

ANNÉE 2011

N°

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le 13 octobre 2011

par **Jérôme Martin**

Conformément aux dispositions du décret
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Sources cellulaires et fonctions d'un récepteur soluble pour
l'interleukine 22 : l'interleukine 22 *bindingprotein***

Président du jury : M. Alain Pineau, Professeur de Toxicologie – Pharmacie - Nantes

Directeur de thèse : M. Régis Josien, Professeur d'Immunologie – Médecine - Nantes

Membres du jury : M. Mohamed Hamidou,

Professeur de Médecine Interne – Médecine - Nantes

Mme Marie Audrain,

Praticien Hospitalier Immunologie – Pharmacie - Nantes

Table des matières

Liste des abréviations :	3
Liste des Figures et Tableaux :	5
Introduction :	7
1 L'interleukine 22 :	9
1.1 Cytokines de la famille de l'interleukine 10 :	9
1.2 Gène et protéine de l'interleukine 22 :	10
1.3 Sources cellulaires d'interleukine 22 :	12
1.3.1 Production d'interleukine 22 par le système immunitaire inné :	12
1.3.2 Production d'interleukine 22 par le système immunitaire adaptatif :	14
1.4 Récepteur membranaire de l'interleukine 22 :	16
1.4.1 Structure du récepteur	16
1.4.2 Distribution tissulaire du récepteur	17
1.4.3 Voies de signalisation en aval de l'activation du récepteur :	17
1.5 Biologie de l'interleukine 22 :	18
1.5.1 Interleukine 22 et défenses anti-infectieuses :	18
1.5.2 Place de l'interleukine 22 au sein des processus inflammatoires et auto-immuns :	20
1.6 Conclusion :	28
2 L'interleukine 22 <i>binding protein</i> :	29
2.1 Gène et protéine de l'IL-22BP :	29
2.2 Distribution tissulaire de l'IL-22BP :	32
2.3 Sources cellulaires de l'IL-22BP :	32
2.4 Propriétés de l'IL-22BP :	33
2.5 Biologie de l'IL-22BP :	35
2.6 Conclusion :	37
3 Cellules dendritiques :	37
3.1 Classification, distribution tissulaire et propriétés générales des cellules dendritiques :	37
3.1.1 Cellules dendritiques conventionnelles :	38
3.1.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes :	40
3.1.3 Cellules dendritiques inflammatoires :	40

3.2	Cellules dendritiques chez le rat :.....	41
4	Objectif du travail :	41
	Matériel et méthodes :.....	43
	Résultats :	51
1	Profil d'expression tissulaire du gène <i>il22ra2</i> chez le rat :	51
2	L'IL-22BP est principalement exprimée par une population de cellules dendritiques dans les tissus :	53
2.1	Isolement des différentes cellules hématopoïétiques spléniques de rat :.....	53
2.1.1	Lymphocytes T, B et NK :	53
2.1.2	Monocytes :.....	53
2.1.3	Cellules dendritiques :.....	54
2.2	Expression de l'IL-22BP par les différentes populations de cellules hématopoïétiques :.....	55
2.3	Analyse de l'expression de l'IL-22BP par les DC tissulaires de l'intestin :	56
2.4	Mise en évidence d'une isoforme courte de l'IL-22BP chez le rat :	57
2.6	Analyse de l'expression d'IL-22BP au niveau protéique:.....	60
2.6.1	Caractérisation de la protéine au niveau de tissus humains sains :	60
2.6.2	Production de la protéine par les DC de rat :	60
2.6.3	Production de la protéine par les DC dérivées de monocytes humaines :.....	62
2.6.4	L'IL-22BP circule dans le sang périphérique :	64
3	Etude de la régulation de l'expression de l'IL-22BP :.....	66
3.1	La maturation des DC entraîne une chute de l'expression de l'IL-22BP :.....	66
3.2	L'expression de l'IL-22BP peut chuter en conditions inflammatoires :	67
3.3	L'acide rétinoïque est un puissant inducteur d'IL-22BP sur les DC :.....	69
4	IL-22BP et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :.....	73
	Discussion :	76
	Conclusion :.....	83
	Bibliographie :.....	84
	Annexes :.....	94

Liste des abréviations :

μM : micromolaire

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AHR : ArylHydrocarbonReceptor

ALK⁺ ALCL: Anaplastic Lymphoma Kinase-positive Anaplastic Large Cell Lymphoma

APECED: Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy

ARN: AcideRibonucléique

ARNm: ARN messenger

CCR: C-C Chemokine Receptor

CD: Cluster Differentiation

CLA: Cutaneous Ligand Antigen

CMC: Candidose cutané-Muqueuse Chronique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

ConA :Concanavaleine A

CPA : Cellule Présentatrice d' Antigène

CRF2: Cytokine ReceptorFamily 2

Ct: Cycle threshold

CXCL: Chemokine (C-X-C motif) Ligand

DC: Dendritic Cell

DSS: Dextran Sulfate Sodium

EAE: Encéphalite Autoimmune Expérimentale

hBD: human Beta Defensin

HPRT: HypoxanthinePhosphoRibosylTransférase 1

IFI: Immunofluorescence Indirecte

IFN: Interféron

IL: Interleukine

IL-22BP: Interleukine 22 BindingProtein

IL-22R: IL-22 Récepteur

ILC: Innate Lymphoid Cell

JAK: Janus Activated Kinase

kDA: kilo Dalton

LPS: LipoPolySaccharide

LTh: Lymphocyte T helper

LTi: Lymphoid Tissue inducer
MC: Maladie de Crohn
MICI: Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MODC: Monocyte Derived Dendritic Cell
NK: Natural Killer
NKG2D: Natural Killer Group 2 member D
nM: nanomolaire
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
pDC: plasmacytoïdeDendritic Cell
PR: PolyarthriteRhumatoïde
PRR: Pattern Recognition Receptor
q-RT-PCR: quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RALDH2 : RetinALdehydeDeHydrogenase 2
RAR α :Retinoic Acid Receptor, alpha
RCH: RectocoliteHémorragique
ROR γ t: Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ t
SEP: Sclérose En Plaques
SDS-PAGE: Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamideGel
SNP :Single-Nucleotide Polymorphism
SPD: SPragueDawley
SSB: Sicca Syndrome B
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF: Sérum de Veau Fœtal
TC22 : T Cytotoxic 22
TCR : T Cell Receptor
TGF β : Transforming Growth Factor beta
TIP-DC: TNF/Inducible NO synthase-Producing Dendritic Cell
TLR: Toll-Like Receptor
TNBS: 2,4,6-TriNitroBenzeneSulfonic acid
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
Tyk2: Tyrosine kinase 2
UTR: UnTranslated Region

Liste des Figures et Tableaux :

Figures :

Figure 1 : Structure tridimensionnelle du monomère d'IL-22

Figure 2 : Cellules Lymphoïdes Innées de l'intestin exprimant ROR γ t

Figure 3 : Interaction de l'IL-22 avec son récepteur membranaire et voies de signalisation cellulaires activées

Figure 4 : Mécanisme présumé de générations des lymphocytes T CD4⁺ Th22

Figure 5 : Différentes actions de l'IL-22 intervenant dans le contrôle de différents micro-organismes présents dans la lumière intestinale

Figure 6 : Gène de la chaîne IL-22R1

Figure 7 : Structure cristallographique du complexe issu de l'interaction entre l'IL-22BP et l'IL-22

Figure 8 : Cycle classique d'une DC migratoire

Figure 9 : Expression de l'IL-22BP au sein de différents tissus de rat

Figure 10 : Stratégies employées pour le tri des différentes sous-populations de DC spléniques chez le rat

Figure 11 : Expression d'IL-22BP par les différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques immatures chez le rat

Figure 12 : Expression d'IL-22BP par les différentes sous-populations de cDC

Figure 13 : Les DC CD4⁺ expriment 2 isoformes de l'IL-22BP chez le rat

Figure 14 : Marquage de l'IL-22BP sur des coupes de tissus humains sains

Figure 15 : Marquage par cytométrie en flux des cellules obtenues après enrichissement par sélection négative en DC

Figure 16 : Marquage en IFI d'une suspension cellulaire enrichie en DC spléniques chez le rat

Figure 17 : Expression de l'IL-22BP par les MODC

Figure 18 : Marquage de l'IL-22BP en IFI (rouge) de monocytes fraîchement isolé et de MODC obtenues par culture 6 jours dans du RPMI complet en présence de GM-CSF et d'IL-4

Figure 19 : L'IL-22BP circule dans le sang périphérique

Figure 20 : L'expression de l'IL-22BP par les DC chute au cours de leur maturation

Figure 21 : L'expression de l'IL-22BP par les DC chute au cours d'un rejet rénal aigu

Figure 22 : Induction de l'expression d'IL-22BP lors de la différenciation de monocytes en DC après culture 6 jours dans du RPMI complet supplémenté par du GM-CSF, de l'IL-4 et d'AM580

Figure 23 : L'AM580 induit fortement l'expression de l'IL-22BP au cours de la différenciation des monocytes en DC

Figure 24 : Les DC différenciées à en présence d'AM580 produisent l'IL-22BP de façon plus importante

Figure 25 : L'AM580 induit l'expression de l'IL-22BP par action directe sur les DC

Figure 26 : Expression de l'IL-22BP au cours des poussées inflammatoires de MC et RCH

Figure 27 : Marquage en immunohistochimie de coupes de colon obtenues sur des pièces opératoires de MC, RCH, ou de cancer du côlon

Tableaux :

Tableau 1 : Principales caractéristiques des cytokines de la famille de l'IL10

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les q-RT-PCR chez le rat

Introduction :

L'immunologie est une science encore relativement récente. Son origine est classiquement attribuée au médecin britannique Edward Jenner, qui, en 1796, découvrit que l'inoculation du contenu des vésicules de vaccine (maladie infectieuse des équidés et des bovidés, proche de la variole humaine) protégeait l'homme de la variole. Par ce procédé, Jenner développa le principe de la vaccination. Le rattachement des maladies infectieuses aux micro-organismes une centaine d'années plus tard par Robert Koch, permit d'étendre ce processus de vaccination à de nombreuses pathologies infectieuses. Le succès de ces stratégies de vaccination, illustré notamment par le vaccin antirabique de Louis Pasteur en 1885, a conduit à développer la recherche visant à étudier les mécanismes de protection mis en jeu, et ainsi au développement de l'immunologie.

Le système immunitaire fait intervenir 2 réponses coordonnées. D'une part l'immunité naturelle ou innée, permet une reconnaissance rapide des organismes pathogènes, via l'utilisation de récepteurs non spécifiques préformés. Cette réponse suffit la plupart du temps à combattre efficacement la majorité des pathogènes. Elle ne confère pas de mémoire en cas de réexposition au même pathogène. D'autre part la réponse immunitaire adaptative, inductible et donc retardée, fait intervenir des récepteurs hautement spécifiques et clonaux. Cette réponse confère une protection en cas de réinfection par le même pathogène. Cette mémoire immunitaire est à la base de la vaccination. Il est important de noter que ces deux réponses sont interdépendantes. En effet, la réponse innée est nécessaire à l'induction de la réponse adaptative, et les mécanismes effecteurs de cette dernière utilisent le plus souvent ceux de la réponse innée.

Il est aujourd'hui clair qu'une réponse immunitaire inappropriée est à la base de nombreuses pathologies rencontrées en médecine. Ainsi, un défaut de réponse ne permet pas de lutter correctement contre les pathogènes, conduisant alors à des infections à répétition, souvent plus sévères. En plus de ces déficits immunitaires, une réponse inefficace peut laisser le champ libre à la prolifération de cellules tumorales. A l'inverse une réponse excessive et chronique est retrouvée dans l'ensemble des pathologies inflammatoires. La meilleure compréhension des mécanismes dérégulés au cours de ces pathologies a permis l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques plus ciblées, les biothérapies. Ces dernières cherchent à agir de façon spécifique sur les effecteurs immuns mal contrôlés.

La place des biothérapies dans la médecine moderne a connu un essor considérable depuis maintenant une dizaine d'années. Suite à la production industrielle des anticorps

monoclonaux anti-IL2R, utilisés en transplantation, puis du rituximab et de l'infliximab, l'apparition sur le marché de nouvelles molécules n'a cessé de se multiplier. Ces immunothérapies permettent en effet la mise en place de thérapeutiques ciblées, dirigées spécifiquement contre une cellule ou une molécule du système immunitaire (lymphocytes B, cytokines, récepteurs de surface membranaire...), tentant ainsi d'agir au centre du processus pathologique tout en limitant au maximum les effets collatéraux. Les applications majeures de ces immunothérapies concernent la cancérologie, la transplantation ainsi que les processus inflammatoires et auto-immuns.

Les cytokines occupent une place centrale au sein de la physiopathologie des processus inflammatoires et auto-immuns. Elles représentent donc une cible de choix dans le développement de nouvelles biothérapies. Les meilleurs exemples sont actuellement représentés par les anti-TNF- α , devenus un traitement de référence dans la polyarthrite rhumatoïde, les spondylarthropathies ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. De nombreuses autres cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10...) ont par la suite fait l'objet du développement de nouvelles biothérapies. Pour autant, les variations inter-individuelles, l'apparition de résistances à ces traitements (anticorps dirigés contre le bioréactif) ou encore les rôles redondants de diverses cytokines dans le système immunitaire, nécessitent un effort constant de recherche vers le développement de nouveaux produits.

L'interleukine 22, une cytokine de découverte récente, concentre actuellement l'attention de nombreux groupes de recherches. Elle semble en effet impliquée dans un certain nombre de pathologies inflammatoires et pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt. Le développement d'une nouvelle biothérapie ciblée nécessite cependant une connaissance optimale des propriétés biologiques de la cible. Les effets pléiotropes des cytokines illustrent par exemple ce besoin. Il s'agit en effet de pouvoir optimiser au maximum la balance bénéfices/risques, de sorte que seules les actions délétères de la cytokine soient bloquées, tout en préservant le plus possible ses autres fonctions.

Après un point sur les connaissances actuelles concernant l'IL-22, une protéine apparaissant essentielle dans sa régulation, l'interleukine 22 *binding protein*, sera plus particulièrement évoquée. Il s'agit d'un récepteur soluble inhibiteur de l'IL-22, probablement impliqué dans la régulation de ses effets physiologiques. L'IL-22BP pourrait donc être utilisé, à l'image de l'IL-1RA (Anakinra*), afin de tempérer les effets de l'IL-22 lorsque ceux-ci sont excessifs. Cependant la biologie de l'IL-22BP est encore assez méconnue, l'objectif du présent travail a donc été de tenter de répondre à certaines des questions encore non résolues sur la physiologie de l'IL22BP.

1 L'interleukine 22 :

Les cytokines sont de petites protéines sécrétées, de masse moléculaire variant de 6 à 60 kDa, produites par de nombreux types cellulaires, notamment du système immunitaire, principalement après activation, et jouant un rôle important dans les communications intercellulaires. Parmi celles-ci, l'interleukine 22 (IL-22) a été identifiée en 2000 dans une lignée murine de lymphome T, au cours de recherches visant à mettre en évidence les gènes surexprimés après stimulation par l'IL-9 (Dumoutier et al. 2000a). L'équivalent humain a été identifié quelques mois après, par 2 équipes différentes (Dumoutier et al. 2000b; Xie et al. 2000).

1.1 Cytokines de la famille de l'interleukine 10 :

L'IL-22 fait partie des cytokines de la famille de l'IL-10. Cette famille, très étroitement liée à la famille des interférons (IFNs), représente la plus abondante des familles de cytokines de classe II. La définition des familles de cytokines de classe II a reposé initialement sur la capacité de ses membres à interagir avec les récepteurs aux cytokines de classe II. Ces derniers sont de nature hétérodimérique et transmembranaire (Renauld 2003). Ils se distinguent des récepteurs de classe I par des différences structurales, particulièrement au niveau de leur domaine extracellulaire.

La constitution de la famille des cytokines apparentées à l'IL-10 repose sur les similarités retrouvées au niveau de l'organisation de leurs gènes, de leurs structures protéiques secondaires (plus que sur une homologie des séquences d'acides aminés, qui n'excède jamais 25%), ainsi donc que sur l'utilisation de récepteurs communs (Wolk et al. 2010). Les cytokines de la famille de l'IL-10 peuvent être encore subdivisées en 3 sous-groupes, essentiellement en fonction de leurs activités biologiques respectives (Ouyang et al. 2010). Les caractéristiques générales de ces cytokines sont résumées dans le **Tableau 1**.

Le premier groupe comprend uniquement l'IL-10. Elle agit sur divers types de leucocytes et tend principalement à réguler les réponses inflammatoires excessives. Le second groupe, comprend les cytokines de la sous-famille de l'IL-20, à savoir l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24, l'IL-26 et l'IL-22. Ce groupe de cytokines agit préférentiellement sur des cellules épithéliales pour les protéger des agressions liées à des germes extracellulaires (bactéries, levures). Ces protéines interviennent également dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation. Ces actions permettent le maintien de l'intégrité et la restauration de l'homéostasie tissulaire au cours des infections et des réponses inflammatoires. Le 3^{ème} groupe enfin, est représenté par les IFNs de type III (aussi dénommés IFNs λ) et comprend l'IL-28A, l'IL-28B et l'IL-29. Ces cytokines

induisent des réponses antivirales similaires à celles induites par les IFNs de type I (α/β) mais agissent avant tout sur les cellules épithéliales. Elles peuvent en outre agir en synergie avec les IFNs type I et accentuer les réponses antivirales de l'hôte.

Nom	Structure	Récepteur		Sources cellulaires	Cibles cellulaires	Fonctions majeures	
		Chaîne α	Chaîne β				
IL-10	Dimère	IL-10R1	IL-10R2	Leucocytes	Leucocytes	Immunorégulation	
IL-19	Monomère	IL-20R1	IL-20R2	Cellules myéloïdes, cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Réponses antibactériennes, remodelage tissulaire, cicatrisation	
IL-20	Monomère	IL-20R1/IL-22R1					
IL-22	Monomère	IL-22R1	IL-10R2	Lymphocytes T, NKT, cellules lymphoïdes innées			
IL-24	Monomère	IL-20R1/IL-22R1	IL-20R2	Cellules myéloïdes, cellules épithéliales, Lymphocytes T CD4 ⁺ Th2			
IL-26	Dimère ?	IL-20R1	IL-10R2	Lymphocytes T, NKT, cellules lymphoïdes innées			
IL-28A	Monomère	IL-28R1		Cellules épithéliales			Réponses antivirales
IL-28B	Monomère						
IL-29	Monomère						

Tableau 1 : Principales caractéristiques des cytokines de la famille de l'IL10, d'après Ouyang et al. 2010.

1.2 Gène et protéine de l'interleukine 22 :

L'IL-22 a rapidement été considérée comme une cytokine du fait de plusieurs caractéristiques. Il peut notamment être mentionné la présence d'un peptide signal hydrophobe situé à l'extrémité N-terminale, une masse moléculaire proche de 20 kDa et une homologie, bien que faible, avec la structure primaire de l'IL-10.

Le gène codant pour l'IL-22 humaine est situé sur le bras long du chromosome 12, en 12q15, à proximité des *loci* IFNG3 et IL26. Il comprend 5 exons codants, et conduit à la formation d'une protéine de 179 acides aminés (AA). Chez la souris et le rat les gènes se

situent sur les chromosomes 10 et 7q22 respectivement. Ils codent pour des protéines de 179 AA et 172 AA respectivement.

La structure tridimensionnelle de la cytokine (**Figure 1**) a pu être élucidée en 2002, par des expériences de cristallisation (Nagem et al. 2002). Comme pour les autres cytokines de la famille de l'IL-10, la structure de l'IL-22 comprend 6 hélices α (A à F) organisées dans une conformation anti-parallèle et reliées entre elles par des boucles. Le cœur de la protéine est constitué d'un « fagot » de 4 hélices (A, C, D et F). L'hélice B est beaucoup plus courte que les autres et se serre au niveau de l'extrémité N-terminale de l'hélice C. L'hélice E, quant à elle, se lie au « fagot » en interagissant avec les hélices B et C ainsi qu'à la boucle AB. Finalement l'hélice F présente un nœud caractéristique des cytokines de la famille de l'IL-10, la divisant en 2 parties (F1 et F2), et permettant l'exposition de résidus importants, nécessaires à l'interaction avec le récepteur (Trivella et al. 2010). La structure primaire de la protéine comprend 4 cystéines à l'origine de la formation de 4 ponts disulfures. L'IL-22 possède également 3 sites de N-glycosylation, la glycosylation au niveau de l'Asn54 est nécessaire à l'interaction de la cytokine avec son récepteur.

L'IL-22 se présente sous la forme d'un monomère bien que la formation de dimères, voire de tétramères, ait pu être décrite *in vitro* pour des concentrations protéiques élevées (Ouyang et al. 2010). L'importance biologique de ce processus reste néanmoins inconnue même s'il peut être supposé que ces différences stœchiométriques, à concentrations élevées, puissent interférer sur l'interaction de la cytokine avec son récepteur membranaire.

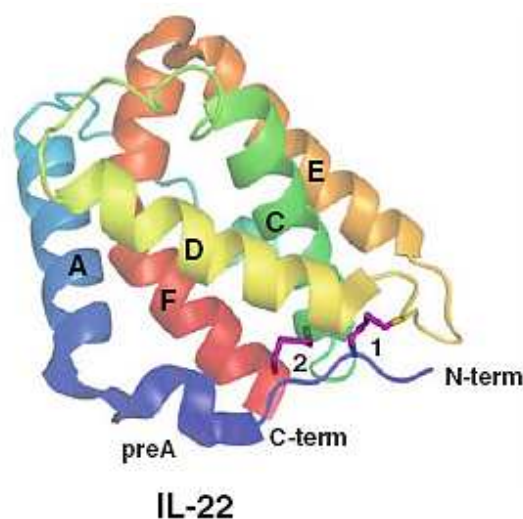


Figure 1 : Structure tridimensionnelle du monomère d'IL-22 (Trivella et al, 2010)

1.3 Sources cellulaires d'interleukine 22 :

Les sources d'IL-22, bien qu'uniquement représentées par des cellules du système immunitaire (Wolk et al. 2004), sont relativement variées. Ainsi, la production d'IL-22 est aussi bien assurée par des cellules du système immunitaire inné que par des cellules de l'immunité adaptative.

1.3.1 Production d'interleukine 22 par le système immunitaire inné :

Une production d'IL-22 par les cellules immunitaires innées a été évoquée rapidement après sa description initiale. Les premières études suggéraient que la cytokine puisse être sécrétée par les lymphocytes *natural killer* (NK) chez l'homme et chez la souris (Wolk et al. 2002; Zenewicz et al. 2008). Une production d'IL-22 a également été imputée aux cellules dendritiques (DC) (Zheng et al. 2008). Ce n'est que par la suite que la source innée d'IL-22 a été rattachée de façon prépondérante à un groupe hétérogène émergent, les cellules lymphoïdes innées (ILCs pour *Innate Lymphoid Cells*) (Spits & Di Santo 2011).

La présence au sein de ce groupe de cellules exprimant des récepteurs cellulaires de type NK, ainsi que divers marqueurs de cellules myéloïdes, a nécessairement imposé la reconsidération d'une production réelle par les cellules NK conventionnelles ou par les DC. En effet, la caractérisation de l'expression d'IL-22 par ces lignées cellulaires, ainsi que des données expérimentales fonctionnelles sur leur contribution à la production d'IL-22 en conditions homéostatiques ou lors de pathologies n'ont jamais été clairement établies. Il ne peut par conséquent être exclu que les premiers systèmes expérimentaux considérant une sécrétion d'IL-22 par ces cellules aient pu être contaminés par différentes populations d'ILCs (Sonnenberg et al. 2011).

Les ILCs représentent une nouvelle famille de cellules hématopoïétiques impliquées dans les réponses immunitaires innées anti-microbiennes, l'organogénèse des tissus lymphoïdes, le remodelage tissulaire après agression physique ou infectieuse et l'homéostasie des cellules stromales (Spits & Di Santo 2011). Bien que formant un groupe hétérogène, ces cellules semblent dériver d'un précurseur commun dépendant d'Id2, un régulateur négatif de facteurs de transcriptions. Ces cellules présentent en outre les caractéristiques communes de dépendre pour leur différenciation de la chaîne γ_c , partagée par les récepteurs des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21, et de n'exprimer aucun des marqueurs de lignées hématopoïétiques communes (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD3, CD19, CD20, CD14...). La diversité importante de la famille des ILCs semble constituer le pendant inné de ce qui peut être observé pour les lymphocytes T.

Plusieurs populations d'ILCs sont capables de produire de l'IL-22. Toutes se développent de façon dépendante du facteur de transcription ROR γ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor* γ t) et expriment le récepteur de l'IL-23 (Spits & Di Santo 2011). Ces populations sont ensuite individualisées par l'expression de marqueurs de surface définis, la co-expression d'autres cytokines (par exemple l'IL-17), leur localisation, leur régulation transcriptionnelle ainsi que leurs fonctions biologiques.

Parmi ces populations, une semble spécialisée dans la production d'IL-22. Elle peut être dénommée sous le terme générique **ILC22** (*Innate Lymphoid Cell 22*). Ces cellules présentent des caractéristiques partagées avec les lymphocytes NK et les LTi (*Lymphoid Tissue inducers*) dont il sera question plus loin. Elles ont été décrites chez l'homme et la souris et sont retrouvées essentiellement au niveau des muqueuses et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*lamina propria* de l'intestin, plaque de Peyer, ganglions mésentériques, amygdales). Chez l'homme, elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD56, NKp44, CD127 et CD117 et n'expriment pratiquement pas le NKp46, un marqueur considéré comme spécifique des cellules NK (Cella et al. 2009), alors que chez la souris elles expriment le NKp46, le CD127 mais pas le NK1.1 (Satoh-Takayama et al. 2008). Ces cellules sont à distinguer des lymphocytes NK conventionnels car, bien que présentant des marqueurs communs elles n'exercent aucune activité cytolytique et ne produisent pas d'IFN γ . La présence de ces cellules dans l'intestin semble être en partie liée à la flore commensale environnante (Sanos et al. 2009; Satoh-Takayama et al. 2008) sans pour autant en être strictement dépendante (Sawa et al. 2011).

Une autre population d'ILCs capable de produire l'IL-22 de façon significative correspond aux **LTi**. Ces cellules furent d'abord décrites pour leur importance dans la formation des ganglions lymphatiques durant l'embryogénèse (Mebius 2003). Chez la souris comme chez l'homme elles expriment le CD127, la lymphotoxine- α et la lymphotoxine- β (Cupedo et al. 2009). En revanche l'expression du CD4 n'est retrouvée que chez la souris. Les LTi persistent après la naissance et sont notamment impliqués dans la génération des organes lymphoïdes tertiaires. Ils semblent constituer une source innée importante d'IL-22, démontrée au cours d'un modèle d'infection digestive chez la souris (Sonnenberg et al. 2011). Les LTi sont présents au niveau de l'intestin, des ganglions et de la rate et sont capables de produire de l'IL-17 en plus de l'IL-22 mais pas d'IFN γ (Cupedo et al. 2009; Takatori et al. 2009).

Les ILC ROR γ t capables de produire de l'IL-22 et leurs principales caractéristiques sont présentées dans la **Figure 2**.

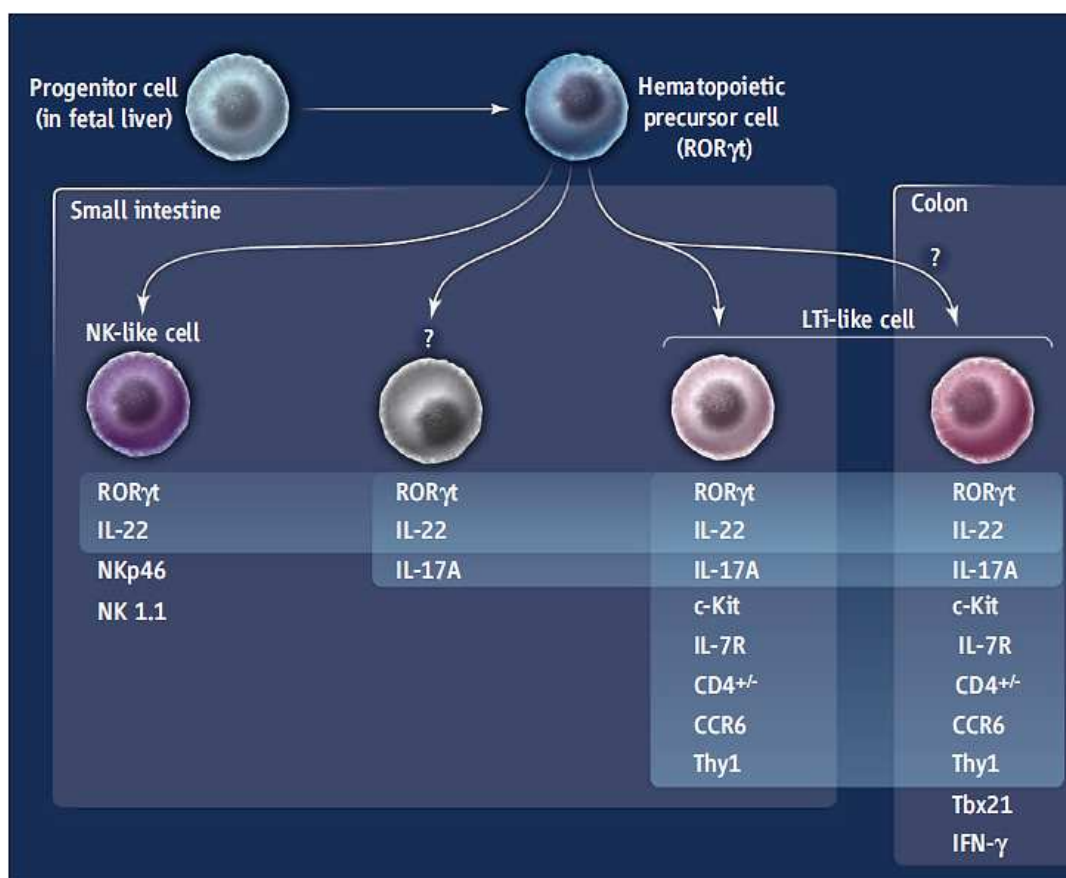


Figure 2 : Cellules Lymphoïdes Innées de l'intestin exprimant RORγt. Plusieurs marqueurs caractéristiques sont montrés. Trois à quatre lignées différentes semblent dériver d'un progéniteur commun (Veldhoen&Whiters, 2010)

1.3.2 Production d'interleukine 22 par le système immunitaire adaptatif :

L'IL-22 a originellement été décrite comme étant produite par les lymphocytes T, mais pas par les lymphocytes B ni par les monocytes (Dumoutier et al. 2000a; Wolk et al. 2002). En 2002, Wolk et al. avaient suggéré que la source principale d'IL-22 serait représentée par des lymphocytes T CD4⁺ de polarisation Th1, et de phénotype mémoire. Depuis lors, l'expression d'IL-22 a été rapportée pour une variété beaucoup plus large de lymphocytes T.

Chez l'homme, d'autres lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires capables de produire la cytokine ont pu être décrits. Les lymphocytes T CD4⁺ de polarisation **Th22** sont retrouvés en premier lieu. Ces cellules, de phénotype mémoire, sont retrouvées dans le sang périphérique et ont un tropisme préférentiellement cutané du fait de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR10, CCR4 et CCR6 ainsi que du ligand de sélectine CLA (*Cutaneous Ligand Antigen*). Elles peuvent se différencier à partir des lymphocytes T mature naïfs, après

stimulation du TCR (*T CellReceptor*) par une cellule dendritique, via la présentation d'un peptide antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). La présence d'un environnement cytokinique approprié permet alors l'orientation vers la voie Th22. Les DCplasmacytoïdes (pDC) activées par un ligand du TLR9 (*TollLikeReceptor 9*), les conduisant à produire de l'IL-6 et du TNF α (pour *TumorNecrosis Factor α*), sont capables d'induire cette polarisation Th22. La polarisation Th22 par les DC cutanées (cellules de Langerhans dans l'épiderme, DC dermiques dans le derme) a également été décrite (Fujita et al. 2009). Les lymphocytes Th22 sont caractérisés par une production exclusive d'IL-22. Elles expriment fortement le facteur de transcription AhR (*ArylhydrocarbonReceptor*) mais très peu ROR γ t (Duhon et al. 2009; Trifari et al. 2009). L'équivalent murin de ces cellules n'est à l'heure actuelle pas clairement établi.

La troisième population de lymphocytes T auxiliaires capables de produire de l'IL-22 est représentée par les T CD4⁺ de polarisation **Th17**. Ces cellules semblent constituer la source principale d'IL-22 chez la souris (Liang et al. 2006). Elles produisent la cytokine également chez l'homme mais leur importance relative vis-à-vis des lymphocytes Th1 semble beaucoup moins tranchée que chez la souris. La différenciation d'un lymphocyte T mature naïf en lymphocyte Th17 nécessite la présence d'IL-6, de TGF β (*TransformingGrowth Factor β*) et d'IL-1 β . Enfin l'IL-23 joue un rôle crucial dans la stabilisation et l'expansion de ces cellules. Elle est également indispensable à une production optimale d'IL-22. Les lymphocytes Th17 expriment les facteurs de transcription ROR γ t et AhR. L'expression plus importante de ROR γ t par ces cellules que par les lymphocytes Th22 suggère ainsi que la différenciation d'un lymphocyte T naïf vers la voie Th17, plus que vers la voie Th22, dépend de la modulation de l'expression de ce facteur de transcription.

Finalement, d'autres lymphocytes T sont également impliqués dans la production d'IL-22. Ainsi des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sécrétant principalement de l'IL-22, nommés par conséquent lymphocytes T cytotoxiques 22 (Tc22), ont pu être observés. Il semblerait exister également des lymphocytes Tc17, sécrétant majoritairement les cytokines Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21) (Sonnenberg et al. 2011). Une production par des lymphocytes T $\gamma\delta$, plutôt impliqués dans l'immunité innée, est également décrite (Simonian et al. 2010).

1.4 Récepteur membranaire de l'interleukine 22 :

1.4.1 Structure du récepteur

Le récepteur de l'IL-22 (IL-22R) est un hétérodimère constitué de 2 chaînes transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines de classe 2 (CRF2), l'IL-22R1 et l'IL-10-R2 (Kotenko et al. 2001a).

La famille des CRF2 est définie sur la base de la structure du domaine extracellulaire de ses membres. Tous comportent 2 domaines fibronectine de type III en tandem. Ces domaines, décrits pour la première fois pour la fibronectine, présentent une structure répétitive d'environ 100 AA et sont capables de se lier aux intégrines. La famille CRF2 se distingue des récepteurs aux cytokines de classe I et des récepteurs hématopoïétiques par des différences sur la position des résidus cystéines ainsi que sur l'absence du motif W-S-X-W-S. Il peut être remarqué que les similarités structurales des membres de cette famille ne concernent que le domaine extracellulaire et pas du tout les domaines transmembranaire ni intracellulaire (Renauld 2003). La **Figure 3** schématise l'interaction de l'IL-22 avec l'IL-22R.

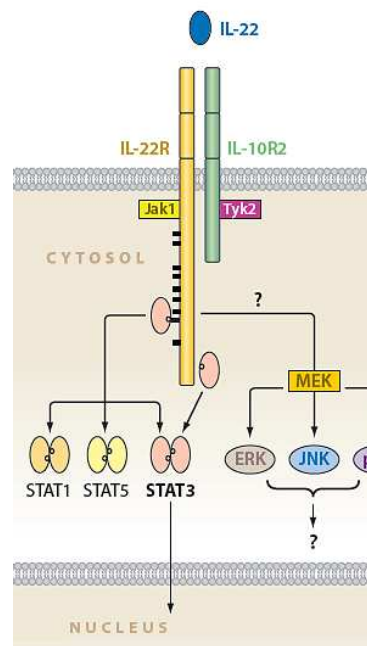


Figure 3 : Interaction de l'IL-22 avec son récepteur membranaire et voies de signalisation cellulaires activées (d'après Ouyang et al. 2010)

1.4.2 Distribution tissulaire du récepteur

Alors que l'IL-10R2 est d'expression relativement ubiquitaire celle de l'IL-22R1 est quant à elle beaucoup plus restreinte. Seules les cellules exprimant les 2 chaînes peuvent être activées par l'IL-22. La restriction d'expression de la chaîne IL-22R1 détermine donc les cellules cibles de l'IL-22. L'expression de cette chaîne est retrouvée dans un nombre limité d'organes. Les principaux sont la peau, le rein, les organes des systèmes digestif (intestin grêle, colon, foie, pancréas) et respiratoire (poumon, trachée), l'expression la plus forte étant présente dans la peau et le pancréas (Wolk et al. 2004). Au sein de ces organes les cellules cibles identifiées sont principalement les cellules épithéliales, les hépatocytes, les cellules acineuses pancréatiques, ainsi que les fibroblastes dans certaines conditions. Il est particulièrement intéressant de noter qu'aucune expression de l'IL-22R1 n'a pu être retrouvée à la surface de cellules hématopoïétiques, au repos ou après stimulation. Ceci laisse ainsi supposer que l'IL-22 n'a aucun effet sur ces cellules et donc sur le système immunitaire.

Pour autant, cette affirmation doit dorénavant être nuancée par un certain nombre d'études récentes soulignant l'expression du récepteur membranaire complet à la surface de cellules du système immunitaire en conditions pathologiques. Tout d'abord, dans un modèle murin d'uvéite auto-immune, Ke et al. démontrent une induction de l'expression de l'IL-22R1 à la surface des monocytes/macrophages. Aucune induction n'est par contre retrouvée pour les lymphocytes, les granulocytes et les DC. Cette expression conférerait des propriétés régulatrices à ces cellules qui interviendraient alors dans le contrôle de la maladie (Ke et al. 2011). De plus, une expression aberrante de l'IL-22R1 a également pu être notée à la surface de lymphocytes tumoraux au cours de lymphomes du manteau et de lymphomes anaplasiques à grandes cellules, phosphatases alcalines positifs (ALK⁺ ALCL) (Bard et al. 2008; Gelebart et al. 2011). Finalement, un modèle murin d'ALK⁺ ALCL a permis de rattacher l'expression aberrante de ce récepteur à la physiopathologie de l'hémopathie ; l'action de l'IL-22 sur ces lymphocytes contribuerait à un renforcement de l'inflammation observée au cours de ce syndrome (Savan et al. 2011).

1.4.3 Voies de signalisation en aval de l'activation du récepteur :

Plusieurs voies de signalisation ont été décrites suite à l'activation de l'IL-22R par l'IL-22 (**Figure 3**). Comme pour l'ensemble des cytokines de la famille de l'IL-10, l'IL-22 est capable d'activer la voie de signalisation Jak (*Janus activated kinase*) / STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). La voie principale, retrouvée dans l'ensemble des études, fait intervenir la phosphorylation de STAT3 au niveau d'un résidu tyrosine. Une étude utilisant la lignée de carcinome hépato-cellulaire de rat HAIIIE, a montré que

l'activation de STAT3 faisait suite à la phosphorylation de Jak1 ou de Tyk2 (*Tyrosine kinase* 2) (Lejeune et al. 2002). Cette étude suggère également la possibilité de phosphorylation de STAT1 et STAT5 ainsi que l'activation des 3 principales voies des MAP kinases (p38, JNK, ERK1/2). Enfin, elle indique qu'une phosphorylation de STAT3 au niveau d'un résidu sérine, de façon indépendante des MAP kinases, serait nécessaire à la transactivation maximale du signal initié par l'IL-22. Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par une autre étude menée en 2007 par Wolk et al. sur des cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) (Wolk et al. 2007).

1.5 Biologie de l'interleukine 22 :

Les effets biologiques de l'IL-22 ne sont pas encore tous clairement caractérisés. Ils font actuellement de ce fait l'objet de nombreux travaux. Il ressort de la plupart des études que l'IL-22 peut induire l'expression de gènes impliqués dans les défenses immunitaires innées antimicrobiennes, dans le remodelage et la motilité tissulaire ainsi que dans l'inflammation tissulaire. La plupart des auteurs s'accordent donc sur le fait que l'IL-22 est une cytokine clef dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en conditions physiologiques. Elle illustre parfaitement l'importance des relations entre système immunitaire, la sécrétion d'IL-22 étant assurée uniquement par des cellules hématopoïétiques, et équilibre tissulaire, les cellules cibles de l'IL-22 étant principalement représentées par des cellules épithéliales. Pour autant, de nombreux travaux font également ressortir un rôle ambivalent de cette protéine dans la physiopathologie d'un certain nombre de processus inflammatoires et auto-immuns. L'IL-22 est en effet incriminée dans le déclenchement ou l'entretien de nombreuses pathologies, alors que pour d'autres elle semblerait avoir un rôle protecteur.

1.5.1 Interleukine 22 et défenses anti-infectieuses :

L'IL-22 semble présenter un rôle important dans l'initiation des réponses immunitaires innées par les cellules épithéliales, au niveau des barrières tissulaires. Les premières études ayant analysé les fonctions de l'IL-22 ont ainsi pu montrer qu'elle pouvait induire fortement l'expression d'un certain nombre de peptides antibactériens par les kératinocytes (Wolk et al. 2004; Liang et al. 2006; Boniface et al. 2005). Parmi ceux-ci peuvent être cités les β -défensines (hBD2, hBD3) et les protéines de la famille S100 (S100A7 ou psoriasine, S100A8, S100A9). Par la suite, l'induction de peptides antimicrobiens au niveau du tube digestif (RegIII β , RegIII γ), ainsi que de diverses molécules impliquées dans les défenses antibactériennes au niveau des poumons (chimiokines CXCL1, CXCL5, CXCL9 ; lipocaline 2...) ont également été décrites (Zheng et al. 2008; Aujla et al. 2008).

L'importance fonctionnelle de l'IL-22 a été élégamment décrite dans 2 modèles d'infections bactériennes chez la souris. Dans un modèle d'infection digestive par l'entérobactérie *Citrobacter rodentium*, Zheng et al. ont pu démontrer que l'IL-22 intervenait dans les défenses immunitaires innées très précoces contre la bactérie. En agissant directement sur les entérocytes, l'IL-22 induisait la sécrétion de peptides antibactériens (lectines de type C : RegIII β , RegIII γ) et permettait le maintien de l'intégrité épithéliale. L'absence d'IL-22 ou sa neutralisation conduisait à la diffusion systémique de la bactérie et à une mort précoce des animaux. Le rôle de l'IL-22 dans ce modèle se concentrait majoritairement dans les premiers jours de l'infection, par la suite le relai était pris par le système immunitaire adaptatif (Zheng et al. 2008). L'importance de l'IL-22 a également été démontrée dans un autre modèle murin d'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae*. Ici aussi les auteurs démontrent le rôle central de l'IL-22 dans le maintien de l'intégrité épithéliale pulmonaire, permettant ainsi d'éviter la diffusion systémique du pathogène. Cependant, contrairement au modèle précédent, les sources d'IL-22 étaient représentées par les lymphocytes T CD4⁺ Th17 et non par des cellules de l'immunité innée (Aujla et al. 2008).

Ces 2 modèles démontrent de façon convaincante la place centrale qu'occupe l'IL-22 dans les défenses immunitaires des barrières tissulaires, plus particulièrement au niveau des muqueuses, contre les pathogènes extracellulaires.

L'influence de l'IL-22 dans les défenses antimicrobiennes doit toutefois être nuancée par le fait qu'elle semble tributaire des germes incriminés. Ainsi, aucun rôle notable de l'IL-22 n'a pu être observé dans des divers types d'infections incluant l'helminthe *Schistosoma mansoni* (administré par voie percutanée), les mycobactéries *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium tuberculosis* (administrés respectivement par voie intraveineuse et par aérosol) ou le bacille gram positif intracellulaire *Listeria monocytogenes* (administré par voie intraveineuse) (Wilson et al. 2010; Graham et al. 2011). En outre un rôle délétère de l'IL-22 a même pu être observé lors d'infections par le protozoaire *Toxoplasma gondii* lorsqu'il était administré *per os*, mais pas par voie péritonéale. Dans ce modèle l'IL-22, exacerbe l'inflammation intestinale initiée par l'infection en induisant une surexpression de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-17, CXCL1, CXCL9, TNF α ...) (Wilson et al. 2010).

Concernant les infections fongiques, l'IL-22 pourrait avoir un rôle dans les infections à *Candida albicans*. Un exemple indirect est fourni par 2 études indépendantes ayant montré la présence d'anticorps anti-IL-22 chez les patients atteints du syndrome APECED (*Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*) qui présentent pour la majorité une candidose cutanéomuqueuse chronique (CMC) (Puel et al. 2010; Kisand et al.

2010). L'IL-22 n'est cependant pas la seule cytokine impliquée dans les défenses contre ce pathogène puisque des auto-anticorps anti-IL17A et IL-17F sont également retrouvés chez ces patients. Par ailleurs la fréquence accrue de CMC chez les patients atteints du syndrome hyper IgE (ou syndrome de Job), lié à un déficit du facteur STAT3, laisse supposer que les cytokines utilisant cette voie de signalisation, dont l'IL-22 et l'IL-17, mais aussi l'IL-6, pourraient être importantes dans les défenses contre *Candida albicans*.

Finalement, la place de l'IL-22 dans les infections virales est encore mal définie. Bien qu'il y ait à l'heure actuelle très peu d'études sur le sujet, il ne semble pas que l'IL-22 exerce un rôle central direct sur ce type d'infections (Sonnenberg et al. 2011).

1.5.2 Place de l'interleukine 22 au sein des processus inflammatoires et auto-immuns :

En plus de ses fonctions dans les défenses anti-infectieuses, essentiellement assurées par l'induction de la synthèse de peptides antimicrobiens par ses cellules cibles, l'IL-22 est capable d'induire la production d'un certain nombre de protéines inflammatoires, ou impliquées dans la motilité, la régénération et la survie tissulaire. Ces propriétés peuvent s'avérer bénéfiques dans un certain nombre de circonstances, et peuvent contribuer à la survie d'un organe ayant subi une agression physique, chimique ou infectieuse. Toutefois, ces mêmes propriétés peuvent être particulièrement délétères, notamment lorsqu'elles sont exacerbées. Les différents effets de l'IL-22 sur ses principaux organes cibles, au cours de différents processus pathologiques, vont être discutés par la suite.

1.5.2.1 Actions de l'interleukine 22 sur le foie :

Les hépatocytes expriment de façon significative les 2 chaînes du récepteur membranaire de l'IL-22 et sont donc capables de répondre à une stimulation par l'IL-22 (Radaeva et al. 2004). Dans un modèle murin d'hépatite chimique induite par la concanavaline A (ConA), Radaeva et al. ont pu démontrer que l'IL-22 exerçait une action protectrice sur le foie en agissant directement sur les hépatocytes. L'injection de ConA induisait une forte élévation de l'expression de l'IL-22 au niveau du foie uniquement. Un blocage de l'IL-22 par des anticorps neutralisants entraînait une exacerbation de l'hépatite, objectivée par les taux de transaminases. L'action protectrice de l'IL-22 passait par une induction de la survie, de la croissance et de la prolifération des hépatocytes. Ces effets faisaient tous suite à l'activation de la voie de signalisation intracellulaire dépendante de STAT3, après activation de l'IL-22R. Par cette voie, l'IL-22 permettait l'expression de gènes codant pour des molécules anti-apoptotiques (Bcl-xL, Bcl-2, McL-1) et mitogènes (c-myc, cycline D1, Rb2, CDK4) (Radaeva et al. 2004). Les effets bénéfiques de l'IL-22 au cours

d'une inflammation hépatique aiguë ont ensuite été confirmés 3 ans plus tard par un autre groupe grâce à l'utilisation de souris déficientes pour le gène de l'IL-22 (Zenewicz et al. 2007).

En plus de son action protectrice en cas d'inflammation hépatique aiguë, l'IL-22 apparaît capable d'induire une régénération hépatique après hépatectomie partielle. Toujours dans un modèle murin, il a pu être observé une surexpression de l'IL-22R au niveau hépatique, associé à une élévation des taux sériques d'IL-22 après hépatectomie partielle. L'inhibition de l'IL-22 par des anticorps bloquant entravait la capacité de régénération du foie en regard des animaux non traités (Ren et al. 2010).

L'IL-22 semble ainsi avoir des effets majoritairement bénéfiques sur le foie, permettant sa protection en cas d'inflammation aiguë et améliorant ses capacités de régénération. D'autres effets positifs dans la stéatose hépatique et les lésions liées à l'éthylisme chronique ont également été rapportés (Yang et al. 2010; Ki et al. 2010). L'ensemble de ces effets protecteurs passent par une activation de la voie de signalisation impliquant STAT3.

Cependant une étude récente suggère que l'activation constante de STAT3 au cours de carcinomes hépatocellulaires chez l'homme et la souris, pourrait être en partie liée à une surexpression d'IL-22 par les lymphocytes infiltrant la tumeur. Le rôle oncogène de STAT3 n'est plus à démontrer et ce travail suggère donc un rôle direct de l'IL-22, produite de façon chronique dans le foie, dans l'initiation et l'entretien de carcinomes hépatocellulaires (Jiang et al. 2011). Ces résultats pourraient aller dans le même sens que ceux obtenus au cours des lymphomes anaplasiques à grandes cellules précédemment évoqués (Bard et al. 2008; Savan et al. 2011).

Finalement l'IL-22 peut également avoir un retentissement systémique après action sur les hépatocytes, en induisant la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (fibrinogène, haptoglobine, SAA1...) (Dumoutier et al. 2000b; Wolk et al. 2007; Liang et al. 2010). Il est à noter que l'IL-22 peut aussi agir sur les cellules du pancréas pour induire la synthèse de certaines protéines de la phase aiguë (Aggarwal et al. 2001).

1.5.2.2 Interleukine 22 et auto-immunité :

a. Connectivites :

De plus en plus de travaux rattachent l'IL-22 à la physiopathologie de plusieurs connectivites. Au sein de celles-ci, la polyarthrite rhumatoïde (PR) est la plus documentée.

Une étude portant sur 49 patients atteints de PR précoce (<5 mois), active (DAS28 \geq 3.2), n'ayant jamais eu aucun traitement, et remplissant les critères révisés de l'ACR (*American College of Rheumatology*), a pu établir une corrélation entre les concentrations sériques d'IL-22 et l'importance de l'évolution de l'érosion osseuse. Les patients ont été divisés en 2 groupes selon qu'ils présentaient des concentrations sériques proches de celles de témoins sains appariés (autour de 4 pg/mL), ou des valeurs environ 6 fois plus élevées. Les auteurs ont conclu que les patients présentant des concentrations sériques initiales plus élevées présentaient une atteinte osseuse plus sévère après 2 ans de suivi (Leipe et al. 2011).

Un autre travail portant sur tissus et liquides synoviaux obtenus au cours d'arthroplasties et de ponctions respectivement, a décrit une expression plus importante de l'IL-22 et de l'IL-22R chez les patients atteints de PR que d'ostéoarthrite (Ikeuchi et al. 2005).

Plusieurs études portant sur des modèles animaux ont par ailleurs tenté de mieux appréhender la place de l'IL-22 dans la physiopathologie de la PR. Un modèle murin d'arthrite au collagène retrouve des niveaux plus élevés d'IL-22 au niveau des synovies. En outre l'induction de la maladie chez des souris déficientes pour le gène codant pour la cytokine est retardée dans le temps et moins sévère (Geboes et al. 2009).

Les sources cellulaires d'IL-22 au cours de la PR sont encore en voie d'identification. Il semble par ailleurs qu'il faille prendre un certain nombre de précautions quant à la transposition des modèles animaux (essentiellement murins) chez l'homme. En effet les lymphocytes T CD4⁺ Th17 sont souvent incriminés chez le rongeur (Mus et al. 2010; Marijnissen et al. 2011). Pour autant, comme mentionné précédemment, les Th17 sont une source d'IL-22 plus importante chez la souris que chez l'homme. Les sources d'IL-22 chez l'homme pourrait être les lymphocytes T CD4⁺ Th1, voir Th22 (Leipe et al. 2011; Zhang et al. 2011). Finalement une étude récente laisse entendre que les ILC22 mentionnées plus haut pourraient représenter une source d'IL-22 au cours de la PR chez l'homme (Ren et al. 2011).

Les actions de l'IL-22 au cours de la PR passeraient notamment par une induction de la prolifération des fibroblastes, la production de CCL2, importante dans le recrutement des monocytes, (Ikeuchi et al. 2005) et une activation de l'ostéoclastogénèse (Geboes et al. 2009).

En plus de la PR, l'IL-22 commence également à être étudiée dans d'autres connectivites. Des concentrations sériques plus élevées d'IL-22 ont été observées chez des patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren. Ces concentrations semblaient corrélées avec les concentrations d'anticorps anti-SSB ainsi qu'à l'importance de la xérostomie (Lavoie et al. 2011). Deux autres études ont également rapporté une corrélation négative entre la concentration sérique d'IL-22 et l'activité de la maladie chez des patients atteints de lupus systémique (Cheng et al. 2009; Pan et al. 2009). Ces résultats imposent cependant une

certaine réserve. En effet, les taux sériques retrouvés chez les témoins sains de ces 2 études sont de l'ordre 350 pg/mL, alors que la totalité des autres travaux ayant pu doser l'IL-22 dans le sérum de témoins ne retrouve jamais des valeurs dépassant 20 pg/mL. Plusieurs équipes ont pourtant utilisé le même kit de dosage que celui employé pour les patients lupiques. Toujours en contradiction avec ces 2 travaux, un autre groupe a récemment observé, par cytométrie en flux intracellulaire, une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD4⁺ pouvant produire de l'IL-22 dans le sang périphérique des patients atteints de lupus systémiques comparé à celui de témoins sains. Une corrélation positive était de plus observée entre l'activité de la maladie et la fréquence de ces lymphocytes (Qin et al. 2011).

b. Psoriasis :

Les premières études fonctionnelles sur l'IL-22 ont rapidement définis les kératinocytes comme cibles importantes de ce médiateur. Il a déjà été précisé auparavant que la cytokine induisait l'expression de plusieurs peptides antimicrobiens, physiologiquement impliqués dans la lutte contre des pathogènes extracellulaires. Ce rôle bénéfique de l'IL-22 peut néanmoins être complètement inversé lorsque les actions de l'IL-22 ne sont plus régulées correctement. La forte expression de peptides antimicrobiens retrouvée au cours du psoriasis, incluant par exemple la protéine S100A7 ou psoriasine, a donc naturellement conduit à suspecter une implication de l'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie.

L'IL-22 a pu être détectée dans la peau de patients souffrant de psoriasis alors qu'aucune expression n'est retrouvée dans la peau saine (Wolk et al. 2004). Des études plus approfondies des effets de l'IL-22 sur les kératinocytes ont permis de conclure qu'elle influençait l'expression de 3 grandes catégories de protéines : peptides antimicrobiens, protéines associées à la différenciation cellulaire, protéines associées à la régulation de la mobilité et de la migration cellulaire (Boniface et al. 2005; Wolk et al. 2006). Les protéines dont l'expression est induite par l'IL-22 (S100A7, S100A8, S100A9, MMP1) sont retrouvées à des niveaux beaucoup plus élevés au sein des plaques psoriasiques que dans la peau saine. Cette expression chute après traitement. L'IL-22 induit aussi une augmentation des capacités de migration des kératinocytes (Boniface et al. 2005) et entraîne une hyperplasie de l'épiderme responsable de l'acanthose (Zheng et al. 2007). L'IL-22 apparaît comme étant la cytokine agissant en aval de l'IL-23, génétiquement rattachée au psoriasis, et responsable de l'inflammation du derme et de l'acanthose. L'IL-23 induit en fait la sécrétion de l'IL-22 par des lymphocytes T CD4⁺ et les ILC22 infiltrant la peau (Zheng et al. 2007; Nakajima et al. 2011).

Les lymphocytes T CD4⁺ impliqués dans la production d'IL-22 chez les patients atteints de psoriasis semblent être principalement les lymphocytes Th17 et Th22 (Eyerich et al. 2009). Il est intéressant de constater que les lymphocytes Th22 semblent principalement se localiser au niveau de l'épiderme. En effet, les cellules de Langerhans apparaissent capables d'induire fortement la différenciation de ces Th22 (Fujita et al. 2009). En outre cette induction pourrait faire intervenir une interaction entre le CD1a des cellules de Langerhans et le TCR de lymphocytes T auto-réactifs (de Jong et al. 2010). La **Figure 4** résume le mécanisme présumé de la génération des lymphocytes T CD4⁺ Th22.

Finalement, il peut être signalé que les patients atteints de psoriasis présentent eux aussi des concentrations sanguines élevées d'IL-22. Ces concentrations se normalisent en cas de thérapie efficace (Wolk et al. 2006).

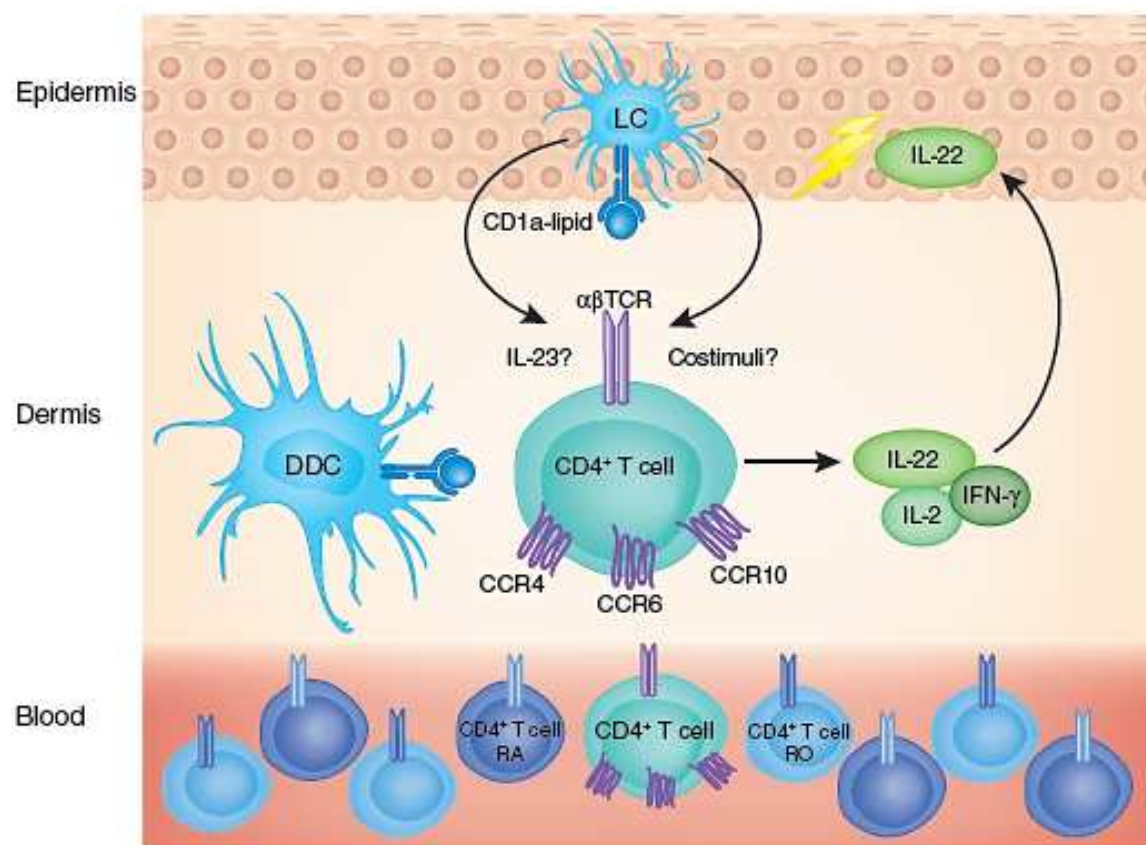


Figure 4 : Mécanisme présumé de générations des lymphocytes T CD4⁺ Th22 (Colonna, 2010)

1.5.2.3 Interleukine 22 et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont la résultante d'une inflammation permanente et dérégulée du tube digestif. Elles sont principalement représentées par la Maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH). Bien que d'étiologies encore mal comprises, les MICI représentent vraisemblablement des maladies

multifactorielles complexes, survenant chez des individus génétiquement prédisposés, au cours desquelles survient une réponse immunitaire muqueuse anormale, dirigée contre la flore intestinale, et pouvant être déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux.

La muqueuse intestinale est en contact permanent avec des milliards de bactéries commensales. La flore intestinale et l'hôte ont progressivement évolué vers le développement d'une association durable, réciproquement bénéfique, la symbiose. Le maintien de cet équilibre impose une adaptation régulée des systèmes de défenses de l'hôte à la flore. D'une part, les cellules épithéliales doivent empêcher la pénétration des micro-organismes au travers de la muqueuse. Pour autant le système immunitaire doit être maintenu dans un état relativement inerte à l'égard de la flore afin d'éviter les dommages tissulaires liés à une inflammation excessive. D'autre part, les systèmes immunitaire et épithélial doivent être capables de détecter et contrôler efficacement l'invasion de pathogènes opportunistes. Un dysfonctionnement, probablement lié à un désordre génétique, de l'un ou l'autre de ces systèmes pourrait être à la base du développement d'une MICI (Hooper & Macpherson 2010).

Les systèmes de contrôle et de défense de l'hôte font intervenir 3 grands mécanismes nécessaires à la préservation de l'homéostasie tissulaire. Premièrement un certain nombre de médiateurs immuns, incluant la couche de mucus, les peptides antimicrobiens et les immunoglobulines A, doivent limiter le contact direct entre les bactéries intestinales et la couche de cellules épithéliales. Une 2^{ème} ligne de protection par le système immunitaire fait intervenir différentes cellules innées (phagocytes, lymphocytes NK, cellules dendritiques) et adaptatives (lymphocytes T). Ces dernières doivent permettre une reconnaissance rapide et l'élimination des bactéries qui auraient pu pénétrer au sein de la muqueuse, afin d'éviter leur dissémination dans l'organisme. Finalement un système de régulation efficace de ces réponses immunitaires est nécessaire contre le développement d'une inflammation excessive et non résorbable.

Ainsi qu'il l'a déjà été mentionné précédemment, l'IL-22 intervient dans ces systèmes de défenses précoces. Elle permet l'induction de la synthèse de plusieurs sortes de peptides antimicrobiens et de chimiokines pouvant recruter différents phagocytes (granulocytes neutrophiles, monocytes) sur le site de l'infection. Elle est en outre capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans la cicatrisation, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Par ces différentes actions, l'IL-22 doit donc normalement contribuer au maintien de l'homéostasie intestinale en permettant le contrôle de la flore commensale, la lutte précoce contre les bactéries pathogènes et la préservation de l'intégrité de la muqueuse. Ces différents effets de l'IL-22 sont résumés dans la **Figure 5**.

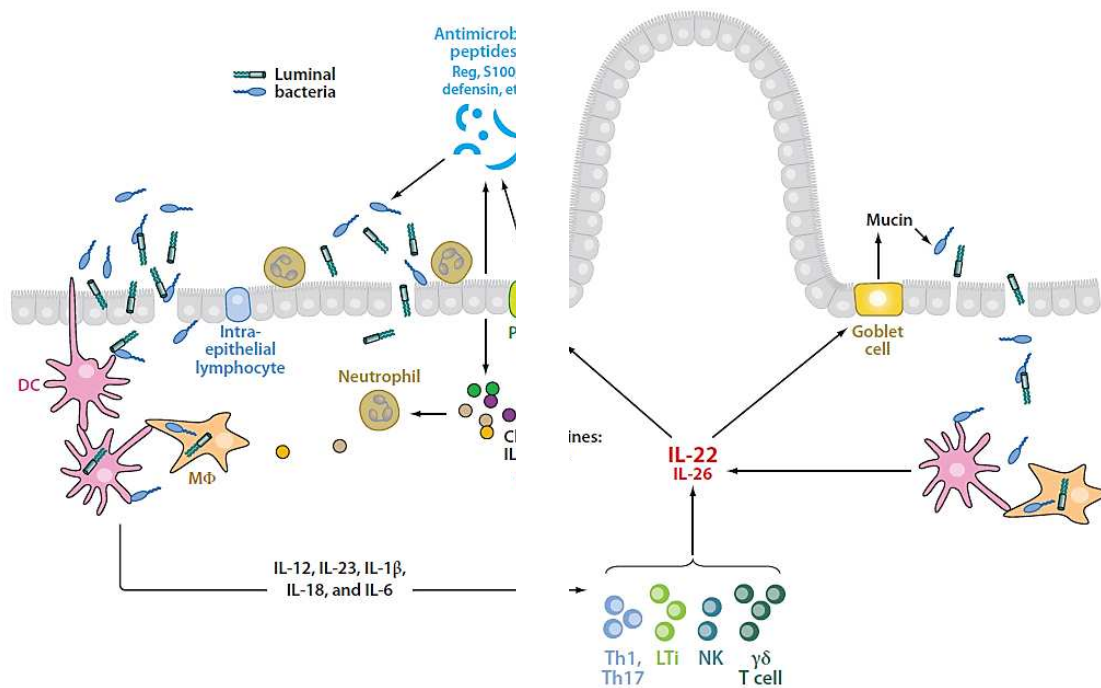


Figure 5 : Différentes actions de l’IL-22 intervenant dans le contrôle de différents micro-organismes présents dans la lumière intestinale (adapté de Ouyang et al. 2010).

Au même titre que pour la PR et le psoriasis, une dérégulation des effets de l’IL-22 impliquée dans la physiopathologie des MICI, a très rapidement été évoquée. Cependant la place de l’IL-22 dans les mécanismes pathologiques déclenchant ces maladies n’est pas encore clairement établie. Elle représente donc de ce fait l’objet d’intenses recherches à l’heure actuelle.

En 2006, Brand et al. ont pu observer une augmentation de l’expression de l’IL-22 au sein de muqueuses intestinales inflammatoires de patients souffrant de MC. Cette surexpression était limitée à la muqueuse inflammatoire, les muqueuses saines provenant des mêmes patients ne montrant pas d’élévation notable de l’ARN messager de l’IL-22. La surexpression de l’IL-22 était de plus fortement corrélée à une surexpression de l’IL-8, importante dans le recrutement des granulocytes neutrophiles, et pouvant être induite par l’IL-22. Une augmentation de l’expression de l’IL-22R était par ailleurs retrouvée. La surexpression de l’IL-22 ne semblait en outre concerner que les MC, les muqueuses inflammatoires de RCH retrouvant les mêmes niveaux, voir une sous-régulation, de l’expression du gène codant pour l’IL-22 en regard des muqueuses saines (Brand et al. 2006).

Les concentrations sériques d’IL-22 chez les patients atteints de MC sont plus élevées que celles de témoins sains. Ces dernières sont par ailleurs corrélées à la sévérité de la maladie (Wolk et al. 2007; Schmechel et al. 2008). Finalement les niveaux sériques d’IL-22

sont plus bas chez les patients porteurs des allèles mineurs du gène codant pour l'IL-23R. Ces allèles confèrent une forte protection contre le développement de la MC (Duerr et al. 2006). L'IL-22 a donc été, à l'aune de ces premiers résultats, considérée comme une cytokine importante dans la MC, et non dans la RCH, impliquée par ses propriétés pro-inflammatoires (induction de l'IL-8, de CCL2...) dans l'initiation et le développement de la maladie.

Par la suite, un certain nombre d'études portant sur des modèles animaux ont essayé de caractériser plus précisément les mécanismes par lesquels l'IL-22 pouvait intervenir dans la physiopathologie de ces colites inflammatoires. Il ressort de ces études que l'IL-22, à l'image de ce qui a déjà pu être décrit pour le foie, semble exercer un rôle plutôt protecteur dans ces modèles. Les colites induites par différents voies (DSS, TNBS, transfert cellulaire) étaient plus sévères chez les animaux déficients pour l'IL-22, que ce soit dans des modèles Th1/Th17, se rapprochant plus de la MC, ou dans des modèles « Th2-like », visant plus à mimer la RCH (Zenewicz et al. 2008; Sugimoto et al. 2008). L'IL-22 permettrait en effet de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale par ses différents effets. Tout d'abord il a pu être montré qu'elle facilitait la régénération des cellules de Goblet ainsi que la production de mucus par ces dernières, favorisant ainsi la formation d'une barrière extérieure séquestrant les micro-organismes et entravant leurs interactions avec les cellules épithéliales (Sugimoto et al. 2008). Ensuite, l'induction de la synthèse de divers peptides antimicrobiens par les entérocytes et surtout les cellules de Paneth, permet de contrôler l'invasion de la muqueuse par les différentes bactéries présentes dans la couche de mucus. Enfin, l'IL-22 permet l'activation de gènes importants pour la cicatrisation (Pickert et al. 2009). Ces différentes actions de l'IL-22, démontrées comme protectrices dans les modèles animaux, apparaissent toutes nécessiter l'activation de STAT3 dans les cellules épithéliales (Zenewicz et al. 2008; Sugimoto et al. 2008; Pickert et al. 2009).

Les niveaux élevés d'IL-22 chez les patients atteints de MC ont été singulièrement rattachés à une sous-population particulière de lymphocytes T CD4⁺ Th17 exprimant des marqueurs habituellement rencontrés à la surface des lymphocytes NK. Cette sous-population exprime en effet le CD161, un récepteur apparenté aux récepteurs des lectines de type C, et le NKG2D (*Natural Killer Group 2 member D*). L'activation de ces cellules par l'intermédiaire du TCR et de signaux de co-stimulation entraîne la synthèse d'IL-22 par ces cellules (associée entre autres à la synthèse d'IL-17). Une activation supplémentaire par un ligand spécifique du NKG2D renforce cette synthèse. La stimulation d'une lignée de cellules épithéliales du colon par les surnageants de culture de ces lymphocytes Th17 conduit à la surexpression de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL5, IL-8, CCL20), laissant les auteurs supposer

qu'elles présentent donc un rôle dans la physiopathologie de la MC (Kleinschek et al. 2009; Pariente et al. 2011).

Les effets pro-inflammatoires ou protecteurs de l'IL-22 au cours des MICI, et particulièrement de la MC, restent donc encore ambigus et nécessitent par voie de conséquence des investigations supplémentaires. Une dernière étude très récente renforce encore un peu plus les difficultés d'appréhension du rôle de cette cytokine dans la MC. En effet, Monteleone et al. démontrent quant à eux une sous-régulation de l'expression d'AhR dans la muqueuse inflammatoire de patients atteints de MC. AhR est important dans l'induction de la synthèse d'IL-22. Ceci laisse donc supposer ici une diminution des quantités d'IL-22 au cours de la MC. Pour autant les auteurs n'ont pas regardé la production d'IL-22 chez leurs patients. Ils suggèrent néanmoins qu'un traitement par un agoniste d'AhR peut conduire à une augmentation de la production d'IL-22, protectrice contre la colite. A nouveau les effets biologiques de l'IL-22 ont été regardés dans différents types de modèles murins (TNBS, DSS, transfert cellulaire) (Monteleone et al. 2011).

1.6 Conclusion :

De découverte récente, l'IL-22 suscite actuellement l'intérêt de nombreux groupes de recherche. L'ambivalence encore présente de ses effets biologiques laisse un certain nombre de questions en suspens.

Les preuves concernant le rôle majeur de l'IL-22 dans le maintien et la restauration de l'intégrité épithéliale de ses organes cibles sont déjà nombreuses et continuent de s'accumuler. En plus des différents travaux déjà évoqués précédemment, un rôle protecteur important de l'IL-22 a également pu être décrit dans la protection contre la fibrose pulmonaire (Simonian et al. 2010), la myocardite auto-immune chez le rat (Chang et al. 2006) et le rejet d'allogreffe cardiaque (Kapessidou et al. 2008). Un rôle, encore à définir, de l'IL-22 dans la sclérose en plaques (SEP) est également fortement suspecté (Kebir et al. 2007; Kreyborg et al. 2007).

A l'opposé, l'IL-22 semble clairement incriminée dans la physiopathologie du psoriasis et de la polyarthrite rhumatoïde, alors que son rôle dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin demande encore à être clarifié.

Finalement il apparaît important de garder à l'esprit que les effets de l'IL-22 ne dépendent pas uniquement de sa seule sécrétion mais également du contexte dans lequel elle est produite. Ainsi, il a pu être décrit une abolition complète de ses effets protecteurs au profit d'une action beaucoup plus délétère, lorsque l'IL-22 est associée à de hauts niveaux d'IL-17 (S. C. Liang et al. 2006; Sonnenberg et al. 2010).

2 L'interleukine 22 *bindingprotein* :

Une singularité propre à l'IL-22 au sein des cytokines de la famille de l'IL-10 est l'existence d'une protéine soluble, capable de se lier spécifiquement à la cytokine. Cette protéine, dénommée interleukine 22 *bindingprotein* (IL-22BP), a été identifiée près d'un an après la découverte de l'IL-22, de façon simultanée par 3 groupes indépendants (Dumoutier et al. 2001; Kotenko et al. 2001b; Xu et al. 2001). La découverte de l'IL-22BP a fait suite au criblage systématique de banques de données publiques d'ADNc (ADN complémentaires), lors de recherches visant à trouver de nouvelles protéines homologues à celles de la famille CRF2, déjà présentée plus haut. L'équivalent murin a pu être identifié quelques années plus tard (Wei et al. 2003; Weiss et al. 2004). Ces premières études laissent émerger l'hypothèse que l'IL-22BP soit un inhibiteur physiologique, spécifique de l'IL-22, et ainsi impliqué dans la régulation des effets biologiques de cette dernière. Malgré cela, les travaux sur l'IL-22BP restent encore rares, laissant le champ libre à de nombreuses investigations. Cette partie a donc pour objet de faire état des différentes connaissances accumulées depuis 10 ans sur l'IL-22BP, ainsi que de présenter les différentes questions encore non résolues et les enjeux qu'elles peuvent susciter.

2.1 Gène et protéine de l'IL-22BP :

La découverte du gène codant pour l'IL-22BP s'est faite en 2001, simultanément par 3 groupes à la recherche d'homologues des protéines de la famille CRF2. La recherche a été réalisée sur des banques publiques de ADNc humain, avec pour objectif de trouver des séquences similaires à celles codant pour l'IL10-R1, l'IL-22R1 et l'IL-20R1 (Dumoutier et al. 2001; Kotenko et al. 2001b; Xu et al. 2001). Ces 3 équipes ont ainsi pu mettre en évidence un nouveau gène, localisé sur le chromosome 6q24, codant pour une protéine présentant une homologie significative avec les différents membres de la famille CRF2, et plus particulièrement avec le domaine extracellulaire de l'IL-22R1. La réalisation d'un arbre phylogénétique (**Figure 6A**) a confirmé la relation plus étroite existante entre l'IL-22BP et l'IL-22R1. Il est intéressant de souligner que ce gène se trouve à proximité et dans la même orientation que les gènes codant pour l'IFN- γ R1 et l'IL-20R1, 2 autres membres de la famille CRF2. Ceci est d'autant plus intrigant qu'il a déjà été mentionné plus haut la proximité entre les gènes codant pour l'IL-22 et l'IFN- γ . La dénomination *il22ra2*, par opposition à l'*il22ra1* codant pour l'IL-22R1, a été choisie pour le gène de l'IL-22BP.

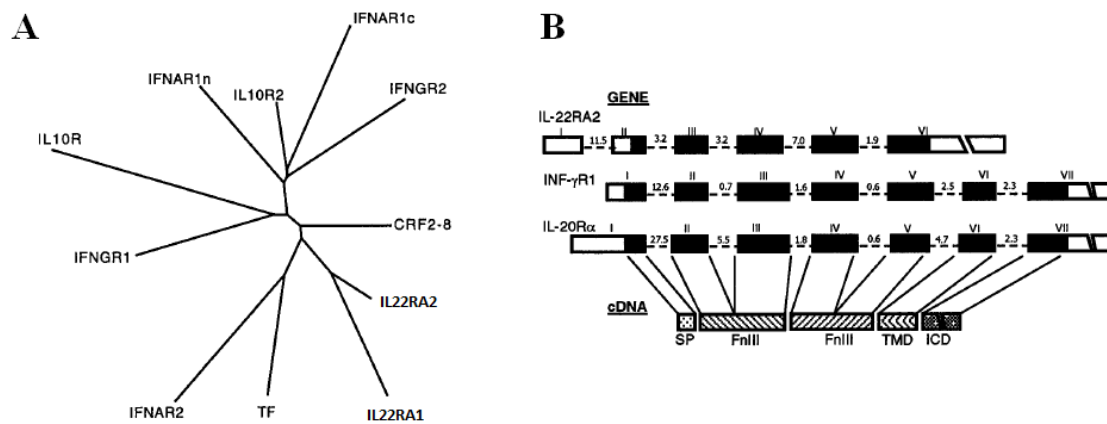


Figure 6 : Gène de la chaîne IL-22R1. (A)Arbre phylogénétique regroupant les différents membres de la famille CRF2 (d’après Dumoutier et al. 2001). (B) Organisation des jonctions exons-introns des gènes codant pour l’IL-22BP, l’IFN- γ R1 et l’IL-20R1. Les boîtes noires représentent les exons codant, les boîtes blanches les régions non traduites et les lignes pointillées les introns (Xu et al. 2001). SP, *signal peptide* ; FnIII, domaine fibronectine III ; TMD, *transmembranedomain* ; ICD, *intracellulardomain*.

La structure du gène *il22ra2* comprend 6 exons. L’organisation est similaire à celles des gènes codant pour l’IFN- γ R1 et l’IL-20R1 (**Figure 6B**). Elle retrouve une région 5’ non traduite (5’UTR pour *untranslatedregion*) codée par l’exon 1 et la première partie de l’exon 2 ; le reste de l’exon 2 code pour un peptide signal de 21 AA, nécessaire à l’adressage de la protéine dans les compartiments cellulaires ; les exons 3 à 5 et la première partie de l’exon 6 codent pour la protéine mature ; le reste de l’exon 6 correspond au 3’UTR.

L’ensemble de la région codante du gène conduit à la synthèse d’une protéine de 231 AA, partageant 33% d’identités avec le domaine extracellulaire de l’IL-22R1. Il a été immédiatement suspecté, puis confirmé expérimentalement que l’IL-22BP était une protéine uniquement sécrétée. En effet, elle représente le seule membre de la famille CRF2 qui ne possède pas de domaines transmembranaire ni intracellulaire. Ainsi, la protéine mature se constitue uniquement de 2 domaines fibronectine III en tandem, caractéristiques du domaine extracellulaire des autres membres de la famille CRF2. L’ensemble conduit à une protéine en forme de L. Les 2 domaines sont reliés par une petite hélice 3_{10} et forment un angle de 125° . Chaque domaine fibronectine III comprend 2 feuillets β anti-parallèles, organisés en « sandwich » composé à partir de 7 brins β (A, B, E d’une part et C, C’, F et G de l’autre). L’IL-22BP présente 5 sites de N-glycosylation potentiels et la protéine purifiée migre aux alentours de 35-45 kDa en gel de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*).

Le complexe formé de l’interaction entre l’IL-22BP et l’IL-22 a été cristallisé récemment (**Figure 7**) (de Moura et al. 2009). L’homologie avec l’IL-22R1 est plus forte au

niveau du premier domaine fibronectine III, suggérant que ce dernier est le plus important dans l'interaction avec l'IL-22.

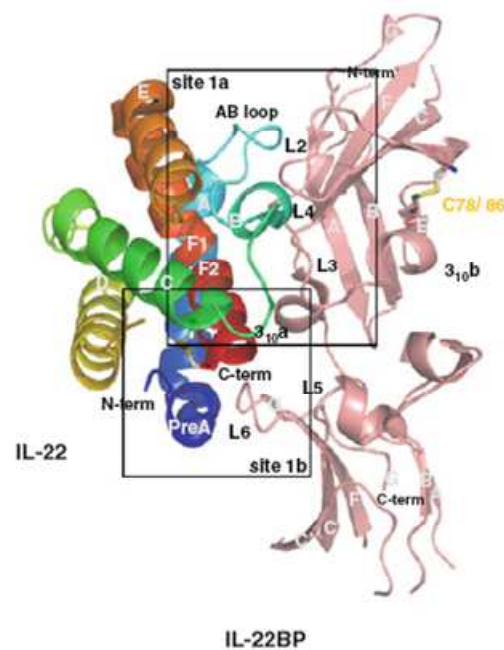


Figure 7 : Structure cristallographique du complexe issu de l'interaction entre l'IL-22BP et l'IL-22 (Trivella et al. 2010)

L'équivalent murin de l'IL-22BP a été identifié par 2 groupes indépendants, lors de la recherche chez la souris de séquences homologues à celle codant pour l'IL-22BP humaine. Le gène se trouve sur le chromosome 10 et code pour une protéine de 230 AA, présentant 67% d'identité avec l'IL-22BP humaine (Wei et al. 2003; Weiss et al. 2004). Chez le rat, le gène se situe sur le chromosome 1p12, code pour une protéine de 229 AA et présente 72% et 84% d'identités avec les protéines humaine et murine, respectivement.

Une dernière particularité de l'IL-22BP, pour l'instant propre à l'homme, est l'existence de 2 autres isoformes. L'une, dite longue, code pour une protéine de 263AA, l'autre, dite courte, code pour une protéine de 130AA (Dumoutier et al. 2001; Kotenko et al. 2001b; Xu et al. 2001). Ces isoformes semblent résulter d'un épissage alternatif de l'ARN messager. La forme courte fait suite à l'excision de l'exon 5, alors que la forme longue est la conséquence de l'insertion d'un exon supplémentaire entre les exons 3 et 4. Jusqu'à alors, aucune de ces 2 isoformes n'a pu être décrite chez la souris ou le rat.

2.2 Distribution tissulaire de l'IL-22BP :

L'étude de la distribution tissulaire de l'IL-22BP se cantonne jusqu'à présent à l'évaluation de l'expression du gène par RT-PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*). Les données ainsi disponibles ne concernent donc que la présence d'ARNm au sein des tissus mais aucun travail ne présente de résultat convaincant quant à la présence réelle de la protéine.

Les principaux tissus dans lesquels l'expression du gène *il22ra2* a pu être détectée chez l'homme sont le placenta, le sein, les organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglion), le tractus gastro-intestinal (intestin grêle, colon), les poumons et la peau (Dumoutier et al. 2001; Xu et al. 2001). Cette expression concerne principalement l'isoforme de taille intermédiaire, qui comme il le sera discuté ultérieurement, semble être la seule capable d'interagir efficacement avec l'IL-22. L'expression de l'isoforme longue n'a pour l'instant été retrouvée que dans le placenta. Il faut par ailleurs noter que l'étude de la répartition tissulaire de l'isoforme courte n'a pas réellement fait l'objet de recherches spécifiques, si bien qu'aucune donnée n'est à l'heure actuelle disponible.

L'expression de l'IL-22BP a également été évaluée chez la souris dans quelques tissus et semble corroborer les données obtenues chez l'homme. L'expression la plus forte est retrouvée dans cette étude au niveau des ganglions lymphatiques (Weiss et al. 2004).

Finalement, bien que l'IL-22BP soit une protéine sécrétée, et par conséquent à même de diffuser dans les différents liquides corporels, aucune information n'est pour l'instant disponible quant à sa circulation ou non dans le sang et les différents liquides biologiques. Ceci résulte directement de l'utilisation de la seule PCR pour en évaluer la présence.

2.3 Sources cellulaires de l'IL-22BP :

Très peu d'études font état des sources cellulaires d'IL-22BP, que ce soit chez l'homme ou l'animal. En 2001 Xu et al. avaient suggéré que les monocytes, les lymphocytes B et T activés pouvaient constituer une source d'IL-22BP, sans pour autant présenter les données (Xu et al. 2001). Deux ans plus tard, Wei et al. suggéraient également que les monocytes activés par du lipopolysaccharide (LPS), un ligand du Toll-Like Récepteur 4 (TLR4), étaient capables d'exprimer le gène *il22ra2*. Cependant, dans ce travail l'expression la plus forte est retrouvée pour une lignée cellulaire, les auteurs n'effectuent en outre aucune comparaison avec d'autres types cellulaires que les monocytes, obtenus par adhérence à partir de rates murines. Il apparaît donc dans ce cas difficile d'évaluer l'importance relative des niveaux d'expression réels détectés (Wei et al. 2003).

Finalement, une seule étude visant à caractériser les sources cellulaires de l'IL-22BP est actuellement disponible (Nagalakshmi et al. 2004). Ce travail mené par RT-PCR quantitative (q-RT-PCR) sur différentes banques d'ADNc, n'a retrouvé aucune expression par les monocytes, activés ou non. Des signaux très faibles ont été observés dans les lymphocytes T et B ainsi que dans les mastocytes. Aucune expression n'a été détectée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*) ni dans différentes lignées de cellules épithéliales et stromales. En revanche des niveaux d'expression significatifs ont pu être observés dans les cellules dendritiques conventionnelles immatures. Cette expression chutait fortement lorsque les cellules étaient activées.

Les sources cellulaires d'IL-22BP restent donc passablement obscures, les arguments les plus forts portant tout de même sur une expression importante des cellules dendritiques conventionnelles immatures en regard des autres cellules, hématopoïétiques ou non.

2.4 Propriétés de l'IL-22BP :

L'IL-22BP est une protéine soluble, uniquement sécrétée et capable de se lier de façon spécifique à l'IL-22. Plusieurs cytokines possèdent des systèmes de régulation faisant intervenir ce type de protéine.

L'IL-1 est par exemple régulée négativement par un récepteur membranaire leurre, l'IL-1RII. Ce dernier est capable de se lier à la cytokine et d'interagir avec la 2^{ème} chaîne du récepteur membranaire, mais compte tenu d'un domaine extracellulaire très court, il est incapable d'initier la transduction d'un signal dans la cellule. D'autres cytokines comme l'IL-18 possèdent des récepteurs solubles inhibiteurs. L'IL-18BP est ainsi capable de se lier très fortement à l'IL-18 et l'empêche d'interagir avec son récepteur membranaire. Ces 2 cytokines possèdent donc un système de régulation négative faisant intervenir des protéines soluble ou membranaire, et jouant le rôle de récepteurs leurres.

Pour autant, d'autres cytokines possèdent également des récepteurs solubles, capables d'une interaction spécifique, mais dont les propriétés physico-chimiques conduisent plus à une régulation positive. Ainsi l'IL-4BP, est capable d'interagir efficacement avec l'IL-4. Cependant la dissociation du complexe IL-4/IL-4BP est beaucoup plus rapide que celle du complexe IL-4/IL-4R. L'IL-4BP permet donc en fait d'augmenter la demi-vie de l'IL-4 en la protégeant contre les dégradations enzymatiques. Elle permet également son transport dans la circulation et l'acheminement de la cytokine jusqu'à son récepteur membranaire. Finalement, le récepteur soluble de l'IL-6 est quant à lui capable d'initier une réponse intracellulaire par des cellules qui ne possèdent pas le récepteur membranaire de la cytokine. Ce phénomène dit de *trans-signaling* permet de mieux comprendre les effets pléiotropiques de l'IL-6.

Les données concernant les propriétés de l'IL-22BP laissent suggérer fortement qu'il s'agit d'un récepteur soluble inhibiteur spécifique de l'IL-22. Dès ses premières descriptions, il avait pu être démontré que l'IL-22BP pouvait abolir les effets biologiques de l'IL-22 *in vitro* (Dumoutier et al. 2001; Kotenko 2001b; Xu et al. 2001). La pré-incubation de l'IL-22BP avec l'IL-22 empêche cette dernière d'induire la phosphorylation de STAT3, la surexpression des molécules du CMH de classe I et l'induction de la prolifération de ses cellules cibles.

Ces propriétés ne semblent concerner que l'isoforme de taille intermédiaire décrite chez l'homme. Elles ont également été confirmées chez la souris, qui ne présente que l'équivalent de cette isoforme de taille moyenne (Wei et al. 2003).

Le rôle inhibiteur de l'IL-22BP a ensuite pu être rattaché aux propriétés physico-chimiques de cette dernière. Ainsi, il a pu être constaté que l'affinité de l'IL-22BP pour l'IL-22 est supérieure à celle du récepteur membranaire (1pM vs 1nM). L'IL-22BP semble par ailleurs incapable de lier aux autres cytokines de la famille de l'IL-10 (Logsdon et al. 2002). La comparaison des complexes cristallographiques IL-22/IL-22BP et IL-22/IL-22R1 a de plus permis d'établir que les sites d'interactions étaient similaires pour les 2 récepteurs (Trivella et al. 2010). Ceci confirme les résultats de Wu et al. qui indiquaient que l'IL-22BP empêchaient la liaison de l'IL-22R1 à l'IL-22 (Wu et al. 2008).

La cristallisation du complexe IL-22BP/IL-22 a également permis d'établir les sites et la conformation nécessaire à une interaction optimale avec l'IL-22. Deux résidus en particulier, Y67 et R119, tous 2 situés dans le domaine D1, apparaissent indissociables de l'interaction avec l'IL-22. Des expériences de mutagenèse dirigée ont ainsi pu établir que le remplacement de l'un ou l'autre de ces 2 résidus par une alanine abolissait complètement la liaison avec la cytokine (de Moura et al. 2009). Ces résidus sont conservés sur l'IL-22R1. Cependant l'IL-22BP établit plus d'interactions polaires avec l'IL-22 et présente un large groupement hydrophobe absent de l'IL-22R1. Ces différences structurales entre IL-22BP et IL-22R1 permettent d'expliquer les affinités différentes de ces 2 protéines pour l'IL-22.

Pour finir, ces expériences de cristallisation ont également permis d'affirmer que l'IL-22BP n'est en mesure d'interagir qu'avec une seule molécule d'IL-22, conduisant alors à la formation d'un hétérodimère.

Ainsi l'IL-22BP est capable d'établir des interactions de hautes affinités avec l'IL-22 tout en empêchant cette dernière de se lier à son récepteur membranaire. Le complexe IL-22BP/IL-22 est très stable et ne semble pas pouvoir être dissocié une fois formé. Ces données, associées aux résultats expérimentaux obtenus lors des études initiales, affirment donc le caractère inhibiteur de l'IL-22BP, laissant suggérer un rôle de régulateur des réponses induites par l'IL-22. En outre l'étude de la structure de l'IL-22BP ainsi que des sites essentiels

à une interaction efficace avec l'IL-22, couplée à quelques résultats expérimentaux préliminaires, suggère fortement que seule l'isoforme de taille intermédiaire soit capable d'exercer ce rôle. Le terme d'IL-22BP est par conséquent uniquement adaptée à la désignation de cette dernière.

2.5 Biologie de l'IL-22BP :

Le rôle physiologique réel de l'IL-22BP reste encore assez mal connu. Aucune étude n'a spécifiquement étudié ses fonctions *in vivo* que ce soit à l'état physiologique ou au cours des différentes pathologies rattachées à l'IL-22. Si ses capacités inhibitrices *in vitro* semblent maintenant clairement établies, les données concernant son rôle de régulateur physiologique chez l'homme comme chez l'animal restent à définir.

En 2008, Sugimoto et al. ont pour la première fois établi une preuve de sa fonctionnalité chez l'animal. Bien qu'encore relativement artificiel, ce modèle a tout de même permis d'apprécier les capacités inhibitrices de la protéine synthétisée *in situ*. Dans leur étude, les auteurs montrent qu'une expression localisée d'IL-22BP inhibe les effets bénéfiques de l'IL-22 dans la restauration d'une homéostasie tissulaire, lors de colites induites au DSS. Cette production localisée est permise par une micro-injection pressurisée d'un vecteur non viral contenant l'ADNc de l'IL-22BP murine avant l'induction de la colite. L'expression de l'IL-22BP, objectivée par q-RT-PCR, reste localisée au site de l'injection et ne diffuse pas aux alentours. La production d'IL-22BP abolit les actions de l'IL-22 sur le site de l'injection. Ainsi, la phosphorylation de STAT3 dans les cellules épithéliales du colon n'a plus lieu, pas plus que la régénération des cellules de Goblet, par comparaison aux sites non micro-injectés. Enfin, le score de gravité histologique est plus important lorsque l'IL-22BP est présente (Sugimoto et al. 2008). Jusqu'à présent cette étude est la seule prouvant un effet biologique de l'IL-22BP *in vivo*.

Une autre étude suggère un rôle délétère de l'IL-22BP au cours d'une pathologie inflammatoire cutanée chronique, la maladie de Verneuil. D'étiologie encore inconnue, cette pathologie résulte d'une occlusion du follicule pilo-sébacé conduisant à une inflammation secondaire ainsi qu'à des suppurations par surinfection bactérienne. Les patients atteints de cette maladie expriment des niveaux plus élevés d'IL-22BP que ceux atteints de psoriasis. Ce résultat a conduit les auteurs à supposer que l'IL-22BP inhiberait l'IL-22 l'empêchant ainsi d'induire les mécanismes de défenses précoces contre les bactéries (Wolk et al. 2010). Pour autant, aucune donnée comparant les niveaux d'expression du gène à ceux de la peau de témoins sains n'est fournie. Il est donc difficile de savoir si l'expression de l'IL-22BP est

augmentée au cours de la Maladie de Verneuil ou si elle reste au même niveau que dans la peau saine.

La régulation de l'expression du gène *il22ra2* n'est, elle non plus, pas encore clairement élucidée. Un certain nombre d'arguments tendent à montrer que les conditions inflammatoires seraient associées à une diminution de l'expression du gène. Ainsi qu'il l'a déjà été précisé, l'expression importante du gène par les DC immatures chute dès lors qu'elles sont activées (Nagalakshmi et al. 2004). Plusieurs travaux font également état d'une diminution de l'expression du gène dans des modèles de colites inflammatoires induites chez la souris (Wolk et al. 2007; Sugimoto et al. 2008).

D'un autre côté, plusieurs études ayant également analysé l'expression du gène dans différentes conditions associées à une inflammation retrouvent, quant à elles une surexpression du gène. Dans leur étude initiale, Xu et al. décrivent une expression accrue au niveau de l'appendice inflammatoire, ainsi que dans des carcinomes ovariens (Xu et al. 2001). Une induction a également été décrite au cours d'infections à helminthe, mycobactérie et protozoaire dans le foie (Wilson et al. 2010), ainsi qu'au niveau de la rate et du rein dans un modèle de péritonite polymicrobienne (Weber et al. 2007). Dans cette étude, les auteurs suggèrent par ailleurs que les effets délétères de l'IL-22 observés sont atténués par l'injection d'IL-22BP recombinante. Finalement, une induction importante de l'expression du gène vient d'être décrite au niveau des articulations inflammatoires dans un modèle murin de PR (souris déficiente pour IL-1RA) (Marijnissen et al. 2011).

La régulation de l'expression du gène est donc encore sujette à de nombreuses interrogations puisqu'elle pourrait être induite ou inhibée dans différentes conditions inflammatoires. Elle dépend probablement des facteurs environnementaux propres à chaque condition observée, ainsi que de l'implication de l'IL-22 dans ces différents processus.

Deux études ont décrit l'association de 2 polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) du gène *il22ra2* à la sclérose en plaque (Beyeen et al. 2010; Vandebroek et al. 2011). Dans les 2 cas les patients porteur du SNP semblent être associés à des maladies plus sévères. L'IL-22 a déjà été évoquée dans la sclérose en plaque. Pour autant, rien de ne permet encore de trancher en faveur d'un rôle protecteur ou déclenchant de cette maladie (Kebir et al. 2007; Kreymborg et al. 2007). Il est par conséquent difficile de prospecter sur le rôle de l'IL-22BP dans la sclérose en plaque.

Pour finir, un SNP de l'*il22ra2* a également été rattaché à la progression de la leucémie lymphoïde chronique (Wade et al. 2011).

2.6 Conclusion :

L'IL-22BP fait encore à l'heure actuelle l'objet de peu d'investigations, la plupart des efforts se concentrant avant tout sur l'IL-22. Pourtant, il semble clairement admis que cette protéine soit un régulateur physiologique de l'IL-22, impliquée dans la modulation des effets biologiques de cette dernière. Il apparaît donc naturel afin de mieux caractériser les différentes fonctions de l'IL-22, que ce soit dans la lutte contre les infections, ou dans différents processus inflammatoires, de chercher à mieux appréhender la biologie de son inhibiteur naturel.

Ainsi qu'il vient de l'être évoqué, de très nombreuses questions restent encore en suspens et méritent d'être résolues. Une meilleure caractérisation des sources cellulaires, de la régulation de la production, des effets physiologiques et de l'implication en physiopathologie de cette protéine permettra probablement de mieux comprendre les effets observés de l'IL-22, et peut-être ainsi de dissoudre les paradoxes encore apparents.

3 Cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques ont été décrites pour la première fois dans la peau par l'anatomo-pathologiste Paul Langerhans en 1868, elles ont alors été dénommées cellules de Langerhans. Longtemps assimilées à des cellules nerveuses, c'est en 1973 que le terme cellules dendritiques a été introduit par Steinman. Il s'agit de cellules rares, présentes dans la plupart des tissus de l'organisme, d'origine hématopoïétique et spécialisées dans la capture et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elles représentent donc l'archétype des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) (Banchereau & Steinman 1998).

3.1 Classification, distribution tissulaire et propriétés générales des cellules dendritiques :

Les DC sont toutes capables de capturer, apprêter et présenter un antigène à un lymphocyte T mature naïf. Cependant il existe de nombreuses sous-populations de DC, chacune présentant une localisation particulière ainsi qu'une spécialisation fonctionnelle dans le système immunitaire. Elles peuvent être distinguées en DC conventionnelles (cDC), DC plasmacytoïdes (pDC) et DC inflammatoires (Shortman & Naik 2007).

3.1.1 Cellules dendritiques conventionnelles :

Le terme de DC conventionnelles regroupe à la fois des DC présentes dans les tissus non lymphoïdes, migrant vers les organes lymphoïdes, ainsi que des DC résidentes dans ces organes lymphoïdes. Elles expriment toutes le CD11c à leur surface.

Les cDC migrant des tissus vers les organes lymphoïdes exercent un rôle de sentinelle dans les tissus périphériques, caractérisé par la capture et la détection des agents pathogènes. Leur activation fait suite à la détection d'un signal de danger, détecté par l'interaction d'un motif moléculaire spécifique des pathogènes (*Pathogen associated molecular pattern* ou PAMP) avec un récepteur de l'immunité innée spécialisé (*Pattern recognition receptor* ou PRR). Les principaux PRR sont représentés par les TLR (Medzhitov 2001). L'activation des DC peut également être initiée par des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1), des cellules nécrotiques et certaines protéines du choc thermique.

Les DC activées migrent alors par voie lymphatique afférente vers les zones T du ganglion lymphatique drainant. Cette migration s'accompagne d'une maturation des DC qui subissent alors des modifications morphologiques (acquisition des dendrites), phénotypiques (augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II, des molécules de co-stimulation, de marqueurs d'activation) et fonctionnelles (perte de la capacité de capture antigénique, acquisition de la capacité à présenter les antigènes apprêtés aux lymphocytes T naïfs). La présentation antigénique à un lymphocyte T mature, naïf, spécifique permet l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative (**Figure 8**).

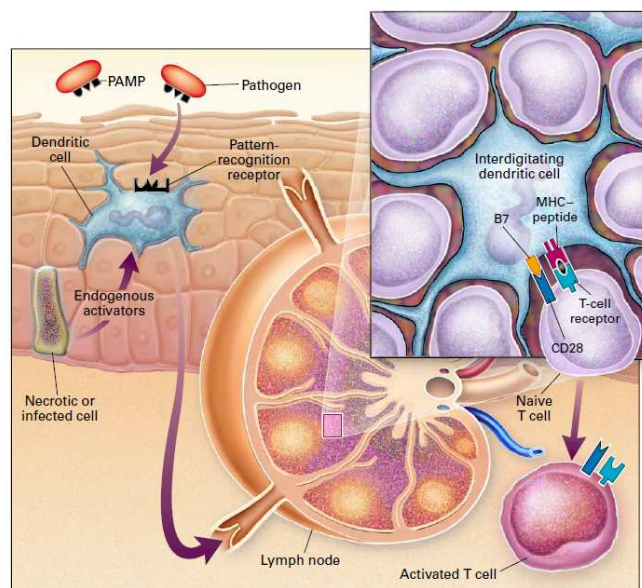


Figure 8 : Cycle classique d'une DC migratoire. La DC immature du tissu périphérique capture et reconnaît un pathogène. Elle migre alors par voie lymphatique afférente jusqu'au ganglion lymphatique drainant tout en subissant un processus de maturation. Dans le ganglion elle peut alors présenter efficacement l'antigène à un lymphocyte T mature naïf, spécifique, et ainsi initier une réponse immunitaire adaptative (Delves&Roitt, 2000).

Les DC assurent donc un lien essentiel entre l'immunité innée non spécifique et l'immunité adaptative spécifique (Medzhitov 2001). Elles sont en outre impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique, lorsqu'elles sont immatures.

Les DC migratoires peuvent être subdivisées en fonction de leur tissu périphérique d'origine.

Les cellules de Langerhans représentent le modèle de ces DC migratoires. Elles forment un réseau de CPA dans l'épiderme (3 à 8% des cellules de l'épiderme) et se caractérisent par des marqueurs de surface spécifiques (CD1a, CD207 ou Langerine, E-cadhérine). Elles possèdent aussi à l'état immature des granules de morphologie particulière, en forme de raquette de tennis, les granules de Birbeck. Ces granules disparaissent lors de la maturation. Les cellules de Langerhans sont également retrouvées dans les épithélia de l'intestin et des tractus respiratoire et reproducteur. D'autres DC migratoires sont retrouvées dans le derme. Elles ne possèdent pas de granules de Birbeck et s'apparentent aux DC interstitielles retrouvées dans les autres organes.

Les DC interstitielles sont présentes en faible proportion dans la quasi-totalité des tissus non lymphoïdes de l'organisme. Leur quantité varie d'un organe à un autre mais ne dépasse jamais 1% de l'ensemble des cellules. Elles sont caractérisées par une forte expression des molécules du CMH II ainsi que du CD209 (DC-SIGN), et du facteur de coagulation XIIIa. Il pourrait y avoir 2 populations distinctes de DC interstitielles, qui seraient d'origines différentes.

Les organes lymphoïdes contiennent aussi des DC dites résidentes. Elles représentent la moitié des DC des ganglions lymphatiques (l'autre moitié étant représentée par les DC migratoires) ainsi que la totalité des DC du thymus et de la rate (Villadangos & Schnorrer 2007). Elles sont principalement localisées dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires (manchon périartériolaire de la pulpe blanche de la rate et paracortex des ganglions lymphatiques). Dans le thymus, elles sont localisées au niveau de la jonction cortico-médullaire et sont particulièrement impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T immatures. Ces cellules ne suivent pas le modèle classique exposé précédemment. Elles se développent dans les organes lymphoïdes à partir de précurseurs médullaires, sans circuler par les tissus périphériques. Elles peuvent, en l'absence d'infection, rester immatures tout au long de leur vie, elles sont ainsi distinguables des DC migratoires dans les ganglions qui présentent obligatoirement un phénotype mature. Finalement, elles sont particulièrement importantes dans les réponses immunitaires dirigées contre les antigènes

transportés dans le sang puisqu'elles représentent les seules DC de la rate, qui ne possède pas de système de drainage lymphatique.

3.1.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes :

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été identifiées vers la fin des années 1990 dans les organes lymphoïdes et le sang. Elles ont été dénommées plasmacytoïdes en raison de leur morphologie proche des plasmocytes. Contrairement aux cDC elles n'expriment pas le CD11c mais expriment en revanche la chaîne alpha du récepteur de l'IL-3 chez l'homme (CD123).

Les pDC représentent la plus grosse source de production d'IFN de type I de l'organisme. Elles sont également capables de produire d'autres cytokines inflammatoires dont le TNF- α et l'IL-6 en réponse à une stimulation par les ligands des TLR7 et 9. Elles sont de ce fait particulièrement impliquées dans les défenses innées antivirales. Ces cellules sont présentes dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires mais pas dans les tissus périphériques.

Le rôle dans la présentation antigénique *in vivo* des pDC reste encore controversé. Il est probablement beaucoup moins important que celui des cDC. Les pDC sont toutefois capables de présenter des peptides viraux aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires lors d'une infection virale.

3.1.3 Cellules dendritiques inflammatoires :

Les cellules dendritiques inflammatoires sont de description récente. Il s'agit de cellules pouvant se différencier rapidement à partir de progéniteurs immédiats ou de monocytes dans les tissus inflammatoires, notamment en réponse à une infection bactérienne. Elles jouent un rôle important dans la réponse innée grâce à la production de cytokines pro-inflammatoires (dont le TNF- α) et de monoxyde d'azote (NO) (TIP-DC pour *TNF/inducible NO synthase-producing dendritic cells*).

Les DC inflammatoires peuvent également initier une réponse immunitaire adaptative en migrant du tissu inflammatoire vers les ganglions lymphatiques drainants.

Ces cellules sont très fréquemment utilisées pour étudier les propriétés des DC *in vitro*, car facilement différenciables à partir de monocytes. Pour autant il faut garder à l'esprit que les conclusions tirées à partir de tels modèles ne concernent qu'une des sous-populations de DC rencontrées *in vivo*. Les résultats des études fonctionnelles obtenues sur ces DC sont donc difficilement extrapolables aux cDC migratoires ou résidentes.

3.2 Cellules dendritiques chez le rat :

Plusieurs sous-populations de DC ont pu être identifiées chez le rat. Actuellement, 3 sous-populations sont décrites dans la rate. Parmi celles-ci deux sous-populations de cDC sont caractérisées par l'expression de l'intégrine $\alpha E2\beta 7$ (CD103), reconnue par l'anticorps monoclonal OX62. Elles sont aussi distinguées par le fait qu'elles expriment ou non CD4 et CD172 α (SIRP α) (Trinité et al. 2000; Turnbull & MacPherson 2001). Il est ainsi retrouvé des DC OX62⁺ CD11b⁺ CD4⁺ CD172 α ⁺ (nommées par le terme générique DC CD4⁺ dans la suite du texte) et des DC OX62⁺ CD11b⁺ CD4⁻ CD172 α ⁻ (DC CD4⁻). La troisième sous-population correspond aux pDC. Ces cellules sont caractérisées par le phénotype suivant : OX62⁻ CD11b⁻ CD4⁺ CD172 α ⁺. Les DC CD4⁺ et CD4⁻ se distinguent par une expression différente des TLR, qui influence ainsi leur capacité à reconnaître les pathogènes. Les DC CD4⁻ apparaissent comme de grandes productrices d'IL-12p40 et induisent une différenciation Th1. A l'inverse les DC CD4⁺ semblent répondre plus faiblement aux stimulations des différents TLRs, par la production de faibles quantités d'IL-12p40 et d'IL-10 (Hubert et al. 2006). Quoiqu'il en soit les réponses de chaque sous-population de DC aux stimulations de différents TLRs apparaissent relativement stéréotypées.

4 Objectif du travail :

L'IL-22BP est une protéine de description récente. Bien que ses propriétés inhibitrices spécifiques de l'IL-22 soient maintenant clairement admises *in vitro*, sa physiologie reste encore méconnue. Une meilleure compréhension de ses propriétés biologiques *in vivo*, de ses sources cellulaires ainsi que de sa régulation permettra sûrement de mieux appréhender les propriétés biologiques de l'IL-22. Cette dernière semble en effet présenter un rôle non négligeable dans le maintien et la restauration de l'homéostasie épithéliale, que ce soit en conditions physiologiques, dans un certain nombre de réponses anti-infectieuses ou encore dans diverses pathologies inflammatoires. Malgré tout, l'étude de la cytokine a également soulevé un certain nombre de paradoxes quant à ses effets biologiques. La régulation des actions de l'IL-22 passe probablement en partie par son interaction avec son inhibiteur naturel. Une meilleure caractérisation des interactions entre IL-22BP et IL-22 devrait donc permettre d'une part de lever un certain nombre de ces singularités, et d'autre part, d'envisager l'éventualité de développement de nouveaux outils thérapeutiques adaptés dans le traitement des pathologies mettant en jeu l'IL-22. L'implication probable de l'IL-22 dans le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde semble indiscutable, l'emploi d'IL-22BP recombinante dans ce type de maladies pourrait donc renforcer l'arsenal thérapeutique actuellement à

disposition pour ces maladies. A l'inverse les actions de l'IL-22 au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin semblent encore ambivalentes, à ce titre l'évaluation de la place de l'IL-22BP dans ces processus pourrait apporter un regard nouveau sur le rôle tenu par la cytokine, et peut-être ainsi de mieux comprendre comment cette cytokine devrait être modulée à des fins thérapeutiques.

Des résultats préliminaires, obtenus grâce à l'utilisation de puces à ADN sur les différentes sous-populations de cellules dendritiques de rat, ont conduit à émettre l'hypothèse que les DC CD4⁺ pourraient représenter une source constitutive d'IL-22BP chez cet animal. Ces résultats sont dans la lignée de ceux décrits par Nagalakshmi et al. en 2004, qui laissaient déjà entendre que les DC seraient la source majeure d'IL-22BP dans l'organisme.

Les objectifs de ce travail ont donc été de chercher à confirmer le rôle des cellules dendritiques en tant que source constitutive d'IL-22BP, chez le rat et l'homme et d'essayer de mieux comprendre la régulation de l'expression de cette protéine. Un dernier objectif a finalement été d'essayer de caractériser la régulation de l'expression de cette protéine au cours de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Matériel et méthodes :

Animaux :

Les rats femelles, âgées de 6 à 10 semaines, de souche SpragueDawley (SPD) ont été obtenus à partir du Centre d'Élevage Janvier (Le Genest Saint-Isles, France).

Milieu :

Le milieu de culture utilisé (milieu complet) a été du RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% et décomplémenté (Biowest, Paris, France), une solution d'acides aminés non essentiels (Sigma Chemical Co.), 2mM de L-glutamine (Sigma Chemical Co.), 100 U/mL de pénicilline (Sigma Chemical Co.), 0,1mg/mL de streptomycine (Sigma Chemical Co.), du tampon Hepes (Sigma Chemical Co.), 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma Chemical Co.) et 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol (Sigma Chemical Co.).

Réactifs :

Les ligands de TLR4, lipopolysaccharide (LPS), et de TLR9, CpG2006 (tcgtcgttttgcgttttgcgtt), ont été obtenus chez Invivogen (San Diego, CA) et Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne), respectivement. L'AM580 provient de chez Sigma Chemical Co. Le GolgiStop et le GolgiPlug ont été achetés chez BD Biosciences (MountainView, CA). L'IL-22BP/Fc recombinant humain a été obtenu chez R&D Systems (Minneapolis, MN). Le TRIZol a été acheté chez Invitrogen (Carlsbad, CA). Le GM-CSF et l'IL-4 proviennent de chez CellGenix (Fribourg-en-Brisgau, Allemagne).

Anticorps :

- Rat :

Plusieurs anticorps monoclonaux de souris anti-rat proviennent d'hybridomes obtenus auprès de l'European Collection of Cell Culture (Salisbury, Royaume-Uni). Les anticorps monoclonaux ont ensuite été purifiés à partir des surnageants au sein du laboratoire : R7-3 (TCR α/β), V65 (TCR γ/δ), OX6 (CMH de classe II), OX62 (CD103), OX8 (CD8), OX12 (chaîne κ des Igs), OX33 (CD45RA), OX41 (CD172 α), OX42 (CD11b/c), 3-2-3 (NKR-P1). L'anticorps monoclonal 85C7, spécifique des pDC, a été généré au laboratoire. Lorsque nécessaire, certains anticorps ont été couplés à la biotine, au FITC, à l'Alexa 488 et à l'Alexa 647, en utilisant les kits provenant d'Invitrogen (Carlsbad, CA). Les anticorps anti-CD4-PE,

HIS24-FITC et HIS24-PE ont été achetés chez BD Pharmingen (San Jose, CA). L'anticorps de chèvre anti-IL-22BP de souris a été obtenu chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA).

- Homme :

Les anticorps anti-IL-22BP humaine, l'un polyclonal et biotinylé, l'autre monoclonal (souris isotype IgG1) proviennent de chez R&D Systems.

Préparation des cellules chez le rat :

- Cellules dendritiques conventionnelles :

Les rates ont été prélevées stérilement puis digérées dans 2 mg/mL de collagénase D (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans du RPMI 1640/1% SVF pendant 30 minutes à 37°C. De l'EDTA à 10mM a été ajouté pendant les 5 dernières minutes. La suspension cellulaire a ensuite été resuspendue pendant 10 minutes puis filtrée sur 100µm. Les cellules ont ensuite été lavées une fois dans du PBS/SVF 1%/EDTA 2mM. Après reprise des cellules à $1-2 \times 10^8$ cellules/mL, 4 mL de cette suspension a été ajouté à 4 mL de Nycodenz 14,5% (m/v) dans du PBS/SVF/EDTA (Nycomed, Oslo, Norvège), dans des tubes coniques de 15 mL, puis centrifugée à 800g pendant 15 minutes à +4°C, sans frein. Les cellules de basse densité ont alors été récupérées, lavées une fois dans du PBS/SVF/EDTA puis reprises à 30×10^6 cellules/mL.

- pDC, lymphocytes T, B et NK, monocytes :

Le culot obtenu après la réalisation du gradient de Nycodenz, a été resuspendu dans 25 mL de PBS/SVF/EDTA et déposé sur du Ficoll-Paque Plus (GE HealthCare Life Sciences, Uppsala, Suède) dans un tube conique de 50 mL. Après centrifugation à 570g pendant 20 minutes à température ambiante, sans frein, les cellules de l'anneau ont été reprises dans 50mL de PBS/SVF/EDTA. Après 2 dépaquetages les cellules ont été reprises à 40×10^6 cellules/mL.

- Tri cellulaire chez le rat :

Toutes les cellules ont été triées sur un cytomètre trieur FACS Aria (BD Biosciences).

a. Cellules dendritiques conventionnelles :

Les cellules spléniques de basse densité ont été marquées par un anti-TCR $\alpha\beta$ -Alexa488 (clone R7.3), un anti-CD45R-FITC (clone HIS24), un anti-CD4-PE (clone OX35) et un anti-CD103-Alexa647 (clone OX62). Après ajout de DAPI à 0,1 μ g/mL, les cellules ont été filtrées sur 60 μ m. Les cellules vivantes ont alors été triées, après exclusion des cellules FITC et Alexa488 positives, en DC CD4⁺ OX62^{low} et DC CD4⁻ OX62^{high}.

b. pDC :

Les splénocytes ont été marqués par un anti-CD45R PE (clone HIS24) et le 85C7 couplé à l'Alexa647. Après ajout de DAPI à 0,1 μ g/mL, les cellules ont été filtrées sur 60 μ m. Les cellules vivantes ont alors été triées. Les cellules 85C7 et CD45R positives ont été triées.

c. Lymphocytes T, B et NK :

Les splénocytes ont été marquées par un anti-TCR $\alpha\beta$ biotinylé (clone R7.3), un anti-CD45R PE (clone HIS24), un anti-NKR-P1 Alexa647 (clone 3-2-3) et un anti-CD45RA FITC (clone OX33) puis par de la streptavidine Pe-Cy7. Après ajout de DAPI à 0,1 μ g/mL, les cellules ont été filtrées sur 60 μ m. Les cellules vivantes ont alors été triées. Les lymphocytes T ont été obtenus en sélectionnant les cellules PE-Cy7 positives (cellules TCR α/β ⁺) ; les lymphocytes B ont été obtenus en sélectionnant les cellules PE-Cy7 négatives, PE et FITC positives (cellules TCR α/β ⁻, CD45R⁺, CD45RA⁺) ; les lymphocytes NK ont été obtenus en sélectionnant les cellules PE-Cy7 négatives et Alexa647 positives (cellules TCR α/β ⁻, NKR-P1⁺).

d. Monocytes :

Les splénocytes ont été marqués par un anti-CMH II PE (clone OX6), un anti-CD172 α biotinylé (clone OX41), un anti-CD103 Alexa647 (clone OX62) et un anti-CD11b/c Alexa488 (clone OX42) puis par de la streptavidine Pe-Cy7. Les cellules vivantes ont alors été triées. Les cellules CMH II positives, CD103 négatives ont été sélectionnées, puis au sein de ces cellules, les cellules CD11b/c et CD172 α positives ont été triées.

Stimulations des cDC de rat :

Les DC CD4⁺ et CD4⁻ triées ont été stimulées à une concentration de 1- \times -10⁶/mL dans du RPMI 1640 complet, en plaques 48 ou 96 puits, pendant 6 ou 24h. Les concentrations utilisées pour les différents stimuli ont été les suivantes : CpG2006 (5 μ M), AM580 (100nM).

Génération des MODC chez l'homme :

Les DC ont été générées à partir de monocytes du sang périphérique de volontaires sains. Après réalisation d'un gradient de Ficoll (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Allemagne), les monocytes ont été obtenus par sélection positive, par l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps de souris IgG2a anti-CD14 humain (Miltenyi Biotech, Paris, France). Après récupération des cellules liées aux billes grâce à un aimant, une suspension de monocytes (pureté >99%) a été obtenue. Les monocytes ont alors été mis en culture dans du RPMI complet en plaques 6 puits, à la concentration de 1×10^6 /mL, pendant 6 jours. Du GM-CSF (1000 UI/mL) et de l'IL-4 (200 UI/mL) ont été rajoutés dès la mise en culture. Pour certaines conditions de l'AM580 (100 nM) ou du DMSO seul ont été ajoutés dès le début de la culture. L'activation des DC immatures a été réalisée par ajout de LPS (0,25 µg/mL) à J6 pendant 24 heures.

Extraction de l'ARN :

Les organes de rat ont été préalablement dispersés dans 1 mL de TRIzol à l'ultra-turrax (IMLAB sarl, Lille, France) jusqu'à obtention d'une solution limpide. Les cellules ont été récupérées sur culot sec puis 1 mL de TRIzol a été rajouté. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

L'ARN total a été récupéré par extraction liquide/liquide en ajoutant du chloroforme. Après centrifugation à 11800g, 15 minutes, la phase aqueuse a été récupérée. L'ARN a alors été précipité par ajout d'isopropanol et laissé une nuit à -20°C. Après centrifugation à 11800g, 20 minutes, le culot a été lavé 2 fois à l'éthanol puis mis à sécher à température ambiante 20 minutes. Finalement le culot a été repris dans de l'eau *ppi*.

Transcription inverse :

La transcription inverse a été réalisée en utilisant la Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) avec 20 µg/mL d'oligo dT pdT24 (Invitrogen, Carlsbad, CA), d'après les instructions du fabricant.

ADNc de DC tissulaires, de reins de rats greffés et biopsies coliques humaines :

Les ADNc des DC tissulaires provenant de l'intestin ont été gracieusement fournis par le Dr Simon Milling (Sir Graeme Davis Building, Université de Glasgow).

Les ADNc de rein de rat après greffes syngéniques et allogéniques ont été gracieusement fournis par le Dr Bernard Vanhove (INSEM UMR643, Nantes)

Les ADNc des différentes biopsies coliques des patients atteints de MC et de RCH ainsi que des témoins sains ont été gracieusement fournis par le Dr Arnaud Bourreille (Service d'Hépto-gastro-entérologie CHU Nantes, INSERM UMR 913).

PCR quantitative en temps réel :

- Pour les échantillons de rat :

L'ADNc total a été amplifié dans 20µL de mix de PCR contenant 300nM de chaque primer, et 10µL de tampon Power Sybr®Green 2× (AppliedBiosystems, Foster City, CA). La PCR a ensuite été réalisée dans le thermocycleur Viia™7 Real Time PCR system. La réaction était commencée par une étape de 2 minutes à 55°C pour permettre à l'uracile-N-glycosylase d'éliminer les contaminants potentiels, puis 10 minutes à 95°C permettant l'activation de l'AmpiTaq Gold DNA polymérase et enfin 40 cycles comprenant chacun 15 secondes à 95°C, une minute à 60°C et 19 secondes au TM-3°C du produit de PCR pour la mesure de la fluorescence.

L'analyse directe des produits de PCR a été effectuée en mesurant l'augmentation de la fluorescence. La méthode de comparaison des Ct a été employée selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les variations d'un échantillon à l'autre ont été corrigées en soustrayant le Ct obtenu pour le gène de ménage codant pour l'hypoxanthinephosphoribosyltransférase 1 (HPRT) au Ct obtenu pour le gène d'intérêt (=ΔCt). L'expression relative des gènes (en unités arbitraires : A.U) a ensuite été évaluée en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La liste des amorces utilisées chez le rat est résumée dans le **Tableau 2**.

- Pour les échantillons humains :

L'ADNc total a été amplifié dans 20µL de mix de PCR contenant 1µL d'amorces et sonde 20X et 10µL de tampon TaqMan®Fast Advanced Master Mix 2X (AppliedBiosystems). La PCR a ensuite été réalisée dans le thermocycleur StepOne Plus (AppliedBiosystems). Après 20s à 95°C suivaient 40 cycles comprenant 1s à 95°C et 20s à 60°C. Les amorces et sondes pour les PCR chez l'homme ont été achetées chez AppliedBiosystems.

PCR pour la recherche des isoformes :

Les amorces utilisées ont été les suivants : sens ATGCCTAAGCACTGCTTTC, anti-sens CACACATCTCTCCTTGCTTC. L'amplification a été réalisée en utilisant l'HERCULASE II Fusion Enzyme (Agilent, Santa Clara, CA). La PCR a été réalisée sur un thermocycleur GeneAmp 9700 (AppliedBiosystems). Après 5 minutes à 95°C et 2 minutes à

62°C, l'amplification s'est faite par 35 cycles comprenant 1 minute à 72°C, 30 secondes à 95°C puis 30 secondes à 55°C. Les produits d'amplifications ont ensuite été révélés par migration sur un gel d'agarose 1,5% en présence de bromure d'éthidium (Amresco, Solon, Ohio).

Séquençage :

Les produits de PCR à séquencer ont été réalisés par la plateforme de séquençage de l'IFR26 à Nantes.

Gène	Amorces	Séquences
IL-22BP de rat	Sens	GGCAAAGGGATCTCTCTGTTCT
	Anti-sens	TAGGAGAGGCAGTGTAGTTCGC
HPRT de rat	Sens	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC
	Anti-sens	TTCGCTGATGACACAAACATGA

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les q-RT-PCR chez le rat

Enrichissement en cDC de rat par sélection négative :

Les cellules de basse densité de la rate ont été marquées par un anti-TCR $\alpha\beta$ (clone R7-3), un anti-TCR $\gamma\delta$ (clone V65), un anti-CD45RA (clone OX33), un anti-chaine légère κ (clone OX12), un anti-CD8 (clone OX8) et un anti-CD45R (clone HIS24). Ces clones sont tous des IgG de souris anti-rat. Après lavage, les cellules ont été mises en présence de billes magnétiques recouvertes par des anticorps de chèvre anti-IgG de souris (billes Dynal de chez Invitrogen), en suivant les instructions du fournisseur. La sélection négative a ensuite été réalisée par élimination des cellules liées aux billes via l'utilisation d'un aimant. Afin d'optimiser le marquage intracellulaire, du GolgiStop et du GolgiPlug ont été utilisés à toutes les étapes aux concentrations indiquées par le fournisseur.

Coupes de biopsies coliques et de peau :

Les coupes de biopsies coliques de témoins sains ainsi que de patients atteints de MC et de RCH ont été gracieusement fournies par le Dr Céline Bossard (Laboratoire d'Anatomo-pathologie, CHU Nantes).

Les coupes de peau saines, issues de plasties abdominales, ont été gracieusement fournies par le Pr Brigitte Dreno (Service de Dermatologie, CHU Nantes, laboratoire d'immunodermatologie, IFR26, Nantes).

Immunohistologie :

- Immunofluorescence indirecte :

La suspension cellulaire obtenue après enrichissement en cDC de rat ou les MODC humaines obtenues en culture ont été mises à adhérer 45 minutes sur des lames recouverte de Poly-Lysine (Sigma Chemical Co.). Après aspiration du surplus, les lames ont été mises à sécher 1 nuit à TA. Les coupes de peau ont été mises à décongeler 30 min à température ambiante. Après fixation 5 minutes dans l'acétone à -20°C, les lames ont été déposées en chambre humide et réhydratées par du PBS 1X pendant 5 minutes. Après une étape de saturation de 30 minutes par du PBS 1X/BSA 1% /Sérum 10% de la même espèce que celle de l'anticorps II (âne ou chèvre ici), l'anticorps I (anticorps anti-IL-22BP de souris, Santa Cruz, à 5µg/mL ; anticorps anti-IL-22BP humaine à 2,5 µg/mL, R&D) a été incubé 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages au PBS 1X, l'anticorps II a été incubé 1 heure à température ambiante (anticorps d'âne anti-chèvre ou anticorps de chèvre anti-souris, couplés à l'Alexa 568). Après 3 lavages au PBS 1X, les lames ont été montées avec le réactif Prolong Gold with DAPI (Invitrogen) puis mises à sécher une nuit à température ambiante, à l'abri de la lumière. La lecture a ensuite été réalisée à l'aide d'un microscope Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

- Immunohistochimie :

Les coupes ont été marquées par l'anticorps monoclonal anti-IL-22BP humaine (R&D). l'anticorps II utilisé a été un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase. La révélation s'est fait à l'aide du kit de détection Envision FLEX (DakoAutostainer, Dako France SAS, Trappes, France) et du tétrachlorure de diaminobenzidine comme chromogène. Les coupes ont ensuite été contremarquées par de l'hématoxyline de Mayer.

Western blot :

Les sérums ont tous été dilués au 1/100 dans du PBS. De l'IL-22BP/Fc recombinante humaine à 50 ng/mL a été utilisée comme contrôle positif. Vingt microlitres de la dilution de sérum ou de protéine recombinante ont ensuite été mélangés à 5 µL de tampon Laemmli et 2 µL de DTT. La dénaturation s'est effectuée en portant les échantillons 5 min à 95°C. La

séparation des protéines s'est effectuée par migration sur un gel de polyacrylamide-SDS à 10%. Après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (ECLTMHybond, Amersham, Orsay, France), en utilisant un Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad France, Marnes-la-Coquette, France). Après une étape de saturation toute la nuit à +4°C, dans du TBS/Tween/BSA 5% puis 12 h à température ambiante, les membranes ont alors été incubées avec l'anticorps anti-IL-22BP humaine biotinylé, à 0,2µg/mL (R&d) pendant 1 nuit à +4°C. Après 3 lavages de 5 min dans du TBS/Tween, les protéines liées à l'anticorps ont été révélées par de la streptavidine couplée à la peroxydase, incubée 1 h à température ambiante. Après 3 nouveaux lavages, la détection s'est faite grâce à un kit de chimiluminescence (ECL, Amersham). La lecture a été effectuée sur un LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japon) et l'acquisition par le logiciel Multi Gauge[®] software (Fujifilm).

Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Les comparaisons de moyennes d'échantillons indépendants ont été faites avec le test de Man-Whitney. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats :

1 Profil d'expression tissulaire du gène *il22ra2* chez le rat :

L'expression tissulaire de l'IL-22BP a été précédemment décrite chez l'homme (Dumoutier et al. 2001; Xu et al. 2001) et la souris (Weiss et al. 2004) mais jamais chez le rat. Cette expression de l'IL-22BP a été analysée par q-RT-PCR au sein de différents organes, prélevés sur des rats de souche Sprague-Dawley (SPD). L'expression la plus forte a été retrouvée pour les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions mésentériques), puis à des niveaux inférieurs pour le tractus digestif (intestin grêle, colon), les poumons et la peau (**Figure 9A**). Finalement, une faible expression a également pu être détectée pour les testicules, l'utérus et le rein.

Afin d'évaluer l'existence de plusieurs isoformes de l'ARNm de l'IL-22BP, à l'image de ce qui a pu être décrit chez l'homme, mais pas chez la souris, une PCR permettant l'amplification de l'ensemble de la région codante de l'ARNm a été réalisée sur ces différents organes (**Figure 9B**). Cependant, seule une bande correspondant à la taille attendue a pu être observée (678 pb). Il n'y a donc pas eu de détection d'autres isoformes, qui auraient été objectivées par des bandes plus longues ou plus courtes sur le gel d'agarose. L'ARNm amplifié ici est l'équivalent chez le rat de l'isoforme moyenne humaine, c'est-à-dire codant pour une protéine fonctionnellement apte à inhiber l'IL-22.

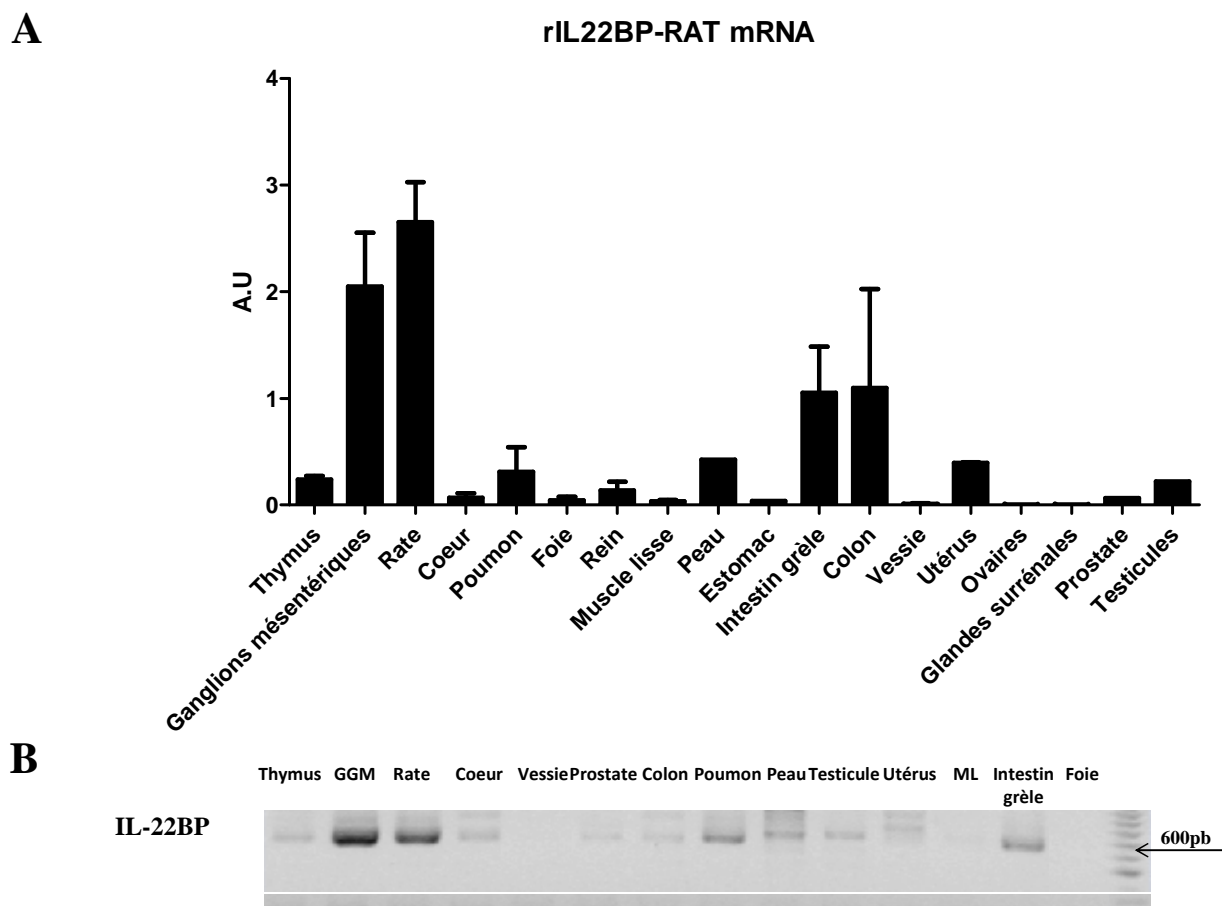


Figure 9 : Expression de l'IL-22BP au sein de différents tissus de rat. **(A)** L'expression a été analysée par q-RT-PCR. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm s.e.m, à partir de 2 animaux différents. **(B)** Analyse par PCR de l'expression d'IL-22BP après amplification de l'ensemble de la région codante. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. GGM : ganglions mésentériques ; ML : muscle lisse.

2 L'IL-22BP est principalement exprimée par une population de cellules dendritiques dans les tissus :

L'expression la plus forte d'IL-22BP a été retrouvée au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ceci laisse donc supposer que l'IL-22BP pourrait être principalement exprimée par des cellules hématopoïétiques. Par ailleurs, l'étude de l'expression du gène *il22ra2* par des cellules épithéliales et stromales a déjà été recherchée. Aucune expression n'avait été retrouvée (Nagalakshmi et al. 2004). L'expression d'IL-22BP a donc été évaluée au sein des différentes sous-populations de cellules hématopoïétiques.

2.1 Isolement des différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques de rat :

2.1.1 Lymphocytes T, B et NK :

Les lymphocytes T spléniques ont été triés sur la base de leur expression du TCR α/β , les lymphocytes B sur la base de leur absence d'expression du TCR α/β ainsi que sur leur forte expression de CD45R et CD45RA. Finalement les lymphocytes NK ont été sélectionnés sur la base de leur absence d'expression du TCR α/β ainsi que sur leur forte expression du NKR-P1. Les différentes stratégies de sélection sont présentées en **Annexe 1**. Pour chaque tri les puretés obtenues ont toujours été $> 99\%$ des cellules vivantes triées. Les rendements pour le tri des lymphocytes NK ont variés entre 0,8 et 1×10^6 cellules par rate. Les tris de lymphocytes T et B ont été arrêtés dès lors que plus de 3×10^6 cellules étaient obtenues.

2.1.2 Monocytes :

Les monocytes spléniques ont été triés sur la base de leur forte expression du CMH II ainsi que sur leur absence d'expression de l'intégrine $\alpha E2\beta 7$ (CD103), marqueur spécifique des DC conventionnelles spléniques chez le rat. Parmi les cellules CMH II⁺ CD103⁻, seules celles exprimant fortement CD11b/c et CD172 α ont été sélectionnées. La stratégie de sélection de ces cellules est présentée en **Annexe 1**. Les puretés des cellules vivantes triées ont toujours été $> 95\%$. Les monocytes sont rares dans la rate, les rendements des tris ont variés entre 0,4 et $0,5 \times 10^6$ cellules par rate. Ces tris n'ont pu être effectués sur la base de l'expression du CD14 par les monocytes compte tenu de l'absence d'anticorps à disposition chez le rat. Une forte expression du CD14 par ces cellules a cependant pu être détectée par PCR (données non montrées).

2.1.3 Cellules dendritiques :

a. DC conventionnelles :

Les cDCspléniques ont été triées sur la base de leur expression de l'intégrine $\alpha E2\beta 7$ (CD103). Au sein des cellules vivantes $TCR\alpha\beta^-$, $CD45R^-$, deux sous-populations de cellules $CD103^+$ ont pu être identifiées, l'une $CD103^{high}$, l'autre $CD103^{low}$ (**Figure 10A**). Ces 2 sous-populations correspondent aux DC $CD4^-$ et $CD4^+$ respectivement. Les ratios DC $CD4^-$: DC $CD4^+$ ont varié de 3 : 1 à 6 : 1 dans l'ensemble des tris réalisés. Après tri, la pureté des cellules vivantes obtenues a toujours été $>95\%$ pour les DC $CD4^-$ et les DC $CD4^+$. Les rendements de cellules $CD103^+$ obtenues après tri ont oscillés entre $0,4 \times 10^6$ et 2×10^6 par rate.

b. DC plasmacytoïdes :

Les pDC spléniques ont été triées sur la base de leur expression du CD45R et de leur marquage par l'anticorps monoclonal 85C7, spécifique de pDC de rat (**Figure 10B**). Après tri, les pDC ont toujours représenté plus de 99% des cellules vivantes.

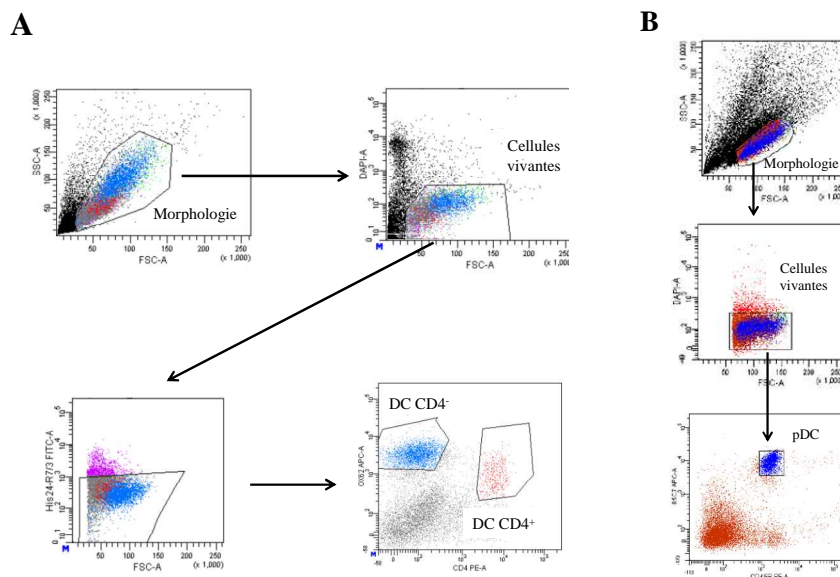


Figure 10 : Stratégies employées pour le tri des différentes sous-populations de DC spléniques chez le rat. (A) Différentes fenêtres utilisées pour trier les 2 sous-populations de cDC. (B) Différentes fenêtres utilisées pour le tri des pDC. La figure est représentative de 7 expériences indépendantes avec 5 à 7 rats par expérience.

2.2 Expression de l'IL-22BP par les différentes populations de cellules hématopoïétiques :

L'expression de l'IL-22BP par les différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques isolées chez le rat a été analysée par q-RT-PCR. L'analyse de l'expression de l'IL-22BP s'est faite sur les ADNc issus des cellules obtenues immédiatement après le tri. Ces cellules présentaient donc toutes un phénotype immature. Une expression très forte a été retrouvée au sein de l'une des 2 sous-populations de cDC, les DC CD4⁺. L'expression au sein des autres populations, notamment l'autre sous-population de cDC (DC CD4⁻) ainsi que les pDC, n'est pas nulle mais reste néanmoins très faible (**Figure 11**). Les DC CD4⁺ sont, au même titre que les DC CD4⁻, des DC résidentes de la rate. Ces résultats laissent donc supposer que l'expression naturelle d'IL-22BP retrouvée dans la rate est principalement la conséquence d'une expression constitutive du gène par les DC CD4⁺.

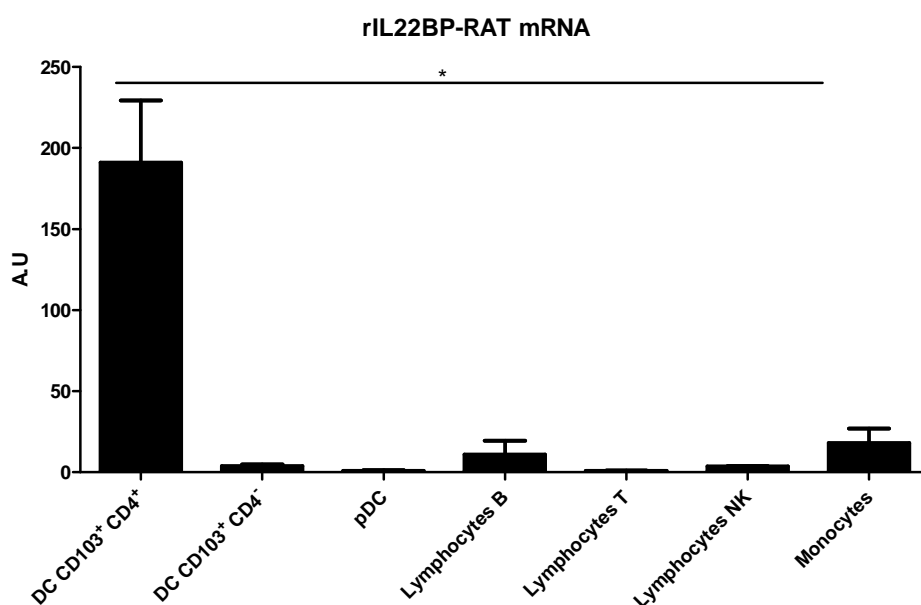


Figure 11 : Expression d'IL-22BP par les différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques immatures chez le rat. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM et sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0.05$.

L'IL-22BP est une protéine dont l'expression est retrouvée de façon naturelle au sein d'un certain nombre de tissus, chez le rat, l'homme et la souris. Ceci impose donc qu'au sein de ces tissus des cellules soient capables de la produire constitutivement. Les résultats obtenus chez le rat laissent fortement suggérer que les cellules responsables de cette production soient des DC.

L'analyse de l'expression de l'IL-22BP par les différentes sous-populations de cellules hématopoïétiques du sang périphérique chez l'homme, comprenant notamment les 2

sous-populations de cDC (caractérisées par l'expression du CD1c et du CD141 respectivement) ainsi que les pDC, n'a pas permis la détection d'une quelconque expression du gène (résultats non montrés). Ces résultats indiquent donc que les DC du sang périphérique sont incapables de produire de l'IL-22BP de façon constitutive. L'ensemble de ces données laisse ainsi émerger l'hypothèse que l'IL-22BP est produite de façon constitutive par des DC tissulaires, donc de phénotype immature.

2.3 Analyse de l'expression de l'IL-22BP par les DC tissulaires de l'intestin :

Afin de tester cette hypothèse, l'expression d'IL-22BP a été analysée sur des DC tissulaires de l'intestin.

Il est possible d'isoler ces cellules chez le rat et ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Simon Milling (Université de Glasgow, Ecosse). Après ablation de l'ensemble des ganglions mésentériques, les animaux sont laissés au repos pendant 6 semaines, permettant ainsi la ré-anastomose des voies lymphatiques afférentes et efférentes. Le canal thoracique est ensuite canulé et la lymphe est alors récupérée (Milling & MacPherson 2010). Cette technique permet donc de récupérer des DC relativement immatures, migrant directement de la muqueuse intestinale, tout en limitant au maximum les manipulations *ex vivo*. Trois sous-populations de DC intestinales ont pu être identifiées chez le rat. Elles sont toutes caractérisées par une forte expression du CD103 et du CMH II. Les sous-populations sont alors définies selon leur expression du CD11b (reconnu par le clone OX42) et du CD172 α (clone OX41). Des DC CD172 α^{low} CD11b $^{-}$, CD172 α^{int} CD11b $^{+}$ et CD172 α^{high} CD11b $^{-}$ peuvent ainsi être définies.

L'analyse de l'expression de l'IL-22BP au sein de ces 3 sous-populations a montré que les DC CD172 α^{high} CD11b $^{-}$ exprimaient très fortement l'IL-22BP (**Figure 12A**). Les DC CD172 α^{int} CD11b $^{+}$ exprimaient aussi le gène mais à des niveaux bien inférieurs. En outre, les DC CD172 α^{high} CD11b $^{-}$ présentaient des niveaux d'expression environ 8 fois supérieurs à ceux retrouvés pour les DC CD4 $^{+}$ spléniques. Ces dernières sont aussi caractérisées par l'expression de CD172 α . En revanche elles expriment le CD11b. Pour autant, les DC CD4 $^{+}$ spléniques exprimaient des niveaux d'IL-22BP 3 fois plus importants que ceux des DC CD172 α^{int} CD11b $^{+}$ intestinales.

Une autre collaboration avec le Pr Miriam Merad, du Mount Sinai Hospital à New York, a permis l'analyse par puces à ADN de l'expression de l'IL-22BP par les différentes sous-populations de DC tissulaires chez la souris. Cette analyse a fait ressortir une expression très forte par les DC CD103 $^{+}$ de l'intestin grêle, et plus spécifiquement par les DC CD103 $^{+}$ CD11b $^{-}$ (**Figure 12B**).

Ces résultats pris dans leur ensemble amènent à penser que la source principale d'IL-22BP à l'état physiologique est représentée par les DC tissulaires, notamment dans la rate et l'intestin. Il semblerait en outre y avoir une spécialisation fonctionnelle des sous-populations de DC, puisque toutes n'expriment pas le gène de façon constitutive.

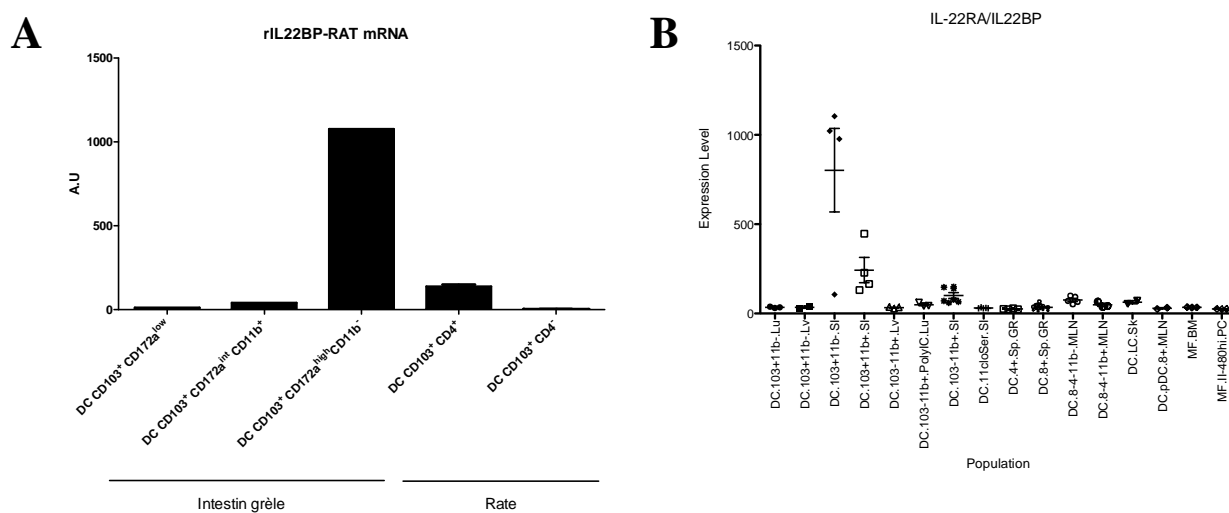


Figure 12 : Expression d'IL-22BP par les différentes sous-populations de cDC. **(A)** Expression de l'IL-22BP par les sous-populations de cDC intestinales et spléniques chez le rat. Les données sont issues d'1 seule expérience pour les DC intestinales et de 2 expériences indépendantes pour les DC spléniques. Les résultats pour les DC spléniques sont présentés sous la forme moyenne \pm S.E.M. **(B)** Analyse par puce à ADN de l'expression de l'IL-22BP par les différentes sous-populations de cDC tissulaires chez la souris. Les données sont issues d'au moins 3 échantillons indépendants.

2.4 Mise en évidence d'une isoforme courte de l'IL-22BP chez le rat :

La séquence de l'ARNm de l'IL-22BP de rat est accessible sur le site GenBank sous le numéro NM 001003404.1. Les frontières entre exons et introns ont pu être définies par comparaison de cette séquence avec celle de l'ADN génomique (NC 005100.2). Il a ainsi pu être retrouvé 5 exons et 4 introns (**Figure 13A**), dont les jonctions sont conformes à la règle GT/AT.

L'existence d'autres isoformes ne pouvait être formellement exclue sur la seule base de l'analyse de l'expression d'IL-22BP dans les tissus. L'expression d'autres isoformes aurait pu être trop faible pour être détectée sur de tels échantillons. Les DC CD4⁺ exprimant très fortement l'IL-22BP, il a donc été décidé d'amplifier l'ADNc obtenu à partir de ces cellules par PCR. Pour cela les amorces permettant l'amplification de l'ensemble de la séquence codante pour l'IL-22BP ont été utilisées.

Après migration sur gel d'agarose la bande correspondant à la taille attendue (678 pb) était présente (**Figure 13B**). Afin de confirmer qu'il s'agissait d'une amplification spécifique de l'IL-22BP, cette bande a été séquencée. Les résultats du séquençage ont confirmé l'expression de l'ARNm de l'IL-22BP par les DC CD4⁺, une homologie de 100% ayant été retrouvée après alignement avec la séquence connue (données non montrées). La traduction en protéine du produit de séquençage obtenu donne bien la structure primaire de l'IL-22BP déjà décrite. Cette protéine de 229AA correspond à l'isoforme de taille intermédiaire (231AA) présente chez l'homme, la seule capable de d'inhiber les actions de l'IL-22 *in vitro*. Après alignement, la protéine de rat présentait bien 72% d'identités avec son homologue humaine (données non montrées).

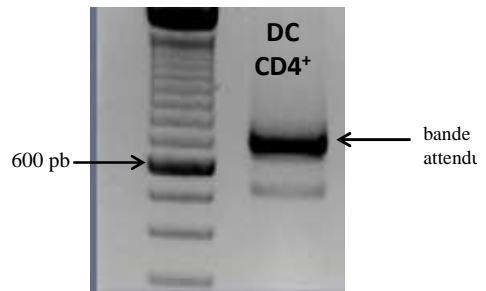
Par ailleurs, une seconde bande de taille plus courte (environ 500 pb) a également pu être observée (**Figure 13B**). Cette bande pouvait donc correspondre à l'isoforme courte décrite chez l'homme. Les résultats du séquençage ont en effet montré que cette bande correspondait à l'IL-22BP. Cependant, cette séquence était plus courte du fait de l'absence complète de l'exon 4. La traduction en protéine de la séquence obtenue conduit à une protéine de 137AA, présentant 73% d'identités avec la protéine correspondant à l'isoforme courte humaine (130 AA) (**Figure 13C**).

Ainsi, il semble bien exister chez le rat une isoforme de taille courte, résultant probablement d'un épissage alternatif. Son expression apparaît moins importante que chez l'homme puisqu'elle n'est pas détectable dans les tissus mais uniquement après analyse de cellules exprimant très fortement l'IL-22BP. En revanche, une isoforme longue n'a pu quant à elle être mise en évidence.

A

```

TTGGTTTCAGACAGGCACACTTGCAACCAGCCTGCTAAGCCTGCTCTAGGGCTGCTCATCATGCGCTGGA
SCACTGGCAGAGAAACCAGCCAGCCCATGGTCTCTGAAGCCTCAGAAGGTCCAAATTCAGTCCAGAAATTC
ACAACATTTTGCACCTGCAACCAGGGAACCTCCTCACCGCAACGGCAGCGCTACTTTGTGCAGTACAGACGCT
ATGGACAGGGAACAATGGAAAGATAAAAAATGACTGCTGGGGGACCACAGCGCTCTTTTGTGACTGACCAAGAAA
CCTTAGACCCATACGAGCCATCTATGGGAGGTGATGATGGCCTGGGCTGGAAGTACTCTGAATGGACCAGGA
CACCCCCCTTCACTCCATGGTGGGAAAACAAATAGATCCTCCGGCTGACTATAACCCGAGTTAATGCATCTT
TGAGGGTTCTCTCCGCCCCAGAGTTGCCACATAGAAACCAAACTGGAAAAAATACGTCATGGAAAAATACT
ACACTTAGTATACCGAGTTTCCATAATCAACAAATCCTCGGAGAGGAAACAAAAGCTACGAGGAACTCAGA
GAGCTGTTGAAAATTCAGGTCCTGACACTCATTCAGCTTACTGGCTAGTGGCTGAAATGACAGCCCATGTTTCG
ACAGAAGAAGCCCAAGAAGCAAGGAGAGATGTGTGCAGATTCCA ACTGGTCTGAAACGGGAGCATATCCAA
AAGAGGATGGCTTGTGCTTGCAACGGCTCACTTCTGTTGATTTCCTAGAGCATTTGTACCACACACCTTTCAA
GGGTTTTTTTTTATTACTTCTTCTGTTTATTTCAGTTATAAAGTAAATTCGAACAGATTCAAAAATAGAATTTCA
AGAGGAGATAAAGAATAAAGAGCTTGTGGTAACAGACATCTTAAATCCAGCACATAAGAGCCAGAAATCAGGCAGA
TTTCTGTCTTAGGGCCAGCTGGTCTACATAGAGAGTTCAGGCTAGCCAGGTCACAGATGAGACCGTCCCT
CAATAAAGTAAAGATTTAAAGATAAAAATCTTATAAAAATACAGAAGTTTATCTGAATATAGCAACCTCAACA
TACTCTTTTTTTCTGTTAAAAATCCCAATAGACCAAAAAATTCAGGCATTTAATAAAAATGTCGCAATGAGT
TTTTAAGCATTATATACAGAAAATCCTGAACCAATGATTTTTTATACTCTATCAAGCCTTTTGTCTTGCAGGGA
TATACCAATTAATACTTTGTGTGAACGAGTATATTTCTGTACATTTCTATTTTAGATGAATATGTTTTATTTTT
TTTATTCTCATGAGGTAATTTCTACTTAGTGAACCTAACACTTTAAAAATAACTCTCGTGGCTGTCTCTAAATTA
ATCTCCAGAATAAAGATTTCAATAACAGCATGTAATAGAGGAAGTCTTCATAATAACAATTTCCCTMACTTAA
CACCAACCTTAGTATGACTACCCTTTCTGGCTTGTCTTTAATATTGCTTTAGAAGTAACTATGCCGTAGAA
GTGGAGTGTATATTTTCAACAGCAAGGATAGAAAAGAAAACAGCTAAGCCACAGTGAATACTGGCAAAAGTGA
TCATTACAGCAAGGGATCTCTCTGTTCTGGGAACAAGTGGAGACCATATAGGAAACTGGCTTGAAGCAAAAG
CACACTGTGGGTGCTTAAAGTGTCTTCTGGGATATAAGGAAAACCAACCCCTGCGAATACACTGCCCTCTCCTA
AGCAAGATTAGTGGCCAGGCTCAGAAAAGTGGCCAGCGTGTCTAAGTCTCTTGTAGCTCTTGAACCTTAGAC
TAGTGTCTCTGAAAAGACATGCGGAGAACATCTGTGCTTTCATGAAAGTGTCTCCACGCTATTACTCTAG
AAAGTACAGTCAATGTGTCTGTCTTACATCTACCATGATAAATGGTAGTAGACATTAATAAATGTGGGAGA
CGTGAAAACCAAGAGTGAAGGATCGTCTGGCTGTCTGTGTGTTCAAAAAACACTGGCTTCACTCTATTTT
TGAATTAATCAATTTTATTTCTTAGTGGCTTAATACCTGCTGGAGTTCTTTGGGTTTTTTGTTTTCTTGA
TGTTTTGCTCTTCTTATTTGACCTTGGGAAGGCGAGACTTGAGAAGGATAAAGTCTTGTGGGAATCAGGACCA
GTGGGTGGCAGCATTCATGTTGAAGATCGGTAGCTAAAGCCCTCATGATACAAAAGGCAATGAATGATATG
GATGTTGACAGTAAACAGGCTTTGCTTTGATTCGTTCTTGGGCTGCTGCTTCTTGCATGAACACAGCCATG
CTCAGATAAGTATAAACCCCTCTGAAAACCTTACCATGTTACATCTTTGATCATGTTAAACAATACATGTCTC
TGACTTCAATAAATCTACTTTGTACTTTA
  
```

B**C**

```

Homme MEGKICFLQF LISFFLTVQA GTQTHSEIK FQRVGFQERN FNNILQWQD RALTONSEVT FVQYKTYGR QNKHEDCSG TQLSCDLSF ETSDICEVY
Rat .....L..M..L..TAT E..RA.V... ..K..... ..N.... M..S.G... ..T...G... ..D.N.... ..TA.F....K...L..ST....
Identite ***** ..11* ..1 ..... ..2* ..... ..1** ..N... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* .....

Homme GRVRAASGS TRSWMTYRF TWNER-KEDS FQMITQVNS SLAVILDAVN LSPFTQKHN NSIDQTELL TRVFINNL EKHVTEQA HWAVEISALT
Rat .....M..W... ..TR... .. ..VT...R..E... ..R.N..D... ..T.M.N...N..V... ..S..... ..*..T...Q....G... ..*
Identite *** ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* .....

Homme FHSPTCVWRE TRQWLDKSS QRKREKVEI S
Rat ..S..... ..M...F... ..F...R...D...
Identite ** ..... 1 ..... ..* .....

Homme MEGKICFLQF LISFFLTVQA GTQTHSEIK FQRVGFQERN FNNILQWQD RALTONSEVT FVQYKTYGR QNKHEDCSG TQLSCDLSF ETSDICEVY
Rat .....L..M..L..TAT E..RA.V... ..K..... ..N.... M..S.G... ..T...G... ..D.N.... ..TA.F....K...L..ST....
Identite ***** ..11* ..1 ..... ..2* ..... ..1** ..N... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* .....

Homme GRVRAASGS TRSWMTYRF TWNER-KEDS FQMITQVNS SLAVILDAVN LSPFTQKHN NSIDQTELL TRVFINNL EKHVTEQA HWAVEISALT
Rat .....M..W... ..TR... .. ..VT...R..E... ..R.N..D... ..T.M.N...N..V... ..S..... ..*..T...Q....G... ..*
Identite *** ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* ..... ..* .....
  
```

Figure 13 : Les DC CD4⁺ expriment 2 isoformes de l'IL-22BP chez le rat. **(A)** Séquence de l'ARNm de rat. Les 5' et 3' UTRs sont représentés en gris. Les différents exons traduits sont représentés en couleur. Le codon d'initiation (ATG) est en gras et le codon stop (TAA) en rouge. Les séquences soulignées correspondent aux séquences des amorces utilisées pour la PCR. **(B)** Bandes identifiées après amplification de l'ensemble de l'ARNm sur l'ADNc des DC CD4⁺ immatures. La figure est représentative de 3 expériences indépendantes. **(C)** Alignement des séquences protéiques codées par les isoformes courtes du rat et de l'homme. Ces Séquences présentent 73% d'identités.

2.6 Analyse de l'expression d'IL-22BP au niveau protéique:

Les DC semblent représenter une source importante d'IL-22BP au sein des tissus. Afin de rattacher l'expression du gène *il22ra2* à une production réelle de la protéine, plusieurs expériences d'immunohistologie ont alors été conduites.

2.6.1 Caractérisation de la protéine au niveau de tissus humains sains :

L'identification de la protéine *in vivo* n'a encore jamais été formellement décrite. La présence de l'IL-22BP a donc tout d'abord été recherchée au niveau de tissus humains connus pour exprimer le gène. Le marquage de coupes de colon, par un anticorps monoclonal spécifique de l'IL-22BP, a permis de mettre en évidence la protéine essentiellement au niveau du chorion (**Figure 14A**). Les cellules marquées présentaient un rapport nucléocytoplasmique élevé, avec de fins prolongements pouvant évoquer des dendrites. Cette morphologie est donc compatible avec une production de la protéine par des DC tissulaires. Le marquage des cellules intéressait uniquement le cytoplasme, laissant penser que la protéine se trouve dans ce compartiment cellulaire. Ce marquage est cohérent avec le fait que l'IL-22BP est une protéine uniquement sécrétée. La spécificité de ce marquage a pu être vérifiée en bloquant au préalable l'anticorps avec de l'IL-22BP/Fc recombinant. Cette incubation préliminaire abolissait alors totalement le marquage. De façon similaire, un marquage en immunofluorescence indirecte (IFI) a permis de retrouver des cellules de morphologie compatible avec une DC au niveau de coupes de peau issues de plasties abdominales (**Figure 14B**). Les cellules marquées étaient présentes au niveau du derme uniquement. Il est donc possible que les cellules produisant l'IL-22BP dans la peau soient uniquement présentes dans le derme et correspondent de ce fait à des DC dermiques.

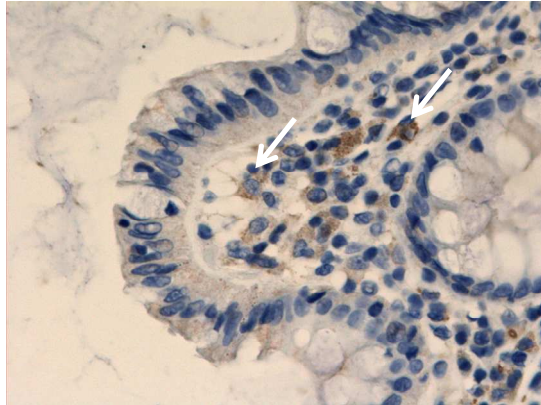
2.6.2 Production de la protéine par les DC de rat :

Afin de mieux cerner la production de la protéine par les DC, des marquages en IFI ont été réalisés sur une suspension cellulaire, enrichie par sélection négative en DC spléniques de rat. L'IL-22BP étant une protéine uniquement sécrétée, des inhibiteurs du transport intracellulaire des protéines (Brefeldine A et Monensine) ont été utilisés. Les DC CD4⁺ exprimant la protéine de façon constitutive, ces inhibiteurs ont été ajoutés à toutes les étapes nécessaires à l'obtention d'une suspension enrichie en DC. Après enrichissement, la suspension comptait environ 20% de cDC spléniques. Les ratios entre DC CD4⁺ et DC CD4⁻ ont toujours été proches de 1 : 1 (**Figure 15**).

Les cellules marquées présentaient une fréquence compatible avec celles des DC CD4⁺ mesurée après enrichissement (**Figure 16**). Cependant des expériences complémentaires, de

type double marquage, devront être entreprises afin de prouver qu'il s'agit bien de ces cellules. A nouveau, le marquage était présent au niveau du cytoplasme.

A



B

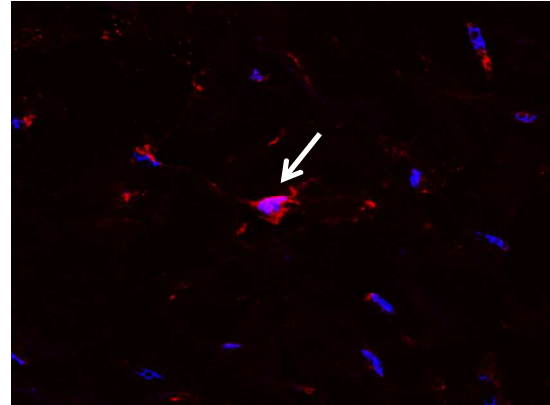


Figure 14 : Marquage de l'IL-22BP sur des coupes de tissus humains sains. (A) Marquage en immunohistochimie d'une coupe de colon (brun). (B) Marquage en IFI d'une coupe de peau (rouge). Seule la section intéressant le derme est présentée. Les cellules marquées sont indiquées par des flèches blanches. Ces marquages sont représentatifs d'au moins 2 expériences indépendantes. Grossissement $\times 400$.

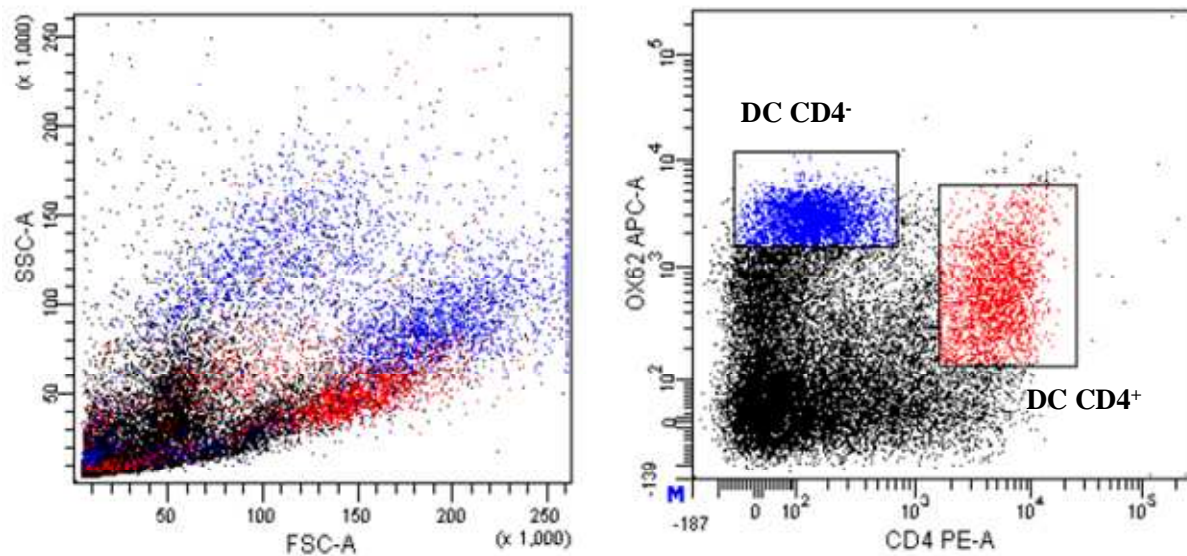


Figure 15 : Marquage par cytométrie en flux des cellules obtenues après enrichissement par sélection négative en DC. Les cDC représentent 20% des cellules totales. Le ratio entre DC CD4⁻ et DC CD4⁺ est de 1 :1. L'image est représentative de 3 expériences indépendantes.

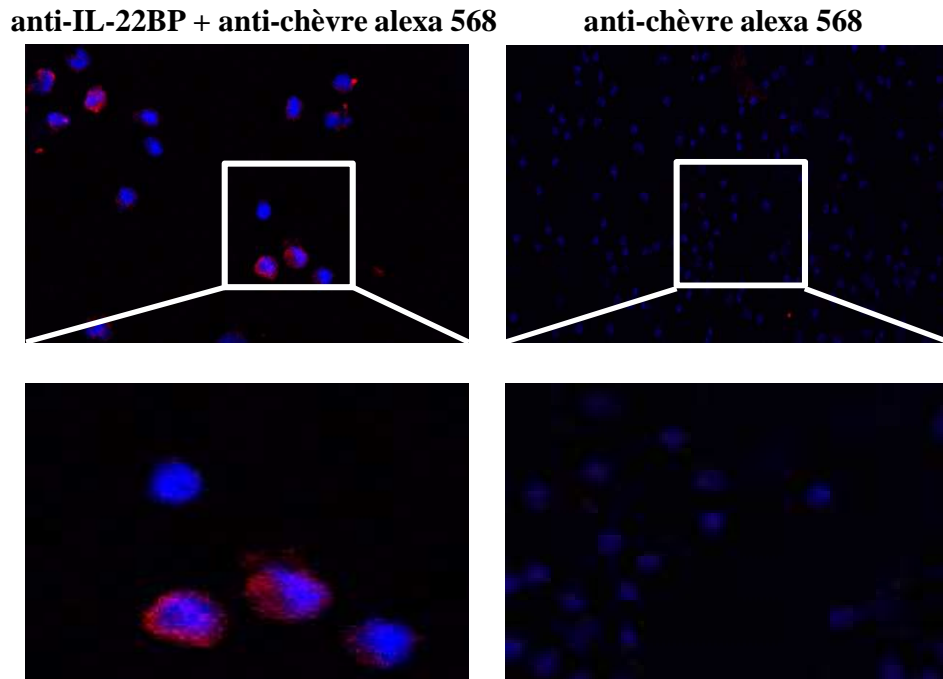


Figure 16 : Marquage en IFI d'une suspension cellulaire enrichie en DC spléniques chez le rat. Grossissement $\times 400$.

2.6.3 Production de la protéine par les DC dérivées de monocytes humaines :

L'expression de l'IL-22BP au niveau de l'ARNm semble indiquer que les DC tissulaires pourraient représenter la source principale d'IL-22BP produite constitutivement dans les tissus. Les marquages présentés plus haut sont compatibles avec une production effective de la protéine par ce type de cellules. Pour autant, si ces marquages n'excluent pas l'hypothèse d'une production par les DC, ils n'apportent malgré tout aucune preuve formelle permettant de valider cette hypothèse. Afin de s'assurer que les DC étaient effectivement aptes à produire la protéine, et compte tenu du peu d'outils à disposition pour étudier la protéine chez le rat, ainsi que de la difficulté d'isoler les DC tissulaires chez l'homme, il a donc été décidé d'étudier la production de l'IL-22BP sur des DC humaines dérivées des monocytes (MODC).

En effet, Nagalakshmi et al. avaient déjà suggéré en 2004 que les MODC, contrairement aux lymphocytes T, B et aux monocytes, pouvaient exprimer de façon significative l'ARNm de l'IL-22BP (Nagalakshmi et al. 2004). Cependant, leur étude ne présentait que des résultats de q-RT-PCR, aucun argument en faveur d'une synthèse réelle de la protéine n'était fourni.

Des monocytes du sang périphérique de volontaires sains, obtenus par sélection positive CD14, ont donc été cultivés pendant 6 jours en présence de GM-CSF et d'IL-4. La différenciation effective en DC a été vérifiée par cytométrie en flux. Une sous-régulation du CD14, associée à une forte expression du HLA-DR ainsi qu'à une sur-régulation des CD209, CD80 et CD1a ont pu être observées. Ce phénotypage a confirmé la réalité de la différenciation (données non montrées). Par ailleurs, ces cellules présentaient un phénotype immature, illustré par la faible expression du CD86 et l'absence d'expression du CD83.

L'expression de l'IL-22BP a d'abord été vérifiée par des expériences de q-RT-PCR. Aucune expression par les monocytes n'a pu être détectée, confirmant les résultats déjà exposés plus haut. Les MODC présentaient quant à elles des niveaux d'expression significatifs (**Figure 17A**). Ces résultats ont donc permis de confirmer les données publiées par Naglakshmi. Par ailleurs, dans le but de s'assurer que l'induction de l'expression du gène *il22ra2* était bien liée à la différenciation en DC, des cinétiques d'expression du gène ont été réalisées, tout au long de la culture (**Figure 17B**). Ainsi, il a pu être observé une induction progressive et très forte à partir de J3 de l'expression du gène au fur et à mesure de la différenciation. Ces résultats, en plus de confirmer que les DC étaient bien capables d'exprimer le gène, ont permis de montrer que cette expression était bien due à la différenciation en DC.

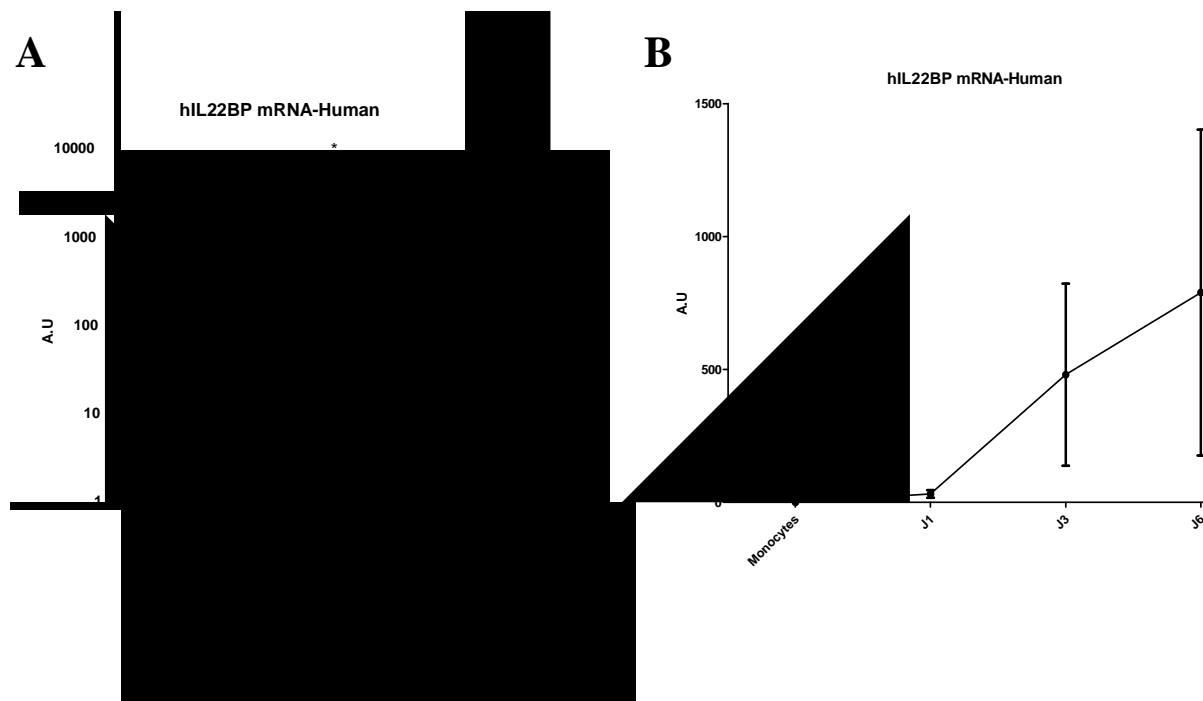


Figure 17 : Expression de l'IL-22BP par les MODC. (A) Expression de l'IL-22BP par les MODC en comparaison des monocytes du sang périphérique. Ces résultats sont issus de 5 expériences indépendantes et présentés sous la forme de moyenne \pm S.E.M. (B) Expression de l'IL-22BP au cours de la différenciation de monocytes en DC. Ces résultats sont issus de 2 expériences indépendantes et sont présentés sous la forme de moyenne \pm S.E.M. * $p < 0.05$.

L'expression de l'IL-22BP au niveau protéique a ensuite été analysée par IFI. La présence de la protéine a été regardée sur les MODC obtenues après 6 jours de culture, ainsi que sur des monocytes fraîchement isolés (**Figure 18**). Un marquage cytoplasmique a bien pu être observé pour les MODC, confirmant ainsi au niveau protéique les observations faites en q-RT-PCR. En revanche, aucun marquage n'a pu être détecté sur les monocytes. Ces expériences d'IFI sur les MODC ont ainsi pu permettre d'objectiver la capacité des DC à produire réellement de l'IL-22BP. Ils permettent de ce fait de renforcer les arguments en faveur d'une production constitutive d'IL-22BP par les DC tissulaires immatures. En effet, aucune stimulation n'a été effectuée pendant ou après la différenciation. La production d'IL-22BP par certaines populations de DC tissulaires apparaît donc être une propriété intrinsèque de ces cellules.

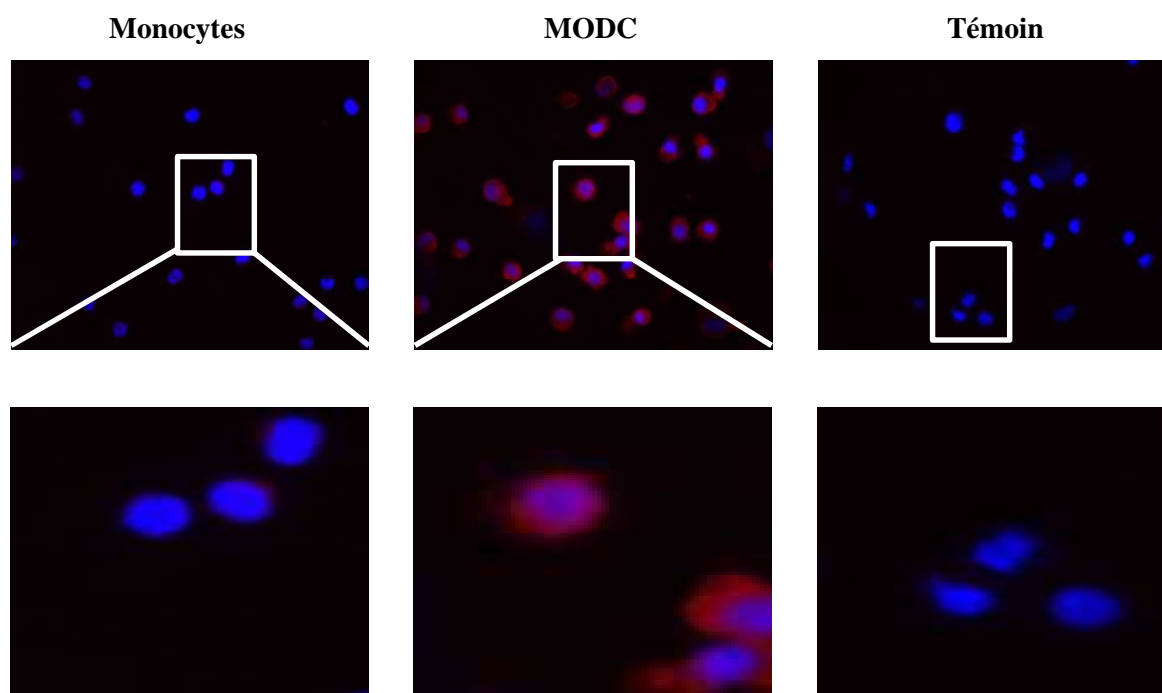


Figure 18 : Marquage de l'IL-22BP en IFI (rouge) de monocytes fraîchement isolé et de MODC obtenues par culture 6 jours dans du RPMI complet en présence de GM-CSF et d'IL-4. Le témoin négatif correspond à l'incubation de l'anticorps II uniquement. L'image est représentative de 3 expériences indépendantes. Grossissement $\times 630$

2.6.4 L'IL-22BP circule dans le sang périphérique :

L'IL-22BP est une protéine uniquement sécrétée. Elle diffuse donc certainement au niveau des tissus dans lesquels elle est produite. Par ailleurs, sa production au niveau de la rate, un organe très largement vascularisé, peut également laisser entrevoir la possibilité d'un

passage de la protéine dans la circulation générale. Cependant, aucune donnée concernant sa présence dans les différents liquides biologiques n'est à l'heure actuelle disponible. La présence éventuelle d'IL-22BP circulante dans le sérum humain a donc été évaluée par *western blot* (**Figure 19**).

Une bande unique a pu être observée dans le sérum de volontaires sains. Cette bande a migré aux alentours de 50 kDa. La masse moléculaire observée est cohérente avec les données déjà disponibles concernant le poids de l'isoforme de taille intermédiaire de l'IL-22BP. Des résultats similaires obtenus chez le rat vont également dans ce sens (données non montrées). Aucune autre bande n'a en revanche pu être détectée. Il semble donc que seule l'isoforme de taille intermédiaire circule à des concentrations détectables en *western blot*.

La signification physiologique de la présence d'IL-22BP dans la circulation générale reste encore à définir. Elle laisse néanmoins entrevoir la possibilité d'un rôle systémique de l'IL-22BP, en plus de son action au niveau local. Une telle fonction permettrait sans doute la régulation des actions de l'IL-22 au niveau d'organes n'exprimant pas constitutivement l'IL-22BP tout en exprimant le récepteur membranaire de la cytokine (foie, rein...).

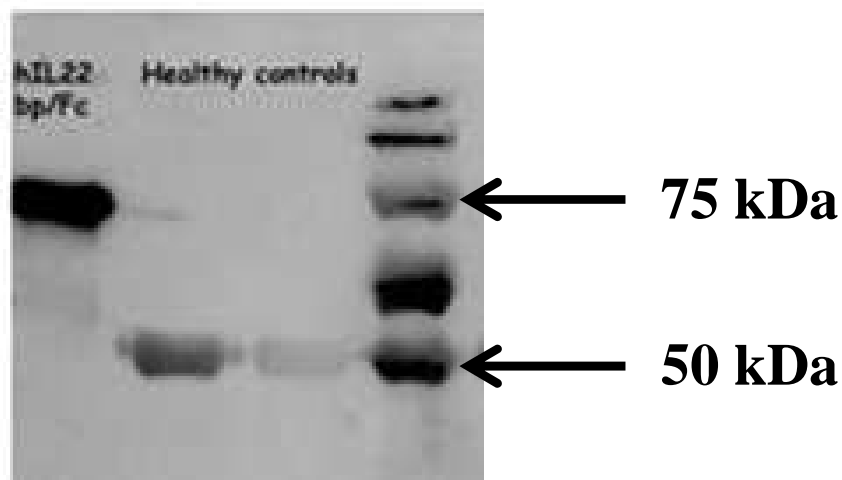


Figure 19 : L'IL-22BP circule dans le sang périphérique. Une bande unique est détectée dans le sérum de témoins sains, migrant aux alentours de 50 kDa. De l'IL-22BP/Fc recombinant a été utilisé comme contrôle positif. Cette protéine Fc migre vers 75 kDa. L'image est représentative de 3 expériences indépendantes.

3 Etude de la régulation de l'expression de l'IL-22BP :

Il ressort des résultats précédents que les DC immatures pourraient constituer l'une des principales sources d'IL-22BP *in vivo*. Jusqu'à présent, les expériences présentées ont uniquement analysé l'expression de l'IL-22BP par des cellules immatures. Cette partie s'attachera donc à présenter les variations des niveaux d'expression de l'IL-22BP ayant pu être observées sous-différentes conditions.

3.1 La maturation des DC entraîne une chute de l'expression de l'IL-22BP :

Les variations des niveaux d'expression de l'IL-22BP par les DC ont été évaluées sous différentes conditions de culture *in vitro*.

La stimulation des DC CD4⁺ par un ligand du TLR9 (CpG 2006) entraîne une chute considérable de l'expression du gène (**Figure 20A**). Cette sous-régulation intervient de façon précoce. Ainsi la chute de l'expression du gène a pu être observée dès 6 heures de stimulation. Les niveaux d'expressions sont toujours restés faibles après 24 et 48 heures de culture (**Figure 20A**). De plus, des résultats similaires ont pu être obtenus après diverses stimulations utilisant les ligands des différents TLR (données non montrées), ainsi qu'après la mise en culture sans aucun stimulus (**Figure 20A**). La mise en culture de DC sans aucune stimulation entraîne tout de même leur maturation. Ce phénomène dit de maturation spontanée est bien caractérisé pour les DC résidentes des organes lymphoïdes (Villadangos & Schnorrer 2007). Ces résultats semblent donc indiquer que la maturation des DC, indépendamment du signal l'ayant initiée, entraîne une chute de l'expression de l'IL-22BP.

Aucune variation significative n'a en revanche pu être observée concernant l'expression du gène par les DC CD4⁻ cultivées avec ou sans les ligands des différents TLR (données non montrées). Ces résultats semblent donc indiquer que chez le rat, la production d'IL-22BP dans la rate est principalement l'apanage des DC CD4⁺ immatures. Au contraire, cette dernière serait abolie dès lors que ces cellules subissent un phénomène de maturation, spontanée ou non.

Les variations d'expression de l'IL-22BP ont également été analysées sur les MODC humaines cultivées 24 heures dans du RPMI complet. Là encore, la stimulation des DC par un ligand de TLR entraîne l'abolition quasi-complète de l'expression du gène (**Figure 20B**). Des résultats similaires avaient déjà été évoqués par Nagalakshmi et al. (Nagalakshmi et al. 2004). Les MODC voient également l'expression du gène de l'IL-22BP chuter lorsqu'elles subissent un phénomène de maturation spontanée (données non montrées).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats laissent supposer que les DC sont uniquement capables de produire de l'IL-22BP lorsqu'elles sont immatures. La maturation des DC entraîne au contraire une chute importante de l'expression du gène.

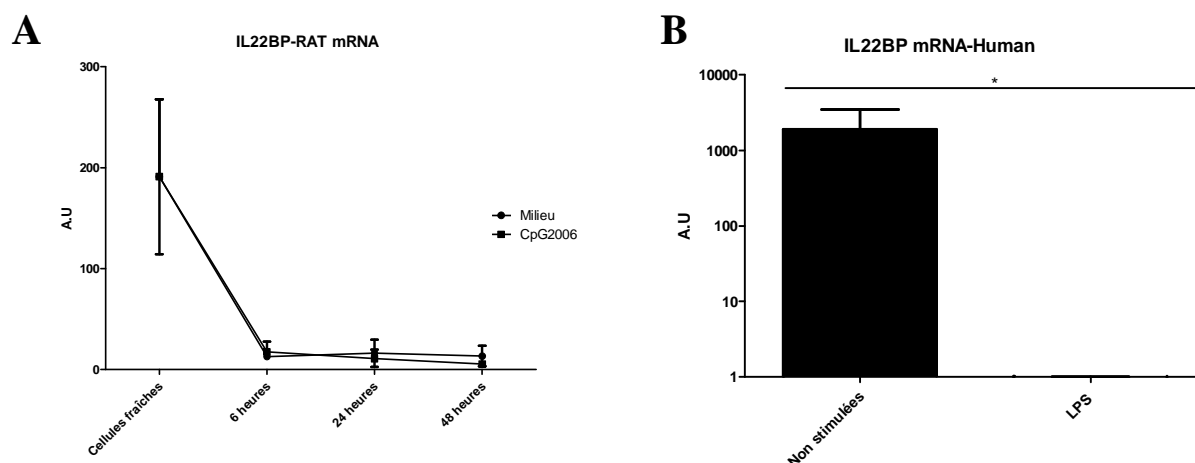


Figure 20 : L'expression de l'IL-22BP par les DC chute au cours de leur maturation. **(A)** Les DC CD4⁺ spléniques de rat ont été cultivées dans du RPMI complet avec ou sans le ligand de TLR9. L'expression du gène a été analysée à 6, 24 et 48 heures et comparée à celles des cellules immatures. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm S.E.M et sont représentatives d'au moins 2 expériences indépendantes. **(B)** Des monocytes fraîchement triés ont été différenciés en DC par culture 6 jours dans du RPMI complet en présence de GM-CSF et d'IL-4. A J6, du milieu seul ou du LPS ont été ajoutés au puits de culture pour 24 heures. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm S.E.M et sont issues de 4 expériences indépendantes. * $p < 0.05$.

3.2 L'expression de l'IL-22BP peut chuter en conditions inflammatoires :

Les résultats précédents suggèrent que la production constitutive d'IL-22BP, assurée par les DC immatures dans les tissus, chute dès lors que ces dernières subissent un phénomène de maturation. Ceci semble indiquer que dans un environnement inflammatoire, l'activation des DC par différents stimuli (ligands de PRR, cytokine pro-inflammatoire, cellules nécrotiques...), entraînerait une chute d'expression du gène *il22ra2*. De telles observations ont déjà été rapportées, sans pour autant rattacher la diminution de l'expression du gène aux cellules productrices (Wolk et al. 2007; Sugimoto et al. 2008).

Ces 2 observations concernaient une inflammation intestinale dans des modèles murins de colites inflammatoires. Afin de tester d'autres conditions inflammatoires, l'expression d'IL-22BP a été analysée au cours d'un rejet aigu après allogreffe rénale chez le rat. Les niveaux d'expression d'IL-22BP dans le rein ont été comparés à ceux observés après greffe syngénique (**Figure 21**). L'expression d'IL-22BP chute dans les prélèvements issus de greffes

allogéniques, par rapport aux greffes syngéniques. Là encore ces résultats vont dans le sens d'une diminution de l'expression du gène *il22ra2* dans un environnement inflammatoire. La chute de l'expression du gène pourrait donc être associée à une activation des DC du donneur suite à l'allogreffe.

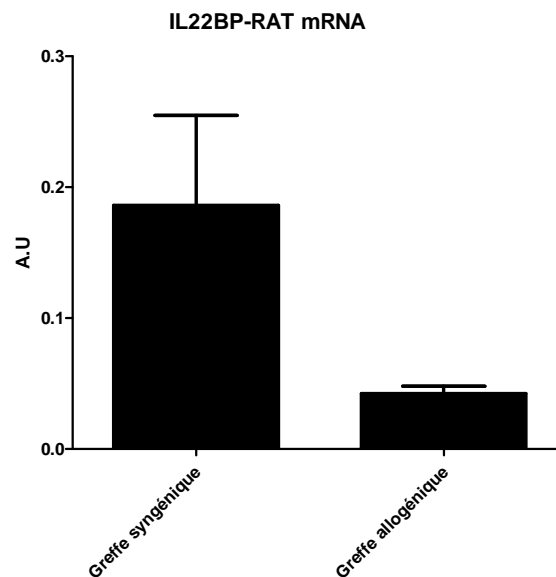


Figure 21 : L'expression de l'IL-22BP par les DC chute au cours d'un rejet rénal aigu. L'expression d'IL-22BP a été analysée après transplantations rénales allo- et syngéniques. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm S.E.M et sont issues de 3 expériences indépendantes.

Cependant la régulation de l'expression du gène *il22ra2* en conditions inflammatoires n'est probablement pas aussi sommaire. Plusieurs études, mentionnées en introduction, ont également fait état d'une surexpression du gène lors de certains états inflammatoires, notamment infectieux, cancéreux ou auto-immuns. Les cellules productrices d'IL-22BP au cours de ces états non pas été identifiées. Il se peut que certains environnements inflammatoires particuliers induisent une surexpression du gène par des DC. Cependant, la chute de l'expression du gène après maturation spontanée n'est pas en faveur de cette hypothèse. La production d'IL-22BP par d'autres cellules que les DC, au cours de certains états inflammatoires, ne peut donc être exclue.

L'expression du gène a été analysée sur différents ADNc obtenus après activation de lymphocytes T et B, ainsi que de monocytes du sang périphérique, activés après culture *in vitro*. Aucune expression n'a pu être détectée pour ces cellules, avant ou après activation (données non montrées). Ces cellules ne semblent donc pas capables de produire l'IL-22BP, du moins *in vitro*. Pour autant, une surexpression du gène par d'autres types cellulaires,

hématopoïétiques ou non reste envisageable, et pourra nécessiter plus d'investigations par la suite.

3.3 L'acide rétinoïque est un puissant inducteur d'IL-22BP sur les DC :

La production d'IL-22BP par les DC tissulaires immatures semble varier en fonction de leur tissu d'origine. Ainsi, chez le rat, les DC intestinales expriment des niveaux beaucoup plus élevés du gène que les DC de la rate. Ces différences laissent supposer que l'environnement tissulaire est important pour induire une expression optimale d'IL-22BP. Parmi les éléments présents dans l'environnement intestinal, et propres à agir sur les DC, l'acide rétinoïque pouvait représenter un bon candidat. Des résultats de puces à ADN laissaient par ailleurs entendre que l'ajout d'un agoniste du récepteur de l'acide rétinoïque, *RAR α* (*RetinoicAcidReceptor, alpha*), au cours de la différenciation de monocytes en DC, induisait une forte expression du gène *il22ra2* (**Figure 22**) (Szatmari et al. 2006).

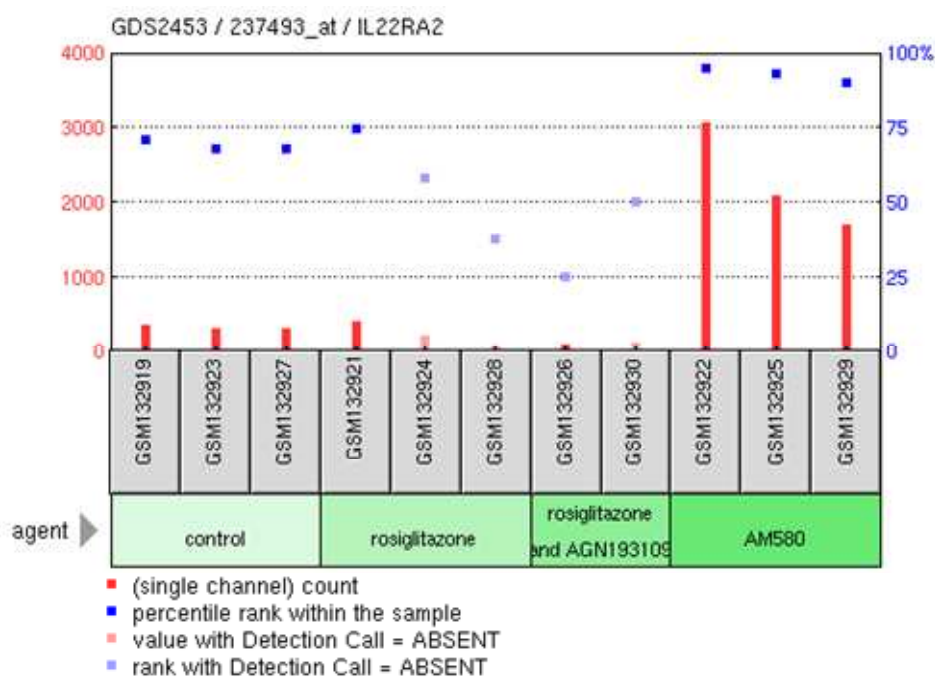


Figure 22 : Induction de l'expression d'IL-22BP lors de la différenciation de monocytes en DC après culture 6 jours dans du RPMI complet supplémenté par du GM-CSF, de l'IL-4 et d'AM580. Les données sont issues de résultats de puces à ADN et disponibles sur le site Geo Profiles (Szatmari I et al. 2006).

Ces résultats ne concernaient que l'expression du gène par puces à ADN. Afin de confirmer ces données, des expériences de q-RT-PCR ont été conduites sur des DC dérivées des monocytes, pour lesquelles de l'AM580 (un agoniste du *RAR α*), a été ajouté dès le 1^{er} jour de culture. L'induction de l'expression du gène lors de la différenciation des monocytes a

bien été retrouvée. En outre, cette expression était très fortement augmentée lorsque de l'AM580 à 100nM était présent dans le milieu de culture (**Figure 23**). L'utilisation de doses plus importantes ou plus faibles, 500 et 10nM respectivement, n'a pas eu d'influence notable sur l'induction de l'expression du gène (données non montrées).

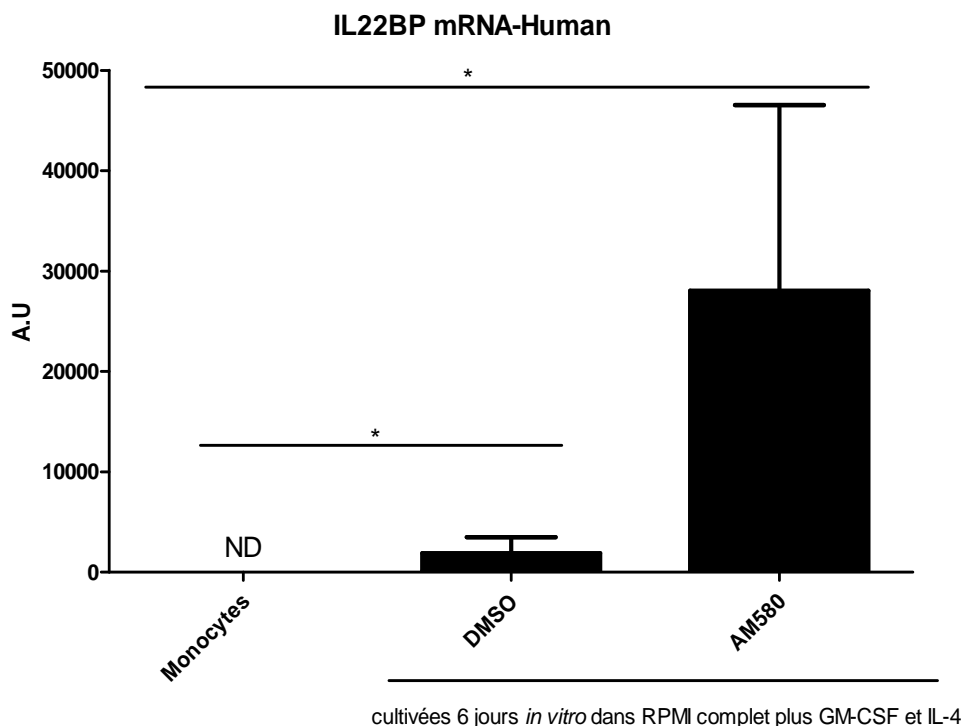


Figure 23 : L'AM580 induit fortement l'expression de l'IL-22BP au cours de la différenciation des monocytes en DC. Des monocytes ont été cultivés 6 jours dans du RPI complet en présence de GM-CSF, d'IL-4. De l'AM580 ou du DMSO seul ont été ajoutés dès le 1^{er} jour de la culture. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm S.E.M et sont issues de 5 expériences indépendantes. * $p < 0.05$.

L'expression du gène détectée en q-RT-PCR a été confirmée au niveau protéique par marquages en IFI des DC différenciées (**Figure 24**). Les marquages confirment la production de l'IL-22BP par les DC et non par les monocytes. Par ailleurs, l'intensité des marquages obtenus pour les DC différenciées en présence d'AM580 était plus importante que celle observée pour les DC différenciées en présence de DMSO seul. La fréquence des cellules mortes étaient plus importante pour les DC AM580 confirmant la capacité de l'acide rétinoïque à induire l'apoptose des DC, particulièrement à concentrations élevées (Geissmann et al. 2003). Ces résultats indiquent donc que l'acide rétinoïque pourrait induire fortement l'expression de l'IL-22BP par les DC.

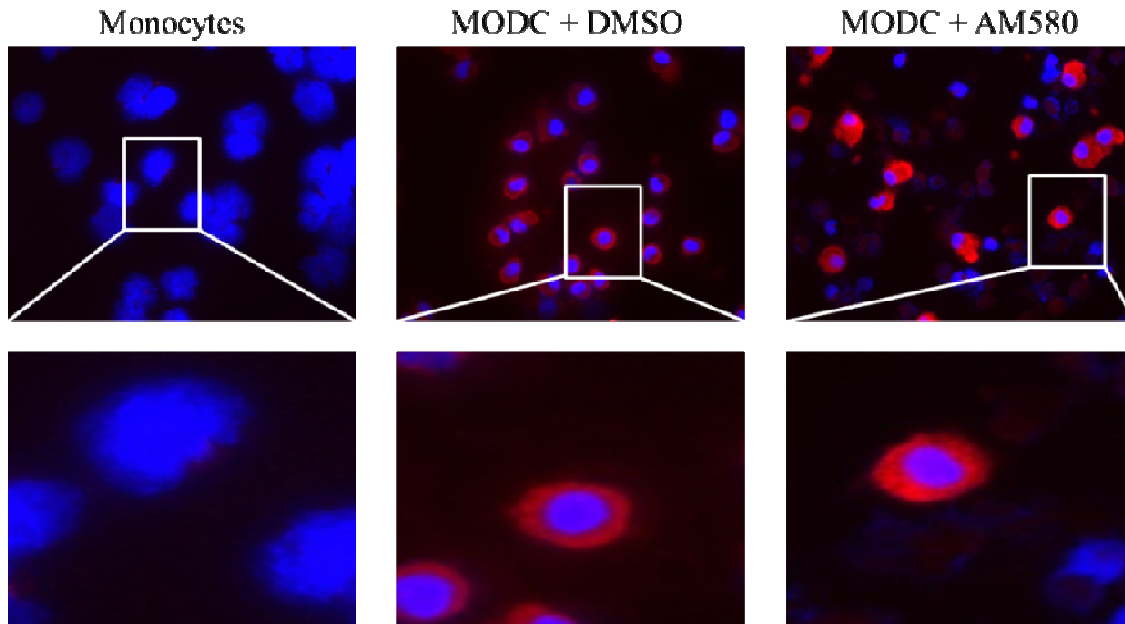


Figure 24 : Les DC différenciées à en présence d'AM580 produisent l'IL-22BP de façon plus importante. Les données sont issues de 4 expériences indépendantes.

Afin de vérifier si l'induction du gène par l'AM580 était plus particulièrement liée à la différenciation en DC ou intervenait une fois cette différenciation opérée, des expériences de cinétiques ont été réalisées. L'induction de l'expression du gène *il22ra2* a principalement lieu entre J3 et J6 (**Figure 25A**). Ces résultats sont donc particulièrement en faveur d'une action directe de l'acide rétinoïque sur les DC, capable d'induire la production de l'IL-22BP. Par ailleurs, l'addition d'AM580 au cours de la culture des DC CD4⁺spléniques de rat fraîchement isolées a permis de restaurer des niveaux d'expression significatifs du gène, sans toutefois permettre le retour aux niveaux initiaux (**Figure 25B**). De façon encore plus surprenante, l'AM580 ajouté aux DC CD4⁻ induisait une expression très forte du gène, à des niveaux similaires de ceux observés pour les DC CD4⁺ immatures. Ces cellules ont donc le potentiel de produire de l'IL-22BP lorsqu'elles sont stimulées par de l'acide rétinoïque. Ces résultats suggèrent que l'acide rétinoïque joue un rôle important dans la régulation de l'expression de l'IL-22BP *in vivo*.

L'acide rétinoïque est le produit du métabolisme de la vitamine A d'origine alimentaire, et joue un rôle important dans les phénomènes de tolérance au niveau de la muqueuse intestinale. Les DC CD4⁻ comme les DC CD4⁺ expriment le récepteur RAR α (**Annexe 2**) expliquant la capacité des 2 sous-populations à répondre à la stimulation par l'AM580. Il a déjà été montré que certaines sous-populations de DC possédaient en outre la pleine capacité de métaboliser la vitamine A en acide rétinoïque, ce dernier pouvant alors agir

de façon autocrine sur ces cellules (Szatmari et al. 2006). C'est le cas des DC CD103⁺ chez la souris. La capacité des DC CD4⁺ à métaboliser la vitamine A pourrait donc expliquer les différences d'expression du gène entre les 2 sous-populations de cDC spléniques à l'état natif. Ces 2 sous-populations de cDC expriment l'enzyme RALDH2 (Rétinaldèhydedeshydrogénase 2) nécessaire à l'oxydation du rétinaldéhyde en acide rétinoïque (**Annexe 2**). Les DC CD4⁺ spléniques pourraient donc partager avec les DC CD103⁺ CD172α^{high} CD11b⁻ des capacités à métaboliser la vitamine A en acide rétinoïque que ne possèdent pas les autres sous-populations de DC étudiées. Ces différences passeraient en outre par d'autres enzymes que la RALDH2. Par ailleurs, il existe très probablement d'autres inducteurs de l'expression du gène codant pour l'IL-22BP, permettant d'expliquer l'expression de cette protéine dans des organes comme la peau ou les poumons.

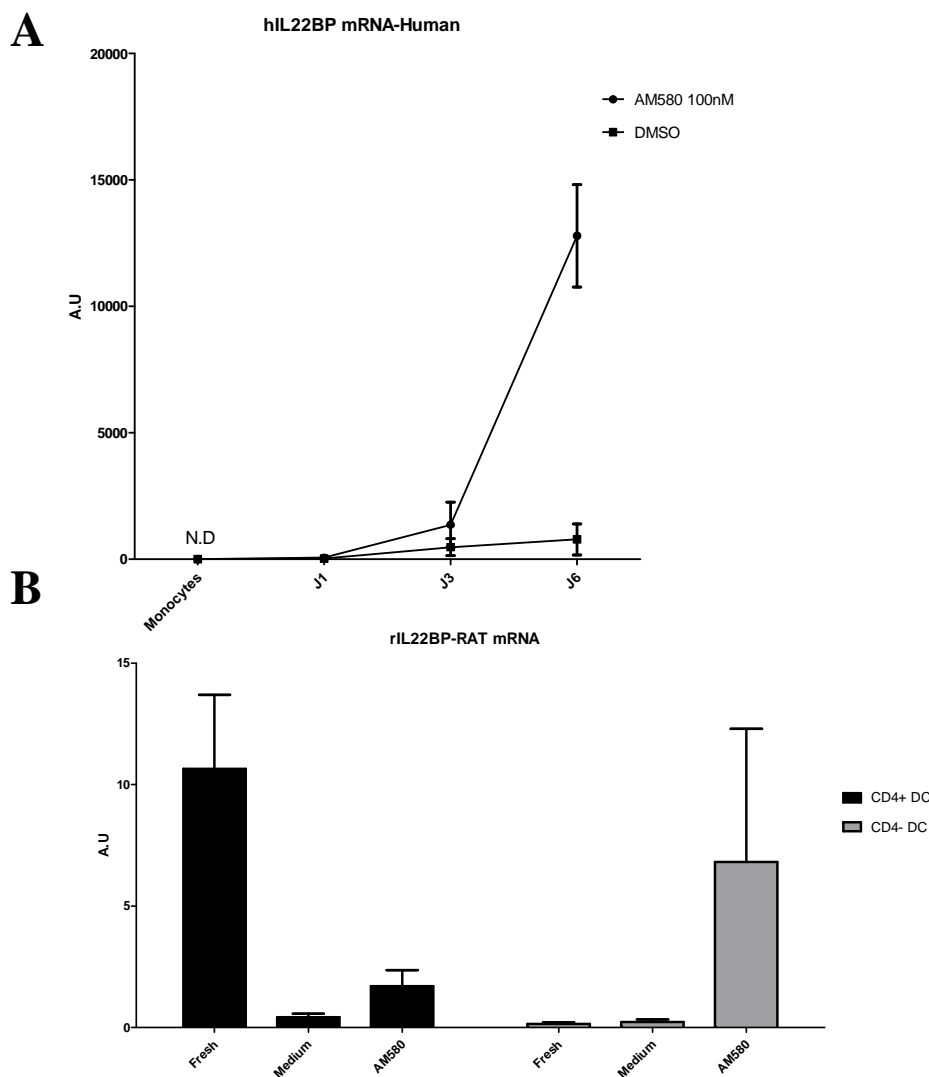


Figure 25 : L'AM580 induit l'expression de l'IL-22BP par action directe sur les DC. **(A)** Expression de l'IL-22BP au cours de la différenciation des monocytes en DC, en présence d'AM580 ou non. Les données sont issues de 2 expériences indépendantes. **(B)** Expression de l'IL-22BP par les 2 sous-populations de cDC spléniques de rat, fraîches ou cultivées 24 heures avec ou sans AM580. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes. Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm S.E.M.

4 IL-22BP et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

Comme discuté précédemment, la place de l'IL-22 au sein de la physiopathologie des MICI reste encore floue. Bien que son augmentation soit corrélée à l'activité de la maladie au cours de la MC, mais pas de la RCH, la plupart des modèles animaux suggèrent malgré tout qu'elle présente des actions protectrices en cas de colites inflammatoires.

Deux études ont pu constater une diminution de l'expression de l'IL-22BP dans des modèles murins de colites au DSS (Wolk et al. 2007; Sugimoto et al. 2008). L'expression de l'IL-22BP n'a pour autant jamais été analysée au cours des MICI chez l'homme. Afin d'évaluer ses variations au cours de la MC et de la RCH, l'expression de l'IL-22BP a été évaluée sur des biopsies coliques de muqueuses inflammatoires de patients atteints de ces 2 pathologies (collaboration Dr Arnaud Bourreille, IMAD, CHU, Nantes). Ces niveaux ont pu être comparés à ceux exprimés au niveau des muqueuses saines de ces mêmes patients, ainsi qu'à des muqueuses de témoins sains.

La mesure de l'expression de l'IL-22BP par q-RT-PCR ne retrouve pas de différences notables pour les échantillons provenant de biopsies de muqueuses saines (**Figure 26**). L'expression de l'IL-22BP ne semble pas varier de façon significative non plus pour les muqueuses inflammatoires de patients atteints de RCH. En revanche, l'expression du gène *il22ra2* apparaît clairement augmentée dans les muqueuses inflammatoires de MC.

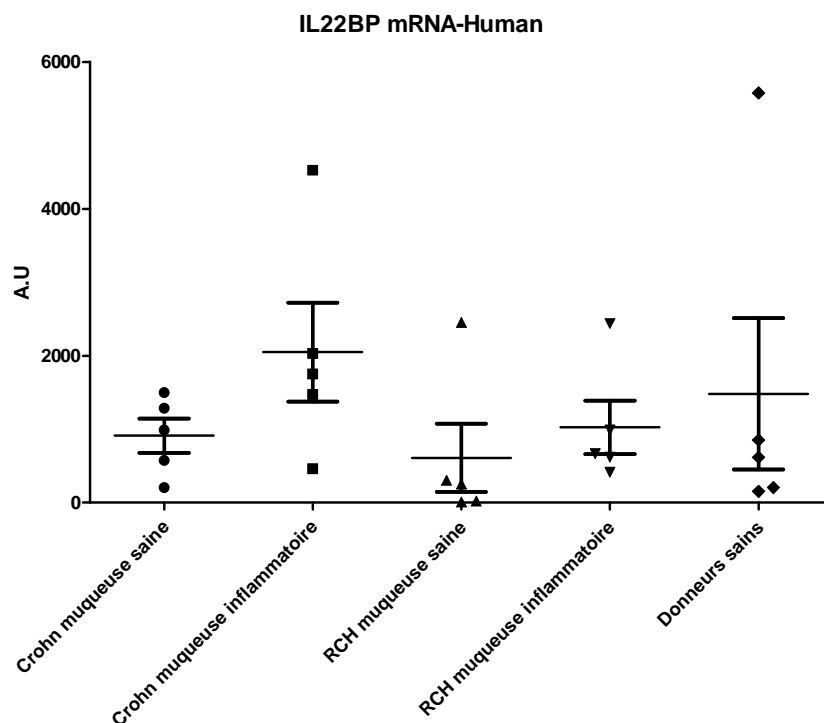


Figure 26 : Expression de l'IL-22BP au cours des poussées inflammatoires de MC et RCH. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm S.E.M et sont issues de 5 patients différents par groupe (MC, RCH, Témoins sains).

Afin de confirmer au niveau protéique les observations faites en q-RT-PCR, des marquages en IHC ont été réalisés sur des coupes de muqueuses inflammatoires de MC et de RCH. Ces marquages ont également été comparés à ceux obtenus sur muqueuses saines (**Figure 27**). La fréquence des cellules marquées pour l'IL-22BP apparaît clairement augmentée au niveau des muqueuses de patients souffrant de MC. Là encore l'IL-22BP semble produite par des cellules du chorion. Au contraire, les marquages de coupes provenant de muqueuses de patients atteints de RCH sont plutôt en faveur d'une diminution, voire d'une disparition de la production de la protéine dans cette maladie, par rapport aux témoins sains (**Figure 27**).

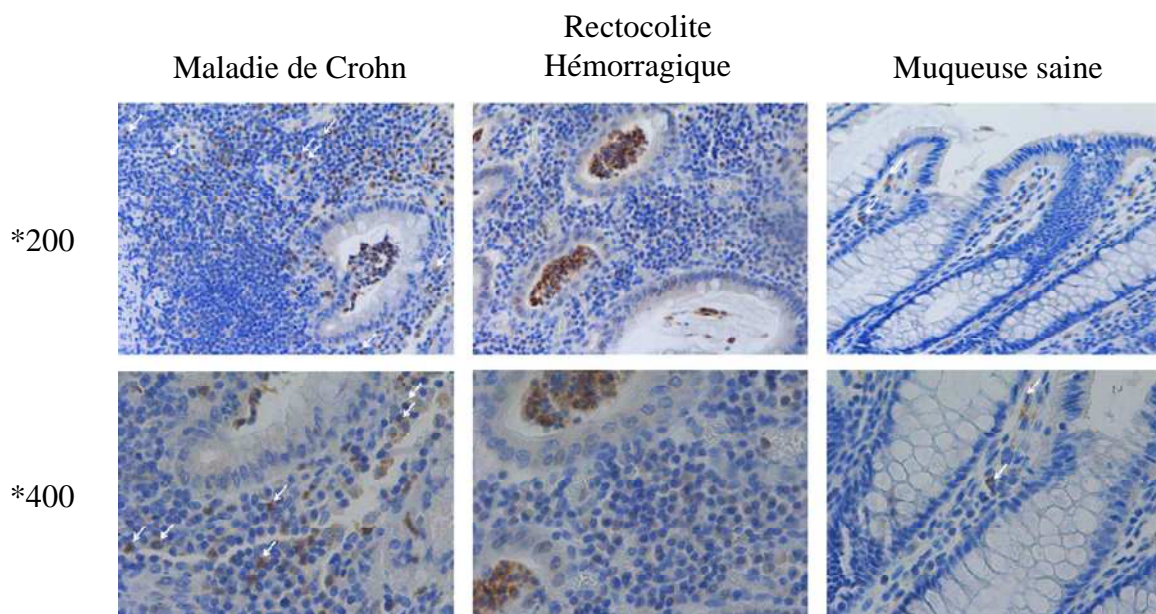


Figure 27 : Marquage en immunohistochimie de coupes de colon obtenues sur des pièces opératoires de MC, RCH, ou de cancer du côlon. Les coupes de MC et RCH sont faites sur muqueuse inflammatoire. Les coupes de cancer du côlon sont réalisées sur muqueuse saine. Les cellules marquées par l'anti-IL-22BP sont indiquées par des flèches blanches. Les images sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

Il semble donc que l'augmentation de l'IL-22 déjà décrite pour la MC soit associée en parallèle à une augmentation de son récepteur soluble inhibiteur, l'IL-22BP. Au contraire, peu de variations de l'IL-22 et de l'IL-22BP semblent exister au cours de la RCH. Ces résultats peuvent ainsi permettre de supposer que même si l'IL-22 est augmentée au cours de la MC, ses actions protectrices ou délétères, seraient en partie abolies par la présence accentuée de l'IL-22BP.

La question de savoir si cette augmentation de l'IL-22BP au cours des MC est la résultante d'une production accrue par les DC ne peut être tranchée avec ces résultats et méritera des explorations complémentaires par la suite.

Discussion :

L'importance croissante de l'IL-22 dans la régulation de l'homéostasie épithéliale, ainsi que dans l'induction de défenses immunitaires précoces, principalement au niveau de barrières tissulaires, a naturellement poussé de nombreux groupes à intensifier les recherches sur cette cytokine. Cependant, jusqu'à présent très peu de travaux ont tenté d'intégrer la place de l'IL-22BP dans l'étude des propriétés biologiques de l'IL-22. Par ailleurs, très peu de travaux ont directement porté sur l'étude de ce récepteur soluble. L'expression constitutive du gène codant pour l'IL-22BP dans un certain nombre de tissus, dont plusieurs expriment également le récepteur membranaire de l'IL-22 (peau, tractus digestif, poumon...), ainsi que les quantités abondantes semblant circuler dans le sang de sujets sains (**Figure 19**), laissent pourtant supposer que cette protéine présente un rôle important dans la physiologie de l'IL-22. Une meilleure caractérisation de l'IL-22BP apparaît donc à l'heure actuelle comme un prérequis nécessaire à l'établissement d'une vision intégrée des différents processus mettant en jeu l'IL-22.

Une seule étude, utilisant la q-RT-PCR, avait jusqu'alors analysé de façon relativement étendue les sources potentielles d'IL-22BP (Nagalakshmi et al. 2004). La limite principale de ce travail reposait sur l'utilisation exclusive de banques de cDNA de sources variées, rendant délicate une interprétation quant à la comparaison des niveaux relatifs d'expression de chaque échantillon. Pour autant, cette étude présentait l'avantage d'avoir testé de nombreuses lignées de cellules épithéliales et stromales, pour lesquelles aucune expression n'était détectée. Ce résultat associé aux hauts niveaux d'expression du gène retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 9** et Dumoutier et al. 2001; Weiss et al. 2004) permettait donc de supposer que les sources d'IL-22BP étaient principalement des cellules d'origine hématopoïétique. L'étude de l'expression du gène par les différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques chez le rat a ainsi pu mettre en évidence une sous-population de DC conventionnelles résidentes, exprimant de hauts niveaux d'IL-22BP. Les niveaux d'expression retrouvés pour ces cellules sont environ 5 fois supérieurs à ceux détectés pour la rate (données non montrés). Ce résultat associé à l'absence de détection de l'expression du gène *il22ra2* dans les PBMC, ou dans les différentes populations de cellules circulantes isolées, laisse supposer qu'une sous-population de cDC tissulaires et/ou lymphoïdes assure la production de l'IL-22BP dans l'organisme à l'état naturel.

L'expression très importante retrouvée pour une sous-population de cDC immatures migrant directement de l'intestin chez le rat, confortée par les résultats de puces à ADN chez la souris (**Figure 12**) semble confirmer cette hypothèse. Les marquages tissulaires réalisés

chez l'homme indiquent en outre que la production de la protéine semble assurée par des cellules de morphologie compatible avec les DC (**Figure 14**).

Il est particulièrement intéressant de constater que les niveaux d'expression les plus élevés du gène *il22ra2* sont retrouvés pour des cDC caractérisées par l'expression du CD103 (DC CD103⁺ CD4⁺ de la rate chez le rat et DC CD103⁺ CD11b⁻ de l'intestin chez le rat et la souris). Cette molécule correspond à la chaîne α_E de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$. D'abord décrit comme caractéristique des lymphocytes T intra-épithéliaux de l'intestin, de la peau ou des poumons, le CD103 a depuis également été retrouvé à la surface de certains lymphocytes T CD8⁺ mémoires, ainsi que sur certaines sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ régulateurs (del Rio et al. 2010). Le CD103 permet l'adhérence aux cellules épithéliales par interaction avec l'E-cadhérine. Les DC CD103⁺ sont retrouvées dans de nombreux tissus, lymphoïdes ou non, et n'ont suscité l'intérêt que très récemment. Elles sont notamment présentes dans la *lamina propria* des villosités intestinales ainsi que dans le derme. Ces dernières bien qu'exprimant le CD207 (Langerine) se distinguent des cellules de Langerhans par l'expression du CD103, une faible expression du CD11b et l'absence d'expression d'EpCam. Les marquages en immunohistologie réalisés chez l'homme révèlent que la localisation des cellules exprimant l'IL-22BP, en plus de leur morphologie, présentent une localisation tissulaire compatible avec les DC CD103⁺. Finalement, des résultats de puces à ADN semblent indiquer une sur-régulation de l'expression du CD103 par les MODC dérivées en présence de GM-CSF, d'IL-4 et d'AM580, un agoniste du récepteur RAR α de l'acide rétinoïque (Szatmari et al. 2006). Ces résultats préliminaires imposent une confirmation de l'expression du CD103 au niveau protéique. Pour autant, pris dans leur ensemble, ces données laissent suggérer que les DC puissent représenter une source importante d'IL-22BP dans les tissus. Cette propriété semble constituer une caractéristique intrinsèque de ces cellules, comme en témoigne l'induction de l'expression du gène au cours de la différenciation des monocytes en DC. En outre, une sous-population particulière de DC, caractérisée par l'expression du CD103 et la faible expression du CD11b pourrait être plus particulièrement responsable de la synthèse tissulaire de l'IL-22BP.

L'étude des MODC impose toute fois une certaine prudence quant à l'interprétation des résultats. Ces cellules sont en effet obtenues artificiellement *in vitro*, en présence de stimuli mimant la différenciation des monocytes en DC dans les tissus au cours d'états inflammatoires. Pour autant, il a déjà été évoqué que les DC des muqueuses, et plus particulièrement les DC CD103⁺, pourraient être renouvelées à partir de monocytes du sang périphérique, même en l'absence d'inflammation (Varol et al. 2007; del Rio et al. 2010). Par ailleurs l'analyse des puces à ADN disponibles sur le site GeoProfiles (numéro d'accès

GDS2453) laisse supposer que les MODC différenciées en présence d'AM580 pourraient sur-exprimer, en plus du CD103, le CD207 et le CD205 (DEC205). Une sous-régulation du CD11b semble également associée à la différenciation (Szatmari et al. 2006). Bien que les stimuli associés à la différenciation des monocytes en DC dans les tissus en l'absence d'inflammation ne soient pas connus, le phénotype présumé des MODC obtenues après différenciation en présence d'AM580 semble proche de celui des DC exprimant fortement l'IL-22BP chez le rat ou la souris. Si la confirmation au niveau protéique du phénotype de ces MODC est obtenue, leur étude plus approfondie, rendue aisée par leur obtention *in vitro*, pourrait donc constituer un bon modèle d'étude de la régulation de l'expression et des propriétés de l'IL-22BP.

Fonctionnellement les DC CD103⁺ ont particulièrement été étudiées dans l'intestin. Elles semblent posséder des caractéristiques uniques, probablement dues au microenvironnement tissulaire dans lequel elles sont retrouvées. Ainsi les DC CD103⁺ des ganglions mésentériques semblent particulièrement importantes pour leur capacité à induire la polarisation de lymphocytes T matures naïfs vers un profil T régulateur (Coombes et al. 2007). Elles sont par ailleurs capables d'induire l'expression du CCR9 et de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ à la surface des lymphocytes T, favorisant ainsi leur migration vers la muqueuse intestinale (Iwata et al. 2004). Finalement, ces cellules peuvent induire la commutation isotypique vers la classe des IgA en agissant sur les lymphocytes B naïfs, de façon indépendante des lymphocytes T. Ces propriétés ne semblent pas particulièrement dépendantes de l'expression du CD103 (Jaensson et al. 2008) mais plus de leur localisation anatomique et du microenvironnement tissulaire associé (Iliev et al. 2009). Ainsi les DC CD103⁺ tissulaires possèdent de nombreuses propriétés immunomodulatrices auxquelles pourrait s'ajouter la production basale de quantités importantes d'IL-22BP, servant à réguler les actions de l'IL-22 à l'état physiologique.

Il est particulièrement intéressant de souligner que ces différentes propriétés des DC CD103⁺ sont majoritairement dépendantes de l'acide rétinoïque. Ce dernier dérive du métabolisme de la vitamine A (ou rétinol) d'origine alimentaire. L'importance de la vitamine A dans le maintien d'une immunité efficace est connu depuis près de 25 ans (Sommer et al. 1986). Il avait alors été montré que la supplémentation en vitamine A réduisait de façon significative la mortalité infantile, principalement associée aux diarrhées et aux complications de l'infection par le virus de la rubéole. Les actions de la vitamine A sur le système immunitaire sont principalement dues à son métabolite le plus oxydé, l'acide rétinoïque. Ce dernier fait suite à l'oxydation du rétinol en rétinol par diverses alcool déshydrogénases.

L'oxydation irréversible du rétinol en acide rétinoïque est alors assurée par diverses enzymes de la sous-famille des rétinol déshydrogénases.

L'acide rétinoïque est particulièrement abondant dans l'intestin. La vitamine A provient en effet de l'alimentation et les différentes enzymes nécessaires à son métabolisme sont exprimées par les entérocytes. L'acide rétinoïque produit *in situ* peut donc aller agir directement sur les DC présentes dans l'environnement. Pour autant, ceci ne permet pas de comprendre les différences observées concernant les propriétés immunomodulatrices des DC CD103⁺ vis-à-vis des DC CD103⁻. Il semble en fait qu'elles soient expliquées par la capacité des DC CD103⁺ à métaboliser elles-mêmes la vitamine A en acide rétinoïque, qui peut alors agir sur ces cellules de façon autocrine (Coombes et al. 2007). La principale différence entre ces 2 sous-populations réside principalement dans l'expression de l'enzyme RALDH2 capable d'oxyder de façon définitive le rétinol en acide rétinoïque. L'induction de l'expression de cette enzyme semble particulièrement associée au GM-CSF et dans une moindre mesure à l'IL-4 et à l'IL-13. Le cholestérol alimentaire et l'acide rétinoïque lui-même induisent également l'expression de RALDH2 (Iwata & Yokota 2011).

L'expression de l'IL-22BP apparaît elle-aussi inductible par l'acide rétinoïque. Des résultats préliminaires semblent indiquer que l'addition d'un agoniste du RAR α sur des MODC humaines après 5 jours de différenciation augmente l'expression du gène *il22ra2*. En outre, l'addition de l'agoniste au cours de la culture des cDCs spléniques de rat permet la restauration de niveaux d'expression significatifs par les DC CD4⁺, et même l'induction d'une forte expression du gène par les DC CD4⁻, qui n'en expriment que de faibles niveaux physiologiquement. Cependant l'acide rétinoïque n'est probablement pas impliqué dans la régulation de l'expression du gène *il22ra2* dans la rate. Les 2 sous-populations de cDC n'expriment que de faibles niveaux de RALDH2, et sont donc probablement incapables de métaboliser le rétinol. Cette faible expression de RALDH2 par les DC de la rate permettrait donc d'expliquer les différences importantes avec les DC CD103⁺ CD11b⁻ intestinales. Ces dernières pourraient produire elles-mêmes de l'acide rétinoïque qui viendrait agir de façon autocrine et induire une surexpression de l'IL-22BP. Il serait par conséquent intéressant d'évaluer si l'induction de l'expression de RALDH2 par les DC spléniques cultivées dans un milieu riche en rétinol augmente ou non l'expression de l'IL-22BP. L'induction de l'expression de RALDH2 par les DC spléniques semble possible par culture en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Yokota et al. 2009). A l'inverse, l'impact du blocage ou de l'absence de l'enzyme RALDH2 sur l'expression de l'IL-22BP par les DC pourrait également être analysé.

Il ressort de ces constatations que la production d'IL-22BP pourrait constituer une propriété intrinsèque des DC tissulaires, et plus spécifiquement d'une sous-population

exprimant le CD103. Par ailleurs, le microenvironnement semble également jouer un rôle important dans la régulation de l'expression du gène. Les expériences faisant intervenir l'agoniste du RAR α vont dans ce sens. L'acide rétinoïque n'est probablement pas le seul inducteur de la production d'IL-22BP. La recherche d'autres molécules exerçant des effets similaires pourrait permettre de mieux comprendre les conditions de production du récepteur soluble. L'importance du TGF- β dans le maintien de l'homéostasie épithéliale, ses propriétés immunomodulatrices ainsi que sa présence abondante dans l'intestin en font un bon candidat. Une autre approche pourrait consister à évaluer l'impact des surnageants de culture de différentes lignées épithéliales sur la régulation de l'expression du gène *il22ra2* par les DC. Une caractérisation plus ciblée des molécules importantes, présentes dans les surnageants, pourrait alors faire ressortir les principaux effecteurs de la régulation de l'expression du gène.

L'importance de l'IL-22BP en conditions pathologiques est encore assez méconnue. L'IL-22 semble être une cytokine clef dans la lutte contre les bactéries extracellulaires, notamment dans le cadre d'infections muqueuses à entérobactéries (Zheng et al. 2008; Aujla et al. 2008). L'absence de la cytokine dans ce type de modèle ne permet pas la survie des animaux. Les propriétés inhibitrices de l'IL-22BP semblent donc incompatibles avec une action optimale de l'IL-22 dans la lutte contre ce type d'infection. La sous-régulation de l'IL-22BP décrite au cours de certains états inflammatoires apparaît donc concordante avec la nécessité de laisser l'IL-22 agir. Les résultats obtenus *in vitro* sur les DC laissent entendre que la maturation de ces dernières est associée avec une diminution importante de l'expression du gène *il22ra2*. Il peut de ce fait être supposé que lors d'une infection, les DC, activées par la reconnaissance du pathogène, cessent d'exprimer l'IL-22BP. Ceci semble particulièrement vrai pour les infections requérant de hauts niveaux d'IL-22. Ainsi la maturation des MODC humaines induite par du LPS, un ligand du TLR4 abondant à la surface des entérobactéries, abolit totalement l'expression du gène.

A l'inverse, une induction de l'expression de l'IL-22BP a pu être décrite pour des infections aux cours desquelles aucune preuve d'une action protectrice de l'IL-22 ne semble exister. Des niveaux d'expression plus élevés d'IL-22BP sont ainsi retrouvés dans le foie de souris infectées par un helminthe ou une mycobactérie en regard de souris saines. Par ailleurs, des niveaux accrus d'IL-22BP sont également associés à une infection par le protozoaire *Toxoplasma gondii* administré *per os*. Il est intéressant de constater qu'au cours de ce type d'infection, l'IL-22 semble exercer une action délétère en exacerbant l'inflammation rencontrée au niveau intestinal (Wilson et al. 2010). Finalement, une surexpression de l'IL-22BP a également été décrite dans la rate de souris, dans un modèle de péritonite poly-

microbienne. Les auteurs suggèrent dans ce cas que les hauts niveaux d'IL-22BP rencontrés entraveraient les actions bénéfiques devant être exercées par l'IL-22 (Weber et al. 2007).

Une sous-régulation franche de l'expression de l'IL-22BP est également décrite dans des modèles de colites inflammatoires au DSS chez la souris (Wolk et al. 2007; Sugimoto et al. 2008). Dans ces modèles l'IL-22 apparaît jouer un rôle important dans la restauration de l'homéostasie intestinale grâce notamment à l'induction de la sécrétion de mucus et la régénération des cellules de Goblet. La présence d'IL-22BP dans le milieu, induite artificiellement au moyen de vecteurs lipidiques, abolit totalement ces effets protecteurs de l'IL-22.

Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils laissent entrevoir l'existence de processus de régulation finement coordonnés de l'IL-22 et de son récepteur soluble. La sous-régulation de l'IL-22BP n'apparaît pas seulement associée à l'existence d'un environnement inflammatoire mais semble plutôt dépendre de l'intégration de l'ensemble des signaux présents dans le milieu. Ainsi, certaines conditions associées à des besoins accrus en IL-22 entraînent une chute de l'expression de l'IL-22BP et *vice versa*. La meilleure caractérisation des différents signaux, inducteurs et inhibiteurs de l'expression du gène *il22ra2*, devrait permettre de mieux appréhender le dialogue pouvant exister au sein des épithélia entre DC, cellules productrices d'IL-22 (ILC22, LTi, LT...) et cellules cibles de l'IL-22 (cellules épithéliales, hépatocytes...). Il peut ainsi être supposé qu'en l'absence de besoins importants d'IL-22, les cellules épithéliales puissent produire différents effecteurs, tels que l'acide rétinoïque, permettant la production de niveaux importants d'IL-22BP. A l'inverse, en conditions inflammatoires, ces mêmes cellules, associées aux pathogènes éventuellement présents, pourraient envoyer d'autres signaux permettant de moduler la production d'IL-22BP à la hausse ou à la baisse. Un tel dialogue peut par exemple être imaginé lors d'une infection digestive à entérobactérie. Avant l'infection, les DC produiraient de hauts niveaux d'IL-22BP servant à contrôler l'IL-22 présente constitutivement dans l'intestin. Au cours de l'infection, les DC activées par la reconnaissance du pathogène, faisant particulièrement intervenir les TLRs, cesseraient de produire de l'IL-22BP et au contraire sécrèteraient des quantités importantes d'IL-23, nécessaire à l'induction de la production d'IL-22. L'IL-22 en retour pourrait aller agir sur les entérocytes afin de lutter efficacement contre l'infection.

La dualité des actions de l'IL-22, pouvant être bénéfiques ou délétères selon le contexte dans lequel elle est produite, laisse penser qu'une dérégulation des mécanismes contrôlant sa production et celle de son récepteur soluble pourrait être impliquée dans diverses conditions pathologiques inflammatoires. La place de l'IL-22 dans la physiopathologie des MICI est encore sujette à de nombreuses interrogations. L'IL-22 semble être surexprimée dans la

maladie de Crohn mais pas dans la rectocolite hémorragique. Cette constatation avait dans un premier temps suggéré aux auteurs qu'elle pourrait exercer une action pathologique dans la MC (Brand et al. 2006). Cependant, la totalité des modèles animaux visant à reproduire cette pathologie laissent au contraire penser que l'IL-22 serait plutôt bénéfique. Les observations faites par q-PCR et IHC montrent une surexpression de l'IL-22BP au niveau des muqueuses coliques inflammatoires de patients atteints de MC. Il pourrait donc être supposé que cette surproduction du récepteur soluble inhibiteur, bien qu'associée à une surproduction d'IL-22, viendrait perturber les actions protectrices de la cytokine. Une telle hypothèse, si elle était vérifiée, impliquerait donc de développer des stratégies visant à bloquer les actions de l'IL-22BP bien plus que celles de l'IL-22. Il pourrait par ailleurs être intéressant d'évaluer l'impact de l'incubation de MODC humaines en présence des surnageant de biopsies de muqueuses inflammatoires de MC et de RCH sur la production d'IL-22BP. Un tel système permettrait en effet d'évaluer si les cellules responsables de la surproduction d'IL-22BP au cours de la MC sont bien les DC ainsi que d'identifier de nouveaux inducteurs de l'expression du gène *il22ra2*.

Finalement, il serait intéressant d'évaluer la production de l'IL-22BP dans d'autres processus inflammatoires impliquant l'IL-22, notamment le psoriasis et la PR. L'étude du récepteur soluble dans la SEP pourrait également permettre de mieux comprendre le rôle joué par l'IL-22 dans cette maladie. En effet, il semble maintenant clair que la cytokine ainsi que son récepteur membranaire sont surexprimés au niveau du système nerveux central de patients souffrant de SEP (Kebir et al. 2007). Pour autant la place exacte tenue par l'IL-22 dans la physiopathologie de ce processus n'est pas définie. Une étude chez l'animal suggère qu'elle ne serait pas impliquée dans le développement de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), une modèle d'étude de la SEP (Kreymborg et al. 2007). Ce résultat, associé à une autre étude montrant une surexpression de l'IL-22BP par les splénocytes de rat plus sensibles au développement de l'EAE, et faisant ressortir un SNP de l'IL-22BP chez des patients présentant des maladies plus sévères (Beyeen et al. 2010), pourrait ici aussi faire entrevoir un rôle délétère de l'IL-22BP dans cette maladie.

Conclusion :

A l'ère du développement de la médecine personnalisée, les biothérapies prennent une place croissante au fil des ans. Ces dernières présentent pour objectif majeur de restaurer de façon ciblée les équilibres perturbés. Parmi ces biothérapies, plusieurs cherchent à bloquer des cytokines produites en excès au cours de diverses pathologies inflammatoires. Le meilleur exemple fourni par ce type de traitement est représenté par les anti-TNF α , et commence à être suivi par de nombreuses autres molécules (anti-IL-6, anti-IL-5, anti-IL-12p40...). L'IL-22 du fait de ses propriétés pro-inflammatoires, pouvant s'avérer particulièrement délétères, a rapidement suscité l'intérêt des chercheurs. Cependant, les propriétés de la cytokine ne sont pas aussi bien caractérisées que celles du TNF- α . L'IL-22 est ainsi souvent qualifiée de cytokine à double face compte tenu des effets protecteurs ou pathologiques qu'elle peut présenter dans différents contextes. Une meilleure caractérisation des propriétés biologiques de l'IL-22 est donc un prérequis indispensable avant d'envisager un traitement pouvant chercher à l'inhiber. Les propriétés de l'IL-22 semblent être grandement tributaires de la régulation de l'expression de son récepteur soluble inhibiteur, l'IL-22BP. Par conséquent l'étude de ce dernier doit faire partie intégrante de la caractérisation des effets biologiques de l'IL-22. Par ailleurs, ce dernier présente un intérêt thérapeutique à part entière puisque ses fortes propriétés inhibitrices permettraient de l'utiliser directement comme inhibiteur sélectif de l'IL-22 dans des pathologies comme le psoriasis. Au contraire, la meilleure compréhension de son importance dans des pathologies comme la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques devrait permettre de mieux cerner la place de l'IL-22 au cours de ces processus. Plusieurs arguments, nécessitant plus de preuves expérimentales, portent en effet à croire que l'IL-22 serait protectrice dans ces maladies. Le blocage de l'IL-22BP surexprimé permettrait alors de rétablir les actions inhibées de l'IL-22. Ainsi, la dualité des propriétés de l'IL-22 pourrait être en partie expliquée par les mécanismes régulant la sécrétion de son récepteur inhibiteur. La caractérisation la plus complète possible de la régulation de l'IL-22 et de l'IL-22BP est donc indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant l'IL-22 d'une part, ainsi qu'au développement de nouvelles thérapeutiques adaptées, présentant un rapport bénéfices/risques optimale et une utilisation ciblée.

Bibliographie :

- Aggarwal, S. et al., 2001. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(12), p.1047-1053.
- Aujla, S.J. et al., 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*, 14(3), p.275-281.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), p.245-252.
- Bard, J.D. et al., 2008. Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, 22(8), p.1595-1603.
- Beyeen, A.D. et al., 2010. IL-22RA2 associates with multiple sclerosis and macrophage effector mechanisms in experimental neuroinflammation. *Journal of Immunology*, 185(11), p.6883-6890.
- Boniface, K. et al., 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *Journal of Immunology*, 174(6), p.3695-3702.
- Brand, S. et al., 2006. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4), p.G827-838.
- Cella, M. et al., 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 457(7230), p.722-725.
- Chang, H. et al., 2006. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Immunology*, 177(6), p.3635-3643.
- Cheng, F. et al., 2009. Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(4), p.604-606.
- Colonna, M., 2010. Skin function for human CD1a-reactive T cells. *Nature Immunology*, 11(12), p.1079-1080.

- Coombes, J.L. et al., 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), p.1757-1764.
- Cupedo, T. et al., 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nature Immunology*, 10(1), p.66-74.
- Duerr, R.H. et al., 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314(5804), p.1461-1463.
- Duhen, T. et al., 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), p.857-863.
- Dumoutier, L et al., 2001. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *Journal of Immunology*, 166(12), p.7090-7095.
- Dumoutier, L, Louahed, J. & Renauld, J.C., 2000a. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(4), p.1814-1819.
- Dumoutier, L et al., 2000b. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), p.10144-10149.
- Eyerich, S. et al., 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(12), p.3573-3585.
- Fujita, H. et al., 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), p.21795-21800.
- Geboes, L. et al., 2009. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis and Rheumatism*, 60(2), p.390-395.
- Geissmann, F et al., 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(4), p.623-634.
- Gelebart, P et al., 2011. Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma. *Translational Oncology*, 4(1), p.9-19.

- Graham, A.C. et al., 2011. IL-22 production is regulated by IL-23 during *Listeria monocytogenes* infection but is not required for bacterial clearance or tissue protection. *PloS One*, 6(2), p.e17171.
- Hooper, L.V. & Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews. Immunology*, 10(3), p.159-169.
- Hubert, F.-X. et al., 2006. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *Journal of Immunology*, 177(2), p.1007-1016.
- Ikeuchi, H. et al., 2005. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and Rheumatism*, 52(4), p.1037-1046.
- Iliev, I.D. et al., 2009. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*, 58(11), p.1481-1489.
- Iwata, M. & Yokota, A., 2011. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells. *Vitamins and Hormones*, 86, p.127-152.
- Iwata, M. et al., 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21(4), p.527-538.
- Jaensson, E. et al., 2008. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), p.2139-2149.
- Jiang, R. et al., 2011. IL-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674558> [Consulté juin 20, 2011].
- de Jong, A. et al., 2010. CD1a-autoreactive T cells are a normal component of the human $\alpha\beta$ T cell repertoire. *Nature Immunology*, 11(12), p.1102-1109.
- Kapessidou, P. et al., 2008. Interleukin-22 deficiency accelerates the rejection of full major histocompatibility complex-disparate heart allografts. *Transplantation Proceedings*, 40(5), p.1593-1597.
- Ke, Y. et al., 2011. IL-22-Induced Regulatory CD11b+ APCs Suppress Experimental Autoimmune Uveitis. *Journal of Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795593> [Consulté juillet 29, 2011].

- Kebir, H. et al., 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, 13(10), p.1173-1175.
- Ki, S.H. et al., 2010. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*, 52(4), p.1291-1300.
- Kisand, K. et al., 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), p.299-308.
- Kleinschek, M.A. et al., 2009. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3), p.525-534.
- Kotenko, S.V. et al., 2001a. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *Journal of Immunology*, 166(12), p.7096-7103.
- Kotenko, S.V. et al., 2001b. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), p.2725-2732.
- Kreymborg, K. et al., 2007. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, 179(12), p.8098-8104.
- Lavoie, T.N. et al., 2011. Expression of interleukin-22 in Sjögren's syndrome: significant correlation with disease parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645026> [Consulté août 5, 2011].
- Leipe, J. et al., 2011. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593004> [Consulté mai 20, 2011].
- Lejeune, D et al., 2002. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), p.33676-33682.
- Liang, S.C. et al., 2010. IL-22 induces an acute-phase response. *Journal of Immunology*, 185(9), p.5531-5538.

- Liang, S.C. et al., 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(10), p.2271-2279.
- Logsdon, N.J. et al., 2002. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22(11), p.1099-1112.
- Marijnissen, R.J. et al., 2011. Increased IL-22 expression by synovial Th17 cells during late stages of arthritis is controlled by IL-1 and enhances bone degradation. *Arthritis and Rheumatism*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618207> [Consulté mai 31, 2011].
- Mebius, R.E., 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nature Reviews. Immunology*, 3(4), p.292-303.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 1(2), p.135-145.
- Milling, S. & MacPherson, G, 2010. Isolation of rat intestinal lymph DC. *Methods in Molecular Biology*, 595, p.281-297.
- Monteleone, I. et al., 2011. Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600206> [Consulté mai 31, 2011].
- de Moura, P.R. et al., 2009. Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS Letters*, 583(7), p.1072-1077.
- Mus, A.M.C. et al., 2010. Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22, but not interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(4), p.1043-1050.
- Nagalakshmi, M.L. et al., 2004. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *International Immunopharmacology*, 4(5), p.577-592.
- Nagem, R.A.P. et al., 2002. Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Structure*, 10(8), p.1051-1062.
- Nakajima, K. et al., 2011. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *Journal of Immunology*, 186(7), p.4481-4489.

- Ouyang, W. et al., 2010. Regulation and Functions of IL-10 Family Cytokines in Inflammation and Diseases. *Annual Review of Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166540> [Consulté décembre 22, 2010].
- Pan, H.-F. et al., 2009. Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta*, 401(1-2), p.179-180.
- Pariente, B. et al., 2011. Activation of the Receptor NKG2D Leads to Production of Th17 Cytokines in CD4(+) T Cells of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600899> [Consulté mai 31, 2011].
- Pickert, G. et al., 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7), p.1465-1472.
- Puel, A. et al., 2010. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), p.291-297.
- Qin, W.-Z. et al., 2011. Expressions of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clinical and Experimental Medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487830> [Consulté août 5, 2011].
- Radaeva, S. et al., 2004. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology*, 39(5), p.1332-1342.
- Ren, J. et al., 2011. Natural Killer-22 Cells in the Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Are an Innate Source of Interleukin 22 and Tumor Necrosis Factor-alpha. *The Journal of Rheumatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765110> [Consulté août 5, 2011].
- Ren, X., Hu, B. & Colletti, L.M., 2010. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(1), p.G74-80.
- Renauld, JC, 2003. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nature Reviews. Immunology*, 3(8), p.667-676.
- del Rio, M.-L. et al., 2010. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunological Reviews*, 234(1), p.268-281.

- Sanos, S.L. et al., 2009. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nature Immunology*, 10(1), p.83-91.
- Satoh-Takayama, N. et al., 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*, 29(6), p.958-970.
- Savan, R. et al., 2011. A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood*, 117(2), p.575-584.
- Sawa, S. et al., 2011. ROR γ t(+) innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunology*, 12(4), p.320-326.
- Schmechel, S. et al., 2008. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(2), p.204-212.
- Shortman, K. & Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews. Immunology*, 7(1), p.19-30.
- Simonian, P.L. et al., 2010. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), p.2239-2253.
- Sommer, A. et al., 1986. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet*, 1(8491), p.1169-1173.
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A. & Artis, D., 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature Immunology*, 12(5), p.383-390.
- Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., et al., 2011. CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity*, 34(1), p.122-134.
- Sonnenberg, G.F. et al., 2010. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p.1293-1305.
- Spits, H. & Di Santo, J.P., 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature Immunology*, 12(1), p.21-27.

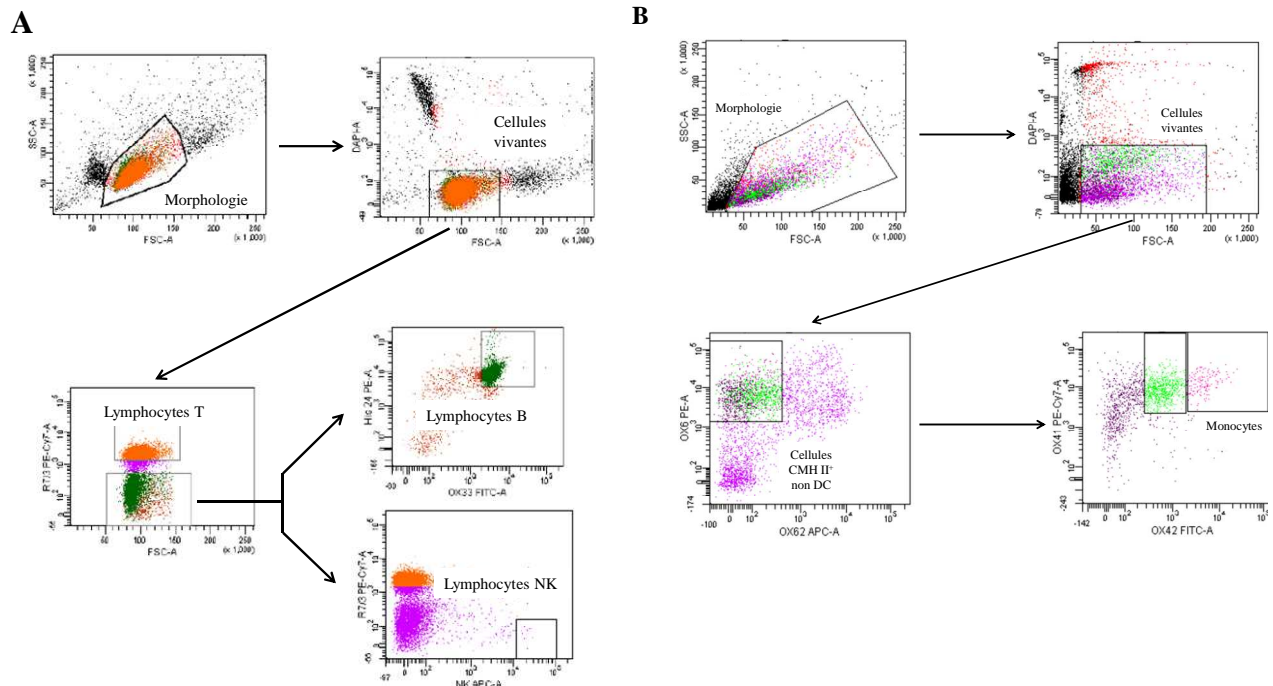
- Sugimoto, K. et al., 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), p.534-544.
- Szatmari, I. et al., 2006. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(10), p.2351-2362.
- Takatori, H. et al., 2009. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(1), p.35-41.
- Trifari, S. et al., 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), p.864-871.
- Trinité, B. et al., 2000. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *Journal of Immunology*, 165(8), p.4202-4208.
- Trivella, D.B.B. et al., 2010. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(17), p.2909-2935.
- Turnbull, E. & MacPherson, G, 2001. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunological Reviews*, 184, p.58-68.
- Vandenbroeck, K. et al., 2011. A cytokine gene screen uncovers SOCS1 as genetic risk factor for multiple sclerosis. *Genes and Immunity*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716315> [Consulté juillet 1, 2011].
- Varol, C. et al., 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1), p.171-180.
- Veldhoen, M. & Withers, D.R., 2010. Immunology. Innate lymphoid cell relations. *Science*, 330(6004), p.594-595.
- Villadangos, J.A. & Schnorrer, P., 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews. Immunology*, 7(7), p.543-555.
- Wade, R. et al., 2011. Association between SNP-genotype and chronic lymphocytic leukemia outcome in a randomized chemotherapy trial. *Haematologica*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659360> [Consulté juin 20, 2011].
- Weber, G.F. et al., 2007. Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infection and Immunity*, 75(4), p.1690-1697.

- Wei, C.-C. et al., 2003. Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes and Immunity*, 4(3), p.204-211.
- Weiss, B. et al., 2004. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes and Immunity*, 5(5), p.330-336.
- Wilson, M.S. et al., 2010. Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *Journal of Immunology*, 184(8), p.4378-4390.
- Wolk, K et al., 2002. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *Journal of Immunology*, 168(11), p.5397-5402.
- Wolk, K et al., 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 21(2), p.241-254.
- Wolk, K et al., 2007. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *Journal of Immunology*, 178(9), p.5973-5981.
- Wolk, et al., 2006. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36(5), p.1309-1323.
- Wolk, K., et al., 2010. Biology of interleukin-22. *Seminars in Immunopathology*, 32(1), p.17-31.
- Wolk, K et al., 2010. Deficiency of IL-22 Contributes to a Chronic Inflammatory Disease: Pathogenetic Mechanisms in Acne Inversa. *Journal of Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148041> [Consulté décembre 27, 2010].
- Wu, P.W. et al., 2008. IL-22R, IL-10R2, and IL-22BP binding sites are topologically juxtaposed on adjacent and overlapping surfaces of IL-22. *Journal of Molecular Biology*, 382(5), p.1168-1183.
- Xie, M.H. et al., 2000. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(40), p.31335-31339.
- Xu, W. et al., 2001. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), p.9511-9516.

- Yang, L. et al., 2010. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of Hepatology*, 53(2), p.339-347.
- Yokota, A. et al., 2009. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *International Immunology*, 21(4), p.361-377.
- Zenewicz, L.A. et al., 2007. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*, 27(4), p.647-659.
- Zenewicz, L.A. et al., 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*, 29(6), p.947-957.
- Zhang, L. et al., 2011. Elevated Th22 Cells Correlated with Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556937> [Consulté août 5, 2011].
- Zheng, Y. et al., 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445(7128), p.648-651.
- Zheng, Y. et al., 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine*, 14(3), p.282-289.

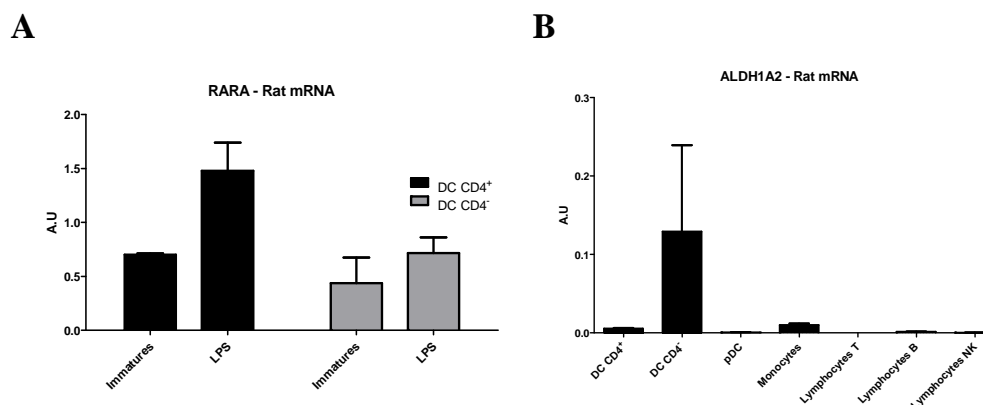
Annexes :

Annexe 1 : Stratégies employées pour l'isolement des populations cellulaires hématopoïétiques spléniques chez le rat



(A) Les lymphocytes T ont été triés sur la base de leur expression du TCR α/β . Au sein des cellules TCR α/β , les lymphocytes B ont été triés sur la base de leur expression du CD45R et du CD45RA, les lymphocytes NK sur la base de leur expression du NKR-P1. (B) Les monocytes ont été triés au sein des cellules CMH II⁺, CD103⁺, sur la base de leur expression du CD11b/c et CD172 α .

Annexe 2 : Expression de RAR α et de RALDH2 par les 2 sous-populations de ccDC spléniques chez le rat



(A) Expression de RAR α par les 2 sous-populations de cDC spléniques de rat immatures ou activées 24 heures avec du LPS. Les données sont représentatives de 2 expériences indépendantes. (B) Expression de RALDH2 par les différentes populations de cellules hématopoïétiques spléniques de rat. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm S.E.M.

Nom – Prénoms : Martin – Jérôme, Christophe

Titre du mémoire – thèse : Sources cellulaires et fonctions d'un récepteur soluble pour l'interleukine22 : l'interleukine 22 *bindingprotein*

Résumé du mémoire – thèse :

L'interleukine 22 est une cytokine de description récente. Ses sources cellulaires sont variées bien qu'uniquement représentées par des cellules du système immunitaire. Les cellules cibles de l'IL-22 sont principalement des cellules épithéliales, les hépatocytes et les cellules acineuses du pancréas. L'IL-22 semble importante dans le maintien de l'homéostasie épithéliale, particulièrement au niveau des barrières tissulaires. Pour autant, l'IL-22 peut s'avérer extrêmement délétère dans certaines conditions. Elle semble ainsi participer à l'entretien de l'inflammation dans le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde. L'IL-22 présente par ailleurs la particularité de posséder un récepteur soluble inhibiteur, l'IL-22BP. Très peu d'études ont jusqu'à présent tenté de le caractériser. Pourtant, cette protéine est produite de manière constitutive dans l'organisme, laissant supposer un rôle important dans la régulation de l'IL-22. Une meilleure compréhension de sa régulation et de son rôle biologique devrait permettre de mieux caractériser les actions de l'IL-22. L'étude de la place de l'IL-22BP en conditions infectieuses et inflammatoires pourrait par ailleurs faciliter la compréhension du rôle de l'IL-22 dans ces différents processus. L'objectif du présent travail a été de tenter de répondre à certaines questions encore non résolues sur l'IL-22BP, touchant particulièrement ses sources cellulaires, sa régulation et sa place dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. La résolution de ces questions apparaît nécessaire à la compréhension de l'axe IL-22/IL-22R, dans la perspective future du développement d'une nouvelle biothérapie ciblée.

MOTS CLÉS: INTERLEUKINE 22 ; INTERLEUKINE 22 *BINDING PROTEIN* ; CELLULES DENDRITIQUES ; IMMUNOPATHOLOGIE

Président du jury : M. Alain Pineau, Professeur de Toxicologie – Pharmacie - Nantes

Directeur de thèse : M. Régis Josien, Professeur d'Immunologie – Médecine - Nantes

Membres du jury : M. Mohamed Hamidou,

Professeur de Médecine Interne – Médecine - Nantes

Mme Marie Audrain,

Praticien Hospitalier Immunologie – Pharmacie - Nantes
