR4 had no effect, as expected, blocking TLR2 and DC-SIGN partly restored DC maturation as shown by CD83 up-regulation (Fig. 5c). In contrast, IL-10-secretion by immature DCF and the lack of IL-12 production by LPS-stimulated DCF remained unchanged (data not shown).

We then assessed the mechanism(s) involved in the inhibition of IL-12 production. We checked whether HO-1 could be implicated, as reported in some studies (Chauveau et al., 2005; Zhong et al., 2014). While hemin, used as a positive control for HO-1 induction, strongly enhanced HO-1 expression levels, *Fprau* had no effect on its expression (Fig. 5d), suggesting HO-1 is not

involved in this IL-12-dependent mechanism. IDO production is another property of TolDC. In a preliminary study we compared the transcriptional level of *ido1* gene in iDC exposed or not to *Fprau* or M89 for 2 days. *Ido1* transcription was highly increased by exposure to *Fprau* and much less by M89 (Supplementary Fig.2).

We next explored how IL-12p70 subunits were affected by *Fprau*. Indeed, both subunits are regulated by distinct pathways, among which the activation of NF- $\kappa$ B induces the IL-12p40 (Ma et al., 2004) and the IFN $\beta$ /IFNAR amplification loop induces the IL12-p35 (Gautier et al., 2005; Godefroy et al., 2011). However, IFN $\beta$  secretion (Fig. 5e) and the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B subunits (Fig.5f) were similar in DC and DCF. Therefore, inhibition of IFN $\beta$  secretion or of NF- $\kappa$ B activation are not involved in the inhibition of IL-12 secretion by *Fprau*. We therefore investigated alternative mechanisms shown to be involved in IL-12p35 and p40 inhibition.

It has been shown that chronic stimulation of *nod2* in macrophages down-regulates the secretion of pro-inflammatory cytokines induced by PRR (Zheng et al., 2015). We tested whether a short exposure to *Fprau* of day 6 iDC blocked LPS-induced IL-12 production. In this condition, the production of IL-12p35 and p40 were not affected (Supplementary figure 3a). Therefore, chronic *nod2* stimulation remains a potential mechanism for *Fprau*-mediated inhibition of pro-inflammatory cytokines. To further address this question and evaluate the immune-modulatory potential of *Fprau* in Crohn's disease, we analyzed the maturation and cytokine secretion by DC of Crohn's disease (CD) patients bearing or not the *3020insC nod2* loss of function mutation.

#### ***Fprau* down-modulates the maturation and pro-inflammatory cytokine secretion of DC from Crohn's disease patients bearing or not the *3020insC nod2* mutation**

*Fprau* induced the secretion of IL-10 by iDC from *nod2*wt patients, but failed to induce this cytokine by DC from *nod2*-mutated patients (Fig. 6a), in accordance with the known defect of these patients to secrete IL-10 (Noguchi et al., 2009). Nonetheless, as healthy donor DC, all patient's DC exposed to *Fprau* failed to up-regulate CD40 and CD83 (Fig. 6b) and to express the IL-12 chains (Fig 6c), and showed unaltered IL-10-secretion, upon LPS stimulation (Fig. 6d). Therefore, *Fprau* efficiently inhibits TLR4-dependent maturation including IL-12 secretion in DC from Crohn's disease patients in a *nod2* independent manner.

## DISCUSSION

T cell secreting IL-10 play a major role in preventing inappropriate immune responses to commensal microbes (Roers et al., 2004; Rubtsov et al., 2008) that develop in IBD (Kostic et al., 2014). In this context, the presence of *Fprau*-specific IL-10 secreting Treg in the colon mucosa and their decrease in IBD patients (Sarrabayrouse et al., 2014), together with the diminution of this bacterium (Frank et al., 2007; Martinez-Medina et al., 2006; Sokol et al., 2008) points out to Treg induction by *Fprau* as a mechanism of gut homeostasis. Therefore, understanding how *Fprau* induces IL-10-secreting T cells, and whether it may happen in IBD patients, are crucial questions.

Here we showed that exposure of differentiating DC to *Fprau* induced these cells to acquire characteristics of tolerogenic DC, as shown by their limited up-regulation of maturation markers (Fig 2) and lack of pro-inflammatory cytokine secretion in response to LPS (Fig 3). Moreover, it endowed these cells with a high ability to prime IL-10- at the expense of IFN-g and IL-13-secreting-T cells. These effects were not induced by a short contact of differentiated iDC with *Fprau* suggesting that their induction relied on DC exposure to the bacterium at an early stage of their differentiation or for a sufficient time. We also showed that most of these effects were not induced by butyrate, the major *Clostridium* metabolite, which contributes to Treg induction in the mouse colon (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013). As far as *Fprau* is present in the colon mucosa (Lopez-Siles et al., 2015; Sokol et al., 2008), such a modulation of DC may take place *in vivo* and could be mandatory to prime IL-10-secreting Treg.

*Fprau* depletion in the colon mucosa and fecal microbiota of adult CD patients is amply documented (Lopez-Siles et al., 2015; Pascal et al., 2017; Sokol et al., 2008). Although its role in the pathogenesis is unknown, the anti-inflammatory properties of this bacterium (Quevrain et al., 2016; Sokol et al., 2008), and its ability to induce or stimulate DP8 $\alpha$  Treg (Sarrabayrouse et al., 2014) suggest that restoration of normal *Fprau* counts should be explored as a therapeutic approach in IBD. In this context, we asked if the tolerizing effects of *Fprau* shown here is effective on DC from CD patients including patients homozygous for the *3020insC nod2* mutation. We showed that *Fprau* inhibited LPS-induced up-regulation of CD40 and CD83, IL-12p40 and p35 production in these cells. Since high secretion of TNF $\alpha$ , IL-12 and IL-23 (composed of the IL12p40) and high expression of CD40 are major contributors to IBD pathogenesis (Park et al., 2017), their inhibition by *Fprau* should be highly relevant towards disease prevention or treatment.

Another marked effect of *Fprau* was the induction of IL-10 secretion by differentiating DC from healthy donors and nod2wt patients. However, this effect was not observed in DC from patients homozygous for the *3020insC nod2* mutation that also failed to secrete IL-10 in response to LPS. Defective secretion of IL-10 by myelomonocytic cells of these patients has already been reported and shown to result from the active inhibition of IL-10 transcription by this nod2 variant (Noguchi et al., 2009).

Suggestive of the IL-10 role in the tolerization of DC by *Fprau*, DC differentiated in presence of this cytokine become tolerogenic and induce anergic or regulatory T cells (Groux et al., 1997; Steinbrink et al., 1997). Results from our IL-10-blocking experiments indeed suggested a contribution of this cytokine to the maturation inhibition. However, they did not restore IL-12 secretion, suggesting that inhibition of this cytokine was IL-10-independent. In accordance, *Fprau* inhibited the secretion of IL-12 without inducing IL-10 secretion by DC bearing the *3020insC nod2* variant.

Several immuno-regulatory effects on DC were *Fprau*-specific as they were not or poorly induced by exposure to *C ramosum* and *C symbiosium*. This was the case for IL-10 induction in iDCF, the inhibition of LPS-induced DC maturation and the priming of IL-10 secreting T cells. In contrast, similarly to *Fprau*, these bacteria inhibited IL-12 production induced by LPS. Together, these data suggest that the high IL-10+ T cell priming ability of DCF does not only depend on pro-inflammatory cytokine inhibition but may depend on the IL-10 secretion at the immature stage and/or the inhibition of maturation markers: CD80, 83, 86 and CD40 significantly induced by *Fprau* only. Alternatively, DC alteration could be due to the production of inhibitory molecules such as HO-1 or IDO. Nonetheless, *Fprau* exposure did not induce HO-1 expression by iDC or mature DC. In contrast *Fprau*, and to a lesser extent, *C symbiosium* (M89), induced *ido1* transcription by iDC (Suppl Fig.2c)

The complete inhibition of IL-12 secretion in DC exposed to the three clostridia is especially puzzling. Inhibition of IL-12p35 and p40 secretion can be induced through NF- $\kappa$ B inhibition (Ma et al., 2004) or by defective IFN $\beta$  secretion preventing the IFNAR/IFN $\beta$  amplification loop (Gautier et al., 2005; Godefroy et al., 2011). Alternatively, it could result from an increased nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B p50/p50 inhibitory dimer (Oeckinghaus et al., 2011; Tomczak et al., 2003). Our results suggest that these mechanisms were not involved, as both nuclear translocation of NF- $\kappa$ B subunits and IFN- $\beta$  secretion were identical in both untreated and *Fprau*-exposed DC. Interestingly, this anti-inflammatory mechanism was thus different from the one observed with *Fprau* supernatant and *Fprau*-produced MAM protein on intestinal epithelial cells that is, at least partially, NF- $\kappa$ B-mediated (Quevrain et al., 2016; Sokol et al., 2008).

Chronic *nod2* stimulation remains a potential mechanism for the inhibition of IL12 secretion by *Fprau*, as in macrophages (Zheng et al., 2015). Indeed, this inhibition was not induced by a short exposure to the bacteria. Moreover, IL-12 inhibition in DC bearing the *3020insC nod2* mutation, does not exclude this hypothesis since this mutation encodes a variant but not a loss of function protein (Noguchi et al., 2009).

Alternatively, inhibition of pro-inflammatory cytokine production by DC may result by simultaneous triggering by *Fprau* of various PRR. In particular, TLR2 stimulation together with TLR4 and TLR7/8 stimulation has been shown to inhibit the release of TNF $\alpha$  and IL-12p70 by human DC, resulting in an altered T cell priming (Wenink et al., 2009). *F prau* expresses TLR2 but no TLR4 ligands (Rossi et al., 2016). Moreover, *Fprau* likely expresses fucosylated ligands of DC-SIGN, as a gram+ bacterium (Miquel et al., 2013). Supporting such expression, DC-SIGN was down-regulated from the surface of DC following their exposure for 24-48h to *Fprau*. This down-regulation barely occurred in DC exposed to M88 or M89 (Supplementary Figure 3), suggesting its *Fprau*-specificity. However, blocking TLR2 on differentiating DC before and during *Fprau*-exposure as well as pre-treating *Fprau* with a recombinant DC-SIGN protein failed to restore IL-12 secretion in response to LPS. This suggests that IL-12 inhibition is mediated by a TLR2 and DC-SIGN-independent pathway. TLR2 and DC-SIGN blocking neither inhibited IL-10 secretion by *Fprau*-exposed immature DC. In contrast, expression of the maturation markers CD40 and CD83 was partially restored in these experiments. Maturation markers were also partially restored by blocking the IL-10/IL-10R pathway, advocating for the contribution of several *F prau*-induced mechanisms in the inhibition of DC maturation, including one dependent on TLR2 engagement and another one on IL-10.

The impact of commensal bacteria on DC has been previously studied by exposing already differentiated DC to the bacteria, with/without a maturation stimulus (Amar et al., 2015; Davies et al., 2009; Konstantinov et al., 2008; Rossi et al., 2016; Smits et al., 2005). In these conditions, relatively limited modulations of IL-10 and IL-12 and/or of maturation were reported. In this set-up, *Fprau* had no impact on LPS-induced cytokine secretion and maturation (Supplementary figure 2a and data not shown). Therefore, the strong modulation of DC function by *Fprau* requires prolonged contacts between the bacteria and DC progenitors or iDC. The physiological relevance of this tolerizing interaction is supported by the presence of significant *Fprau*-levels of in the colon mucosa of healthy donors and their decrease in IBD (Lopez-Siles et al., 2015; Sokol et al., 2008).

We did not study the regulatory functions of IL-10 secreting T cells induced by *F prau*-exposed DC, since induction of a full regulatory program likely relies on additional environmental cues from the colon mucosa, lacking in our cultures. Nonetheless, the induction by *F prau* of TolDC that efficiently prime IL-10 secreting T cells is potentially important for the maintenance of colon homeostasis and IBD prevention, as suggested by the worse prognosis of CD patients with decreased levels of the bacteria.

In conclusion, our data demonstrate for the first time that *Fprau*, a major component of the human gut microbiota, already known to exert anti-inflammatory properties, strongly modulate DC functions conferring anti-inflammatory and tolerizing properties to these cells and concurrently a strong ability to prime IL-10 producing T cells. Importantly, *F prau* similarly modulated DC from CD patients. Other tested clostridia only partly shared these effects and in particular did not efficiently prime IL-10-secreting T cells.

Altogether, these data identify tolerogenic DC induction by *Fprau* as one of the mechanisms that may explain how a balanced microbiota may influence the prevention or control of IBD. Moreover they strongly suggest that the dominant induction of human colonic DP8 $\alpha$  Treg by *Fprau* results from the unique ability of this bacterium to tolerize DC. Even if future studies will be required to understand the molecular mechanisms of this effect, identification of such mechanisms will for sure pave the way for the development of treatments for diseases resulting from defective gut tolerance.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Antibodies, cytokines and reagents

We used PE-labeled Ab to CD40 (clone 5C3), CD80 (clone L307.4), CD83 (clone HB15e) and DC-SIGN (clone DCN46), from Becton Dickinson (BD), and anti-CD86-PE (clone HA5.2B7), -CD3-PB (clone UCHT1) -CD8-APC (clone B9.11), -CD4-FITC (clone 13B8.2) from Beckman Coulter. For intracellular staining, we used anti-IL-12p35-PE (clone REA121, Milteny Biotech), anti-IL-12p40-APC (clone C11.5, BioLegend), anti-IL-10-PE (clone JES3-19F1, BD), anti-IFN-g-APC (clone B27, BD) and anti-IL-13-PE (clone JES10-5A2, BD).

For blocking experiments, we used rat neutralizing Ab to IL-10 (10 µg /ml, BD), IL-10R (10 µg /ml, R&D Systems), TLR2 (10µg/ml, InvivoGen) and TLR4 (10µg/ml, R&D Systems) and recDC-SIGN (5µg/ml, R&D Systems).

### Bacteria

*Faecalibacterium prausnitzii* A2–165, (*Fprau*) *Clostridium ramosum* DSM1402, (M88), and *Clostridium symbiosum* DSM934, (M89), were grown as described elsewhere (Sarrabayrouse et al., 2014). The number of bacteria was determined using the conversion factor  $1,3 \times 10^8$  bacteria/ml/OD<sub>600</sub> unit.

### Generation of DC

This study was approved by the ethics committee of the Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV (Suivithèque). All the patients signed informed consent forms (see Table I for patients characteristics). PBMC were isolated by Ficoll gradient centrifugation from healthy donors (EFS, Nantes, France) and IBD patients (see Table I for patients characteristics). Monocytes, purified using CD14 microbeads (Miltenyi) were differentiated into immature DC (**iDC**) by a 6 day-culture with rhGM-CSF (500 IU/ml) and rhIL-4 (300IU/ml), in the presence or not of bacteria (ratios 1:5, 1:1 or 5:1) and or butyrate (145µM). At d6, iDC were stimulated by ultrapure LPS-E.coli (InvivoGen, 200ng/ml) with or without rhIFN $\gamma$  (Milteny Biotech, 1000IU/ml) for 24h.

### Isolation of naïve and memory CD4+ T cells

Naïve or total CD4+ T cells were isolated from PBMCs using negative selection kits (MACS eBioscience).

### CD4 T cell priming and responses

CD4 T cells were stained with Violet Proliferation Dye 450 (VPD) (BD Bioscience, 1µM) and co-cultured with allogeneic DC (ratios 20:1 or 50:1) differentiated or not with *Fprau* and then matured by LPS (**DC and DCF respectively**). After 10d, CD4+ T cells were re-stimulated with CD3/CD28 coated beads (Gibco) (ratio 1:3) for 6h for IFN- $\gamma$  and IL-13 staining or 24h for IL-10 staining, in the presence

of BFA for the last 5h. T cell proliferation was evaluated by measuring the % of T cells having diluted the VPD.

### **Flow cytometry**

Cell surface staining, was done at 4°C in PBS 0,1 %BSA. Results are expressed as Relative fluorescence intensity (RFI).

For intracellular staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10min, and stained for 30min at RT in PBS 0,1% BSA 0,1% saponin. Fluorescence was measured on a Canto II flow cytometer and analyzed using Diva software (BD).

### **ELISA-based assays**

DC supernatants were frozen at -80°C until analysis. The level of IL-10, TNF $\alpha$ , IL-12p70 (eBioscience) and IFN- $\gamma$  (pbl Assay Science) was determined in DC supernatants by specific sandwich ELISA according to the manufacturer's guidelines.

For detection of NF- $\kappa$ B activation, iDCs were matured for 2h with LPS. Nuclear extracts were prepared using the Nuclear Extraction Kit (Active Motif, USA) and tested for their content in NF- $\kappa$ B transcription factors using the TransAM NF- $\kappa$ B Family Kit (Active Motif).

### **Statistics**

Two-tailed Student's t-tests were performed for paired measurements with GraphPad Prism software.  $p < 0.05$  were considered significant.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

J.A. performed, analyzed and interpreted experiments as well as contributed to the manuscript ; E.G. contributed to some experiments, the study organization and discussions ; G.S. contributed to the study organization and discussions; C.B. provided bacteria. K.Y. allowed for HO-1-related experiments. H.S. provided IBD patients and contributed to the manuscript. F.A. contributed to study design and discussions ; F.J. supervised the project and wrote the manuscript. E.G., F.A. J.A. and F.J. edited the manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the members of Frederic Altare's laboratory (INSERM U1232), Euloge Ekaza and Grâce Ada Da Silva for technical help and discussions. We also thank Quentin Boulord for technical assistance. This work was supported by the ANR 2015 Microbiota-induced T<sub>REG</sub> and ARMINA consortium (Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses Nantes-Angers) of La Région des Pays de la Loire, France (grant no. 201209680).

## **CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE**

There are none to declare

## REFERENCES

- Amar, Y., Rizzello, V., Cavaliere, R., Campana, S., De Pasquale, C., Barberi, C., Oliveri, D., Pezzino, G., Costa, G., Meddah, A.T., *et al.* (2015). Divergent signaling pathways regulate IL-12 production induced by different species of Lactobacilli in human dendritic cells. *Immunol Lett* *166*, 6-12.
- Anderson, A.E., Sayers, B.L., Haniffa, M.A., Swan, D.J., Diboll, J., Wang, X.N., Isaacs, J.D., and Hilkens, C.M. (2008). Differential regulation of naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* *84*, 124-133.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., *et al.* (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* *504*, 451-455.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* *500*, 232-236.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* *331*, 337-341.
- Chauveau, C., Remy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., *et al.* (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* *106*, 1694-1702.
- Coombes, J.L., and Maloy, K.J. (2007). Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* *19*, 116-126.
- Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* *166*, 4312-4318.
- Davies, J.M., Sheil, B., and Shanahan, F. (2009). Bacterial signalling overrides cytokine signalling and modifies dendritic cell differentiation. *Immunology* *128*, e805-815.
- Escobar, A., Aguirre, A., Guzman, M.A., Gonzalez, R., Catalan, D., Acuna-Castillo, C., Larrondo, M., Lopez, M., Pesce, B., Rolland, J., *et al.* (2014). Tolerogenic dendritic cells derived from donors with natural rubber latex allergy modulate allergen-specific T-cell responses and IgE production. *PLoS One* *9*, e85930.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13780-13785.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., *et al.* (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446-450.

Garcia-Gonzalez, P.A., Schinnerling, K., Sepulveda-Gutierrez, A., Maggi, J., Hoyos, L., Morales, R.A., Mehdi, A.M., Nel, H.J., Soto, L., Pesce, B., *et al.* (2016). Treatment with Dexamethasone and Monophosphoryl Lipid A Removes Disease-Associated Transcriptional Signatures in Monocyte-Derived Dendritic Cells from Rheumatoid Arthritis Patients and Confers Tolerogenic Features. *Front Immunol* **7**, 458.

Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E.E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* **201**, 1435-1446.

Godefroy, E., Manches, O., Dreno, B., Hochman, T., Rolnitzky, L., Labarriere, N., Guilloux, Y., Goldberg, J., Jotereau, F., and Bhardwaj, N. (2011). Matrix metalloproteinase-2 conditions human dendritic cells to prime inflammatory T(H)2 cells via an IL-12- and OX40L-dependent pathway. *Cancer Cell* **19**, 333-346.

Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., and Geijtenbeek, T.B. (2009). Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat Immunol* **10**, 1081-1088.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742.

Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., and Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **60**, 631-637.

Knights, D., Lassen, K.G., and Xavier, R.J. (2013). Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* **62**, 1505-1510.

Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., *et al.* (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19474-19479.

Kostic, A.D., Xavier, R.J., and Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* **146**, 1489-1499.

Li, D., Romain, G., Flamar, A.L., Duluc, D., Dullaers, M., Li, X.H., Zurawski, S., Bosquet, N., Palucka, A.K., Le Grand, R., *et al.* (2012). Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J Exp Med* **209**, 109-121.

Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Abella, C., Busquets, D., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Aldeguer, X., Flint, H.J., and Garcia-Gil, L.J. (2015). Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Appl Environ Microbiol* **81**, 7582-7592.

Ma, W., Gee, K., Lim, W., Chambers, K., Angel, J.B., Kozlowski, M., and Kumar, A. (2004). Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic

cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol* 172, 318-330.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., *et al.* (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275-1283.

Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., and Garcia-Gil, L.J. (2006). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 12, 1136-1145.

Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., and Langella, P. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 16, 255-261.

Monteleone, I., Platt, A.M., Jaensson, E., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2008). IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function. *Eur J Immunol* 38, 1533-1547.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-1870.

Noguchi, E., Homma, Y., Kang, X., Netea, M.G., and Ma, X. (2009). A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol* 10, 471-479.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12, 695-708.

Park, J.H., Peyrin-Biroulet, L., Eisenhut, M., and Shin, J.I. (2017). IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev* 16, 416-426.

Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., *et al.* (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 66, 813-822.

Quevrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermudez-Humaran, L.G., Pigneur, B., *et al.* (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415-425.

Re, F., and Strominger, J.L. (2004). IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 173, 7548-7555.

Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W., Gruber, A.D., Krieg, T., Rajewsky, K., and Muller, W. (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*, 1289-1297.

Rossi, O., van Berkel, L.A., Chain, F., Tanweer Khan, M., Taverne, N., Sokol, H., Duncan, S.H., Flint, H.J., Harmsen, H.J., Langella, P., *et al.* (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep* *6*, 18507.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., *et al.* (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* *28*, 546-558.

Sarrabayrouse, G., Alameddine, J., Altare, F., and Jotereau, F. (2015). Microbiota-Specific CD4CD8 $\alpha$  $\alpha$  Tregs: Role in Intestinal Immune Homeostasis and Implications for IBD. *Front Immunol* *6*, 522.

Sarrabayrouse, G., Bossard, C., Chauvin, J.M., Jarry, A., Meurette, G., Quevrain, E., Bridonneau, C., Preisser, L., Asehnoune, K., Labarriere, N., *et al.* (2014). CD4CD8 $\alpha$  $\alpha$  lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol* *12*, e1001833.

Smits, H.H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E.C., Schipper, K., van Capel, T.M., Zaat, B.A., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E.A., van Kooyk, Y., *et al.* (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* *115*, 1260-1267.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., *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*, 16731-16736.

Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Dore, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* *15*, 1183-1189.

Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* *159*, 4772-4780.

Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 685-711.

Tanoue, T., Atarashi, K., and Honda, K. (2016). Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* *16*, 295-309.

Tomczak, M.F., Erdman, S.E., Poutahidis, T., Rogers, A.B., Holcombe, H., Plank, B., Fox, J.G., and Horwitz, B.H. (2003). NF-kappa B is required within the innate immune system to inhibit microflora-induced colitis and expression of IL-12 p40. *J Immunol* *171*, 1484-1492.

Unger, W.W., Laban, S., Kleijwegt, F.S., van der Slik, A.R., and Roep, B.O. (2009). Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol* *39*, 3147-3159.

Wenink, M.H., Santegoets, K.C., Broen, J.C., van Bon, L., Abdollahi-Roodsaz, S., Popa, C., Huijbens, R., Remijn, T., Lubberts, E., van Riel, P.L., *et al.* (2009). TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol* *183*, 6960-6970.

Zheng, S., Hedl, M., and Abraham, C. (2015). TAM receptor-dependent regulation of SOCS3 and MAPKs contributes to proinflammatory cytokine downregulation following chronic NOD2 stimulation of human macrophages. *J Immunol* *194*, 1928-1937.

Zhong, H., Bao, W., Friedman, D., and Yazdanbakhsh, K. (2014). Hemin controls T cell polarization in sickle cell alloimmunization. *J Immunol* *193*, 102-110.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Exposure to *Fprau* alters DC ability to prime CD4 T cells.** VPD-stained naïve CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated by allogeneic LPS-matured-DCs exposed (DCF) or not (DC) to *Fprau* during their differentiation and restimulated by CD3/CD28-coated beads. **a** IL-10-secreting CD4 T cells are increased, **b,c**, IFN- $\gamma$ - and IL-13-secreting T cells respectively are decreased, after stimulation with DCF. Paired t test :  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$

**Figure 2. Exposure of differentiating DC to *Fprau*, but not butyrate, inhibits LPS-induced maturation.** **a-d**, expression by DC of CD40, CD80, CD83 and CD86, measured by flow cytometry. DC were differentiated in the presence or not of *Fprau* and/or butyrate for 6d and then matured for 24h with LPS. Results are presented as a mean +/- sem. p values as in Fig. 1.

**Figure 3. DC exposure to *Fprau* alters their cytokine profile from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory.** **a.** *Fprau*-exposure induced IL-10 secretion by iDC. **b.** LPS-induced IL10 secretion by DC exposed or not to *Fprau* or butyrate or both during their differentiation. **c-d.** DCF secrete little to no TNF $\alpha$ , and IL-12p70 upon LPS stimulation. **e.** IL-12p40 staining and IL-12p35/p40 co-staining of DCF. **f.** Representative IL-12p35/p40 co-staining of DC and DCF. IL-10 and IL-12p70 secretion were measured by ELISA, IL-12p35 and p40 production by intracellular staining. p values as in Fig.1.

**Figure 4. *Fprau*-mediated modulation of DC maturation and function is in part specific.** **a.** Priming by *Fprau*-, but not M88- or M89-exposed DC, induces IL-10-producing CD4 T cells. **b.** Bacteria-induced IL-10 secretion by iDC. **c.** Expression of CD80 and CD83 by mDC exposed or not to the indicated bacteria (**d**). Secretion of IL-12p70 by DC and DCF. **e-f.** IL-12 p40 staining and IL-12p35/p40 co-staining by mDC exposed to the indicated bacteria. p values as in Fig.1.

**Figure 5. Potential mechanisms for *Fprau*-mediated effects on DC function.** **a.** Blocking the IL-10/IL10R interaction partially restores the LPS-induced maturation of DCF, but **b.** does not restore IL-12p70 secretion. **c.** TLR2 and DC-SIGN, but not TLR-4-blocking partially restores LPS-induced CD83 expression. **d.** Expression of HO-1 by DC in the presence or not of *Fprau*. **e.** IFN-beta secretion by LPS-stimulated DC and DCF. **f.** Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B subunits in LPS-stimulated DC and DCF.

**Figure 6. *Fprau* similarly alters the functions of DC from Crohn's disease patients with no *nod2* mutation (*nod2* wt) or homozygous for the *3020insC nod2* mutation (*nod2* mutated), and from healthy donors.** Cytokine production and maturation were measured in DC exposed (F) or not (Ctrl) to *Fprau* at the beginning of their differentiation. **a.** IL-10 secretion by 2d iDC, **b, c, d** respectively CD83 and CD40 expression, IL12p40 and p35 expression and IL-10 secretion by LPS-stimulated DC.

	<b>Non-mutated patients (n=5)</b>	<b>Mutated patients (n=3)</b>
Age (years), median (min, max)	40 (31, 55)	28 (26, 64)
Female	1 (20%)	2 (67%)
<b><i>Treatment:</i></b>		
Infliximab	4 (80%)	3 (100%)
Azathioprine	1 (20%)	1 (33%)
Vedolizumab	1 (20%)	0 (0%)
<b><i>Montreal classification:</i></b>		
L1	3 (60%)	1 (33%)
L2	1 (20%)	1 (33%)
L3	1 (20%)	1 (33%)

**Table 1. Characteristics of IBD patients.** Mutated: homozygous for the Nod2 frame shift mutation (1007FS, rs2066847) without any at risk mutation for the other 2 main Nod2 SNP (rs2066844 and rs2066845).

## 1.2 Résultats complémentaires non intégrés à l'article

### 1.2.1 Matériels et méthodes

#### Origine des monocytes et différenciation en iDC

Nous avons utilisé des PBMC provenant de poches de concentré leuco plaquettaire (CLP) de donneurs sains de l'EFS (Etablissement Français du Sang) obtenus par gradient de Ficoll. Sur les PBMC obtenus, nous avons réalisé un premier Tri avec des billes magnétiques CD14<sup>+</sup> pour récupérer les monocytes à l'aide du kit de tri positif des cellules CD14 de chez Miltenyi. La deuxième étape a consisté à cultiver les monocytes dans une plaque 96 puits fonds plats à la concentration de 10<sup>5</sup> cellules /puits dans 100µl de 10% SVF (sérum du veau) 1%PSG (Péni-strepto +glutamine), puis nous avons ajouté ou non 100 µl du même milieu contenant la bactérie (10<sup>5</sup> bactéries/puits). Les iDC contrôles ont été obtenues par culture des monocytes avec de IL-4 (300U/ml) et du GM-CSF (1000 U/ml).

Pour tester l'effet de *F prau* sur la maturation des iDC, des monocytes ont été cultivés en IL-4 et GM-CSF et après 3 ou 5 jours nous avons chargé ou non les iDC avec les bactéries. L'expression des marqueurs CD80, 83 et 86 a été mesurée 48h plus tard.

#### Essais d'induction de DP8α *in vitro*

Brièvement, pour identifier le mécanisme d'induction de DP8α, nous avons stimulé une ou deux fois (à une semaine d'intervalle) des CD4 naïfs par des APC (monocytes, DC immatures ou DC matures) chargés ou non par *F prau* en présence de différents agents pouvant moduler la différenciation : TGF-β, IL-27, butyrate (145µM, cette concentration a été utilisée du fait de la toxicité des concentrations plus fortes que nous avons testés 250, 500 et 1000µM) ou différentes combinaison de ces molécules. Nous avons ensuite mesuré à J7 ou J14 et/ou après expansion sur feeders les cellules co-exprimant du CD8α.

#### Préparation des ARNm pour les Q-PCR

Nous avons préparé des cellules dendritiques immatures pour 4 donneurs avec les conditions suivantes : DC contrôle, DC *F* et DC M89. La différenciation a été faite pendant environ 36 heures. Sur chaque culot qui correspond à environ 2 à 3 millions, l'extraction des ARNm et les PCR quantitatives ont été réalisées par Jérôme Cayon de la plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire (PACeM) d'Angers Bâtiment IBS-IRIS. Selon le protocole intégré au Matériel et Méthodes de l'article 1

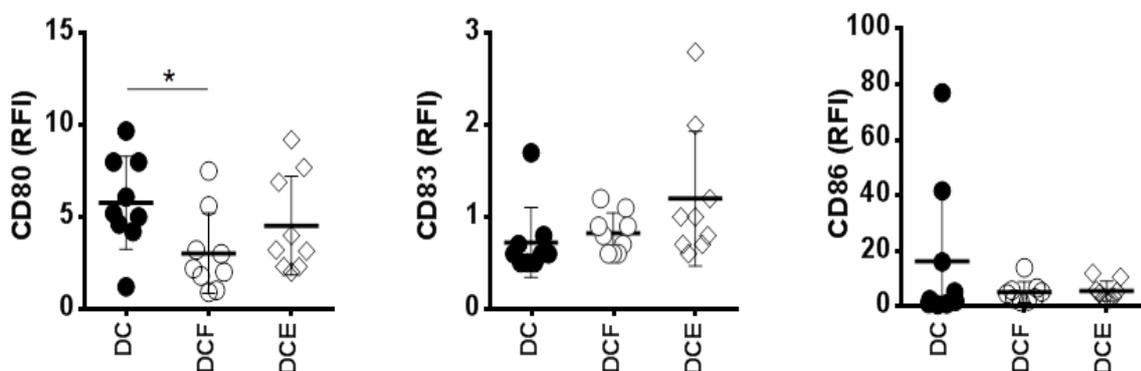
## 1.2.2 Recherche des effets de *F prau* sur les cellules dendritiques

Comme indiqué dans l'introduction de l'article 1, l'un des objectifs de ma thèse était de rechercher comment la bactérie *F prau* contribue à l'induction des lymphocytes T régulateurs DP8 $\alpha$  dans la muqueuse colique.

Connaissant le rôle des CD tolérogènes dans l'induction des lymphocytes régulateurs nous avons supposé que l'induction des DP8 $\alpha$  par *F prau* pouvait dépendre de la capacité de cette bactérie à induire des DC tolérogènes. Nous avons donc étudié si *F prau*, comparée à d'autres bactéries proches ou à *E coli* pouvait moduler la différenciation ou la maturation de DC dérivées de monocytes in vitro.

Les résultats de l'article 1 montrent que les DC différenciées en présence de la bactérie (ajoutée seulement à J0) acquièrent un phénotype et un profil cytokinique de DC tolérogènes et induisent la différenciation des CD4 naïfs en lymphocytes sécréteurs d'IL-10 potentiellement régulateurs au détriment de l'induction de lymphocytes sécréteurs d'IFN- $\gamma$  une cytokine produite par les Th17 pro-inflammatoires décrits dans le colon de souris (Honda et Littman 2016).

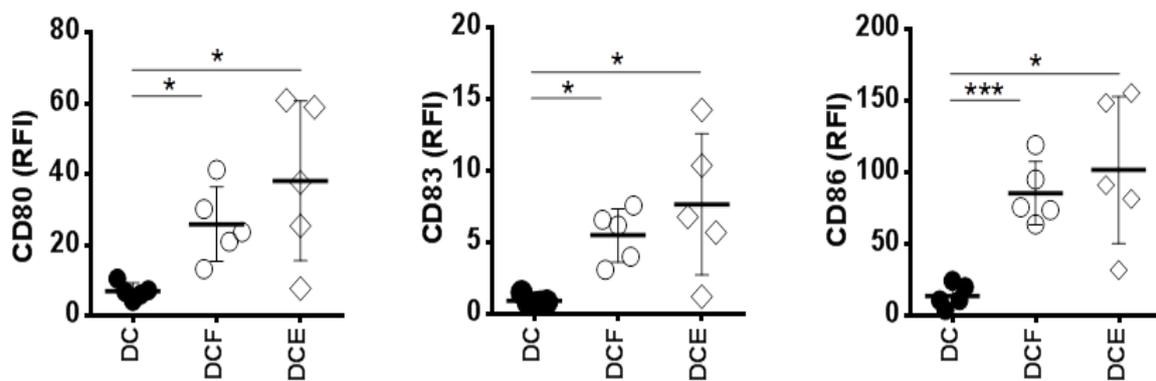
Des études antérieures de mon équipe ayant montré que des monocytes chargés par *F prau* induisaient une expression de CD8 $\alpha$  par des CD4 naïfs, significativement supérieure à celle induite par de monocytes chargés par *E coli*, la première question que nous avons posée a consisté à déterminer si la bactérie pouvait induire la différenciation des monocytes en DC immatures. Pour cela nous avons étudié l'expression de marqueurs des cellules dendritiques immatures et matures, CD80, 83 et 86, par des monocytes cultivés avec ou sans *F prau* ou *E coli* ou avec le cocktail GM-CSF/IL-4 pendant 3 jours. Les résultats montrent que *F prau* induit seulement une expression faible de CD80 et 86 par les monocytes, comparée à la condition GM-CSF/IL-4. De plus, le CD83 n'est pas ou peu induit dans aucune des 3 conditions (**Fig. 1**). Ces résultats montrent donc que *F prau* n'induit pas une différenciation des monocytes en DC.



**Figure 1.** *F prau* n'induit pas la différenciation de monocytes en DC. Les monocytes ont été différenciés pendant 3 jours en IL-4+ GM-CSF (DC) ou en présence de *F prau* ou de *E coli*.

L'expression de CD80, CD83 and CD86 a été évaluée par cytométrie en flux (canto) et exprimée en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

Nous avons ensuite voulu déterminer l'impact de *F prau* ajoutée à J3 d'une culture de monocytes avec le cocktail IL-4/GM-CSF sur la différenciation de ces cellules, comparé au cocktail seul ou en présence de *E coli*. Dans ces conditions *F prau* induit l'expression de CD80, 83 et 86 comparé aux cellules laissées sans stimulation bactérienne. *E coli* tend à avoir le même effet mais de façon moins significative (**Fig 2**). *F prau*, ainsi que *E coli*, induisent donc une vraie maturation des iDC.

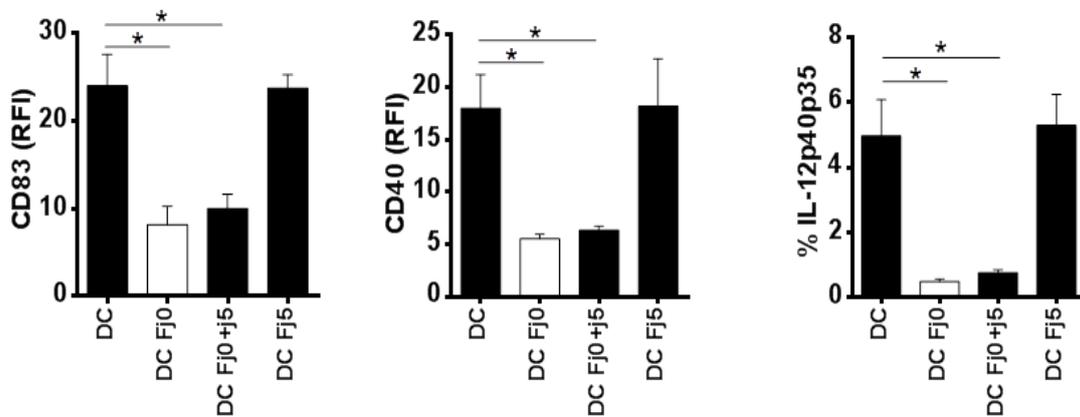


**Figure 2. *F prau* induit une maturation de DC.** Après 3 ou 5 jours de la différenciation des DC immatures à partir des monocytes en présence d'IL-4+ GM-CSF, nous avons ajouté aux cultures ou non *F prau* ou *E coli*. Puis l'expression de CD80, CD83 and CD86 a été évaluée par cytométrie en flux (canto) et est exprimée en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

Cet effet de maturation n'étant pas l'effet attendu d'une bactérie induisant des Treg, nous avons ensuite étudié si *F prau* pourrait avoir un effet tolérogène en étant ajoutée dès le début de la différenciation des monocytes par le mélange IL-4/GM-CSF. Une telle approche avait été utilisée pour montrer l'induction de DC tolérogènes par différentes molécules comme l'IL-10, la vitamine D3 ou la dexaméthasone (Naranjo-Gomez *et al.*, 2011). Par contre, cette approche n'avait pas été utilisée pour rechercher un effet immuno-modulateur de composants du microbiote, ces études s'étant limitées à regarder l'impact des bactéries ajoutées simultanément à, ou juste avant, un agent de maturation (Li *et al.*, 2014).

Nous avons alors observé l'effet tolérogène majeur de l'addition de *F prau* dès le début de la différenciation, effet que nous avons décrit dans l'article 1. Nous avons de plus étudié si l'effet inducteur de maturation, montré ci-dessus lors de l'addition de *F prau* aux DC différenciées 3 jours, pouvait neutraliser l'effet tolérogène de la bactérie ajoutée à J0. Pour cela, nous avons comparé la maturation induite par le LPS de DC exposées ou non à la bactérie à J0, J5 ou J0 et J5. La **Figure 3** montre que l'effet inhibiteur de maturation de la

bactérie à J0 n'est pas observé quand la bactérie est ajoutée à J5, et que l'addition de F à J5 ne neutralise pas l'inhibition de maturation induite par l'exposition à F à J0.

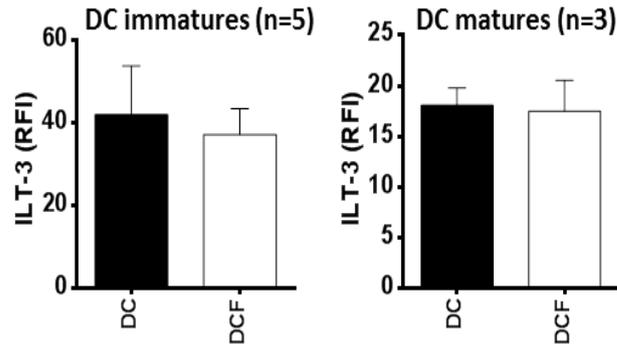


**Figure 3. La présence de *F prau* pendant la différenciation induit des DC tolérogènes en réponse au LPS** Les monocytes ont été différenciés en IL-4+ GM-CSF, en présence ou non de *F prau* ajoutée aux différents temps indiqués. A J5 les cellules dendritiques immatures ont été traitées par (LPS +/- *F ou F prau* seul). CD40, CD83 et IL-12p35p40 été évalués par cytométrie en flux (canto) et exprimés en RFI ou en % de cellules. Paired t tests:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,005$  \*\*,  $p < 0,0005$  \*\*\* mean +/-sem.

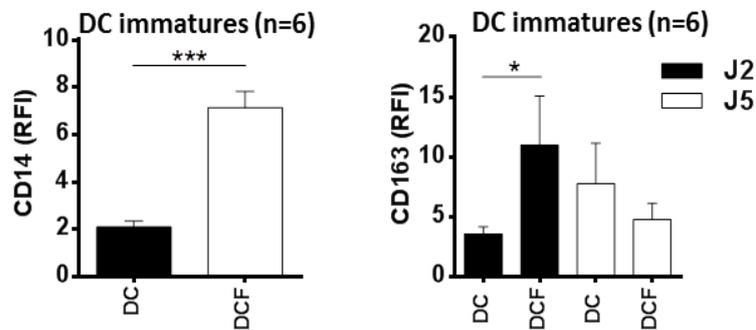
Les résultats de l'article 1 ayant montré que *F prau* inhibe la maturation et la fonction de priming des T effecteurs des DC maturées par le LPS, nous avons recherché de plus si les DC ainsi induites expriment des marqueurs ayant été rapportés comme étant exprimés par des cellules dendritiques ou des macrophages tolérogènes induits *in vitro* tels que : ILT3 induit sur les DC cultivées en IL-10 DC10, PDL1 , CD14 exprimé par les DC dérivées en présence de dexamétasone (DEX-DC) et CD163 exprimé par les macrophage suppresseurs de type M2 ou de marqueurs exprimés par des cellules dendritiques de l'intestin considérées comme naturellement tolérogènes tels que : SIRP $\alpha$ , CD103, ... $\beta$ 8 ( Steimle *et al.*, 2016).

ILT3 est une molécule régulatrice induite par les DC différenciées en présence d'IL-10. De façon étonnante étant donné la sécrétion d'IL-10 par les DC exposées à *F prau*, l'expression d'ILT3 par les iDC J2 et mDC J6 exposées à *F prau* est similaire à l'expression par les DC contrôles (**Fig. 4a**). Par ailleurs, les niveaux d'expression de CD14 et de CD163 sont plus élevés sur les iDC exposées à *F prau* pendant 2 jours mais que cette surexpression disparaît ensuite à J5 (**Fig. 4b**).

(a)

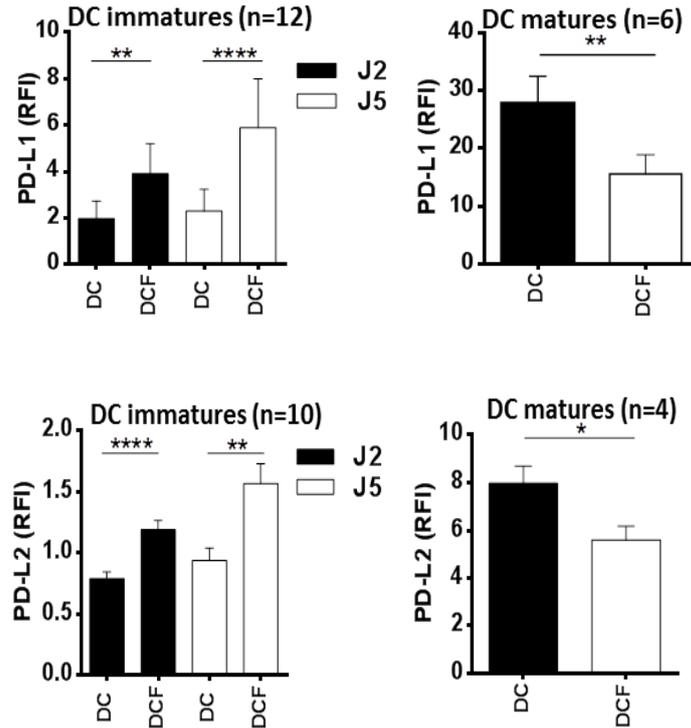


(b)



**Figure 4. (a) Absence d'effet de *F prau* sur l'expression d'ILT3 à J2 de la différenciation des DC et après maturation (b) *F prau* augmente l'expression de CD14 et CD163 sur les DC immatures à J2 mais pas à J5.** Les monocytes ont été différenciés en IL-4+ GM-CSF) en présence ou non de *F prau*, puis maturés ou non par le LPS. L'expression des marqueurs a été évaluée par cytométrie et exprimés en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

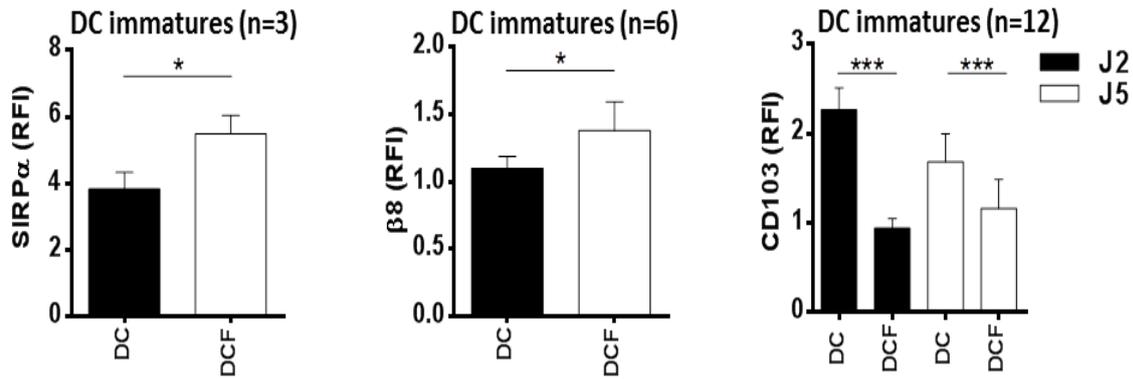
L'expression de PDL-1 par les DC contribue au développement, au maintien et à la fonction des pTreg (Francisco, 2009), nous avons donc étudié si cette molécule et PDL-2 sont induites sur les DC exposés à *F prau*. Comme le montre la **figure 5**, une augmentation de PDL-1 stable est induite par *F prau* à J2 et J5, de même qu'une augmentation de PDL-2 mais ce dernier est de très faible intensité. De plus, ces marqueurs sont par contre diminués après maturation des DC par le LPS. Nous n'avons pas regardé l'impact d'autres bactéries sur l'expression de ces marqueurs.



**Figure 5. *F prau* augmente PDL-1 et PDL-2 sur les DC différenciés pendant 2 et 5 jours, l'effet est inverse après la maturation.** Les iDC différenciés en IL-4+ GM-CSF, en présence ou non de *F prau*, ont été stimulés ou non par LPS. A J2 ou à J5 et J6 l'expression de ces marqueurs a été évaluée par cytométrie et est exprimée en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{****}$  mean +/-sem.

Concernant les marqueurs des DC intestinales tolérogènes, l'exposition à *F prau* semble augmenter, mais très faiblement leur expression : beta8, molécule impliquée dans l'activation du TGF- $\beta$  (Travis *et al.*, 2007) et SIRP1 $\alpha$  qui joue un rôle dans l'induction de Treg par les DC intestinales de souris (Steimle *et al.*, 2016). Par contre *F prau* n'induit pas l'expression de CD103 mais plutôt la diminue à J2 et J5 (Fig 6). CD103 est une molécule dont l'expression est induite par le TGF- $\beta$  (Yu *et al.*, 2013). Le TGF- $\beta$  est aussi un inducteur de Treg Foxp3<sup>+</sup>.

Suggérant que le TGF- $\beta$  n'est pas un inducteur des Treg DP8 $\alpha$  nous avons observé dans une étude préliminaire du transcriptome des DC exposées ou non à *F prau* l'augmentation par *F prau* des ARNm codant CD109 qui régule négativement la signalisation dépendante du TGF- $\beta$  et la diminution des ARN Mir 503 suppresseur de deux inhibiteurs de la signalisation par le TGF- $\beta$  (résultats non montrés).

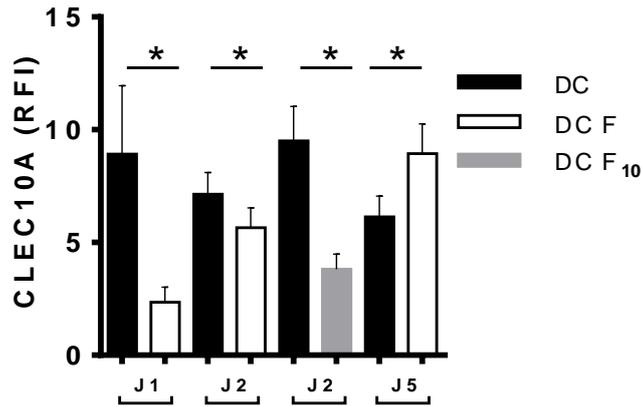


**Figure 6.** *F prau* induit l'expression de *SIRP $\alpha$*  et de  *$\beta$ 8* à J2 de la différenciation des DC, l'effet est inverse pour *CD103* (DC J2 et J5). Les monocytes ont été différenciés en IL-4+ GM-CSF en présence ou non de *F prau*. A J2 et J5 l'expression de ces marqueurs a été évaluée et est exprimée en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

### 1.2.3 Recherche de récepteurs CLR engagés par *F prau*

L'interaction des PAMP bactériens avec certains récepteurs d'endocytose de cette famille tel que CLEC10a ou CLEC12a induisent des signaux capables d'induire des caractéristiques tolérogènes des DC (van Vliet *et al.*, 2013). Nous avons regardé si *F prau* est ou non internalisée par CLEC10a et CLEC12a en comparant le niveau d'expression de ces CLR par les DC incubées 24 à 48h avec ou non la bactérie. Les résultats montrent une diminution significative de CLEC10a en présence de *F prau* à J1 et à J2 aux 2 rapports monocytes/ *F prau* utilisés (1:1 et 1:10), comparé aux DC contrôles. Par contre l'expression des CLEC10a est restaurée à J5. Ces résultats suggèrent que *F prau* interagit avec CLEC10a induisant sa down-régulation. Une interaction de la bactérie par ce récepteur est donc probable et pourrait contribuer à l'induction de DC tolérogènes (**Fig. 7**). Nous avons testé de la même façon si *F prau* induisait une down-regulation de CLEC12a. Aucune diminution de l'expression de ce récepteur n'a été observée (**résultats non montrés**).

Récemment une étude a souligné le rôle d'un autre récepteur de cette famille : Clec-4a ou DCIR en tant que récepteur de *Mycobacterium tuberculosis* induisant un fort effet anti-inflammatoires et en particulier une diminution de la sécrétion d'IL-12 (Troegeler *et al.*, 2017). Il serait intéressant de rechercher un rôle de ce récepteur dans l'effet tolérogène de *F prau*.

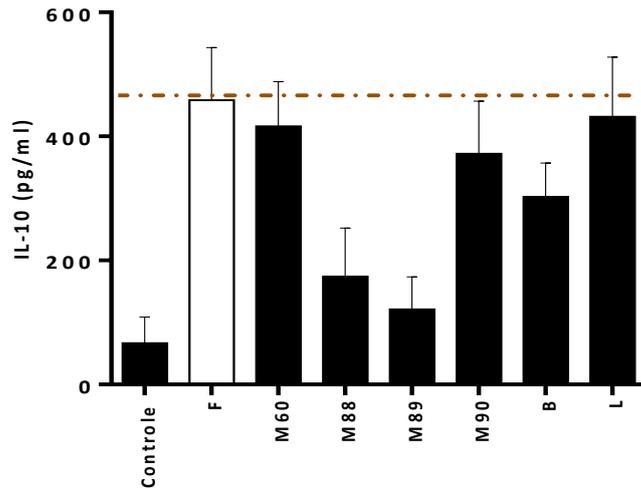


**Figure 7. *F prau* diminue l'expression de CLEC10a à J1, J2 mais pas à J5 de la différenciation.** Les monocytes ont été différenciés par un agent classique en IL-4+ GM-CSF, en présence ou non de *F prau*. A J2 ou à J5 l'expression de CLEC10a a été évaluée par cytométrie (canto) et exprimée en RFI. Paired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

#### 1.2.4 Etude de l'effet des autres bactéries sur l'induction de CD tolérogènes

Pour déterminer si l'impact de *F prau* sur les CD est ou non spécifique de cette bactérie nous avons différencié des DC en présence des bactéries suivantes: **M21** *Clostridium leptum*, **M60** *Subdoligranulum variabile*, **M68** *Roseburia intestinalis*, **M88** *Clostridium ramosum*, **M89** *Clostridium symbiosium*, **M90** *Clostridium Bolteae*, **M91** *Anaerotruncus colihominis* **L10** *Clostridium coccoides*, **B57** *Ruminococcus gnavus*, **L** *Lactobacillus casei* et **B** *Bacteroides thetaiotaomicron*. Certaines de ces bactéries sont connues par leurs effets régulateurs, M60 à des propriétés anti-inflammatoires (communication de Sokol H). Mais aussi B et L. De plus, les clostridium M88, M89, M90 et M91 induisent des Treg Foxp3 dans le colon de souris gnotobiotiques. Nous avons étudié l'effet de ces bactéries sur **l'induction d'IL-10 par les DC immatures** et sur l'expression de CD80, CD83 et CD86 et la sécrétion d'IL-10 et IL-12 par les DC en réponse au LPS.

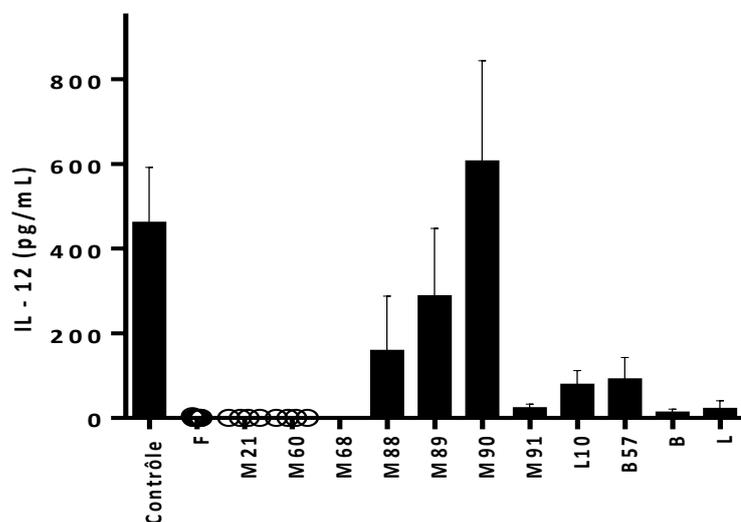
Les résultats de la **Fig. 8** montrent la sécrétion d'IL-10 induite par différentes bactéries. Seules M60 et Lactobacillus induisent une sécrétion d'IL-10 au même niveau que *F prau*. La production induite par M88 et M89 est significativement plus faible que celle induite par *F prau*.

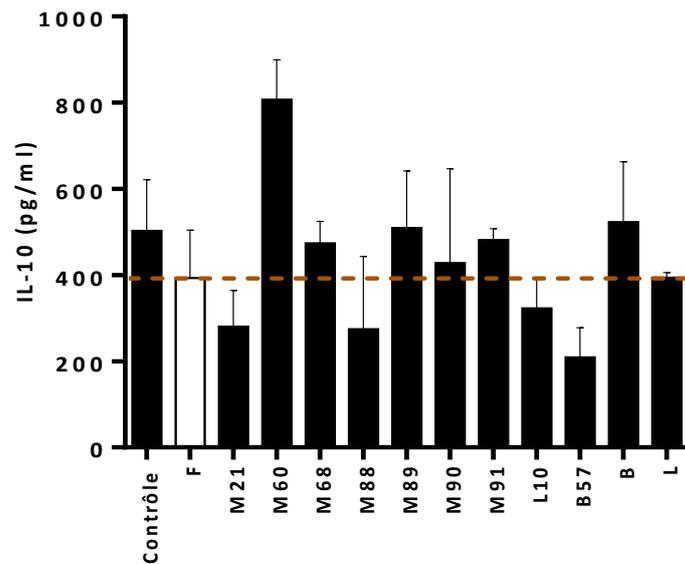
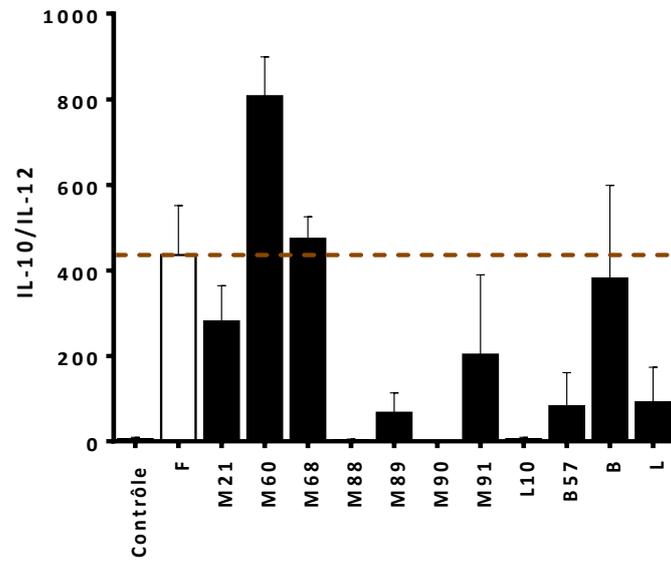


**Figure 7.** Concentration en IL-10 du surnageant des DC différenciées *in vitro* à partir des monocytes par l'ajout de GM-CSF+IL-4 pendant 48 h en présence ou non (ctrl) des différentes bactéries au rapport mono:bactérie 1:1 (n=9).

Nous avons ensuite étudié la sécrétion d'IL-10 et d'IL-12 par les DC différenciées en présence des différentes bactéries puis stimulées par le LPS à J6 pendant 24h. Les cytokines ont été mesurées dans les surnageants par ELISA

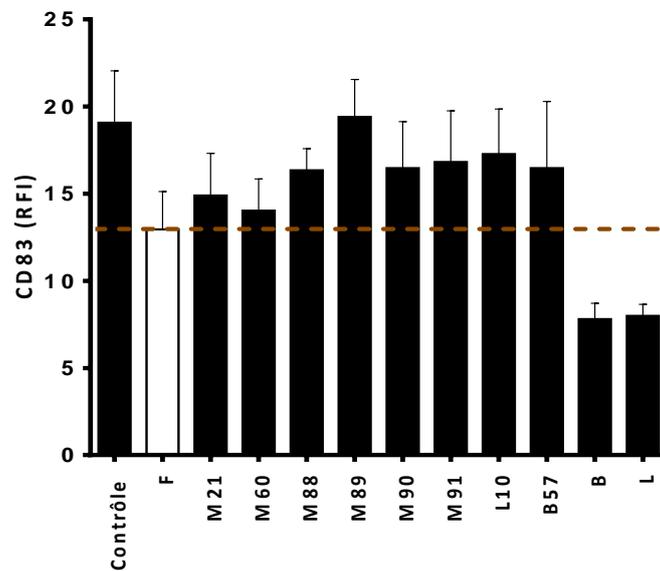
Les résultats de la figure 8 montrent que les DC différenciées en présence de *F prau* et des *Clostridium f prau* et 3 autres *Clostridium* M21, 60 et 68 ont une sécrétion d'IL-12 complètement bloquée et de ce fait un rapport IL-10/IL-12 aussi ou plus élevé que les DC différenciées en présence de *F prau*. De même le rapport IL-10/IL-12 est élevé pour la bactérie *Bacteroides*.



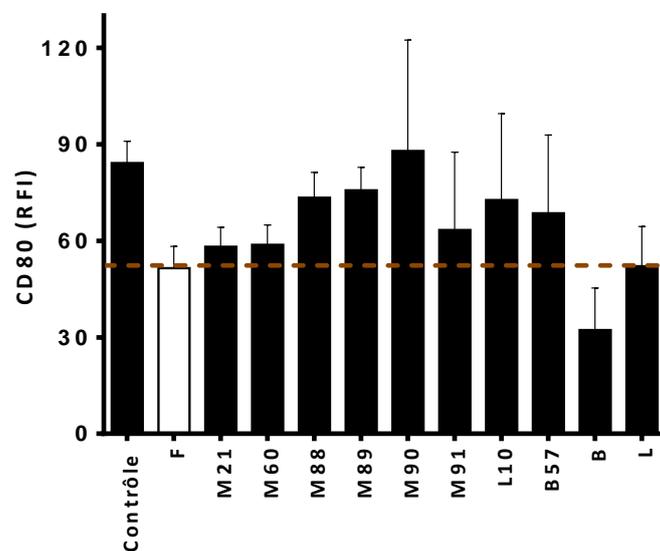


**Figure 9.** Concentrations en IL-12p70 (a) et en IL-10 (b) mesurées par ELISA des surnageants de DC différenciées *in vitro* à partir des monocytes par l'ajout de GM-CSF+IL-4 en présence ou non (ctrl) des bactéries et maturés par LPS (5 < n < 10). (c) illustre le rapport d'IL-10/IL-12.

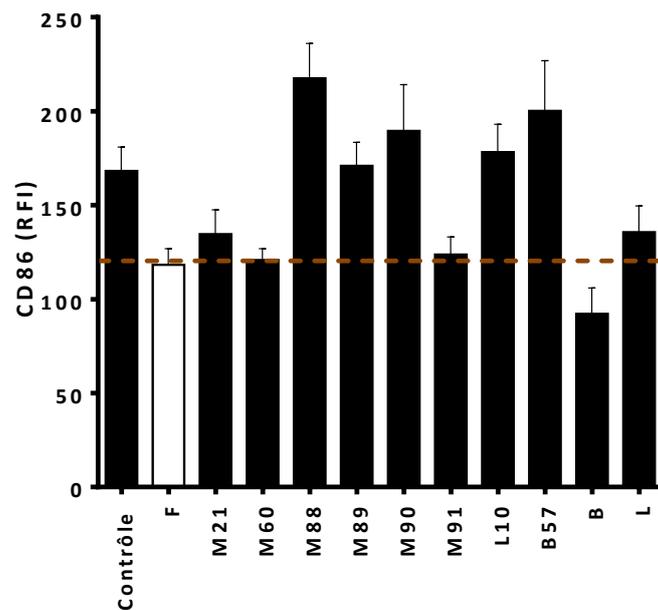
Nous avons aussi mesuré l'expression des marqueurs de maturation : CD80, 83 et 86 24h après stimulation par le LPS (**Fig. 10a, b et c**).



**Figure 10a.** Effets des différentes bactéries sur l'expression de CD83 par les DC différenciées en présence ou non (ctrl) de différentes bactéries puis stimulées par le LPS (5<n<10).



**Figure 10b.** Effets des différentes bactéries sur l'expression de CD80 par les DC différenciées en présence ou non (ctrl) de différentes bactéries puis stimulées par le LPS (5<n<10).



**Figure 10c.** Effets des différentes bactéries sur l'expression de CD86 par les DC différenciées en présence ou non (ctrl) de différentes bactéries puis stimulées par le LPS (5<n<10).

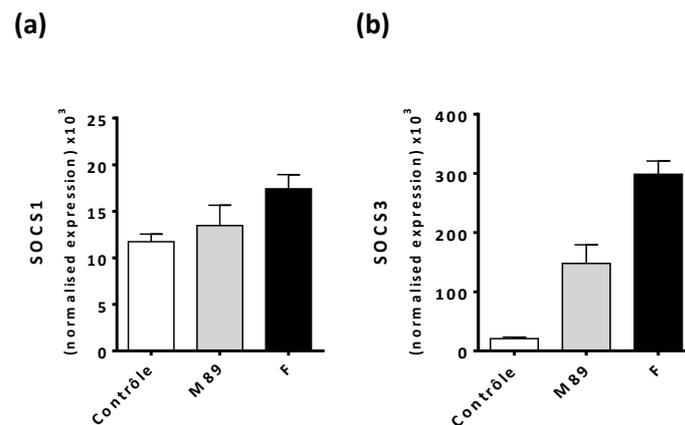
Les résultats des figures 10a, 10b et 10c montrent que *F prau*, *Bacteroides* et *Lactobacillus* inhibent le mieux les 3 marqueurs. Cependant les *Clostridia* M21, 60 et 68 inhibent au même niveau que *F prau* CD80 et 86. Une seule bactérie B partage donc avec *F prau* les 3 effets potentiellement importants pour la régulation du priming : l'inhibition de l'expression des 3 marqueurs de maturation et la sécrétion d'un rapport IL-10/IL-12 élevé. Cependant cette bactérie semble induire une production d'IL-10 plus faible par les DC immatures.

M60 et M68 induisent un rapport IL-10/IL12 élevé et inhibent aussi l'expression des marqueurs de maturation.

### 1.2.5 *F prau* induit la transcription par les DC immatures (36-40h) de molécules inductrices de Treg ou anti-inflammatoires.

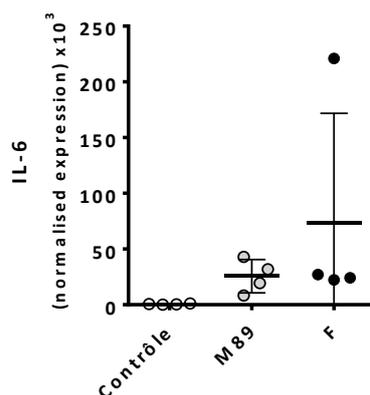
Nous montrons dans l'article 1 que les DC différenciées en présence de *F prau* acquièrent des propriétés tolérogènes, la plupart non induites par la bactérie *Clostridium* M89, mais les mécanismes de cet effet n'ont pas pu être identifiés. Nous avons donc débuté une étude comparative des DC cultivées ou non en présence de *F prau* ou de M89, en étudiant l'impact de ces deux bactéries sur la transcription de gènes codant pour des molécules connues pour leur implication dans la tolérance et qui pourraient nous renseigner sur les mécanismes d'action de *F prau* sur les DC :

- les protéines SOCS1 et SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling): sont des facteurs inhibiteurs de la signalisation par les cytokines. Ils permettent un rétrocontrôle négatif de ces signalisations en inhibant l'activation de JAK et STAT ou en se fixant sur le récepteur. Hanada *et al.* ont montré que l'expression de SOCS1 réduit la maturation des DC (Hanada *et al.*, 2003). Nous observons (**Fig. 11a**) que les DC exposées à *F prau* ne montrent pas d'augmentation des transcrits de cette molécule, comparées aux DC contrôles. Par contre, La transcription de SOCS3 est considérablement augmentée par *F prau* et à un niveau nettement moindre par M89 (**Fig. 11b**).



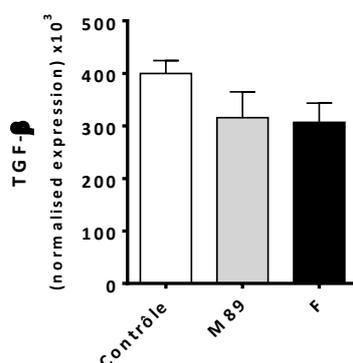
**Figure 11.** Expression relative de SOCS1 (a) et SOCS3 (b) par PCR quantitative en comparant différentes conditions d'obtention des DC après 2 jours de la différenciation (DC contrôle, DC *F prau* et DC M89 ; (n=4).

- **L'IL-6**, est une cytokine connue par son effet pro-inflammatoire. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, il a été suggéré que l'IL-6 peut contribuer à des fonctions régulatrices. La transcription de l'IL-6, semble être augmentée au même niveau dans les DC exposées à *F prau* et M89 comparées aux DC contrôles. Seul un donneur sur les 4 étudiés montre une transcription très augmentée de l'IL-6 dans les DC exposées à *F prau* (**Fig. 12**).



**Figure 12.** Expression relative de l'IL-6 par PCR quantitative en comparant différentes conditions d'obtention des DC après 2 jours de la différenciation (DC contrôle, DC *F prau* et DC *M89* ; (n=4).

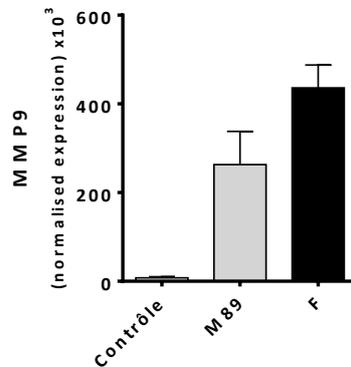
- **TGF- $\beta$**  : est la cytokine inductrice des Treg Foxp3 chez la souris. Aucune augmentation, voire une diminution légère de la transcription du TGF- $\beta$ , est observée après exposition à *F prau* et à *M89* comparé aux DC contrôles (**Fig.13**).



**Figure 13.** Expression relative du TGF- $\beta$  par PCR quantitative en comparant différentes conditions d'obtention des DC après 2 jours de la différenciation (DC contrôle, DC *F prau* et DC *M89* ; (n=4).

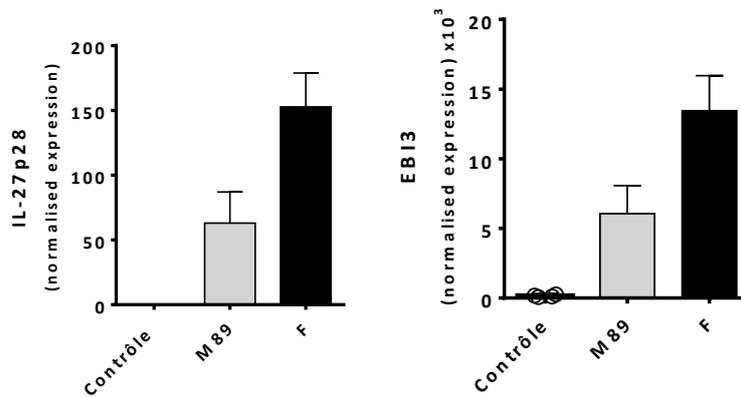
- MMP-2 et MMP-9 sont des métalloprotéines matricielles. Lors de l'induction de Treg Foxp3 dans le colon de souris axéniques par transfert de bactéries *Clostridium*, un rôle des MMP-2 et 9 et 13 a été suggéré lié à l'augmentation de la transcription de ces MMP dans l'épithélium intestinal de ces souris (Atarashi, 2011), et au rôle de ces MMP dans l'activation du TGF- $\beta$  latent (D'Angelo, 2001). Nous n'avons pas observé de transcription de MMP-2 dans aucune des DC étudiées (data not shown) tandis que les DC exposées à *F prau* ont une transcription très augmentée de MMP-9 (**Fig. 14**). Les données des Figures 12 et 13 montrent donc que *F prau* induit la transcription de MMP-9 mais n'a pas d'impact sur la transcription du TGF- $\beta$ . *F prau* pourrait cependant augmenter la production de TGF- $\beta$  actif à

partir du TGF- $\beta$  latent via la production de MMP-9 sans augmenter la transcription du TGF- $\beta$ . Une autre possibilité est que MMP-9 augmente les capacités de migration vers les formations lymphoïdes des DC exposées à *F prau* comme décrit (Yen et al., 2008)



**Figure 14.** Expression relative de MMP-9 par PCR quantitative en comparant différentes conditions d'obtention des DC après 2 jours de la différenciation (DC contrôle, DC *F prau* et DC *M89* ; (n=4).

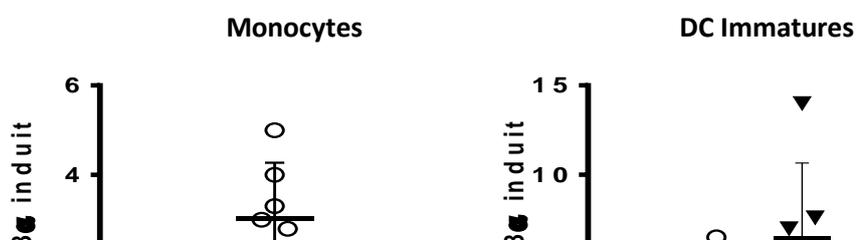
- L'IL-27 est une cytokine inductrice de la différenciation des Tr1 (Apetoh et al., 2010). Elle est composée des chaînes EB13 et de l'IL-27p28. Nous avons observé que *F prau* induit dans les DC une forte augmentation de la transcription des gènes codant ces deux chaînes alors que ces transcrits sont très rares ou absents dans les DC contrôles et que *M89* induit ces transcrits mais à un niveau plus de deux fois moindre, comparé à *F prau* (Fig. 15).



**Figure 15.** Expression relative de l'IL-27p28 et d'EB13 par PCR quantitative en comparant différentes conditions d'obtention des DC après 2 jours de la différenciation (n=4).

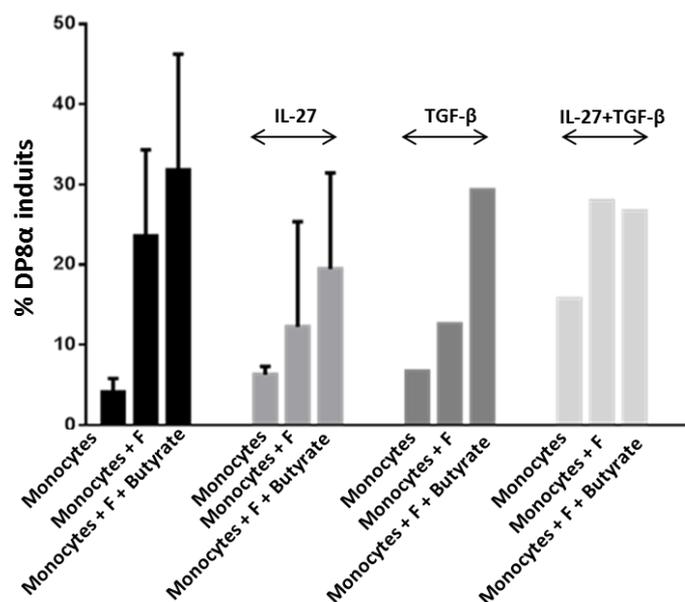
### 1.2.6 Etude de l'effet de *F prau* sur l'induction de DP8 $\alpha$

Nous avons tout d'abord voulu savoir si des lymphocytes DP8 $\alpha$  peuvent être induits à partir de lymphocytes T CD4 naïfs par une stimulation par des monocytes ou des iDC chargés par la bactérie. La stimulation par des monos ou des iDC chargés *F prau* induit l'apparition de lymphocytes DP8 $\alpha$  respectivement 1 à 5% et 2 à 6%, alors que les mêmes cellules chargées par *E coli* en induisent peu. Nous avons ensuite testé si deux stimulations successives par ces cellules pouvaient augmenter cet effet. Nous n'avons observé aucune augmentation. (Résultats non montrés) (**Fig. 16**). Cette figure montre que la stimulation par les iDC en présence de butyrate induit également l'apparition de lymphocytes DP8 $\alpha$  sur un % de cellules supérieur à celui induit par *F prau*.



**Figure 16: Quantification des DP8 $\alpha$  parmi les CD4 naïfs cultivés 5j ou 7j avec des monocytes ou iDC chargés ou non par *F prau* +/- butyrate ou *E coli*.**

Nous avons également testé l'impact des cytokines IL-27 et TGF- $\beta$ , inductrices de Treg, seules ou combinées et associées ou non au butyrate sur l'induction de lymphocytes DP8 $\alpha$  (**Fig. 17**) Les résultats suggèrent que ces deux cytokine et leur combinaison n'augmentent pas le % de lymphocytes DP8 $\alpha$  mais semblent confirmer la capacité du buyrate à augmenter le % de ces cellules. Nous avons ensuite confirmé le caractère stable du phénotype DP8 $\alpha$  induit, en obtenant des lignées de ces cultures par passages des cellules nourricières (EBV-B et PBMC allogéniques irradiés additionnés de PHA).



**Figure 17: Quantification des DP8 $\alpha$  parmi les CD4 naïfs cultivés pendant 14 jours avec des monocytes chargés ou non par *F prau* +/- : butyrate, TGF- $\beta$  et IL-27.**

## **2- Caractérisation et rôle physiologique des lymphocytes T CD4CD8 $\alpha$ circulants réactifs à la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii*.**

Les données de la littérature ont montré que des lymphocytes T double-positifs caractérisés par la co-expression de CD4 et de CD8 $\alpha$  (à un taux plus faible que celui exprimé par les lymphocytes T CD8 conventionnels) (ci-après appelés DP8 $\alpha$  sont présents chez l'homme dans le sang circulant et dans certains tissus (Parel et Chizzolini). Nous avons montré que dans le sang la fréquence de ces cellules parmi les CD3 est très variable (0,1 à près de 20%). Cependant, et de façon étonnante lié à leur forte fréquence chez certains donneurs, la signification fonctionnelle de ces populations reste inconnue. Certains travaux suggèrent la présence parmi ces cellules d'effecteurs anti-viraux (Nascimbeni *et al.*, 2004, Suni *et al.*, 2001) et, lié à leur augmentation dans certaines maladies auto-immunes, de lymphocytes auto-réactifs (Parel et Chizzolini 2004). La présence d'expansions clonales parmi ces cellules a été documentée, particulièrement en rapport avec une spécificité anti-virale (Suni 2001, Nascimbeni 2004). Par ailleurs, mon équipe d'accueil a montré la présence parmi les PBL CD4 CD8 $\alpha^{\text{low}}$ (DP8 $\alpha$ ) de lymphocytes réactifs à *F prau*, sécréteurs d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  et doués *in vitro* de propriétés régulatrices similaires à celles des Treg Foxp3 $^+$ . (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). Ces données montrent donc que certains PBL DP8 $\alpha$  sont des lymphocytes recirculants originaires du colon. Des essais de quantification de ces cellules ont été réalisés par mon équipe en mesurant la réponse proliférative à *F prau* des PBL DP8 $\alpha$  ) Ils montrent que 5 à 30% (en moyenne 10%) de ces PBL prolifèrent ce qui suggère que seule une fraction faible et très variable entre les individus des PBL DP8 $\alpha$  circulants est spécifique de *F prau* (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). La majorité des lymphocytes T DP8 $\alpha$  circulants sont donc constitués de sous-populations de spécificité et sans doute aussi de fonctions différentes.

Dans un premier temps nous avons voulu mieux apprécier la variabilité de la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  chez des donneurs sains en fonction de l'âge et du sexe. Ensuite ayant observé une diminution des PBL DP8 $\alpha$  chez les patients MICI (Sarrabayrouse *et al.*, 2014), maladie associée à une diminution de *F prau* dans le microbiote fécal, nous avons voulu rechercher si une diminution similaire était associée à d'autres maladies inflammatoires associées à des dysbioses, plus particulièrement à une diminution de *F prau* telle que la spondylarthrite (Stoll, 2015) l'obésité et le diabète (Le Chatelier E *et al.*, 2013), mais aussi chez des patients atteints de cancers colique (Chen, 2012) dont l'origine a été associée à une inflammation excessive . Pour cela nous avons établi des collaborations avec plusieurs médecins du CHU ayant fait ou non l'objet d'un essai clinique. Nous avons obtenu du Dr Jean Marie Bertelot le sang et les données cliniques de 20 patients atteints de spondylarthrite, du Pr Bertrand Cariou du sang et les données cliniques de 47 patients atteints d'obésité et de 15 patients atteints d'obésité et de diabète et de 20 patients pré-diabétiques. Enfin, en collaboration avec le Dr Emmanuel Montassier nous avons débuté un

essai clinique MILCA sur une vingtaine de patients atteints de cancers colique et d'un nombre équivalent de sujets contrôles d'âge apparenté.

Les résultats de la quantification des PBL DP8 $\alpha$  dans ces pathologies sont montrés ci-dessous. Ils montrent soit une légère tendance à la baisse de ces cellules soit pas de différences avec les donneurs contrôles, interne ou non. Dans l'étude MILCA la fréquence des PBL DP8AA $\alpha$  a été évaluée chez les patients et les contrôles par la plateforme de cytométrie du CHU (CIMNA). Ces fréquences ont été comparées à celles observées chez les donneurs sains d'âges équivalents étudiés par Aurélie Fétiveau dans notre équipe. L'étude de la fréquence des PBL DP8AA $\alpha$  chez les patients obèses et diabétique a été réalisée par moi au laboratoire et les données ont été comparées aux valeurs obtenues chez des donneurs sains d'âges équivalents provenant de l'EFS, étudiées par Aurélie Fétiveau, travail que j'ai encadré. Enfin la fréquence des PBL DP8AA $\alpha$  des patients atteint de spondylarthrite (SPA) a été mesurée par la plateforme du CHU et nous avons comparé les valeurs obtenues à celles de donneurs sains d'âges équivalents, obtenues dans notre laboratoire.

Ces résultats et ceux publiés (Sarrabayrouse *et al.*, 2014) ayant montré que les DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* représentent une proportion très variable des PBL DP8 $\alpha$  nous avons alors réalisé la nécessité d'identifier des marqueurs supplémentaires des PBL DP8AA $\alpha$  induits dans le colon, pour pouvoir rechercher des anomalies de la fréquence de ces cellules dans le sang associées à des maladies, qui pourraient suggérer un rôle physiologique de ces cellules dans la prévention de ces maladies. Les résultats de cette étude font l'objet du manuscrit 2 qui identifie CCR6 comme l'un de ces marqueurs des Treg DP8 $\alpha$  circulants spécifiques de *F prau*. Des résultats préliminaires d'Emmanuelle Godefroy, non encore intégrés au manuscrit 2 suggèrent qu'un facteur de transcription semble être un deuxième marqueur indispensable à la quantification des PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*. Une demande de brevet sur ces marqueurs est envisagée.

## 2.1 Article 2: « Characterization of recirculating human T<sub>REGS</sub> induced by the gut commensal *Faecalibacterium prausnitzii* »

Emmanuelle Godefroy<sup>1</sup>, Joudy Alameddine<sup>1</sup>, Juliette Desfrançois-Noël<sup>2</sup>, Nadège Marec<sup>2</sup>, Celine Bossard<sup>3</sup>, Anne Jarry<sup>3</sup>, Guillaume Sarrabayrouse<sup>4</sup>, Frédéric Altare<sup>1</sup> and Francine Jotereau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1232 ; IRS2 ; 22 boulevard Bénoni Goullin 44200 Nantes, France

<sup>2</sup> CytoCell ; IRS-UN ; 8 quai Moncoussu ; BP 70721 ; 44007 Nantes Cedex 1, France

<sup>3</sup> University of Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Barcelona, Spain

\* Corresponding author : Francine Jotereau

INSERM U1232

IRS2

22 boulevard Bénoni Goullin

44200 Nantes

France

[jotereau@nantes.inserm.fr](mailto:jotereau@nantes.inserm.fr)

+33 2 28 08 02 72

Running Title : Microbiota-specific DP8AA $\square$  T<sub>REGS</sub> express CCR6

Text: 2366 words; Abstract: 197 words ; 6 Figures ; X References

## KEY POINTS

- DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub>, induced in the colon by *Faecalibacterium prausnitzii*, can recirculate and keep identical functions
- Colonic and circulating *Faecalibacterium prausnitzii*-specific DP8 $\alpha$  preferentially express CCR6

## ABSTRACT

*Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*) is one of the most abundant commensal in the human gut. Its decrease in inflammatory diseases, and the prognostic value of this decrease in Crohn's disease suggest an important role of this bacterium in immune homeostasis. In support of this we have described the presence, in the colon and blood, of a Tr1-like regulatory T cell (T<sub>REG</sub>) population specific for this bacteria and decreased in IBD. These cells, named DP8 $\alpha$ , co-expressed CD4 and CD8 $\alpha$ . However, in blood, quantification of these cells remains challenging since DP8 $\alpha$  T cells are heterogeneous. Here we aimed at identifying specific markers of gut-derived *F prau*-specific circulating DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub>. We have assessed the expression of colon-tropic chemokine receptors and integrins by DP8 $\alpha$  cells in the colon lamina propria and in PBMCs, which allowed for the identification CCR6 as a marker preferentially expressed by *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells. These data also confirm the presence, in blood, of a T<sub>REG</sub> subset of colon origin induced by *F prau*, which is of variable abundance between subjects. CCR6 will allow for a better quantification of these cells in health and disease to further ascertain their physiological significance and potential value as prognostic markers.

## INTRODUCTION

Various diseases, such as IBD (Inflammatory Bowel Disease) or metabolic disorders, involve dysregulated immune response against gut microbiota<sup>1,2</sup>, which thus represent a major causal candidate especially in IBD where its composition is imbalanced (i.e. dysbiosis)<sup>3-6</sup> and may predict disease evolution<sup>7</sup>. A common feature shared by most IBD patients lies in an overall decrease in major genera of the Firmicutes phylum such as *Faecalibacterium* and *Roseburia* bacteria which have been reported to convey anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*. This is especially the case for *Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*), a member of the Clostridium IV group of the Firmicutes phylum that accounts for about 5% of the total fecal microbiota in healthy subjects, making it the most abundant microbiota bacterium. Changes in the abundance of *F prau* and other members of the Clostridium leptum group have been extensively reported in different human intestinal and metabolic disorders<sup>8</sup>. Importantly, in the context of IBD, *F prau* is a potent inducer of IL-10 secretion<sup>7</sup>, a cytokine known to be a master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans<sup>9</sup>. Together, these data suggest that low levels of *F prau* among the microbiota might disturb the control of inflammatory responses. In support of this, in ileal Crohn's disease, *F prau* reduction correlated with increased risk for post-operative recurrence, suggesting a role for altered levels of *F prau* in the pathogenesis<sup>7,10</sup>.

Moreover, we recently characterized, in the human colon lamina propria, a subset of T<sub>REGS</sub> whose reactivity against *F prau* antigens suggested the contribution of this bacterium to their induction<sup>11</sup>. These results brought the first evidence that in humans, like in mice, the microbiota plays a role in stimulating regulatory functions. However, in contrast with mice data, these T<sub>REGS</sub> lacked Foxp3 expression and exhibited a unique phenotype characterized by the stable co-expression of CD4 and CD8 $\alpha$ , but not CD8 $\beta$ . This cell subset was named "double positive CD8 $\alpha$  or DP8 $\alpha$ . Remarkably, while DP8 $\alpha$  lamina propria lymphocytes (LPL) lacked Foxp3, they shared most regulatory markers (CD25, GITR, CTLA-4 and LAG-3) and functions (inhibition of dendritic cell (DC) maturation and of T cell proliferation) with Foxp3-expressing T<sub>REGS</sub><sup>11</sup>. Moreover, they were relatively abundant in the healthy colonic mucosa (13% of CD4 LPL) and were decreased in the inflamed colonic mucosa of Crohn's disease patients, suggestive of a role for these cells in colon homeostasis.

We also showed that around 2% of circulating CD4 PBMCs display the DP8 $\alpha$  phenotype. Whether these circulating cells strictly reflect the role of their colonic counterparts is unknown even though about 10% of these cells recognized *F prau* and thus likely represent recirculating colonic T<sub>REGS</sub>. Additionally, circulating DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub> appeared to be less frequent in the blood of IBD patients compared with healthy donors<sup>11</sup>, suggesting these circulating cells indeed echo their function in the colon. Therefore, being able to track them easily in the blood represent an exciting mean for the determination of colonic homeostasis/inflammation status.

To try and identify biomarkers for circulating *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells, we

hypothesized that these DP8 $\alpha$  cells should express gut homing markers as they were induced in the colon. For example, CCR6 and its ligand, CCL20, are highly expressed in mucosal tissues, including at high levels in inflamed human and mouse colon<sup>12</sup>. Moreover, CCR6-expressing T<sub>REGS</sub> display better suppressive capacities than CCR6-negative T<sub>REGS</sub> during colitis, and represent a strikingly high frequency of IL-10<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> derived from the colon<sup>13</sup>. CCR6 therefore represent a good candidate for the detection of circulating DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub> induced in the colon. Other chemokine receptors such as CXCR3<sup>14</sup> and CXCR6<sup>15</sup> are over-expressed in intestinal mucosa during inflammation and could therefore be expressed by *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells. Additionally, CCL25, the CCR9 ligand, is expressed by epithelial cells in the intestine, although especially in the small intestine<sup>16</sup>. CCL28, one of the CCR10 ligand, is expressed by epithelial cells of various mucosal tissues, such as intestines. IgA antibody-producing B cells generated in mucosa-associated lymphoid tissues express CCR10 for their migration and maintenance at mucosal sites<sup>17</sup>. Finally, integrin  $\alpha_4\beta_7$  serves as a homing receptor for mucosa-seeking populations by recognizing mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)<sup>18</sup>. Furthermore, the integrin  $\alpha_E\beta_7$ , which recognizes epithelial cadherin, identifies potent subpopulation of regulatory T cells that can protect mice from colitis in the severe combined immunodeficient model (SCID) *in vivo*<sup>19</sup>. We therefore considered  $\beta_7$  as a potential integrin expressed by gut-homing DP8 $\alpha$  cells.

Here we demonstrate, through T cell clone generation, the *F prau*-specificity for DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub> and investigate whether various gut-homing receptors could help detect circulating *F prau*-specific DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub>.

## METHODS

### Reagents

PBMCs, purified monocytes or lymphocytes were cultured in RPMI-1640 supplemented with 5% human Serum, 2 mM L-glutamine and 10 $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin (Gibco). rhIL-2 was used for the culture and expansion of T cells. Violet Proliferation Dye 450 (VPD) (1  $\mu$ M, BD Bioscience), anti-CD3/anti-CD28 activation beads (Gibco), Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich), and 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) were used.

### Bacterial Cultures

*F. prausnitzii* A2–165 were obtained from Commensal and Probiotic-Host Interactions Laboratory, UMR1319 Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France. *F. prausnitzii* was grown for 20 h at 37°C in LYBHI medium (brain–heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract; Difco), cellobiose (1 mg/ml; Sigma–Aldrich), maltose (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), and cysteine (0.5 mg/ml; Merck) in an anaerobic chamber. *F. prausnitzii* was used after sonication.

## Cell separation

Human Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient centrifugation from healthy donor blood (EFS, Nantes, France). Monocytes and CD4 T cells were purified using CD14 and CD4 microbeads, respectively, according to the supplier's instructions (Miltenyi).

Normal colonic mucosa was obtained from surgically resected tissue, taken approximately 10 cm downstream of the tumor. The lamina propria was separated from the epithelium after incubation in EDTA buffer (20 min) and then minced into approximately 1 mm<sup>2</sup> fragments and washed with RPMI containing penicillin (10%) and gentamycin (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich). Tissue fragments were digested with collagenase IV (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), with shaking at 37°C. Mucus and large debris were removed by filtration through a 40 mm-cell strainer (BD). Viable cells were obtained by Ficoll gradient centrifugation.

Of note, all samples, from donors and patients, have been de-identified prior to the analysis.

## Antibodies

For surface staining, cells were harvested, washed and stained for 30 min at 4°C in PBS 0,1 % BSA with the following Abs: anti CD3-PECy7 (clone UCHT1, BD Pharmingen), anti CD4-FITC (clone 13B8.2, Beckman Coulter), anti CD8 $\alpha$ -APC (clone B9.11, Beckman Coulter) or -BV605 (clone SK1, BD Horizon), CCR6-BV421 (clone 11A9, BD Horizon), CXCR3-BV785 (clone G025H7, Biolegend), CXCR6-APC (clone K041E5, Biolegend), anti b7-PE (clone FIB504, BD Pharmingen),

For intracellular staining, cells were harvested, fixed in 4% paraformaldehyde, washed and stained for 30 min at RT in PBS 0,1 % BSA 0,1% saponin with anti-IFN $\gamma$ -APC (clone B27, BD Pharmingen).

Fluorescence was measured on FACS LSR II flow cytometer and analyzed using Diva software (BD).

## T cell culture and stimulation

Purified CD4<sup>+</sup> T cells or PBLs were stained with violet proliferation dye (VPD) and stimulated by autologous monocytes (ratio 10 lymphocytes:1 monocyte) loaded ON or not with bacteria (10 bacteria:1 monocyte). As a positive control, T cells were stimulated by CD3/CD28 beads (3 T cells:1 bead). VPD dilution was assessed 5 days later.

To obtain F prau-specific T cell clones, VPD-stained CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated as above. At

day 5, VPD<sup>low</sup> DP8AA<sup>+</sup> T cells were cloned using a FACS Aria and amplified using irradiated allogeneic PBMCs and LAZ cells (B-EBV cell line), in the presence of 1µg/ml PHA and 150 IU/ml rhIL-2.

T cell clones were stimulated by autologous monocytes (ratio 2-3 lymphocytes:1 monocyte) loaded ON or not with bacteria (10 bacteria:1 monocyte). For IFN $\gamma$  detection, T cell clones were stimulated for 6h in the presence of 10µg/ml brefeldin A before intracellular staining of cytokines. For IL-10 detection, clones were stimulated 48h by 1µg/ml coated anti-CD3 (OKT3), before IL-10 measurement by ELISA.

## **ELISA**

DP8 $\alpha$  T cell clones were stimulated or not using coated anti-CD3 (clone OKT3, 1µg/ml, eBioscience) for 48h at 37°C. Supernatants were harvested and tested for their IL-10 content using the Ready-Set-Go ELISA according to the manufacturer's guidelines (eBioscience)

## **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.0. Comparisons were performed using 2-sided t-test, as indicated in figure legends. p<0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

To study DP8 $\alpha$  T cells within colonic lamina propria lymphocytes (LPLs) for the expression of intestine homing markers, we dissociated LPL, using collagenase IV, from 6 colon biopsies and first stained the CD3<sup>+</sup> DP8 $\alpha$  cells for CCR6, CXCR3 and CXCR6 (Fig.1A,B) at day 7 because the collagenase enzyme stripped most surface markers from the cell surface (not shown). Seventy-eight percent of LPLs expressed CCR6, among which 50% expressed the 3 markers (Fig.1B). Virtually all LPLs also expressed the  $\beta$ 7 integrin (Fig.S1). It is noteworthy that, in LPLs, the frequency of CCR6<sup>+</sup> DP8 $\alpha$  cells was similar to that previously reported of *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells (about 80%)<sup>11</sup>.

To characterize circulating DP8 $\alpha$  cells for the expression of intestine homing markers and thereby detect gut-associated blood DP8 $\alpha$  (Fig.2A), we stained PBMCs for not only CCR6, CXCR3 and CXCR6, but also CCR9, CCR10 and  $\beta$ 7 (Fig.2B)<sup>12,14-18</sup>. CCR9 and CCR10 were barely expressed by DP8 $\alpha$  cells (or by their CD4 counterparts, not shown). On the other hand, CCR6, CXCR3, CXCR6 or  $\beta$ 7 positive cells represented a significant amount of DP8 $\alpha$  cells (20-40%; Fig.2B). Moreover, the expression of these 4 markers in DP8 $\alpha$  cells was heterogenous and overall more frequent than in CD4 T cells (Fig.2B and not shown), which could be compatible with the amount of *F prau*-specific T cells (Fig.2C). Indeed, because 1/ the frequency of DP cells can highly vary between individuals and be amplified, especially by viruses (REFs), and 2/ that the fecal *F prau* levels varies considerably from one person to another<sup>8,20</sup>, one can speculate that the expected number of *F prau*-specific T cells within DP8 $\alpha$  T cells fluctuates significantly between donors. We therefore studied more closely the frequency of CCR6 CXCR3 CXCR6 and  $\beta$ 7 in DP8 $\alpha$  cells. Almost 22% of DP8 $\alpha$  cells expressed  $\beta$ 7 (Fig 2B), but sorted DP8 $\alpha$  cells displayed *F prau*-specific responses in both  $\beta$ 7-positive and  $\beta$ 7-negative subsets (not shown), eliminating  $\beta$ 7 as a marker for *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells. We therefore further focused on CCR6, CXCR3 and CXCR6 as potential markers for *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells: in comparison to LPLs, CCR6<sup>+</sup> cells represented only 55% of DP8 $\alpha$  cells derived from PBMCs, and almost 18% of the latter cells expressed the 3 molecules (Fig.2D).

We went further and studied the *F prau*-specificity of both CCR6-negative (Fig.3A) and CCR6-positive (Fig.3B) DP8 $\alpha$  cells. No *F prau*-specific cells were detected in the CCR6-negative fraction of DP8 $\alpha$  cells (Fig.3A). Nevertheless, in the same donor, a significant fraction of CCR6-positive DP8 $\alpha$  cells proliferated in response to *F prau* (Fig.3B). In other words, *F prau*-specific cells can be found in the CCR6<sup>+</sup> fraction, but not in the CCR6<sup>-</sup> fraction, of DP8 $\alpha$  cells.

To better assess whether *F prau*-specific cells were located in the CCR6<sup>+</sup> DP8 $\alpha$  subset, we generated clones from an enriched population of specific cells (Fig.4A). Thirty-six clones proliferated (Fig.4B) and produced IFN $\gamma$  (Fig.4C) in response to autologous monocytes loaded with *F prau*. Additionally, most of these clones could produce IL-10 upon CD3 ligation (Fig.4D). Strikingly, the majority (about 86%) of the tested *F prau*-specific clones expressed

CCR6, CXCR3 as well as CXCR6 and 89% expressed CCR6 (Fig.4F), highly suggestive of a significant correlation between *F prau*-specificity and CCR6 expression.

To determine their inhibitory potential, VPD-stained CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated by CD3/CD28 beads in the presence or in the absence of one *F prau*-specific DP8 $\alpha$  clone. Most of the 19 tested clones substantially inhibited CD4 T cell proliferation (Fig.5A,B) and still displayed inhibitory functions at 1:20 DP8 $\alpha$ :CD4 T cell ratio (Fig.5C), demonstrating their potent regulatory function.

Altogether, these data support that CCR6 is preferentially expressed by circulating *F prau*-specific DP8 $\alpha$  T<sub>REGS</sub>, which should allow for their rough quantification in PBMC samples. The function of these circulating cells seem to mirror those of the colonic lamina propria and therefore could help determine the prognosis for IBD patients as well as the relative level of colonic *F prau*.

## DISCUSSION

The generation of *F prau*-specific DP8 $\alpha$  clones derived from PBMCs definitely established the presence of such cells in the periphery. Importantly, these circulating cells display the same properties than DP8 $\alpha$  cells derived from colonic LPLs: they specifically recognize a commensal colonic bacterium, *Faecalibacterium prausnitzii* (Fig.4A-C), produce IL-10 (Fig.4D) and exert potent regulatory functions (Fig.5). Nevertheless, in the colon, most DP8 $\alpha$  cells are highly specific for *F prau*<sup>11</sup>, while in the blood, the frequency of *F prau*-specific cells varies much more and can be as low as a few percent (Fig.2B,3B and 4A). This could be due to clonal expansion of various viruses-specific DP T cells<sup>21,22</sup> taking over *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells.

In contrast with colonic LPLs, quantifying overall circulating DP8 $\alpha$  cells is therefore not sufficient to estimate the frequency of *F prau*-specific cells, which appears to be central in determining colonic inflammatory status and as a consequence IBD prognosis. Unfortunately, assessing the specificity of these cells for *F prau* remains cumbersome because 1/ the bacterium is difficult to grow due to its anaerobic properties and 2/ the need for autologous or HLA-matched antigen presenting cells. Therefore, identification of a marker(s) for *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells is critical to detect these cells in the blood, rather than in colonic biopsies where very little material ends up being available anyway. Therefore, identifying a marker for this circulating subset appears to be key to use these cells as a prognosis marker in IBD. Zooming on CCR6-positive cells within DP8 $\alpha$  cells seems to allow for such a closer detection of *F prau*-specific cells, than overall DP8 $\alpha$  cells. Accordingly, *F prau*-specific cells were found only in the CCR6<sup>+</sup> fraction of DP8 $\alpha$  cells (Fig.3B) and 89% of the clones specific for *F prau* expressed CCR6 (Fig.4F). Whether other markers, such as CXCR3, CXCR6 or others would allow for a more stringent focusing on the DP8 $\alpha$  specific cells remains to be fully determined.

*F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells had a strong propensity to produce IL-10 upon TCR ligation (Fig.4D). Foxp3-negative T<sub>REGS</sub> producing IL-10 are usually referred to as T<sub>R1</sub> cells<sup>23-26</sup>. Nevertheless, regulatory human DP cells have not yet been described by other groups. *F prau*-specific DP8 $\alpha$  cells could therefore be a subset of T<sub>R1</sub>-like cells. Whether DP8 $\alpha$  cells exert their regulatory function through IL-10 still needs to be established. T<sub>R1</sub> cells can be obtained via restimulations with IL-10-producing DCs<sup>24,27</sup>. DP8 $\alpha$  cells also seem to need priming via IL-10-producing APCs (Alamaddine *et al.* Submitted).

In summary, circulating DP8 $\alpha$  clones specific for *F prau* have ascertained both their specificity and their regulatory function. Nonetheless, the frequency of *F prau*-specific cells is much lower in DP8 $\alpha$  derived from PBMCs as compared to colonic LPLs. Therefore, identifying CCR6, within DP8 $\alpha$  cells, as a cell marker for enrichment in *F prau*-specific cells will permit to better follow these cells in the blood as a mirror of the colonic IBD inflammatory status. This should represent a tool for the prognosis and better management of IBD patients.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the members of Frederic Altare's laboratory (INSERM U1232), Euloge Ekaza and Grâce Ada Da Silva for technical help and discussions. This work was supported by the INSERM (ANR Microbiota-induced T<sub>REG</sub>) and ARMINA (2012 09680)

## **AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS**

E.G. performed, analyzed and interpreted experiments as well as wrote the manuscript ; J.A. contributed to the study organization and discussions ; J.D.N. and N.M. performed sorting experiments ; C.B. and A.J. provided human colon biopsies ; G.S. contributed to the study organization and discussions; F.A. contributed to study design and discussions ; F.J. supervised the project. E.G., F.A. and F.J. edited the manuscript.

## **CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE**

F.J., F.A. and G.S. have a patent regarding the role of DP8AA<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> in inflammatory bowel disease (WO, PCT EP2014/064928)

## REFERENCES

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573-621.
2. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut.* 2013;62(10):1505-1510.
3. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 2011;60(5):631-637.
4. Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014;63(8):1275-1283.
5. Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(8):1183-1189.
6. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(5):653-660.
7. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16731-16736.
8. Miquel S, Martin R, Rossi O, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(3):255-261.
9. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, et al. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv Immunol.* 2014;122:177-210.
10. Martin R, Chain F, Miquel S, et al. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(3):417-430.
11. Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, et al. CD4CD8alpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001833.
12. Ito T, Carson WFt, Cavassani KA, Connett JM, Kunkel SL. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):613-619.
13. Kitamura K, Farber JM, Kelsall BL. CCR6 marks regulatory T cells as a colon-tropic, IL-10-producing phenotype. *J Immunol.* 2010;185(6):3295-3304.
14. Chami B, Yeung AW, van Vreden C, King NJ, Bao S. The role of CXCR3 in DSS-induced colitis. *PLoS One.* 2014;9(7):e101622.
15. Satoh-Takayama N, Serafini N, Verrier T, et al. The chemokine receptor CXCR6 controls the functional topography of interleukin-22 producing intestinal innate lymphoid cells. *Immunity.* 2014;41(5):776-788.

16. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667-685.
17. Xiong N, Fu Y, Hu S, Xia M, Yang J. CCR10 and its ligands in regulation of epithelial immunity and diseases. *Protein Cell*. 2012;3(8):571-580.
18. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*. 1994;152(7):3282-3293.
19. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):13031-13036.
20. Hold GL, Schwiertz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(7):4320-4324.
21. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*. 2004;104(2):478-486.
22. Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, et al. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2512-2520.
23. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 2013;19(6):739-746.
24. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-742.
25. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:39-68.
26. White AM, Wraith DC. Tr1-Like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage. *Front Immunol*. 2016;7:355.
27. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116(6):935-944.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Colonic lamina propria DP8 $\alpha$  T cells express high levels of CCR6, CXCR3 and CXCR6.** **A.** Gating strategy for the detection of CCR6-, CXCR3- and CXCR6-expressing DP8 $\alpha$  cells. Colonic lamina propria were dissociated as described in Methods. A representative example is shown. **B.** The frequency for each subset is represented as a mean of 6 donors.

**Figure 2. DP8 $\alpha$  T cells circulate in blood and express CCR6, CXCR3 and CXCR6, but at lower levels than in colonic lamina propria.** **A.** The gating strategy to detect circulating DP8 $\alpha$  cells is shown. **B.** The frequency within DP8 $\alpha$  cells of indicated markers is shown. **C.** CD4<sup>+</sup> T cells were stained with VPD and stimulated by autologous monocytes (ratio monocytes: CD4<sup>+</sup> T cells of about 1:10) loaded ON with *F prau* (ratio monocytes:bacteria of about 1:10 ; middle panel) in the presence of 0.5 $\mu$ g/ml anti-CD28 (Miltenyi Biotec). Unloaded monocytes or monocytes in the presence of CD3/CD28 beads (ratio T cells:beads of 3:1) were used as negative and positive controls, respectively. Proliferation was measured at day 5 by dilution of VPD. **D.** The frequency of the various CCR6, CXCR3 and CXCR6 subsets in blood DP8 $\alpha$  is shown for a representative donor and as a mean of 8 donors.

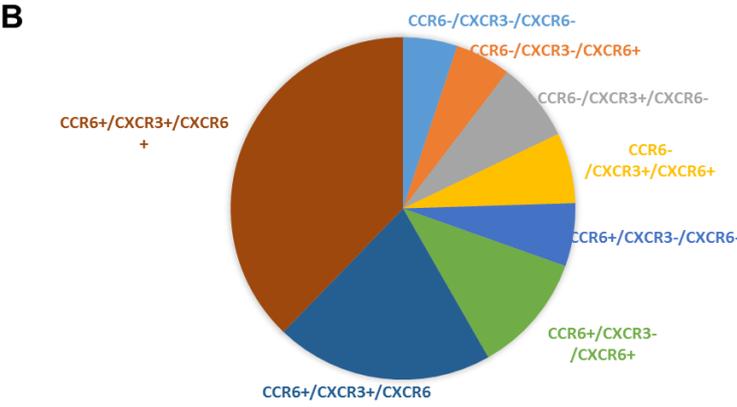
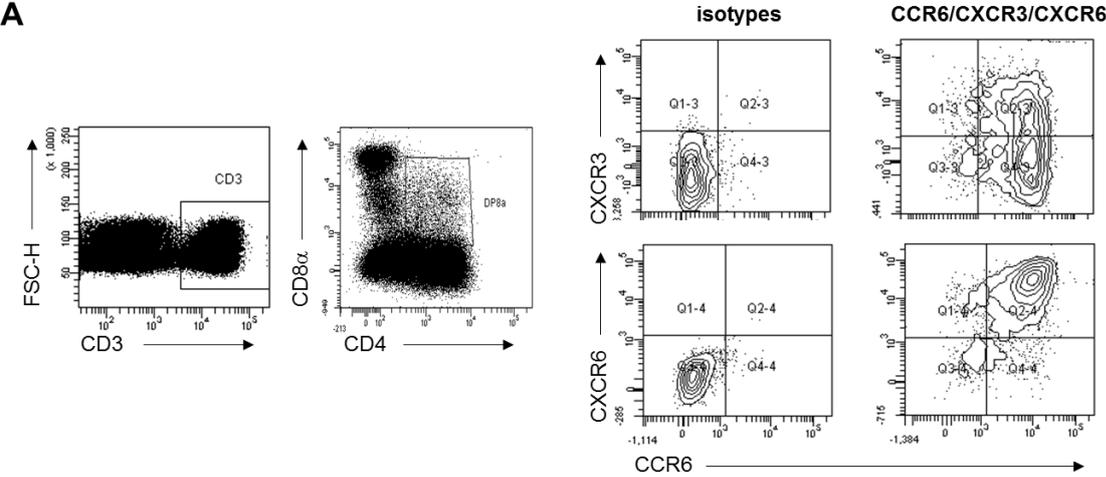
**Figure 3. Circulating *F prau*-reactive DP8 $\alpha$  T cells are present in the CCR6+ population.** Sorted CCR6-negative (**A**) or CCR6-positive (**B**) DP8 $\alpha$  T cells were stained with VPD and stimulated by autologous monocytes (ratio monocytes:CD4<sup>+</sup> T cells of about 1:1) loaded ON with *F prau* (ratio monocytes:bacteria of about 1:10 ; middle panel) in the presence of 0.5 $\mu$ g/ml anti-CD28 (Miltenyi Biotec). Unloaded monocytes or monocytes in the presence of CD3/CD28 beads (ratio T cells:beads of 3:1) were used as negative and positive controls, respectively. Proliferation was measured at day 5 by dilution of VPD.

**Figure 4. Clonal responses and phenotype of circulating DP8 $\alpha$  cells.** **A.** Gating strategy used for cloning. **B,C.** Proliferative (**B**) and IFN $\gamma$  (**C**) response of a representative DP8AA $\square$  clone against *F prau*-loaded monocytes (ratio 1:1). **D.** Production of IL-10 by a panel of DP8AA $\square$  clones in the presence (gray bars) or in the absence (black bars) of 1 $\mu$ g/ml coated anti-CD3 Ab. **E.** Expression of CCR6, CXCR3 and CXCR6 by a representative DP8 $\alpha$  clone. **F.** Percentages of clones among all 36 *F prau*-specific DP8 $\alpha$  clones tested expressing the indicated subsets. Non-indicated subsets were not detected in the clone panel.

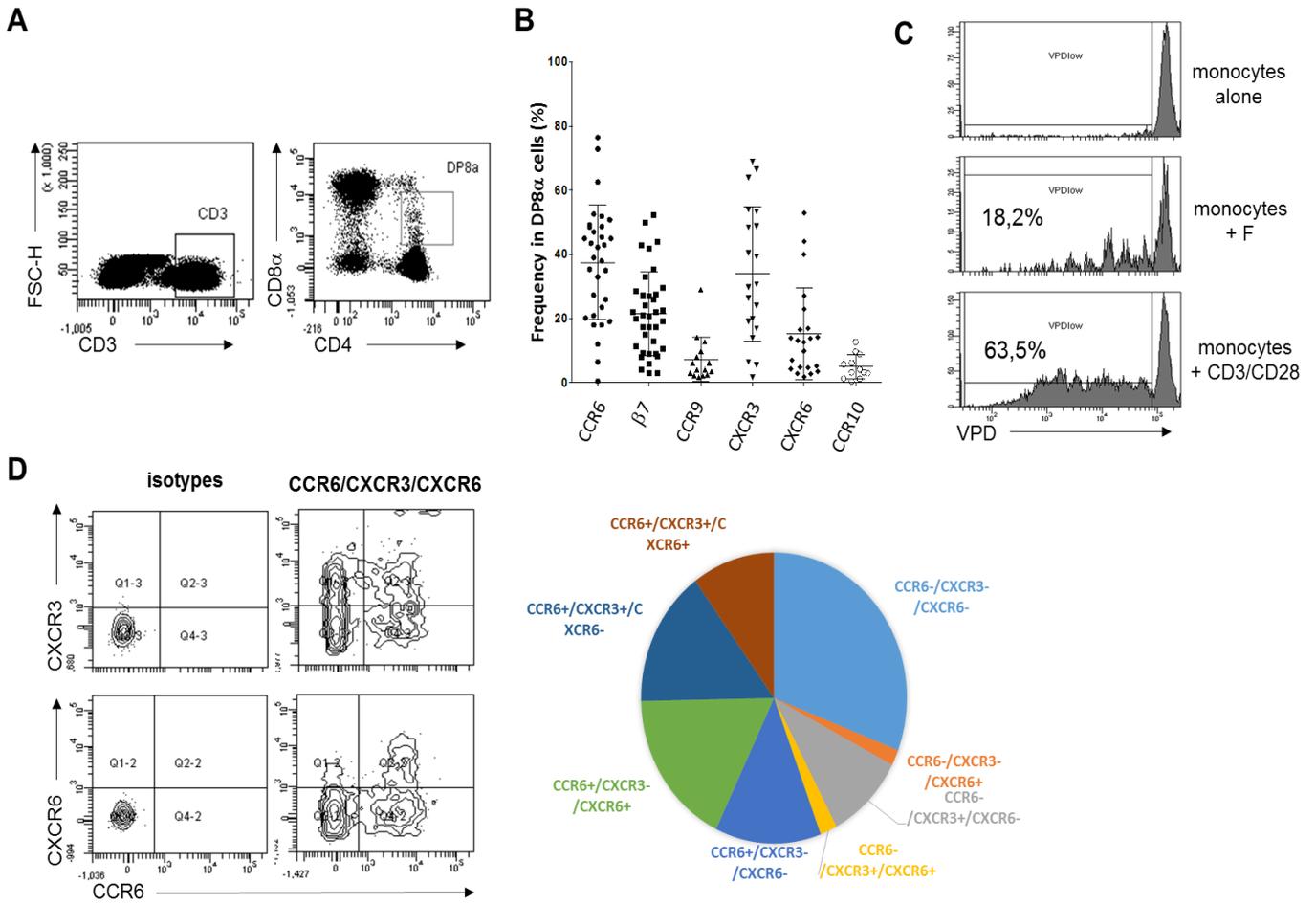
**Figure 5. *F-prau*-specific DP8 $\alpha$  clones inhibit CD4 T cell proliferation.** **A,B.** CD4<sup>+</sup> T cells were stained with VPD and stimulated by CD3/CD28 beads (ratio CD4 T cells:beads of 3:1) in the presence (bottom panel) or in the absence (middle panel) of either a representative DP8AA $\square$  clone (**A**) as well as each of all 19 clones tested (**B**) (ratio 1:1). Proliferation of CD4 T cells was measured at day 5. sem bars are from 3 different donors of CD4 T cells. **C.** VPD<sup>+</sup> CD4 T cells were stimulated as above at indicated CD4 T cells: DP8 $\alpha$  clones ratios and proliferation was measured at day 5 in the presence of 4 different DP8 $\alpha$  clones. Two-sided unpaired t-test ; error bars: sem ; \*: p<0.05 was considered significant.

FIGURES

Figure1



**Figure 2**



**Figure 3**

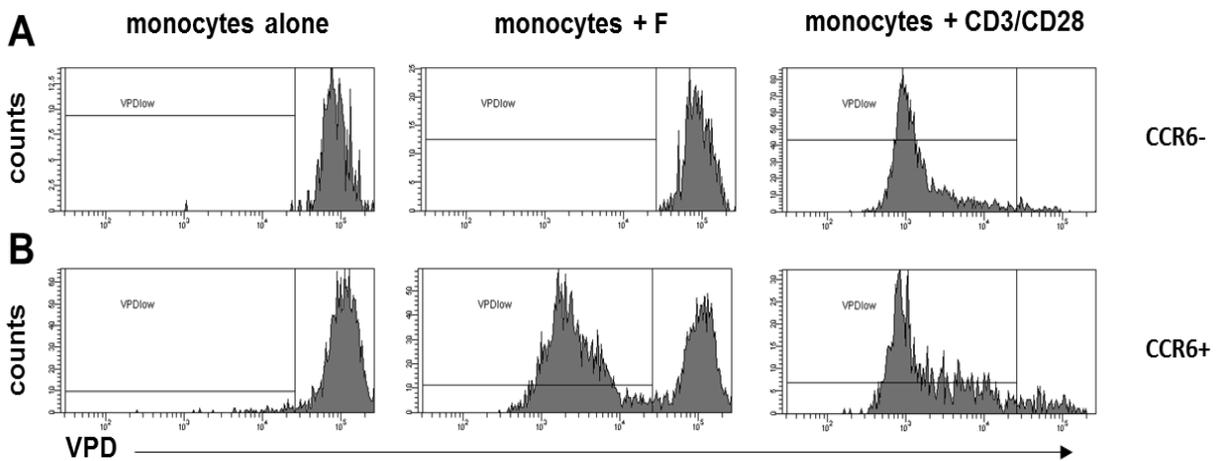


Figure 4

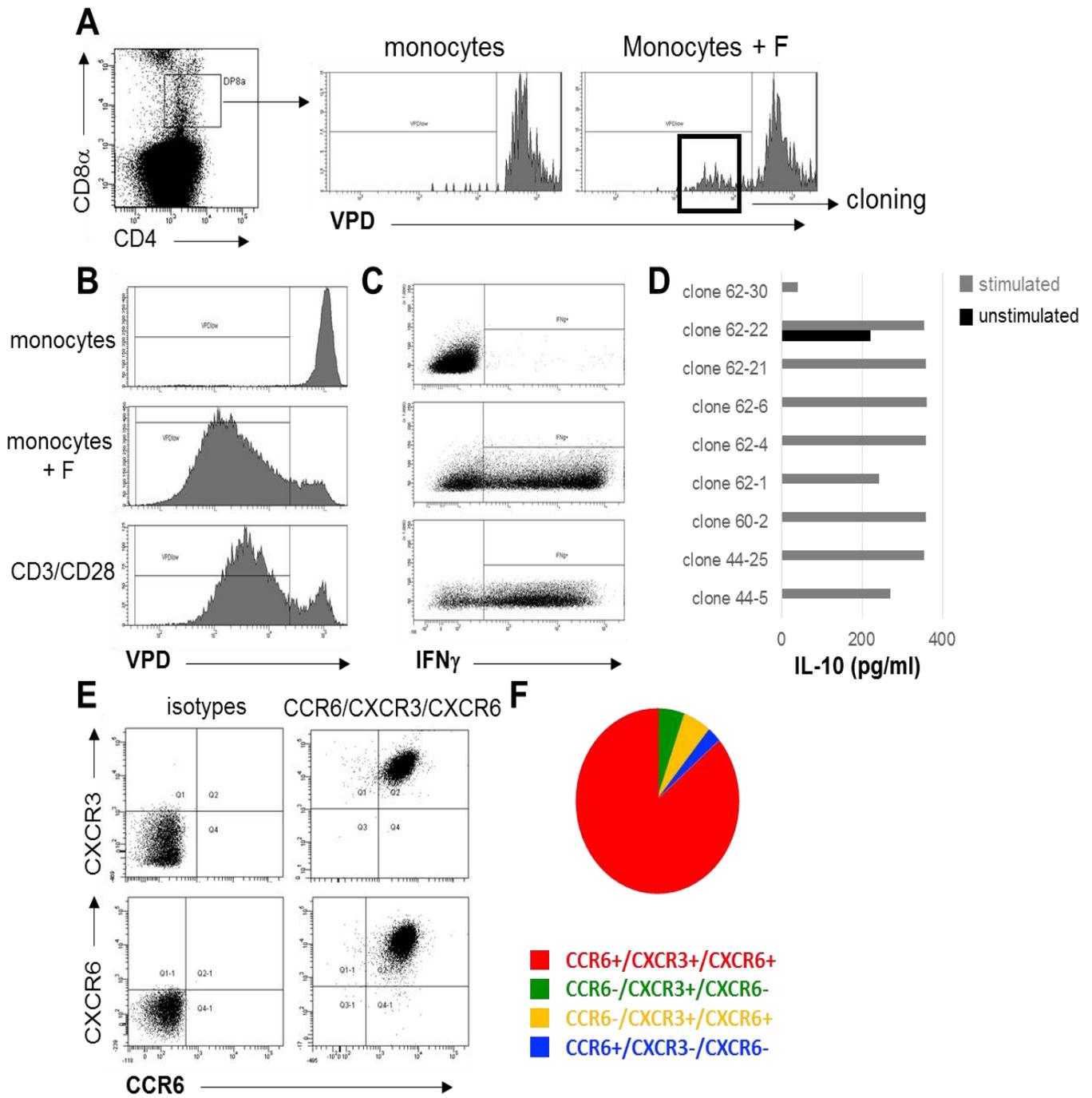
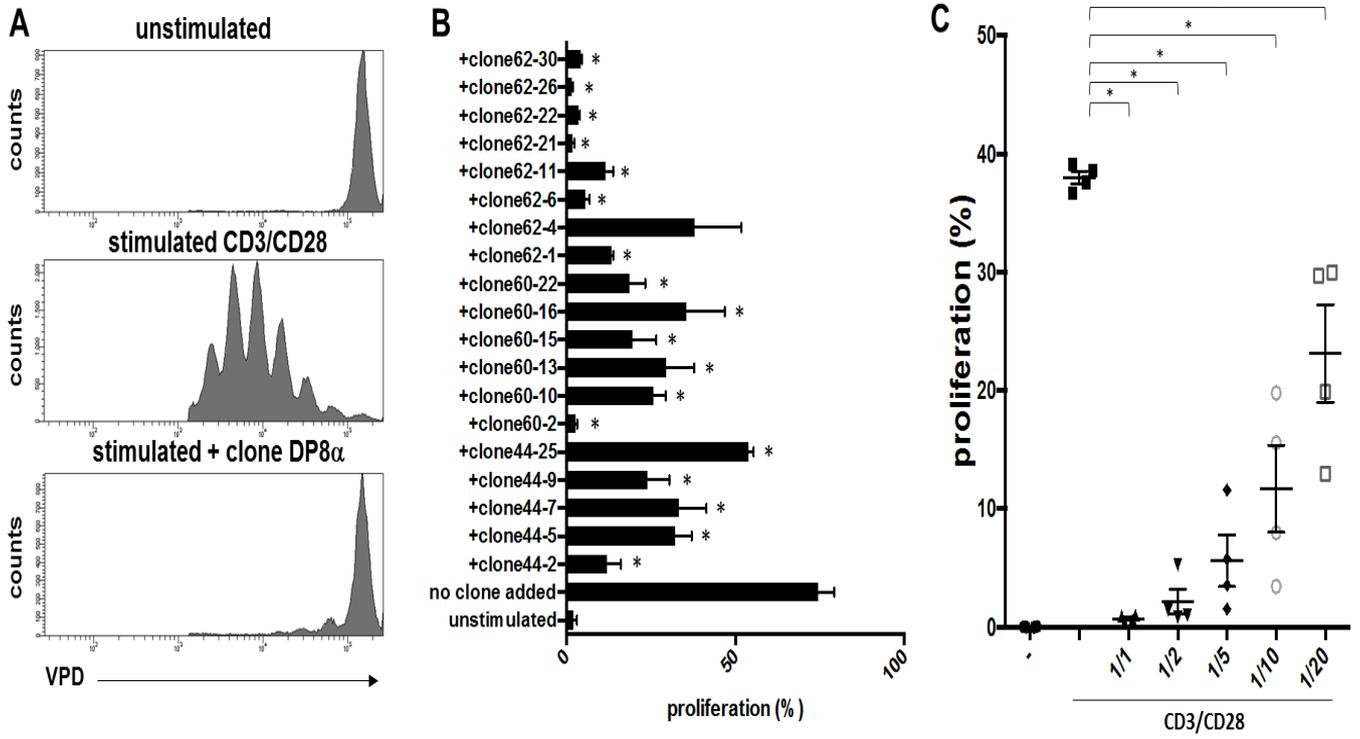
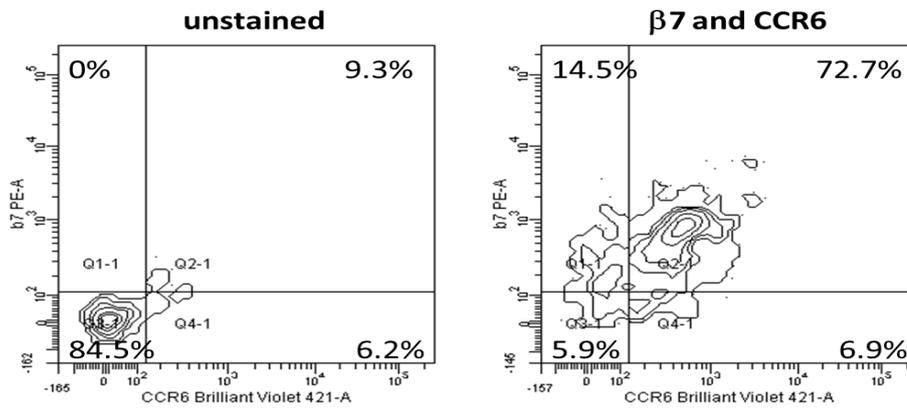


Figure 5



## Supplementary datas



**Figure S1.** CCR6 and  $\beta 7$  expression by LPL-derived DP8 $\alpha$  cells. LPLs were obtained as described in the Method section. Dissociated cells were stained for CD3, CD4 and CD8a to gate on DP8 $\alpha$  cells. Cells were further stained or not for b7 and CCR6.

## **5.1 Résultats non intégrés à l'article**

### **2.2.1 Matériels et méthodes**

#### **Obtention du sang de patients atteints de spondylarthrite, obésité et cancers coliques**

Nous avons reçu en moyenne 10ml du sang de ces patients par les médecins du CHU de Nantes impliqués dans la prise en charge de ces maladies: Dr Jean-Marie Berthelot pour les spondylarthrites, Pr Bertrand Cariou pour les patients Obèses diabétiques ou non et Dr Montassier pour les cancers coliques. Le jour même, ou le lendemain de la réception des tubes, nous avons réalisé un marquage des PBL DP8Aα sur 100 µL sang total des patients Obèses. Pour les deux autres pathologies ce marquage a été confié à la plateforme CIMNA du CHU qui a utilisé les conditions de marquage sur sang total que nous avons mises au point (ci-dessous), mais également des tubes truecount (BD) pour quantifier le nombre absolu de ces lymphocytes. Nous avons isolé les PBMC du reste du sang par Ficoll et les avons congelés en deux ou 3 ampoules pour la réalisation de tests ultérieurs.

#### **Quantification des lymphocytes DP8Aα sur sang total de donneurs sains**

On prélève 100 µL de sang bien homogénéisé par retournements

On distribue 50 µL par tube dans deux tubes à cytométrie.

Les anticorps utilisés proviennent de chez Beckman Coulter et ont été titrés pour permettre une séparation optimale des populations CD8 et CD4

Dans le tube contrôle le sang est marqué par addition de: 2 µL d'anti CD45-PC7, 2 µL d'anti CD3-Pacific Blue, 2 µL d'anti CD4-FITC et 0,5 µL d'IgG1-APC (isotype du CD8)

Dans le tube expérimental on ajoute: 2 µL d'anti CD45-PC7, 2 µL d'anti CD3-Pacific Blue, 2 µL d'anti CD4-FITC et 1 µL d'anti CD8-APC

Les tubes sont vortexés homogénéiser les mélanges puis incubés 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

On ajoute 500 µL de tampon de lyse Beckman (Versal Lyse TM lysing solution ; Réf : A09777) par tube et on incube 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

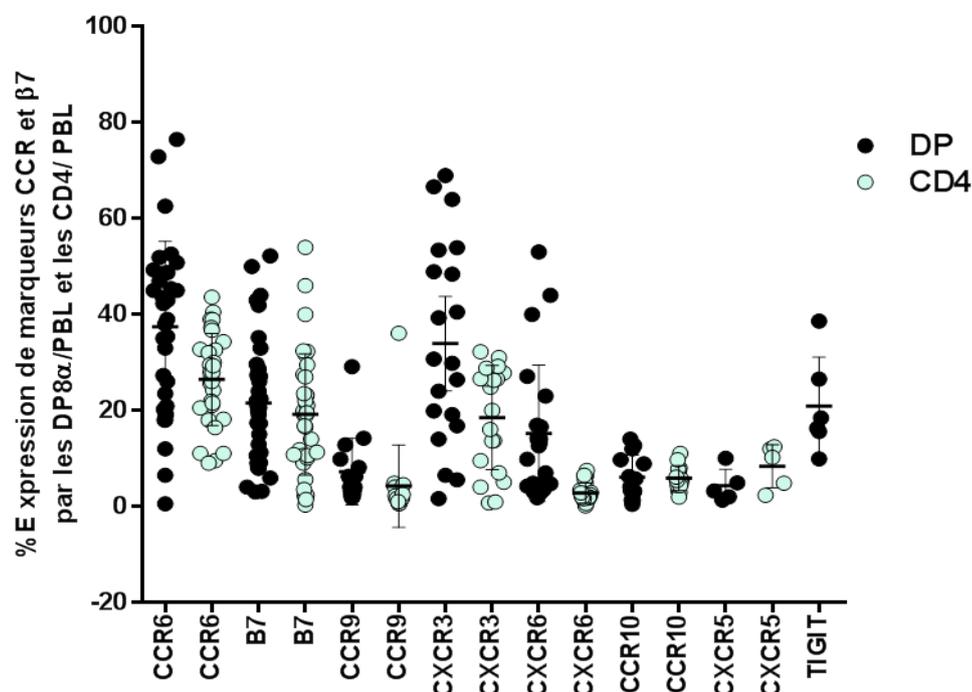
Les tubes sont lus directement à l'aide d'un FACS Canto en réglant le cytomètre sur 20000 CD3 et toujours à vitesse moyenne.

On note le temps d'acquisition pour estimer le nombre de DP8α par volume de sang, sachant que la vitesse moyenne de passage est de 32 µL par minute.

On calcule ensuite la fraction des lymphocytes T DP8α parmi les CD3, parmi les CD4 et le nombre des lymphocytes DP8α par litre de sang.

### **2.2.2 Expression de récepteurs de homing dans l'intestin (CCR et de l'intégrineα4β7 par les PBL DP8α et CD4**

Comme montré dans l'introduction de l'article 2, le but de ce travail est de trouver un ou des marqueurs permettant de différencier les PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*. Nous avons commencé notre étude en testant l'expression par ces PBL et par les CD4 d'un panel de récepteurs de homing dans l'intestin des lymphocytes : récepteurs de chémokines. Et intégrine $\alpha$ 4 $\beta$ 7. L'analyse se fait pour chaque marqueur sur les CD4 et sur les DP8 $\alpha$ . Les résultats montrent que CCR6, CXCR3 et CXCR6 sont exprimés par un pourcentage plus important et beaucoup plus variable par les DP8 $\alpha$  comparés aux CD4 (**Fig 1**). Cette étude nous a conduit à nous focaliser sur l'étude de ces 3 CCR mais aussi de  $\beta$ 7 ayant observé que les % de DP8 $\alpha$  exprimant  $\alpha$ 4 et  $\beta$ 7 sont identiques (résultats non montrés). (L'étude de ces récepteurs en fonction de la spécificité des PBL DP8 $\alpha$  fait l'objet de l'article 2.



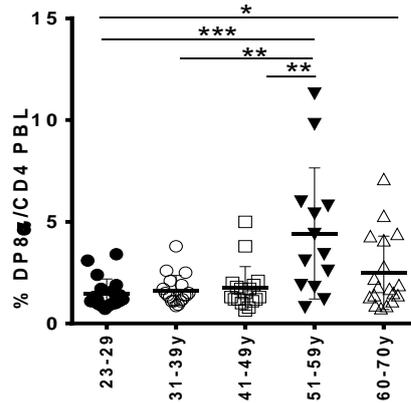
**Figure 1.** Expression des marqueurs ( $\beta$ 7, CCR et CXCR) sur les PBL DP8 $\alpha$  et CD4 de donneurs sains.

### 2.2.3 Recherche d'anomalies de la fréquence des PBL DP8 $\alpha$ dans différentes pathologies.

Mon équipe d'accueil a montré que chez les patients MICI à la fois la fréquence des lymphocytes T DP8 $\alpha$  totaux et de ceux réactifs à *F prau* sont diminuées comparés à des donneurs sains. Des nombreuses autres pathologies ont été caractérisées par une diminution de la quantité de la bactérie *F prau*. Nous avons donc recherché si ces maladies étaient aussi associées à une diminution des PBL DP8 $\alpha$

### A - Fréquence des PBL DP8 $\alpha$ chez les donneurs sains

Dans un premier temps nous avons quantifié la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  totaux chez 88 donneurs sains. Ensuite nous avons effectué une analyse comparative entre les donneurs de différentes tranches d'âge (18-20 par tranche d'âge). Globalement, les résultats montrent que le % des PBL DP8 $\alpha$  est très variable entre les donneurs quel que soit l'âge. Cependant la fréquence de ces cellules semble augmenter avec l'âge (**Fig 2**).

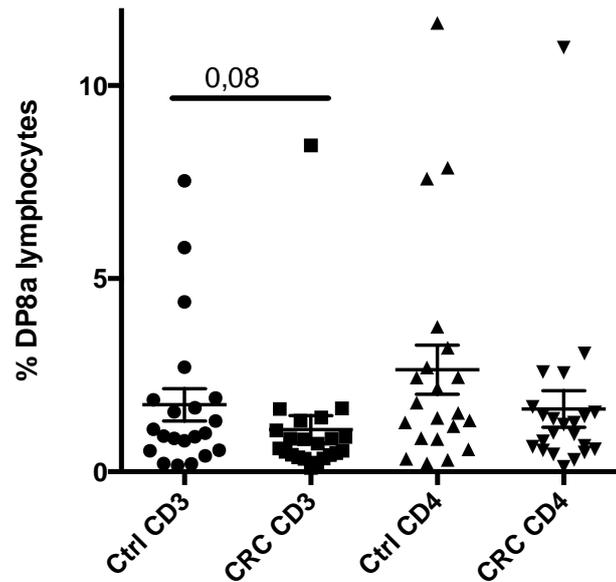


**Figure 2.** Variation du pourcentage de DP8 $\alpha$  parmi les CD3 et parmi les CD4 sanguins chez de sujets sains par catégories d'âge. Unpaired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

### B- Fréquence des PBL DP8 $\alpha$ dans différentes pathologies

Nous avons ensuite effectué les mêmes quantifications des PBL DP8 $\alpha$  totaux dans le sang des patients atteints par des pathologies associées à une diminution de *F prau*

- **Fréquence des PBL DP8 $\alpha$  chez les patients atteints de cancers coliques (Etude MILCA)**

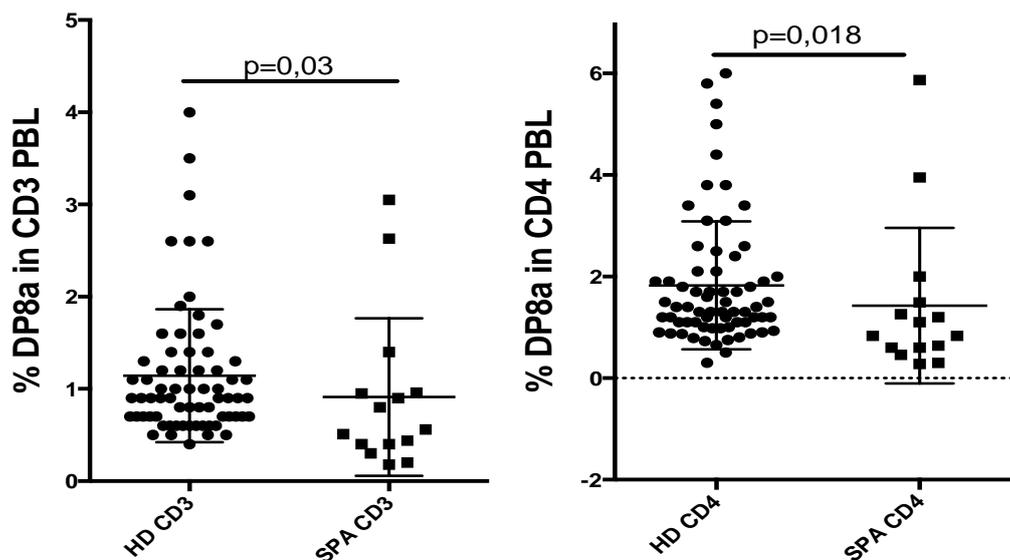


**Figure 3.** Fréquence des lymphocytes T DP8AAα parmi les PBL CD3 et les CD4 des patients de l'étude MILCA (Cancer colorectaux: CRC), comparés à des sujets sains d'âges apparentés. Unpaired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

Globalement, les résultats (**Fig. 3**) montrent que la fréquence moyenne des PBL DP8AAα semble diminuée chez ces patients, comparés aux sujets contrôles. Cependant, cette différence reste non significative. Une diminution de *F prau* dans le microbiote fécal de patients atteints de cancers colorectaux a été rapportée dans certaines études (Chen W et al., 2012). Cette diminution pourrait indiquer l'existence d'une corrélation entre la fréquence des PBL DP8α spécifiques de la bactérie et l'abondance relative de celle-ci.

- **Fréquence des PBL DP8α chez les patients atteints de spondylarthrite**

Nous avons mesuré la fréquence des PBL DP8α chez 15 de ces patients. Les résultats (**Fig. 4**) suggèrent que la fréquence de ces cellules est diminuée. De façon intéressante, une partie des patients étudiés présentent aussi des désordres inflammatoires de l'intestin. Ces données suggèrent qu'une diminution des Treg spécifiques de *F prau* est associée à cette pathologie et pourrait être impliquée dans les réponses inflammatoires observées chez ces patients au niveau de certaines articulations.

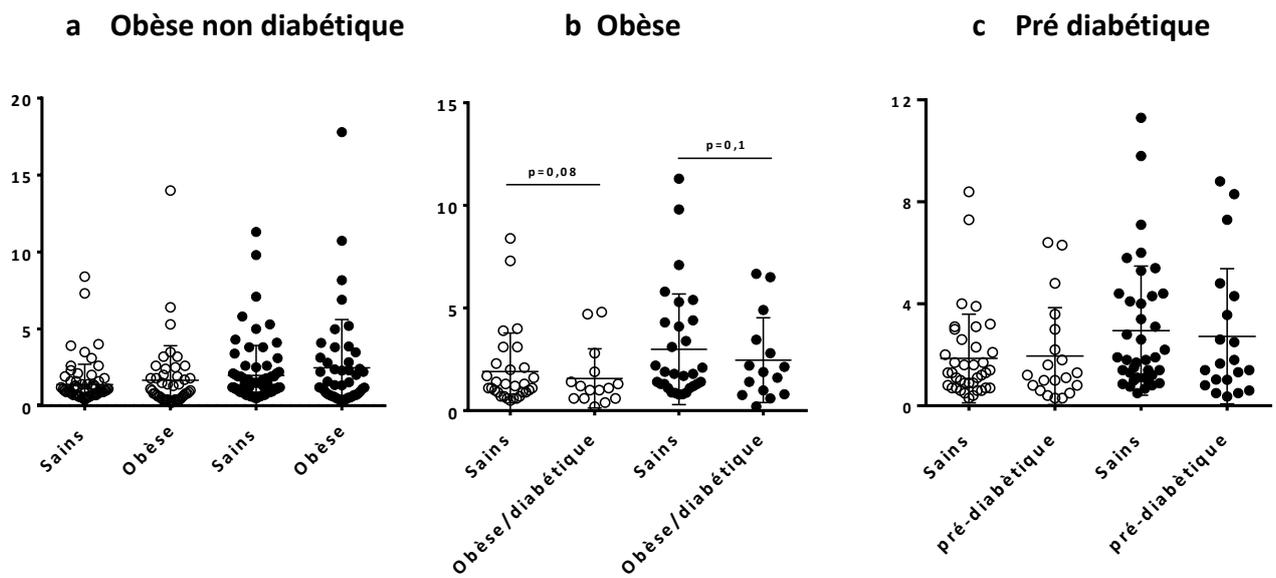


**Figure 4.** Fréquences des PBL DP8α parmi les PBL CD3 et CD4 de patients atteints de spondylarthrite, comparés à des sujets sains (HD) d'âges apparentés. Unpaired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

- **Fréquence des PBL DP8α dans les pathologies métaboliques** (obèses, diabétiques, pré diabétiques et obèses diabétiques).

Une diminution de F prau par une certaine fraction des patients obèses présentant des désordres métaboliques importants, a été rapportée (Cho and Blaser *et al.*, 2013). Nous avons donc voulu savoir si des anomalies de la fréquence des PBL DP8α sont aussi observées chez ces patients. Les résultats actuels concernant la fréquence des DP8Aα totaux ne permettent pas de conclure dans ce sens. En effet nous n'observons pas de différence entre les contrôles et les patients (**Fig. 5 a-c**).

Une fraction plus importante des patients présente cependant des % de PBL DP8α très bas plus rares chez les contrôles (résultats non montrés). Néanmoins il ne semble pas y avoir de lien entre ces cas et les données cliniques. Les résultats ne montrent aucune anomalie de la fréquence de ces cellules.



**Figure 5.** Fréquences des PBL DP8 $\alpha$  parmi les CD3 et les CD4 chez des patients obèses, obèses non diabétiques et pré-diabétiques, comparé avec des sujets sains (HD) d'âges apparentés. Unpaired t tests:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$  mean +/-sem.

## IV- Discussion et perspectives

Chez l'homme, les évidences de l'impact du microbiote sur l'immunité restent indirectes. Il s'agit essentiellement de l'observation que des dysbioses sont associées aux maladies impliquant le SI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), allergies, arthrites, diabète, cancer du côlon, obésité (Cho and Blaser, 2013). Cependant aucun lien de causalité n'avait été établi même si un tel lien existe chez la souris pour le diabète, certaines MICI et l'obésité. Les résultats antérieurs de mon équipe (Sarrabayrouse *et al.*, 2014, 2015) et ceux présentés dans cette thèse documentent pour la première fois l'impact d'une bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*) sur l'induction de lymphocytes T régulateurs présents dans la muqueuse colique humaine et caractérisés par le phénotype double positif CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ). Cependant le rôle de ces lymphocytes dans l'homéostasie du colon ou dans la tolérance systémique reste à établir. C'est sur cette question majeure que porte mon travail de thèse.

Mon travail principal a été l'étude des effets de *F prau* sur les cellules dendritiques (DC) pouvant contribuer à l'induction de Treg DP8 $\alpha$  et la spécificité de cet impact en étudiant en parallèle d'autres bactéries commensales. J'ai également tenté d'identifier les modalités d'induction de lymphocytes CD4CD8 $\alpha$  à partir de CD4 naïfs *in vitro* par différentes présentations de la bactérie, combinées ou non à des inducteurs potentiels de Treg de la muqueuse colique : TGF- $\beta$ , IL-27 et butyrate. Enfin j'ai étudié la fréquence et la diversité phénotypique des PBL DP8 $\alpha$  chez des donneurs sains, et étudié de la fréquence de ces cellules chez des patients atteints de pathologies inflammatoires, spondylarthrite, obésité diabète et cancers du côlon, dont l'association à des dysbioses, en particulier une diminution de *F prau*, a été rapportée (Miquel *et al.*, 2013).

J'ai pu établir *in vitro* l'impact de *F prau* dans l'induction des cellules dendritiques tolérogènes (DC tol). Sur plus de 50 donneurs, les DC qui ont été obtenues à partir de monocytes différenciés en présence de *F prau* (DC F) sont résistantes à la maturation induite par le LPS, un ligand de TLR4 mais aussi à des agents de maturation plus puissants tels que la combinaison LPS / IFN- $\gamma$  et LPS / R848.

Les DC F sont caractérisées par : l'expression d'IL-10 à l'état immature et, en réponse à un agent de maturation, par une faible augmentation des marqueurs de co-stimulation (CD40, CD80, CD83 et CD86) et un défaut complet de sécrétion des cytokines inflammatoires IL-12p70 (IL-12p35 et IL-12p40) et TNF $\alpha$ . En revanche, la sécrétion d'IL-10 induite par le LPS n'est pas affectée. Ces caractéristiques sont celles décrites pour des DC tolérogènes (tolDC) obtenues *in vitro*. Ces DC sont dites tolérogènes car elles induisent peu de réponses T effectrices (différenciation en Th1, Th2 ou Th17 et prolifération) mais favorisent l'induction de T reg, de lymphocytes anergiques ou l'apoptose de lymphocytes.

Les DC différenciées en présence de *F prau* favorisent en effet l'induction de lymphocytes T sécréteurs d'IL-10 au détriment de l'induction de cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$

et de l'IL-13. L'IL-10 joue un rôle majeur dans la prévention de réponses immunitaires inappropriées contre le microbiote, réponses à l'origine des MICI (Roers A J Exp Med 2004). L'IFN- $\gamma$  est une cytokine produite par les Th1 et les Th17 pathogéniques deux sous-populations considérées responsables des réponses inflammatoires dirigées contre le microbiote dans les MICI. La diminution d'IL-13, suggère que *F prau* pourrait également contribuer à la prévention des allergies. A l'appui de cette hypothèse les Treg Foxp3 induites dans le colon de souris par les bactéries Clostridium préviennent l'allergie (Atarashi 2011)

Les lymphocytes DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* sécrètent de l'IL-10 et de l'IFN- $\gamma$ . (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant de savoir si les lymphocytes IFN- $\gamma$ + et IL-10+ induits par les DC exposées à F sont les mêmes cellules. Cela semble possible au regard des % de cellules exprimant ces 2 cytokines, sauf chez deux donneurs ou la fraction des cellules IFN- $\gamma$ + est beaucoup plus élevée que celle des cellules IL-10+ (**Fig.1** de l'article 1)

Nous n'avons pas étudié les fonctions régulatrices des lymphocytes T IL-10+ induits, faute de temps mais aussi en supposant, que des facteurs autres que la bactérie sont nécessaires à la différenciation en T régulateurs. J'ai cependant débuté une étude pour déterminer si *F prau* elle-même induit la production par les DC de tels facteurs comme IDO1, IL-27, TGF- $\beta$ . Les résultats montrent que les IDC exposées à *F prau* pendant environ 40h ont une expression très fortement augmentée des gènes codant les deux chaînes de l'IL-27 et IDO1, comparées aux DC contrôles et aux DC exposées à M89.

Les résultats présentés dans l'article 1 montrent que deux des bactéries Clostridium capables d'induire des Treg Foxp3 chez la souris (Atarashi *et al.*, 2013) n'induisent pas ou peu de lymphocytes sécréteurs d'IL-10 et ont des effets moins importants que *F prau* sur les DC : expression plus faible d'IL-10 par les iDC et faible inhibition de la maturation. Cependant ces bactéries inhibent aussi la sécrétion d'IL-12. J'ai aussi étudié les effets sur les DC de nombreuses autres bactéries commensales, dont un rôle anti-inflammatoire avait été rapporté (plusieurs Clostridia mais aussi un Lactobacille et un Bacteroides). La synthèse des résultats des figures 7, 8 et 9 et du tableau 1 suggèrent que seule *Bacteroides thetaiotaomicron* partage l'ensemble des effets modulateurs de *F prau* sur les DC. Deux Clostridium M60 et M68 ont cependant des propriétés proches. La plupart des autres bactéries à l'exception peut-être des Clostridiums capables d'induire des Treg Foxp3 chez la souris (M88, 89, 90 et 91) ont des effets similaires à ceux de *F prau* mais souvent à des niveaux moindres. Ces bactéries à l'exception de M88 et M89 (article 1) n'ont pas été testés pour leur effet sur le priming des lymphocytes T (**article 1**).

La présence de *F prau* dans la muqueuse intestinale est bien démontrée (Sokol *et al.*, 2008 ; Lopez-Siles M *et al.*, 2015). Des contacts prolongés entre les DC de cette muqueuse et *F prau* sont donc possibles *in vivo*. Cependant, nos résultats portent sur des DC dérivées de monocytes et il reste à établir si les effets observés peuvent être retrouvés sur les DC du colon. Nous avons étudié l'effet de *F prau* sur l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 par les DC circulantes sur sang total, en collaboration avec Cécile Braudeau de la plateforme CIMNA du

CHU dirigée par le Dr Régis Josien. *F prau* a été ajouté au sang total en même temps ou 2h avant l'addition du LPS et la production de l'IL-12p40 a été étudiée dans les DC par marquage intracellulaire. Les résultats ne montrent pas d'inhibition de l'IL-12p40. Ce défaut d'inhibition rappelle celui que nous avons observé en ajoutant *F prau* à des iDC en même temps que le LPS. Deux hypothèses sont envisageables : soit les DC circulantes étudiées ne sont pas sensibles aux effets immuno-modulateurs de *F prau*, soit l'incubation courte avec la bactérie ne permet pas ces effets. Nos résultats soulèvent donc la question d'une contribution possible de *F prau* à induire le caractère tolérogène de DC de la muqueuse colique voire de macrophages. Un tel effet pourrait expliquer les observations ayant montré que l'abondance relative de cette bactérie est un marqueur de santé du colon, que des niveaux bas de cette bactéries peuvent être prédictifs de rechute, alors que des traitements efficaces peuvent s'accompagner d'une restauration du taux de cette bactérie (Miquel S *et al.*, 2013).

Sur le plan fonctionnel l'exposition à *F prau* a quatre effets potentiellement majeurs en terme d'homéostasie de la muqueuse intestinale : la sécrétion d'IL-10 par les iDC, le blocage de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-12p35 et p40 et TNF- $\alpha$ , mais aussi de IL-23 qui utilise la chaîne p40 et le priming des lymphocytes sécréteurs d'IL-10. Ces effets-semblent dépendre de la présence de la bactérie pendant la différenciation des DC, ou d'une incubation prolongée avec ces cellules. En effet ils ne sont pas observés sur des DC cultivées moins de 24h avec la bactérie juste avant la maturation.

De façon inattendue nous n'avons pas observé d'effet du butyrate sur le profil tolérogène des DC exposées à F et à cette molécule ou au butyrate seul (article 1) Ces résultats diffèrent de l'effet de cet acide gras à chaîne courte dans la différenciation ou la survie/expansion des Treg Foxp3 du colon de souris (Furusawa *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2013, Arpaia *et al.*, 2014).

Nous n'avons pas pu identifier les mécanismes de ces différents effets de *F prau*. L'engagement des récepteurs TLR2 et DC-SIGN et les signaux induits par l'IL-10 semblent être impliqués dans l'inhibition de maturation des DC en réponse au LPS (article1). Néanmoins, ni le blocage du TLR2 ni celui de DC-SIGN ne bloque la sécrétion d'IL-10 par les IDC exposées à *F prau*. Les DC expriment de très nombreux PRR en particulier des CLR comme Clec10a ou Clec4a (DCIR) qui peuvent induire la sécrétion d'IL-10 (van Vliet *et al.*, 2005 ; Sancho D and Reis e Sousa, 2012) .

Concernant le blocage des cytokines pro-inflammatoires IL-12, TNFA A et IL23. Nos résultats suggèrent que cet effet de dépend pas de l'IL-10 sécrété par les iDC en réponse à *F prau*, puisque le blocage de l'IL-10 et de son récepteur ne restaurent pas ces sécrétions (article 1). Les données de l'article 1 montrent que cette inhibition ne résulte pas non plus d'une inhibition de l'activation de NF-kB ni de la boucle d'amplification IFNAR/IFN $\beta$ . Le manque d'inhibition de NFkb dans les DC exposées à *F prau* lors de la stimulation par le LPS semble à priori contradictoire avec le blocage de NF-kB induit par *F prau* sur les PBMC (Sokol

*et al.*, 2008) et l'aptitude d'une protéine sécrétée par *F prau* à diminuer l'activation de NF-κB dans les cellules épithéliales (Quevrain, 2016). Cette différence est probablement due au fait que dans nos expériences la bactérie n'est plus présente dans les cultures lors de l'addition du LPS. Un mécanisme possible du blocage des cytokines pro-inflammatoires que nous n'avons pas directement testé est la stimulation chronique de nod2. Il sera possible de tester cette hypothèse en stimulant ce récepteur à l'aide de son ligand : le Muramyl dipeptide (MDP).

Il serait aussi intéressant de tester l'implication de différents PRR de la bactérie dont DC-SIGN et de l'IL-10 induit par *F prau* dans la modulation des propriétés de priming des DC. Pour questionner un rôle de l'IL-10, nous allons regarder si les DC des patients porteurs de la mutation *nod23020insC* différenciées en présence de *F prau* permettent ou non un tel priming alors qu'elles ne sécrètent pas d'IL-10.

Dans la perspective d'identifier des effecteurs de l'effet tolérogène de *F prau* sur les DC et en particulier de l'effet sur le priming des lymphocytes IL-10<sup>+</sup> nous avons lancé deux approches dont les résultats sont incomplètement analysés. Une étude de la transcription de gènes d'intérêt dans les DC exposées ou non à F ou à M89 pendant 40h et une étude du transcriptome de DC exposées ou non à ces deux bactérie puis stimulées 8h par le LPS. En effet M89 n'induit pas de priming des T IL-10 (article 1).

Les résultats des PCR montrent la forte capacité de *F prau* à induire des molécules qui pourraient être impliqués dans ses effets tolérogènes sur les DC ou dans l'induction des Treg DP8AAa. C'est le cas particulièrement de MMP9 susceptible d'induire du TGF-β actif par clivage du TGF-β latent, de l'IL-27, cytokine connue pour ses capacités à induire la différenciation de Tr1 et de IDO-1 inducteur de Treg. Une forte augmentation de l'expression de SOCS3 suggère par ailleurs que cet inhibiteur pourrait-être impliqué dans le blocage de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans les DC exposées à *F prau*. SOCS3, a été impliqué dans l'effet anti-inflammatoire de l'activation chronique de nod2 dans les macrophages. Enfin nous avons identifié l'expression sur les DC exposées à *F prau* de marqueurs impliqués dans la tolérance *in vivo* tels que SIRPα et PDL-1.

Lors du priming des CD4 naïfs par des DC exposées à *F prau* puis stimulées par le LPS, nous n'avons pas induit l'expression de CD8α sur les CD4 stimulés. Cette induction a par contre été observée lors de stimulations de CD4 naïfs par des monocytes ou des DC immatures chargés par la bactérie (**Fig.15** des résultats complémentaires de la partie 1). Ces données suggèrent que cette différence peut être liée au stade de différenciation des APC. Nous l'avons en effet observée aussi lors d'une expérience visant à obtenir des Lymphocytes DP8α spécifiques de *F prau* par deux stimulations de CD4 naïfs à une semaine d'intervalle par des mDC chargées par la bactérie (résultats non montrés). De plus, dans certaines expériences nous avons observé que l'expression du CD8α peut exister transitoirement ou pas. L'établissement en lignées des cultures représentées sur la figure 16 (résultats complémentaires de la partie 1) par passages sur cellules feeders montre le caractère stable

du phénotype des CD4CD8 $\alpha\alpha$  induit par certaines stimulations avec *F prau* et/ ou le butyrate. Nous envisageons de caractériser le profil régulateur de ces DP8 $\alpha$  et leur spécificité pour la bactérie. Dans cette perspective nous avons congelé des lignées de ces cellules ce qui nous permettra de poser ces deux questions.

Nous n'avons pas étudié si l'expression de CD8 $\alpha$  est nécessaire aux fonctions régulatrices des Treg induits par *F prau*. L'induction du CD8 $\alpha$  sur les Treg du colon pourrait dépendre comme celle du CD103 de facteurs présents dans la muqueuse intestinale. A l'appui de cette hypothèse, beaucoup des lymphocytes intestinaux expriment ce marqueur (Das G *et al.*, 2003 ; Cheroutre *et al.*, 2011), dont le rôle n'est pas clair même chez la souris.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons montré que la proportion des lymphocytes DP8AA $\alpha$  du sang est très variable selon les individus, de même que le % de ces cellules exprimant des marqueurs de homing pour l'intestin tels que CCR6, CXCR3, CXCR6 et beta7 (**Fig.1** des résultats complémentaires de la partie 2). La chaîne  $\beta$ 7 peut s'associer à  $\alpha$ 4 ou  $\alpha$ E (CD103). Ayant observé que la proportion des PBL DP8 $\alpha$  qui expriment CD103 est très faible et que des % identiques de ces cellules expriment  $\alpha$ 4 et  $\beta$ 7 nous en avons conclu que le % de  $\beta$ 7 traduit essentiellement la fréquence des lymphocytes  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 qui est un marqueur de migration dans l'intestin. Les résultats des simples marquages de la figure 1 montrent que CCR6, CXCR3 et surtout CXCR6 sont exprimés par des pourcentages plus importants des DP que de CD4 et, de façon très intéressante car suggérant un lien possible avec la diversité de composition du microbiote, que ces marqueurs sont exprimés par des % très variables d'un individu à l'autre contrairement à une distribution apparemment gaussienne de leur expression par les CD4. Ces résultats nous ont incité à rechercher l'intérêt de ces marqueurs ainsi que  $\beta$ 7 pour identifier les PBL DP8 $\alpha$  originaires du colon spécifiques de *F prau*. Par contre, les récepteurs CCR9, CXCR10 et CXCR5 beaucoup moins exprimés par les DP n'ont pas fait l'objet d'autres études.

Nous avons par ailleurs étudié la fréquence des lymphocytes DP8 $\alpha$  du sang chez de nombreux donneurs sains d'âges différents, afin d'avoir des témoins permettant de rechercher des anomalies de la fréquence de ces cellules dans différentes pathologies comme cela avait été fait auparavant pour les MICI (Sarrabayrouse *et al.*, 2014). Pour cela, nous avons mis au point un test de quantification des DP8 $\alpha$  sur sang total nécessitant seulement 100 $\mu$ l de sang. Les résultats montrent une très grande variabilité de la fréquence des DP8 $\alpha$  circulants, et une tendance à l'augmentation de ces cellules avec l'âge (**Fig.2** des résultats complémentaires de la partie 2).

Des résultats préliminaires suggèrent que cette augmentation n'est pas due à des Lymphocytes DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*, en particulier chez des individus âgés ayant des pourcentages très élevés de ces cellules. Chez ces donneurs on observe fréquemment un enrichissement des cellules DP8 $\alpha$  exprimant un haut niveau du CD8 $\alpha$  (mais qui reste inférieur à celui des lymphocytes CD8 $\alpha\beta$ ). Ces lymphocytes expriment en effet beaucoup moins des CCR de homing pour l'intestin que les DP8 $\alpha$  ayant un niveau de CD8 $\alpha$  plus faible

(résultats non montrés). Ces augmentations pourraient résulter de l'expansion avec l'âge de populations de même phénotype mais d'origine, voire de fonctions différentes, telles que les populations de PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de virus décrites comme présentes parfois sous forme d'expansion clonales (Sun M A 2001; Nascimbeni M 2004).

Nous avons également étudié la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  chez des patients atteints de spondylarthrite (n=15), d'obésité avec diabète (n=15), d'obésité sans diabète (n=47 et de pré-diabétiques non obèses (n=19) ainsi que de patients atteints de cancer colorectal (n=21). Les % de DP8 $\alpha$  ont été comparés avec ceux présents chez des donneurs sains d'âge équivalent (donneurs de sang de l'EFS sauf dans l'étude MILCA ou des témoins internes ont été analysés).

Une diminution significative des PBL DP8 $\alpha$  parmi les PBL CD3 et CD4 est observée chez les patients SPA (**Fig.4** des résultats complémentaires de la partie 2). Ces données suggèrent une diminution des lymphocytes DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* dans cette pathologie souvent associée à des pathologies de type MICI. Et à une diminution de *F prau*. (Gill T *et al.*, 2015).

Une tendance non significative à la diminution de ces cellules est observée chez les patients atteints de cancer colique (**Fig.3** et aucune différence n'est observée chez les patients atteints de diabète et/ou d'obésité (**Fig.5** des résultats complémentaires de la partie 2)).

Dans ces deux pathologies la moyenne d'âge des patients était nettement plus élevée que chez les patients SPA : respectivement 44, 55 et 60 chez les obèses non diabétiques, diabétiques et chez les pré-diabétiques non obèses et 66 ans chez les patients atteints de cancer colique. Si notre hypothèse que des PBL DP8 $\alpha$  d'origine et de fonction inconnue augmentent avec l'âge, il est probable que la quantification des DP8 $\alpha$  totaux ne permet pas de détecter une éventuelle baisse de la fréquence des Treg DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* dont la proportion est moindre. Les marqueurs identifiés présentés dans l'article 1 et le facteur de transcription en cours d'analyse permettront de réaborder cette question à l'aide des PBMC que nous avons congelés.

En conclusion, notre étude permettra de mieux comprendre la nature et les mécanismes des interactions de certaines bactéries commensales avec leur hôte et la contribution de ces interactions au maintien de l'homéostasie immunitaire du colon, par l'induction de Treg. Ces données pourraient avoir des retombées socio-économiques majeures telles que la prévention ou le traitement de maladies chroniques résultant d'un défaut d'immuno-régulation dans l'environnement intestinal. Afin d'atteindre ces objectifs ambitieux, mon équipe réalise par ailleurs un projet ANR dont l'un des objectifs est de tester la capacité des Treg DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* à prévenir les MICI in vivo dans un modèle murin de souris humanisées NOD SCID gamma KO exprimant du HLA-DR\*0401. Pour cela, mon équipe produira des clones de Treg spécifiques de *F prau* restreints HLA-DR\*0401

et le Dr Harry Sokol (UMR1319 Micalis, INRA, Jouy-en-Josas) testera la capacité de ces clones à prévenir ou atténuer la colite expérimentale induite par injection de TNBS ou de DSS chez ces souris, conjointement ou non à l'injection de la bactérie humaine. Le second objectif majeur du projet ANR en cours est de déterminer si la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* circulants a une valeur de marqueur pronostique ou de dysbiose. Pour cela les marqueurs de ces Treg en partie identifiés dans l'article 2 seront utilisés par le Dr Harry Sokol pour quantifier ces cellules chez les patients MICI, dont la composition du microbiote fécal et en particulier le niveau relatif de *F prau* sera étudié. Le Dr Sokol analysera également chez ces patients si la fréquence des PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* est prédictive de rechute post-chirurgie, comme il l'a montré précédemment pour le niveau de la bactérie dans le microbiote fécal chez les patients atteints de maladie de Crohn au niveau de l'iléon (Sokol *et al.*, 2008).

## Référence Bibliographiques

### A

- 1- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013;**14**:307-8.
- 2- Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008;**251**:109-15.
- 3- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:745-56.
- 4- Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;**103**:131-6.
- 5- Akdis M. T-cell tolerance to inhaled allergens: mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Opin Biol Ther* 2008;**8**:769-77.
- 6- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011;**6**:e24226.
- 7- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:499-511.
- 8- Altman JK, Plataniias LC. Exploiting the mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2008;**15**:88-94.
- 9- Amar Y, Rizzello V, Cavaliere R, Campana S, De Pasquale C, Barberi C, *et al.* Divergent signaling pathways regulate IL-12 production induced by different species of Lactobacilli in human dendritic cells. *Immunol Lett* 2015;**166**:6-12.
- 10- Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* 2010;**11**:854-61.
- 11- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;**504**:451-5.
- 12- Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;**184**:387-96.
- 13- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;**190**:995-1004.
- 14- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013;**500**:232-6.
- 15- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 2011;**331**:337-41.

**16-** Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, *et al.* A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007;**8**:1380-9.

## B

**17-** Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, *et al.* High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;**179**:493-502.

**18-** Bacchetta R, Gregori S, Serafini G, Sartirana C, Schulz U, Zino E, *et al.* Molecular and functional characterization of allogantigen-specific anergic T cells suitable for cell therapy. *Haematologica* 2010;**95**:2134-43.

**19-** Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 2002;**32**:2237-45.

**20-** Bachmann MF, Kohler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol* 1999;**163**:1128-31.

**21-** Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006;**176**:4622-31.

**22-** Bagot M, Echchakir H, Mami-Chouaib F, Delfau-Larue MH, Charue D, Bernheim A, *et al.* Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 1998;**91**:4331-41.

**23-** Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:767-811.

**24-** Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degermann S, Heusser C, Tonegawa S, *et al.* Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 1990;**172**:239-44.

**25-** Barnett MW, Watson RF, Vitalis T, Porter K, Komiyama NH, Stoney PN, *et al.* Synaptic Ras GTPase activating protein regulates pattern formation in the trigeminal system of mice. *J Neurosci* 2006;**26**:1355-65.

**26-** Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003;**300**:1524-5.

**27-** Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. 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* 2007;**204**:1765-74.

**28-** Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS, Jr., Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I $\kappa$ B kinase activity. *Blood* 2004;**104**:1100-9.

**29-** Blue ML, Daley JF, Levine H, Schlossman SF. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J Immunol* 1985;**134**:2281-6.

- 30-** Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol* 2014;**5**:131.
- 31-** Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J Immunol* 1994;**152**:1509-14.
- 32-** Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;**204**:1303-10.
- 33-** Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;**110**:1225-32.
- 34-** Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 2008;**456**:507-10.
- 35-** Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Hacker G, *et al.* Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2009;**183**:145-54.
- 36-** Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;**27**:68-73.
- 37-** Buckland M, Jago C, Fazekesova H, George A, Lechler R, Lombardi G. Aspirin modified dendritic cells are potent inducers of allo-specific regulatory T-cells. *Int Immunopharmacol* 2006;**6**:1895-901.
- 38-** Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:790-801.
- 39-** Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, Shaw DG, Meisel M, McDonald BD, *et al.* Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* 2015;**43**:541-53.
- 40-** Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O'Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ, *et al.* Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol* 2003;**171**:5853-64.
- 41-** Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008;**28**:112-21.
- 42-** Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, *et al.* ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008;**180**:774-82.

## C

- 43-** Cao AT, Yao S, Gong B, Nurieva RI, Elson CO, Cong Y. Interleukin (IL)-21 promotes intestinal IgA response to microbiota. *Mucosal Immunol* 2015;**8**:1072-82.

- 44-** Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007;**27**:635-46.
- 45-** Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003;**197**:403-11.
- 46-** Carlsen HS, Yamanaka T, Scott H, Rugtveit J, Brandtzaeg P. The proportion of CD40+ mucosal macrophages is increased in inflammatory bowel disease whereas CD40 ligand (CD154)+ T cells are relatively decreased, suggesting differential modulation of these costimulatory molecules in human gut lamina propria. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:1013-24.
- 47-** Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 2008;**28**:740-50.
- 48-** Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;**198**:1875-86.
- 49-** Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2012;**7**:e39743.
- 50-** Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;**265**:1237-40.
- 51-** Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003;**19**:425-36.
- 52-** Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2011;**11**:445-56.
- 53-** Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol* 2013;**75**:289-311.
- 54-** Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, *et al.* Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;**172**:6003-10.
- 55-** Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, *et al.* IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med* 2012;**209**:1595-609.
- 56-** Collison LW, C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. A. Vignali The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory Tcell function. *Nature* 2007;**450**:566-9.
- 57-** Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;**450**:566-9.
- 58-** Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;**15**:297-322.

- 59-** Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;**204**:1757-64.
- 60-** Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, *et al.* SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 2003;**4**:540-5.
- 61-** Cronin SJ, Penninger JM. From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity. *Immunol Rev* 2007;**220**:151-68.
- 62-** Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, Blom B, Spits H. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 2005;**35**:383-90.
- 63-** Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 2008;**29**:114-26.

## D

- 64-** Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, *et al.* IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;**9**:1347-55.
- 65-** Das G, Augustine MM, Das J, Bottomly K, Ray P, Ray A. An important regulatory role for CD4+CD8 alpha alpha T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:5324-9.
- 66-** Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;**204**:1257-65.
- 67-** Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: the dendritic cell --> regulatory T cell axis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1070**:233-8.
- 68-** Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007;**8**:1086-94.
- 69-** DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, *et al.* Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 2011;**471**:220-4.
- 70-** Desfrancois J, Derre L, Corvaisier M, Le Mevel B, Catros V, Jotereau F, *et al.* Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer* 2009;**125**:374-80.
- 71-** Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, Godet Y, Khammari A, Dreno B, *et al.* Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS One* 2010;**5**:e8437.
- 72-** Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 2003;**170**:1383-91.
- 73-** Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004;**135**:64-73.

- 74-** Dudziak D, Nimmerjahn F, Bornkamm GW, Laux G. Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol* 2005;**174**:6672-6.
- 75-** Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;**165**:6037-46.

## E/F

- 76-** Fainaru O, Shay T, Hantisteanu S, Goldenberg D, Domany E, Groner Y. TGFbeta-dependent gene expression profile during maturation of dendritic cells. *Genes Immun* 2007;**8**:239-44.
- 77-** Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Gefter ML, *et al.* Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996;**26**:130-5.
- 78-** Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002;**9**:1069-77.
- 79-** Favre L, Spertini F, Corthesy B. Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J Immunol* 2005;**175**:2793-800.
- 80-** Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**:203-8.
- 81-** Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977;**18**:921-37.
- 82-** Ferreira GB, Gysemans CA, Demengeot J, da Cunha JP, Vanherwegen AS, Overbergh L, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes tolerogenic dendritic cells with functional migratory properties in NOD mice. *J Immunol* 2014;**192**:4210-20.
- 83-** Ferreira GB, Vanherwegen AS, Eelen G, Gutierrez AC, Van Lommel L, Marchal K, *et al.* Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep* 2015.
- 84-** Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995;**155**:1079-90.
- 85-** Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, *et al.* Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 2007;**8**:1372-9.
- 86-** Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, *et al.* Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 2001;**167**:7150-6.
- 87-** Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;**4**:330-6.
- 88-** Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005;**6**:1142-51.

- 89-** Franchi L, Munoz-Planillo R, Reimer T, Eigenbrod T, Nunez G. Inflammasomes as microbial sensors. *Eur J Immunol* 2010;**40**:611-5.
- 90-** Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Kiyono H. alpha beta T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes with CD4+, CD8- and CD4+, CD8+ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. *J Immunol* 1993;**151**:6681-91.
- 91-** Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* 2000;**164**:64-71.
- 92-** Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;**98**:70-7.
- 93-** Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013;**504**:446-50.

## G

- 94-** Gagliani N, Jofra T, Valle A, Stabilini A, Morsiani C, Gregori S, *et al.* Transplant tolerance to pancreatic islets is initiated in the graft and sustained in the spleen. *Am J Transplant* 2013;**13**:1963-75.
- 95-** Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013;**19**:739-46.
- 96-** Garoute C, Plouvier N, Iacob E, Cotrel R, Suguenot R, Lecuyer E, *et al.* [Severe hyponatremia during chemotherapy for small cell carcinoma]. *Rev Mal Respir* 2015;**32**:52-7.
- 97-** Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;**445**:771-5.
- 98-** Geissmann F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehuen A, *et al.* A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol* 2001;**166**:346-52.
- 99-** Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;**76**:287-99.
- 100-** Gershon RK, Mokyr MB, Mitchell MS. Activation of suppressor T cells by tumour cells and specific antibody. *Nature* 1974;**250**:594-6.
- 101-** Gill T, Asquith M, Rosenbaum JT, Colbert RA. The intestinal microbiome in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2015;**27**:319-25.
- 102-** Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:594-606.
- 103-** Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* 2011;**77**:89-99.

- 104-** Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol* 2012;**3**:30.
- 105-** Gregori S, Roncarolo MG, Bacchetta R. Methods for in vitro generation of human type 1 regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2011;**677**:31-46.
- 106-** Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010;**116**:935-44.
- 107-** Greiner DL, Mordes JP, Handler ES, Angelillo M, Nakamura N, Rossini AA. Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *J Exp Med* 1987;**166**:461-75.
- 108-** Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002;**3**:1097-101.
- 109-** Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004;**104**:2840-8.
- 110-** Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;**389**:737-42.
- 111-** Ha M, Kwon HJ, Leem JH, Kim HC, Lee KJ, Park I, *et al.* Korean Environmental Health Survey in Children and Adolescents (KorEHS-C): survey design and pilot study results on selected exposure biomarkers. *Int J Hyg Environ Health* 2014;**217**:260-70.
- 112-** Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, *et al.* Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 2003;**101**:4457-63.
- 113-** Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, *et al.* Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011;**34**:237-46.
- 114-** Hale JS, Ahmed R. Memory T follicular helper CD4 T cells. *Front Immunol* 2015;**6**:16.
- 115-** Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 2011;**35**:13-22.
- 116-** Hamdi H, Godot V, Maillot MC, Prejean MV, Cohen N, Krzysiek R, *et al.* Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 2007;**110**:211-9.
- 117-** Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2013;**31**:743-91.
- 118-** Hansson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol* 2012;**15**:57-62.
- 119-** Harkiolaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, *et al.* T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 2009;**30**:348-57.

- 120-** Harman AN, Bye CR, Nasr N, Sandgren KJ, Kim M, Mercier SK, *et al.* Identification of lineage relationships and novel markers of blood and skin human dendritic cells. *J Immunol* 2013;**190**:66-79.
- 121-** Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;**90**:3245-87.
- 122-** Hart DN, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 1988;**168**:157-70.
- 123-** Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016;**535**:75-84.
- 124-** Hopkins PA, Srisakandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005;**140**:395-407.
- 125-** Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol* 2003;**81**:331-71.
- 126-** Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;**21**:503-13.

## I/J

- 127-** Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, *et al.* Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001;**194**:847-53.
- 128-** Iellem A MM, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, *et al.* Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2001;**194**:847-53.
- 129-** Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009;**10**:981-91.
- 130-** Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, *et al.* The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000;**191**:927-36.
- 131-** Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, *et al.* The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994;**180**:1849-60.
- 132-** Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;**4**:337-49.
- 133-** Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 2006;**126**:1121-33.

- 134-** Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2007;**25**:381-418.
- 135-** Janssens W, Carlier V, Wu B, VanderElst L, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003;**171**:4604-12.
- 136-** Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, Hernandez-Lopez C, Zapata AG, Varas A. Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2002;**168**:5005-13.
- 137-** Jin JO, Han X, Yu Q. Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun* 2013;**40**:28-44.
- 138-** Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 2007;**178**:1433-42.
- 139-** Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;**171**:6323-7.
- 140-** Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;**192**:1213-22.
- 141-** Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:531-64.

## K

- 142-** Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;**194**:863-9.
- 143-** Kang SW, Kim SH, Lee N, Lee WW, Hwang KA, Shin MS, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. *J Immunol* 2012;**188**:5276-82.
- 144-** Karlsson G, Liu Y, Larsson J, Goumans MJ, Lee JS, Thorgeirsson SS, *et al.* Gene expression profiling demonstrates that TGF-beta1 signals exclusively through receptor complexes involving Alk5 and identifies targets of TGF-beta signaling. *Physiol Genomics* 2005;**21**:396-403.
- 145-** Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;**282**:324-6.
- 146-** Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;**34**:637-50.
- 147-** Kim KS, Hong SW, Han D, Yi J, Jung J, Yang BG, *et al.* Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* 2016;**351**:858-63.
- 148-** Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002;**168**:1080-6.

- 149-** Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, *et al.* Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J Immunol* 2012;**189**:2869-78.
- 150-** Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, *et al.* S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:19474-9.
- 151-** Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash DV, Winsauer C, Prepens S, Seleznik GM, *et al.* Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 2013;**342**:1243-6.
- 152-** Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, *et al.* Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2007;**178**:2661-5.

## L

- 153-** Lampen A, Meyer S, Arnhold T, Nau H. Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;**295**:979-85.
- 154-** Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;**201**:233-40.
- 155-** Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, *et al.* Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011;**478**:250-4.
- 156-** Laux I, Khoshnan A, Tindell C, Bae D, Zhu X, June CH, *et al.* Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging. *Clin Immunol* 2000;**96**:187-97.
- 157-** Lecuyer E, Rakotobe S, Lengline-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, *et al.* Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* 2014;**40**:608-20.
- 158-** Lee AY, Aaker JL, Gardner WL. The pleasures and pains of distinct self-construals: the role of interdependence in regulatory focus. *J Pers Soc Psychol* 2000;**78**:1122-34.
- 159-** Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;**105**:1162-9.
- 160-** Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;**444**:1022-3.
- 161-** Li MO, Rudensky AY. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:220-33.
- 162-** Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007;**26**:579-91.

- 163-** Li YN, Huang F, Cheng HJ, Li SY, Liu L, Wang LY. Intestine-derived *Clostridium leptum* induces murine tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in vitro. *Hum Immunol* 2014;**75**:1232-8.
- 164-** Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008;**180**:5916-26.
- 165-** Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:361-70.
- 166-** Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006;**177**:840-51.
- 167-** Liu B, Gulati AS, Cantillana V, Henry SC, Schmidt EA, Daniell X, *et al.* *Irgm1*-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;**305**:G573-84.
- 168-** Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015;**63**:1-12.
- 169-** Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;**203**:1701-11.
- 170-** Lochner M, Berard M, Sawa S, Hauer S, Gaboriau-Routhiau V, Fernandez TD, *et al.* Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. *J Immunol* 2011;**186**:1531-7.
- 171-** Long M, Park SG, Strickland I, Hayden MS, Ghosh S. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 2009;**31**:921-31.
- 172-** Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Abella C, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, *et al.* Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:7582-92.

## M

- 173-** Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 2013;**6**:666-77.
- 174-** Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev* 2011;**241**:206-27.
- 175-** Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;**55**:205-11.
- 176-** Mann ER, Bernardo D, English NR, Landy J, Al-Hassi HO, Peake ST, *et al.* Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. *Gut* 2016;**65**:256-70.

- 177-** Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthesy B, Neutra MR. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* 2002;**169**:1844-51.
- 178-** Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006;**25**:441-54.
- 179-** Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology* 2000;**101**:53-60.
- 180-** Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, *et al.* Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;**8**:931-41.
- 181-** Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**:144-54.
- 182-** McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, *et al.* The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 2009;**10**:314-24.
- 183-** McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;**16**:311-23.
- 184-** McIlroy D, Troadec C, Grassi F, Samri A, Barrou B, Autran B, *et al.* Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 2001;**97**:3470-7.
- 185-** Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999;**64**:429-35.
- 186-** Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013;**31**:563-604.
- 187-** Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 2006;**22**:561-9.
- 188-** Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 2010;**185**:3190-8.
- 189-** Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:421-5.
- 190-** Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM, Sokol H, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 2013;**16**:255-61.

- 191-** Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;**172**:4676-80.
- 192-** Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;**142**:46-54 e42; quiz e30.
- 193-** Monti P, Mercalli A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* 2003;**75**:137-45.
- 194-** Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;**19**:683-765.
- 195-** Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, *et al.* IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999;**11**:803-11.
- 196-** Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**:610-21.
- 197-** Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, *et al.* Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 2014;**343**:1249288.
- 198-** Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;**136**:2348-57.
- 199-** Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:667-85.
- 200-** Mucida D, Husain MM, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, *et al.* Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat Immunol* 2013;**14**:281-9.
- 201-** Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;**10**:1178-84.
- 202-** Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:8686-91.
- 203-** Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 2006;**6**:379-86.

## N/O

- 204-** Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *J Histochem Cytochem* 1996;**44**:721-31.
- 205-** Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007;**8**:1217-26.

- 206-** Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;**194**:629-44.
- 207-** Naranjo-Gomez M, Raich-Regue D, Onate C, Grau-Lopez L, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, *et al.* Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med* 2011;**9**:89.
- 208-** Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One* 2011;**6**:e20145.
- 209-** 209 Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004;**104**:478-86.
- 210-** Nussenzweig MC, Steinman RM, Unkeless JC, Witmer MD, Gutchinov B, Cohn ZA. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J Exp Med* 1981;**154**:168-87.
- 211-** O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004;**10**:801-5.
- 212-** Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORgammat(+) T cells. *Science* 2015;**349**:989-93.
- 213-** Osorio F, Fuentes C, Lopez MN, Salazar-Onfray F, Gonzalez FE. Role of Dendritic Cells in the Induction of Lymphocyte Tolerance. *Front Immunol* 2015;**6**:535.
- 214-** Ouellette AJ. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;**26**:547-53.
- 215-** Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 2010;**32**:642-53.

## P

- 216-** Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;**12**:821-32.
- 217-** Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* 1988;**335**:642-4.
- 218-** Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;**8**:1353-62.
- 219-** Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:3459-67.
- 220-** Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* 2004;**3**:215-20.
- 221-** Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 2017.

- 222-** Patel VI, Metcalf JP. Identification and characterization of human dendritic cell subsets in the steady state: a review of our current knowledge. *J Investig Med* 2016;**64**:833-47.
- 223-** Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;**178**:145-53.
- 224-** Periwal SB, Cebra JJ. Respiratory mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates virus-specific humoral and cellular immune responses, including double-positive (CD4+)/CD8(+) T cells. *J Virol* 1999;**73**:7633-40.
- 225-** Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2007;**2**:328-39.
- 226-** Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;**19**:615-22.
- 227-** Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, *et al.* CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002;**196**:237-46.
- 228-** Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, *et al.* Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999;**162**:6473-81.
- 229-** Pilette C, Detry B, Guisset A, Gabriels J, Sibille Y. Induction of interleukin-10 expression through Fc $\alpha$  receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol Cell Biol* 2010;**88**:486-93.
- 230-** Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, *et al.* DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008;**38**:1654-63.
- 231-** Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol* 2011;**23**:202-8.

## Q/R

- 232-** Quevrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016;**65**:415-25.
- 233-** Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011;**332**:600-3.
- 234-** Remy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, *et al.* Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol* 2009;**182**:1877-84.
- 235-** Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011;**32**:256-64.
- 236-** Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 2004;**76**:719-26.

- 237-** Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, Du Pont JS, Hoefsmit EC, Kamperdijk EW. Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1994;**98**:330-6.
- 238-** Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005;**35**:1133-42.
- 239-** Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;**180**:83-93.
- 240-** Romani N, Lenz A, Glassel H, Stossel H, Stanzl U, Majdic O, *et al.* Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 1989;**93**:600-9.
- 241-** Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep* 2016;**6**:18507.
- 242-** Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:12204-9.
- 243-** Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008;**28**:546-58.

## S

- 244-** Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 2014; **259**: 88-102.
- 245-** Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 1982;**156**:1577-86.
- 246-** Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;**133**:775-87.
- 247-** Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;**182**:389-400.
- 248-** Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;**179**:1109-18.
- 249-** Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;**12**:431-40.
- 250-** Salter RD, Watkins SC. Dendritic cell altered states: what role for calcium? *Immunol Rev* 2009;**231**:278-88.

- 251-** Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:491-529.
- 252-** Sarrabayrouse G, Alameddine J, Altare F, Jotereau F. Microbiota-Specific CD4CD8alphaalpha Tregs: Role in Intestinal Immune Homeostasis and Implications for IBD. *Front Immunol* 2015;**6**:522.
- 253-** Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quevrain E, *et al.* CD4CD8alphaalpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol* 2014;**12**:e1001833.
- 254-** Sarrabayrouse G, Corvaisier M, Ouisse LH, Bossard C, Le Mevel B, Potiron L, *et al.* Tumor-reactive CD4+ CD8alphabeta+ CD103+ alphabetaT cells: a prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2011;**128**:2923-32.
- 255-** Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008;**28**:402-13.
- 256-** Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 2013;**38**:187-97.
- 257-** Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Frohlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, *et al.* The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 2014;**513**:564-8.
- 258-** Schrader JW. Interleukin is as interleukin does. *Trends Immunol* 2002;**23**:573-4.
- 259-** Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;**203**:1693-700.
- 260-** Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of RORgamma(+) regulatory T cells. *Science* 2015;**349**:993-7.
- 261-** Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;**209**:653-60.
- 262-** Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;**31**:335-40.
- 263-** Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med* 1986;**163**:436-51.
- 264-** Shalev I, Wong KM, Foerster K, Zhu Y, Chan C, Maknoja A, *et al.* The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. *Hepatology* 2009;**49**:387-97

- 265-** Shen Y, Giardino Torchia ML, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* 2012;**12**:509-20.
- 266-** Sheridan BS, Lefrancois L. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;**12**:513-21.
- 267-** Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**:389-400.
- 268-** Shin JS, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 2006;**444**:115-8.
- 269-** Shouval DS, Biswas A, Goettel JA, McCann K, Conaway E, Redhu NS, *et al.* Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* 2014;**40**:706-19.
- 270-** Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;**359**:693-9.
- 271-** Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, *et al.* Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 2014;**40**:128-39.
- 272-** Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;**341**:569-73.
- 273-** Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, *et al.* Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005;**115**:1260-7.
- 274-** Snoeck HW. Quantitative trait analysis in the investigation of function and aging of hematopoietic stem cells. *Methods Mol Med* 2005;**105**:47-62.
- 275-** Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1183-9.
- 276-** Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:145-9.
- 277-** Steimle A, Frick JS. Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J Immunol Res* 2016;**2016**:1958650.
- 278-** Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;**93**:1634-42.
- 279-** Steinbrink K, Paragnik L, Jonuleit H, Tuting T, Knop J, Enk AH. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res* 2000;**292**:437-45.

- 280-** Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;**159**:4772-80.
- 281-** Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974;**139**:380-97.
- 282-** Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:685-711.
- 283-** Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997;**156**:25-37.
- 284-** Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:95-114.
- 285-** Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, *et al.* Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 2006;**18**:1197-209.
- 286-** Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;**204**:1775-85.
- 287-** Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 2001;**16**:115-23.

## T

- 288-** Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 2005;**6**:152-62.
- 289-** Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, *et al.* 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* 1998;**10**:1969-80.
- 290-** Takahashi T *et al.* 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* 1998;**10**:1969-80.
- 291-** Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:335-76.
- 292-** Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* 2005;**5**:228-36.
- 293-** Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:295-309.
- 294-** Tauschmann M, Prietl B, Treiber G, Gorkiewicz G, Kump P, Hogenauer C, *et al.* Distribution of CD4(pos) -, CD8(pos) - and regulatory T cells in the upper and lower gastrointestinal tract in healthy young subjects. *PLoS One* 2013;**8**:e80362.

- 295-** Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 2010;**184**:3433-41.
- 296-** Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, *et al.* Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999;**223**:1-15.
- 297-** Toledano N, Gur-Wahnon D, Ben-Yehuda A, Rachmilewitz J. Novel CD47: SIRPalpha dependent mechanism for the activation of STAT3 in antigen-presenting cell. *PLoS One* 2013;**8**:e75595.
- 298-** Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007;**8**:825-34.
- 299-** Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005;**23**:975-1028.
- 300-** Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007;**178**:7018-31.

## U

- 301-** Ueda Y, Kayama H, Jeon SG, Kusu T, Isaka Y, Rakugi H, *et al.* Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int Immunol* 2010;**22**:953-62.
- 302-** Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, *et al.* Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;**219**:118-42.
- 303-** van Vliet SJ, Bay S, Vuist IM, Kalay H, Garcia-Vallejo JJ, Leclerc C, *et al.* MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF-alpha secretion. *J Leukoc Biol* 2013;**94**:315-23.
- 304-** Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell development. *J Immunol* 2008;**181**:3285-90.
- 305-** Veenbergen S, Samsom JN. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2012;**24**:269-76.
- 306-** Velasquez-Lopera MM, Correa LA, Garcia LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2008;**154**:107-14.
- 307-** Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, *et al.* Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002;**295**:1726-9.
- 308-** Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbj H, Westendorf A, Buer J, *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 2008;**9**:1341-6.

- 309-** Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, *et al.* 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* 2004;**172**:5986-93.
- 310-** Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:523-32.
- 311-** Vlad G PF, Colovai A, Cortesini R, Della Pietra F, Suci-Foca N, *et al.* Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *J Hum Immunol* 2003; **64**:483–9.

## W

- 312-** Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:5126-31.
- 313-** Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol* 2013;**8**:477-512.
- 314-** Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;**24**:677-88.
- 315-** Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol* 2001;**2**:671-2.
- 316-** Whittaker DS, Bahjat KS, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Autoregulation of human monocyte-derived dendritic cell maturation and IL-12 production by cyclooxygenase-2-mediated prostanoïd production. *J Immunol* 2000;**165**:4298-304.
- 317-** Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995;**3**:521-30.
- 318-** Williams LA, Egner W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol* 1994;**153**:41-103.
- 319-** Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;**322**:271-5.
- 320-** Wohlfert E, Belkaid Y. Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol* 2008;**28**:707-15.
- 321-** Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, *et al.* GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest* 2011;**121**:4503-15.
- 322-** Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000;**30**:1807-12.
- 323-** Woltman AM, van der Kooij SW, de Fijter JW, van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am J Transplant* 2006;**6**:2580-91.
- 324-** Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 2005;**174**:688-95.

**325-** Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007;**26**:741-50.

## X/Y

**326-** Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* 2005;**62**:45-54.

**327-** Yang BH, Hagemann S, Mamareli P, Lauer U, Hoffmann U, Beckstette M, *et al.* Foxp3(+) T cells expressing ROR $\gamma$  represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2016;**9**:444-57.

**328-** Yu CI, Becker C, Wang Y, Marches F, Helft J, Leboeuf M, *et al.* Human CD1c<sup>+</sup> dendritic cells drive the differentiation of CD103<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> mucosal effector T cells via the cytokine TGF- $\beta$ . *Immunity* 2013;**38**:818-30.

## Z

**329-** Zandi-Nejad K, Takakura A, Jurewicz M, Chandraker AK, Offermanns S, Mount D, *et al.* The role of HCA2 (GPR109A) in regulating macrophage function. *FASEB J* 2013;**27**:4366-74.

**330-** Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006;**107**:3925-32.

**331-** Zheng Z, Narita M, Takahashi M, Liu A, Furukawa T, Toba K, *et al.* Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;**27**:93-103.

**332-** Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* 2013;**4**:333.

**333-** Zsigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, Walker CR, Yona S, Kim KW, *et al.* Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 2014;**40**:720-33.

**334-** Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;**72**:55-66.

# Thèse de Doctorat

Joudy ALAMEDDINE

Lymphocytes T régulateurs induits par *Faecalibacterium prausnitzii* :  
Modalités de leur induction et signification fonctionnelle.

## Résumé

Comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie des muqueuses est un enjeu majeur pour prévenir ou traiter les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Mon équipe d'accueil a montré la présence dans la muqueuse colique et le sang de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) sécréteurs d'IL-10 induits par la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii* (*F prau*). De plus, ces Treg sont diminués dans la muqueuse colique et le sang des patients atteints de MICI. Ces données, et la diminution de *F prau* observée dans ces pathologies, suggèrent l'existence d'un lien entre la diminution de *F prau* et celle des Treg spécifiques et un rôle de ces cellules dans la prévention de l'inflammation. Mon projet de thèse a consisté à rechercher comment *F prau* induit des Treg et à mieux caractériser et quantifier les PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau*, afin de questionner leur signification fonctionnelle. Nous montrons que l'exposition des cellules dendritiques (DC) à *F prau* pendant leur différenciation induit la sécrétion d'IL-10 et d'IDO-1, une résistance à la maturation, la non sécrétion de TNF $\alpha$  et IL-12 en réponse au LPS et favorisent le priming de lymphocytes sécréteurs d'IL-10 par ces cellules. Ces effets de *F prau* ne sont pas ou peu partagés par des bactéries proches de *F prau* testées en parallèle, suggérant que l'effet dominant de *F prau* dans l'induction des Treg DP8 $\alpha$  dépend de sa capacité unique à tolérer les DC via l'induction de molécules immunomodulatrices dont plusieurs ont été identifiées par PCR quantitative et puces affymétrie comparant des DC exposées ou non à *F prau* et à une bactérie proche. Par ailleurs, nous montrons que plusieurs récepteurs de chimiokines et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  marquent les PBL DP8 $\alpha$  spécifiques de *F prau* et que ces lymphocytes représentent une fraction variable des PBL DP8 $\alpha$ , eux-mêmes en proportion très variable, et augmentant avec l'âge, entre les individus. Malgré cela, la fréquence des DP8 $\alpha$  totaux semble diminuée dans la spondylarthrite, les MICI et les cancers coliques. La quantification plus précise des Treg DP8 $\alpha$  originaires du colon dans le sang des patients grâce aux marqueurs identifiés, permettra de rechercher la valeur pronostique de cette fréquence et sa corrélation avec le niveau de *F prau* dans le microbiote fécal.

**Mots clés** Lymphocytes T régulateurs; Cellules dendritiques; Microbiote; *Faecalibacterium prausnitzii*; maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## Abstract

Understanding mechanisms underlying mucosal homeostasis represent a critical step towards prevention and treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). My host laboratory has shown the presence, in colonic mucosa, of IL-10-producing regulatory T cells (Treg) CD4CD8 $\alpha$  (DP8 $\alpha$ ) induced by the commensal bacteria *F prau*. Moreover, these Treg are less frequent in the colonic mucosa as well as in the blood of IBD patients. These data, together with the fact that *F prau* is reduced in these diseases, suggest a link between the decrease of *F prau* and of specific Treg as well as a role for these cells in containing inflammation. My thesis project consisted in understanding how *F prau* induces Treg and in further characterizing and quantifying *F prau* specific PBL to define their function. Here we show that *F prau* exposure during dendritic cell (DC) differentiation induces IL-10 and IDO-1 production, and a poor maturation including a lack of TNF $\alpha$  and IL-12 secretion in response to LPS. We also show that *F prau*-conditioned DC prime CD4 T cells towards an IL-10-producing phenotype. These *F prau*-mediated effects are not all shared by other close bacteria, suggesting that the critical role for *F prau* in inducing DP8 $\alpha$  Treg depends on its unique ability to tolerize DC. This tolerization could happen via induction of immunoregulatory molecules identified by qPCR and affymetrix gene array. Also, we show that several chemokine receptors as well as  $\alpha 4\beta 7$  identify *F prau*-specific PBL-derived DP8 $\alpha$  cells. Indeed, these lymphocytes represent a variable fraction of DP8 $\alpha$  cells, the inter-individual frequency of which considerably fluctuate and increases with age. Nonetheless, frequency of total DP8 $\alpha$  cells seems diminished in spondyloarthritis, IBD and colorectal cancers. Accurate quantification of DP8 $\alpha$  Treg originating from the colon in patients' blood, using identified markers, should allow to study their prognosis value as well as their correlation with *F prau* levels within fecal microbiota.

**Key Words** Regulatory T cells; Dendritic cells; Microbiota; *Faecalibacterium prausnitzii*; Inflammatory Bowel diseases.

