N° d'ordre 009-2016

Année 2016

Thèse d'Immunologie

présentée devant

Université Claude Bernard – Lyon 1

Pour l'obtention du

Diplôme de Doctorat

(arrêté du 7 Août 2006)

Ecole doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Inserm U1111 – CNRS UMR5308 – ENS Lyon – Université Lyon 1

Centre International de Recherche en Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement le 14 Janvier 2016 par

Gilles BOSCHETTI

IMPACT DE L'INFLAMMATION INTESTINALE SUR LA DYNAMIQUE ET LA FONCTION DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS

JURY

Pr Matthieu ALLEZ	Rapporteur
Dr Stéphane PAUL	Rapporteur
Pr Bernard FLOURIE	Président du Jury
Dr Michel MAILLARD	Examinateur
Dr Dominique KAISERLIAN	Directeur
Pr Stéphane NANCEY	Directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professuer Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maëutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BORUGEOIS
Insititut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSTANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. H. HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. J-C. PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord merci au Professeur Matthieu Allez d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse. J'espère pouvoir continuer à bénéficier de votre expertise dans le domaine de l'immunologie des MICI notamment au sein du GETAID et de REMIND.
Merci également au Docteur Stéphane Paul pour son rapport de thèse et ses conseils. Je souhaite vivement que nous continuions à collaborer sur des projets communs pour renforcer encore « l'axe Saint-Etienne – Lyon ».
Merci au Docteur Michel Maillard d'avoir bien voulu évaluer mon travail.

Monsieur Flourié, je vous remercie d'être à nouveau mon président de jury, mais surtout pour vos nombreux conseils et vos enseignements, aussi bien sur le plan clinique que pour les publications passées… et à venir !
Dominique, tu m'as fait découvrir l'immunologie et la recherche fondamentale depuis 2007. Un grand merci pour tes conseils et pour nos discussions. Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir fait confiance malgré mon emploi du temps « tiraillé » entre le laboratoire et la clinique…
Stéphane, plus de 10 ans que nous travaillons ensemble et tu m'impressionnes toujours autant par ton savoir et ton accessibilité. Un immense merci pour ton aide précieuse, quelle que soit l'heure du jour ou de la nuit ! Encore une étape passée et vivement la suite, de pouvoir continuer à avancer à tes côtés et mener à bien tous nos projets cliniques et de recherche !

Merci à tous les membres actuels ou passés de l'équipe de Dominique qui m'ont beaucoup appris et ont participé à mes recherches en particulier Reem, Emilie, Ludo, Thibaut, Fatima, Karine, Mathilde, Morgan, Rémi, Fériel, Sophie, Jean-Benoit…
Merci aussi à Hélena et Bertrand pour leurs conseils lors des réunions d'équipe ou de discussions informelles !
Merci aussi aux autres membres du CIRI, de la Tour Cervi ou de la Faculté Lyon-Sud pour les échanges scientifiques ou non !! Merci aussi à Anca Hennino et Mathias Chamaillard de mon comité de suivi de thèse.

Comment ne pas remercier aussi mes collègues médecins, secrétaires et infirmières qui ont dû « composer » avec mes absences pour la recherche… vive la « télé-médecine » parfois… et qui m'ont également soutenu au quotidien, en particulier Sarah, Marion, Hichem, Marielle, Catherine, Muriel, Florence, Géraldine, Corinne, Christine…

Un grand merci aussi à ma famille, mes parents et beaux-parents, Laurianne et Clémentine pour leur aide dans tous les domaines ! Une pensée également à mes amis. Merci à mes filles Jade, Lili et Juliette pour leur joie de vivre au quotidien et enfin un immense merci à Anne pour son amour et son soutien de chaque instant…

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 5

SOMMAIRE 7

ABREVIATIONS 9

INTRODUCTION 11

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 13

MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN 15
1. DEFINITION 15
2. HISTORIQUE 16
3. EPIDEMIOLOGIE DES MICI 16
4. PHYSIOPATHOLOGIE 18
4.1. Facteurs environnementaux 19
4.1.1. Tabagisme 19
4.1.2. Appendicectomie 19
4.1.3. Facteurs alimentaires 20
4.1.4. Facteurs psychologiques 20
4.1.5. Agents infectieux 20
4.1.6. Hypothèse de la chaîne du froid 21
4.1.7. Améliorations de l'hygiène 22
4.2. Facteurs génétiques 22
4.2.1. Agrégations familiales de MICI 22
4.2.2. Découverte du premier gène 23
4.2.3. Les autres gènes 24
4.2.4. Applications cliniques 25
4.3. Flore intestinale 25
4.4. Anomalies de la barrière intestinale 27
4.5. Anomalies des cellules épithéliales 29
4.6. Réponse immune et MICI 31
4.6.1. Anomalies de l'immunité innée 32
4.6.1.1. Récepteurs NOD et TLR 32
4.6.1.2. Activation anormale des voies de signalisation 33
4.6.1.3. Les cytokines au cours des MICI 34
4.6.1.4. Recrutement vers l'intestin des cellules de l'inflammation 37
4.6.1.5. Anomalies de l'apoptose au cours des MICI 38
4.6.2. Anomalies de l'immunité spécifique 38
4.6.2.1. Implication d'un excès d'effecteurs 39
4.6.2.2. Implication d'un défaut de LT régulateurs dans les MICI 39
4.6.2.3. Anomalies de la tolérance dans les MICI 40
5. TRAITEMENT ANTI-TNFα 41
5.1. Description et indications au cours des MICI 41
5.2. Principaux effets secondaires 43
5.3. Mécanismes d'action 44

LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET MICI 47
1. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS, CLASSIFICATION ET FONCTIONS 48
1.1. Les LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ naturels (nTreg) 48
1.2. Les LT régulateurs induits ou adaptatifs (iTreg) 49
1.2.1. Les lymphocytes T régulateurs $Foxp3^-$ induits (Tr1 et Th3) 49
1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs $Foxp3^+$ induits (iTreg $Foxp3^+$) 50
1.3. Distinction entre nTreg et iTreg 51
1.4. Les fonctions suppressives des Treg 53
1.4.1. Effet suppresseur direct sur les cellules effectrices 54
1.4.2. Effet suppresseur via les cellules présentatrices d'antigènes 56
2. INFLAMMATION INTESTINALE ET TREG 57
2.1. Implication des Treg au cours de l'inflammation intestinale 57
2.2. Recrutement des Treg dans l'intestin 59
2.3. Néoconversion de Treg dans l'intestin 60
2.4. Survie des Treg dans l'intestin 63
2.5. Fonctions suppressives des Treg dans l'intestin inflammatoire 63
2.6. Inhibition et réversibilité du statut régulateur au site inflammatoire 65

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS 67

PUBLICATION N°1 69
PUBLICATION N°3 115

DISCUSSION 143

1. LE TRAITEMENT PAR ANTICORPS ANTI-TNFα S'ACCOMPAGNE D'UNE AUGMENTATION DE LA FREQUENCE ET DE LA FONCTION SUPPRESSIVE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS $FOXP3^+$ CIRCULANT AU COURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN 143
1.1. Un défaut de fréquence et de fonction des Treg comme élément physiopathologique des MICI ? 143
1.2. Les Treg sont-ils des cibles du traitement par anticorps anti-TNFα ? 145
2. L'INFLAMMATION INTESTINALE INDUIT UNE ACTIVATION FONCTIONNELLE DES TREG $FOXP3^+$ MAIS DIMINUE LEUR CONVERSION A PARTIR DE LT $CD4^+$ 149
2.1. Les Treg participent au contrôle de la colite induite par le DSS 149
2.2. La colite DSS entraine une prolifération locale de Treg fonctionnels 151
2.3. Inhibition de la néo-conversion des Treg 153
3. PLASTICITÉ DES TREG 155
4. TRAITER LES MICI PAR LES TREG ? 157
5. SYNTHESE ET PERPECTIVES 159

CONCLUSION 165

ANNEXES 167

PUBLICATIONS ANNEXES N°1 167
PUBLICATIONS ANNEXES N°2 195

BIBLIOGRAPHIE 207

ABREVIATIONS

ADA : Adalimumab
ADP : Adénosine diphosphate
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATG16L1 : Autophagy-related 16-like 1
ATP : Adénosine triphosphate
CARD 15 : Caspase activation recrutement domain
CD : Cluster of differenciation
CDAI : Crohn disease activity index
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CRP : C-réactive protéine
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC : Cellule dendritique
DSS : dextran sodium sulfate
Ebi3 : Epstein-Barr virus induced gene 3
eGFP : Enhanced green fluorescent protein
Foxp3 : Forkhead winged hélix box p3
GALT : Gut associated lymphoid tissue
GITR : Glucocorticoid-induced TNF-receptor related protein
ICOS : Inducible costimulator
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFX : Infliximab
IFNγ : Interferon gamma
IL : Interleukine
IPEX : Immune dysregulation polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked syndrome
IRGM : Immunity-related GTPase family, M
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
LAG-3 : Lymphocyte activation gene 3
LB : Lymphocyte B
LPS : lipopolysaccharide
LRR : Leucine rich region
LT : Lymphocyte T
MAP : Mycobacterium avium paratuberculosis
MC : Maladie de Crohn
MDP : Muramyl dipeptide
MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel
PD-1 : Program death-1
qPCR : PCR quantitative
RA : Acide rétinoïque

Rag : Recombination activating gene
RCH : Rectocolite hémorragique
RE : Réticulum endoplasmique
RR : Risque relatif
SCID : Severe combined immunodeficiency
sTNFR : Forme soluble du récepteur au TNFα
Tconv : Lymphocyte T conventionnel
TCR : Récepteur de l'antigène des cellules T
Teff : Lymphocyte T effecteur
TGFβ : Transforming growth factor β
Th : T Helper
TLR : Toll like receptor
TNBS : Trinitrobenzene sulfonic acid
TNFα : Tumor necrosis factor α
TNFR : Récepteur au TNFα
Treg : Lymphocyte T régulateur
UPR : Unfolded protein response

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), sont des affections cryptogénétiques évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Leur physiopathologie fait intervenir une prédisposition génétique et une réponse immunitaire exaggérée vis-à-vis de certains constituants de la flore digestive. Cette rupture de la tolérance muqueuse s'explique par un déséquilibre entre d'une part les cytokines pro et anti-inflammatoires et d'autre part entre les cellules effectrices et les cellules régulatrices. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui expriment le facteur de transcription Foxp3 ont un rôle bien démontré dans le contrôle de l'inflammation intestinale chez l'animal dans les modèles murins de colite et chez l'homme au cours des MICI. En dépit d'une efficacité prouvée dans les pathologies inflammatoires de l'intestin, le mode d'action précis des biothérapies anti-TNFα reste mal connu, en particulier leur impact sur la sous-population de Treg. Nous avons fait l'hypothèse que les anticorps anti-TNFα pouvaient induire des modifications des Treg circulants en terme de fréquence, phénotype et/ou fonction suppressive. Nous avons testé notre hypothèse en réalisant une étude prospective chez des patients atteints de MICI en poussée, naïfs d'anti-TNFα et nécessitant la mise en route de ce traitement. La proportion et les caractéristiques phénotypiques des Treg avant et après anticorps anti-TNFα ont été déterminées par cytométrie en flux et l'impact des biothérapies sur la fonction suppressive des Treg a été mesuré à l'aide d'un test fonctionnel *in vitro*. La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude des conséquences de l'inflammation intestinale sur les Treg dans un modèle de colite au DSS en terme de phénotype et de fonction suppressive. L'influence de l'inflammation sur le phénomène de néo-conversion des Treg sera également analysée dans ce modèle. Enfin, la troisième partie de ce travail est consacrée à l'étude de la dynamique des principales populations de Teff et Treg durant les périodes de rémission de la MC et leur relation avec le risque de rechute. L'évolution dans le temps des fréquences et nombre des lymphocytes Treg, Th1 et Th17 circulants dans une cohorte de patients avec une MC en rémission clinique a été étudiée.

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

1. DEFINITION

Le terme de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupe principalement la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée » qui présente les caractéristiques d'une colite idiopathique pour laquelle il subsiste un doute diagnostic entre MC et RCH malgré l'ensemble des examens réalisés **(Figure 1)**. La MC peut atteindre la totalité du tube digestif avec une prédilection pour la région iléo-caecale alors que la RCH touche exclusivement le rectum et une partie plus ou moins étendue du colon. Les MICI sont des affections dites cryptogénétiques dont l'origine est multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux, génétiques et immunologiques. Une réponse immunitaire exacerbée contre certains constituants de la flore, sur un terrain génétique prédisposé, serait responsable de l'inflammation intestinale chronique (Bouma et al., 2003). L'évolution des MICI se fait généralement de manière intermittente avec alternance de poussées évolutives imprévisibles entrecoupées de périodes de rémission plus ou moins longues. Les MICI ne s'accompagnent pas d'une surmortalité significative mais leur évolution chronique chez de jeunes patients (préférentiellement entre 20 et 30 ans), les traitements médicamenteux et le recours à la chirurgie d'exérèse sont responsables d'une morbidité importante et d'une altération notable de la qualité de vie des malades.

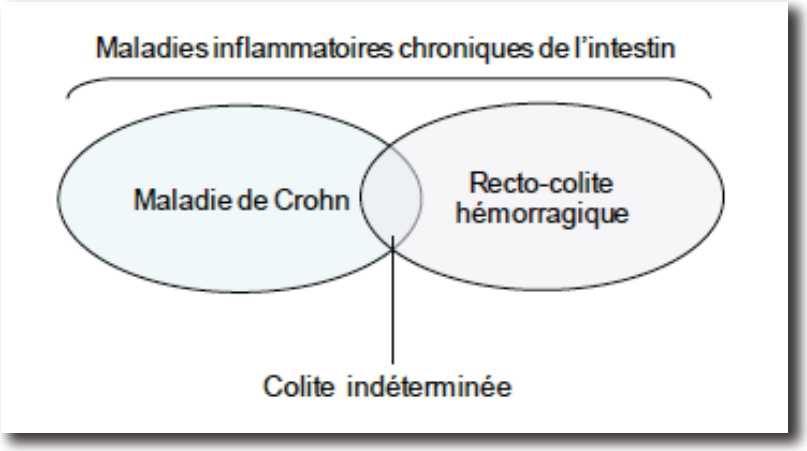


Figure 1 : Représentation schématique des pathologies reprises sous le terme de MICI.

2. HISTORIQUE

Les MICI semblent affecter l'homme depuis plusieurs siècles comme en attestent certaines descriptions anatomo-cliniques sommaires mais compatibles avec le diagnostic de MICI datant de l'Antiquité (textes du IIème siècle après J.-C. des médecins grecs Soranus et Arétée de Cappadoce). La MC fut décrite pour la première fois par le chirurgien allemand, Wilheilm Fabry en 1623 (Wilhelm Fabry, 1964).

En 1837, le médecin écossais John Abercrombie consacre dans son ouvrage plus de 80 pages « aux affections inflammatoires de la membrane muqueuse du canal intestinal ». Il y décrit déjà, sur des comptes rendus d'autopsies, les lésions retrouvées dans la MC et la RCH, mais il ne propose pas un cadre syndromique. Wilks et Moxon, en 1875, décrivent bien les aspects anatomo-cliniques de la RCH et proposent l'appellation « ulcerative colitis » (ou UC). C'est Hale White qui en détermine le cadre nosologique en 1895. Quant à la MC, si Moschowitz et Wilensky, en 1923 et 1927, furent les premiers à parler de « granulome non spécifique de l'intestin grêle », la paternité de cette maladie revient, en 1932, à Crohn et ses collaborateurs Ginsberg, Oppenheimer et Berg du Mount Sinaï Hospital (New York), qui rapportèrent dans le « Journal of the American Medical Association » 14 cas d'iléite terminale (Burril et al., 1984). En réalité, la MC avait déjà été décrite 19 ans auparavant par Sir T. Kennedy Dalziel, dans le « British Medical Journal », où il rapportait une iléite terminale et surtout une inflammation intestinale transmurale chez 13 patients souffrant d'obstruction intestinale (Daziel, 1989).

3. EPIDEMIOLOGIE DES MICI

Les MICI sont des maladies considérées comme rares avec toutefois une incidence qui varie fortement selon les pays. En France, on estime que plus de 100 000 personnes sont atteintes de MICI. Les premières données épidémiologiques françaises datent de la fin des années 80 avec une étude regroupant près de 6 millions d'habitants des régions Nord-Pas-de-Calais, Somme et Haute-Normandie (Gower-Rousseau et al., 1994). C'est ensuite la création du registre EPIMAD dans le Nord-Ouest de la France qui permet encore aujourd'hui d'enregistrer les cas incidents de MICI avec un recul de plus de 20 ans.

En Europe, l'incidence de la MC varie de 0,7 à 10,7 pour 100 000 habitants et celle de la RCH de 3,9 à 17 alors que la prévalence de la MC varie de 8,3 à 214 pour 100 000 habitants et celle

de la RCH de 21,4 à 294 (Loftus et al., 2004). La France et la Belgique sont les deux seuls pays où l'incidence de la MC est supérieure à celle de la RCH (Gower-Rousseau et al., 1996). En France, l'incidence standardisée moyenne de la MC est de 6,4/100 000 habitants, alors que celle de la RCH est de 3,8/100 000 habitants. En Amérique du Nord, l'incidence de la MC varie de 3,9 à 15,6 pour 100 000 habitants et celle de la RCH de 2,3 à 15,6 alors que la prévalence de la MC varie de 44 à 199 pour 100 000 contre 37,5 à 230 pour la RCH. L'incidence et la prévalence des MICI en Asie, Amérique du Sud et Afrique restent faibles comparées à celles observées dans les pays occidentaux, mais celles-ci ont augmenté rapidement principalement au Japon, en Corée du Sud, en Australie et en Afrique du Sud (Loftus et al., 2004) **(Figure 2)**.

Il existe donc un gradient Nord-Sud avec une fréquence des MICI plus élevée dans les pays du Nord (Europe et USA) les plus industrialisés que dans les pays en voie de développement (Asie et Afrique). Le gradient Nord-Sud existe également en Europe et aux USA.

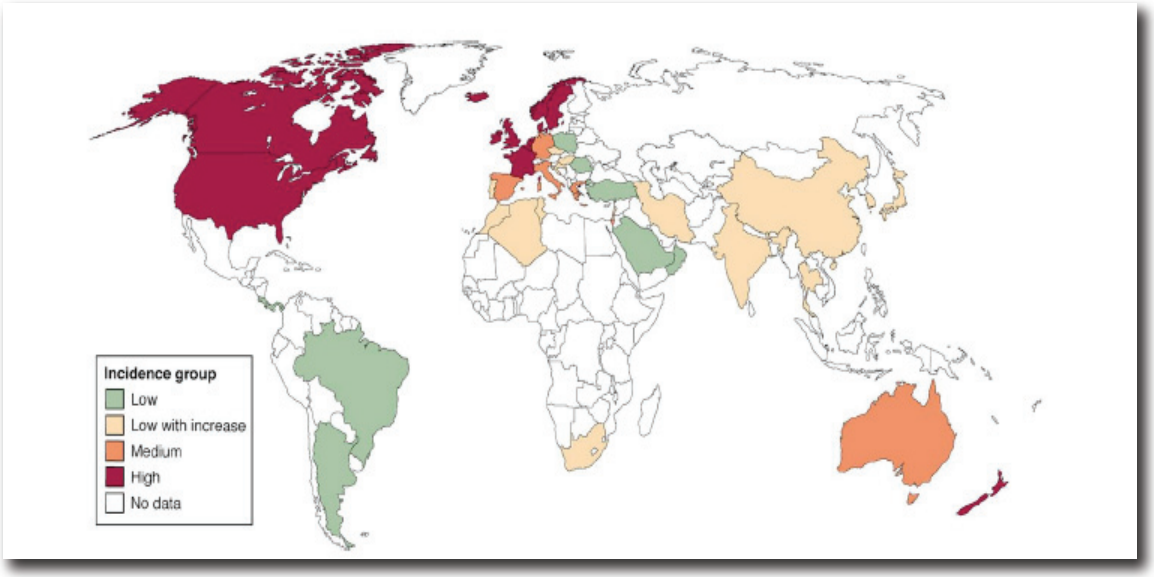


Figure 2 : Incidence des MICI dans le monde.

La couleur rouge correspond à une incidence annuelle supérieure à 10 pour 10^5 habitants, orange à une incidence de 5 à 10 pour 10^5 habitants, vert à une incidence inférieure à 4 pour 10^5 habitants et jaune à une faible incidence mais en constante augmentation (d'après Molodecky et al., 2012).

4. PHYSIOPATHOLOGIE

La physiopathologie des MICI reste encore incomplètement connue et fait intervenir des facteurs environnementaux et génétiques, des anomalies de la barrière intestinale et de la réponse immune et inflammatoire **(Figure 3)** . Une réponse immunitaire inappropriée vis-à-vis des constituants de la flore intestinale survenant sur un terrain génétique prédisposé, correspondant à une rupture de tolérance orale à certains antigènes bactériens de la flore commensale digestive, constitue l'hypothèse physiopathologique la plus couramment admise.

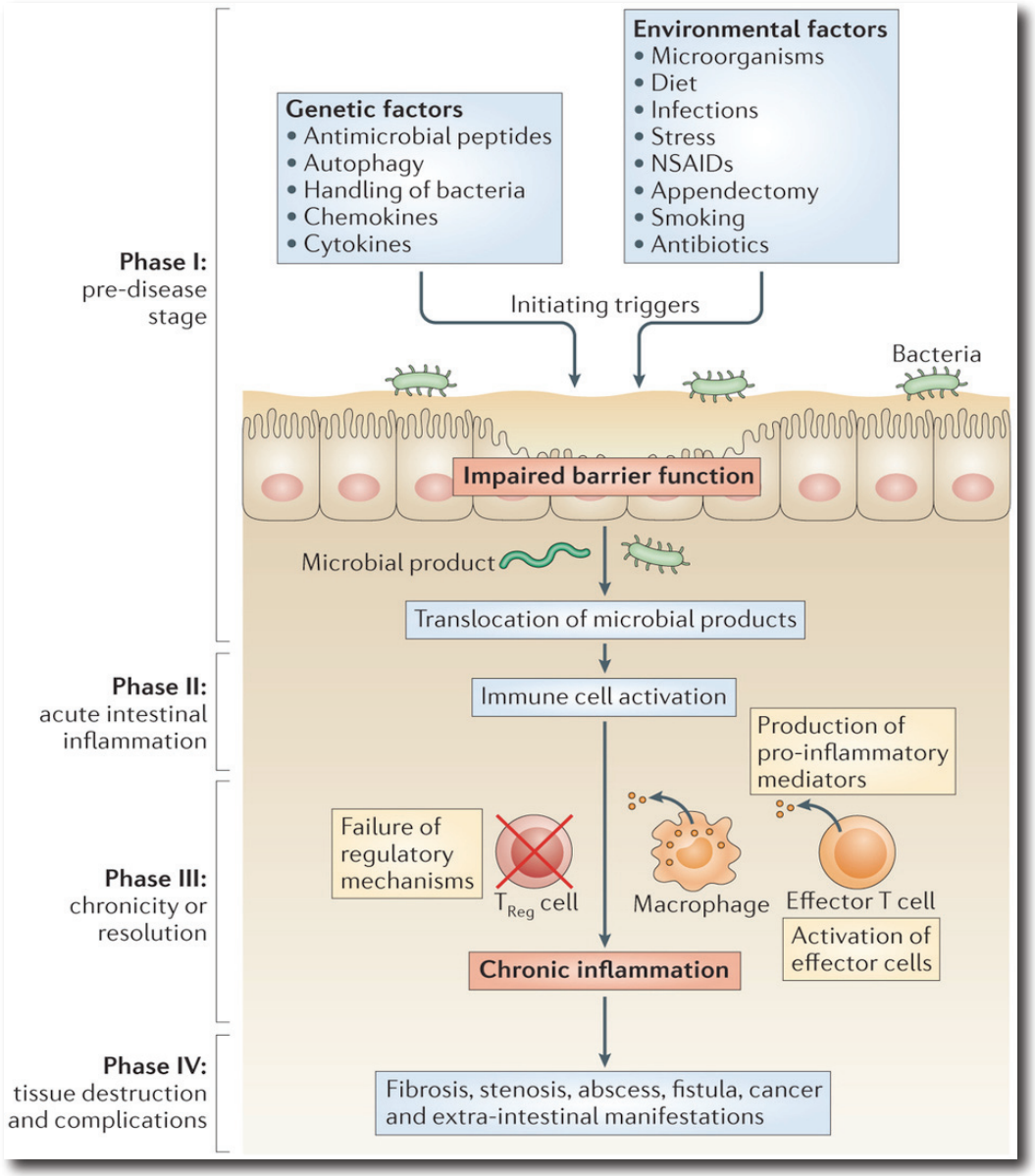


Figure 3 : Principaux facteurs intervenant dans la physiopathologie des MICI (d'après Neurath, 2014).

4.1. Facteurs environnementaux

Leur impact dans la survenue des MICI est suggéré par l'augmentation d'incidence de la MC depuis les années 50, par les variations d'incidence chez les migrants (Pinsk et al., 2007), par l'absence de concordance parfaite entre jumeaux homozygotes (Spehlmann et al., 2008) et par l'existence de formes conjugales statistiquement plus fréquentes que ne le voudrait le hasard.

4.1.1. Tabagisme

Le tabac a une influence clairement démontrée à la fois sur le déclenchement mais également sur l'évolutivité des MICI. Cette influence est toutefois opposée puisque le tabac protège de la RCH et améliore son évolution alors qu'il favorise le développement de la MC et aggrave son évolution. Ainsi, le risque relatif (RR) de développer une RCH est deux fois et demi plus faible chez le fumeur par rapport au non-fumeur. La RCH du sujet fumeur est par ailleurs moins grave, nécessitant plus rarement le recours à la corticothérapie et plus tardivement à la colectomie. L'effet bénéfique du tabac semble notamment être lié à l'augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus au niveau du colon (Calkins, 1989 ; Odes et al., 2001). *A contrario*, le risque relatif de développer un MC est deux fois plus élevé chez les fumeurs que chez les sujets n'ayant jamais fumé (Cosnes et al., 2004). Le nombre de poussées est en moyenne augmenté de 50 % chez le fumeur avec prescription plus fréquente de corticoïdes par voie systémique ou d'immunosuppresseurs. Il existe également un sur risque de chirurgie et de récidive post-opératoire précoce en cas de tabagisme. Même une consommation faible de tabac semble avoir des effets délétères sur l'évolution de la MC (Cosnes et al., 2001 ; Sokol et al., 2010). L'effet négatif du tabac sur la MC serait en rapport avec des modifications vasculaires de la microcirculation intestinale impliquant aussi des phénomènes immunitaires et inflammatoires. Bien que la relation entre le tabac et les MICI soit clairement établie, plusieurs éléments indiquent que le tabac serait avant tout un facteur modulant l'inflammation intestinale et ne peut être responsable à lui seul du développement des MICI (Bastida et al., 2011).

4.1.2. Appendicectomie

L'appendicectomie pour appendicite diminue significativement le risque de survenue de la RCH dans un grand nombre d'études avec une réduction relative du risque de RCH d'environ 70% (Andersson et al., 2001). Chez les patients appendicectomisés qui développent une RCH, celle-ci est d'évolution moins grave avec un recours plus rare à la colectomie (Cosnes et al., 2002). L'effet bénéfique de l'appendicectomie est cumulatif avec celui du tabagisme sur

l'histoire naturelle de la RCH. Dans le cadre de la MC, l'appendicectomie n'est pas associée à un effet protecteur mais semblerait au contraire, dans certaines études, avoir un rôle délétère et constituer une forme d'entrée dans la maladie (Russel et al., 1997).

4.1.3. Facteurs alimentaires

Plusieurs études cas-témoins ont trouvé une association significative entre la consommation de saccharose et la MC (RR = 4). De manière moins évidente la consommation de graisse et la diminution des fibres alimentaires ont été incriminées. Toutefois, les difficultés méthodologiques inhérentes aux études diététiques ainsi que l'existence de résultats contradictoires interdisent toute conclusion quant au rôle précis des facteurs alimentaires dans la genèse des MICI y compris l'impact de la consommation de sucres rapides. Le rôle de l'allaitement maternel est encore très discuté avec des études aux résultats opposés qui ne permettent pas de conclure. Des anticorps dirigés contre divers constituants alimentaires (protéines de lait de vache, levure de boulanger) ont été retrouvés avec une fréquence et des titres anormalement élevés dans le sérum de certains malades atteints de MICI. Ceci s'expliquant habituellement par l'augmentation de la perméabilité intestinale notamment au cours de la MC (Jantchou et al., 2006).

4.1.4. Facteurs psychologiques

Le rôle du stress dans le développement des MICI est incriminé par près de la moitié des malades, entretenant l'idée reçue d'une origine psychosomatique de l'affection. Les résultats des différentes études sur ce thème ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer cette « impression » clinique (Li et al., 2004). De la même manière, le rôle du stress dans le déclenchement des poussées de MICI reste controversé chez l'homme alors que celui-ci est bien établi chez l'animal comme facteur aggravant des colites induites (Qiu et al., 1999).

4.1.5. Agents infectieux

Plusieurs agents infectieux ont été incriminés dans la genèse des MICI, c'est le cas notamment du virus de la rougeole, de *Listeria monocytogenes*, d'*Helicobacter pylori* et de certaines mycobactéries atypiques. La responsabilité du vaccin contre la rougeole peut raisonnablement être écartée compte tenu des données actuelles (Seagroatt et al., 2003). *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) a été suggéré comme responsable de la MC car cette bactérie entraine une inflammation gastro-intestinale chez les ruminants appelée « maladie de Johne » qui présente de nombreuses similitudes cliniques et histologiques avec la MC (Sartor, 2005). La transmission de MAP à l'homme pourrait être due à l'ingestion de viande, de lait ou d'eau

contaminés (Abubakar et al., 2007 ; Patel et al., 2011). Le rôle de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) et des autres bactéries intracellulaires repose sur le fait que les mutations du gène NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain 2) observées dans la MC seraient responsables d'un défaut de l'immunité innée à l'origine d'une accumulation de ces germes dans la muqueuse intestinale, provoquant ainsi une stimulation chronique de l'immunité cellulaire. Mais, l'association entre la détection d'une bactérie (*Mycobacterium paratuberculosis, Listeria monocytogenes,…*) et les MICI pourrait alors seulement être le reflet d'une faille dans l'immunité innée et non un facteur déclenchant de la maladie. Des études ont mis en avant le rôle possible d'*Escherichia coli* adhérent/invasif (ECAI) dans la pathogénie de la MC. Cette bactérie, retrouvée dans 22 à 36% des lésions des patients ayant une MC, ne synthétise pas de facteur de virulence mais est capable d'adhérer à l'épithélium intestinal, d'envahir les cellules et de se multiplier. La phagocytose d'ECAI par les macrophages induit un stress cellulaire et une forte synthèse de cytokines pro-inflammatoires (en particulier TNF) à l'origine de lésions de la muqueuse digestive. De plus, les patients atteints de MC expriment à la surface des cellules épithéliales iléales des niveaux élevés du récepteur CEACAM6, responsable de l'adhésion d'ECAI (Barnich et al., 2007; Abraham et al., 2007).

4.1.6. Hypothèse de la chaîne du froid

La théorie de la chaîne du froid propose qu'une exposition chronique à des bactéries psychotrophes (proliférant entre -1°C et +10°C) soit impliquée dans la pathogénie de la MC (Hugot et al., 2003). L'émergence de la MC pourrait être liée notamment à deux bactéries entéro-pathogènes, *Yersinia* et *Listeria* présentes dans les aliments et dont la croissance est favorisée par la réfrigération. L'augmentation de l'incidence de la MC semble parallèle à l'avènement puis la généralisation de la réfrigération en Europe et en Amérique du Nord. Plusieurs arguments physiopathologiques sont en faveur de l'implication de *Yersinia enterocolitica* et *pseudotuberculosis* dans la pathogénie de la MC. Ainsi, ces deux bactéries sont capables d'envahir la muqueuse intestinale et d'entrainer la formation d'abcès et d'ulcérations. Plusieurs aspects cliniques et morphologiques de la yersiniose sont d'ailleurs similaires à ceux de la MC, en particulier la présence de granulomes (Forbes et al., 2006 ; Malekzadeh et al., 2009). L'ADN de *Yersinia enterocolitica* et *pseudotuberculosis* a également été mis en évidence dans les lésions muqueuses de patients atteints de MC. De plus, il a été démontré que des souris déficientes pour le gène NOD2/CARD15 présentaient une grande susceptibilité à l'infection par *Yersinia pseudotuberculosis.*

4.1.7. Améliorations de l'hygiène

L'hypothèse dite de « meilleure hygiène » est souvent mise en avant pour expliquer le gradient Nord-Sud de la MC et l'augmentation de fréquence des MICI depuis les années 1950. Ainsi, l'amélioration des conditions d'hygiène, par la réduction de l'exposition aux maladies infectieuses avec ses conséquences sur le système immunitaire, favoriserait la survenue ultérieure de maladies allergiques, auto-immunes et de maladies inflammatoires chroniques comme la MC (Gent et al., 1994). Plusieurs études semblent corroborer cette hypothèse notamment le taux plus faible d'IgG anti *Helicobacter pylori* et la plus grande incidence d'eczéma chez les patients atteints de MC (Halme et al., 1996) mais également la quasi inexistence des MICI dans les populations en contact permanent avec des bactéries et des parasites potentiellement pathogènes (Scaldaferri et al., 2007).

4.2. Facteurs génétiques

L'influence des facteurs génétiques a été établie suite à la mise en évidence d'une agrégation familiale des cas de MICI, de prévalences différentes selon les groupes ethniques et d'une concordance d'environ 40% de MC chez les jumeaux monozygotes. Ce pourcentage de concordance implique néanmoins une contribution égale de facteurs environnementaux aux MICI. Ainsi, les MICI sont définies comme des maladies complexes, c'est-à-dire ne présentant pas une transmission de type mendélienne (récessive, dominante, liée au chromosome X) mais résultant de l'interaction de plusieurs gènes de susceptibilité et de facteurs environnementaux.

4.2.1. Agrégations familiales de MICI

Une prédisposition génétique aux MICI a été suspectée suite à l'observation d'une incidence supérieure de MICI dans les familles ayant un membre atteint d'une de ces pathologies par rapport à la population générale (Orholm et al., 1993; Probert et al., 1993). En effet, de 10 à 25% des malades atteints de MC présentent une histoire familiale de MC ou de RCH. Le RR de développer la MC pour un parent au premier degré d'un sujet atteint de MC est compris entre 15 et 42 et le RR de développer une RCH est situé entre 7 et 17, pour un parent au premier degré d'un sujet atteint de RCH (Kuster et al., 1989 ; Meucci et al., 1992 ; Orholm et al., 1993).
Les études chez les jumeaux ont permis d'évaluer la part respective des facteurs génétiques et environnementaux. Une maladie purement génétique aura une concordance de 100% chez des jumeaux monozygotes et de 50% chez des jumeaux dizygotes. Si aucun facteur génétique n'est impliqué, ces concordances seront identiques pour chaque type de jumeaux. Dans la MC,

les larges études réalisées en Suède, Danemark et Grande-Bretagne ont montré un taux de concordance pour les jumeaux monozygotes de 20 à 50% alors que les taux de concordances pour les jumeaux dizygotes avoisinent les 10% (Halfvarson et al., 2003 ; Orholm et al., 2000; Tysk et al., 1988). Dans la RCH, le taux de concordance entre jumeaux monozygotes est de 13 à 19% et de 0 à 5% entre jumeaux dizygotes (Orholm et al., 2000; Tysk et al., 1988). Ces données confirment une forte contribution génétique à la pathogénie des MICI, probablement plus importante dans la MC que dans la RCH.

4.2.2. Découverte du premier gène

La première étude « génome entier » pour la MC a été effectuée par Hugot et al. en 1996, qui a mis en évidence par la stratégie du gène candidat, une association entre une région péricentromérique du chromosome 16 (IBD1) et la MC (Hugot et al., 1996), association ensuite confirmée par une large étude européenne (Curran et al., 1998). Cette découverte fut la première confirmation moléculaire d'une contribution génétique à la MC. De nombreuses études ont, par la suite, largement validé cette association qui est spécifique de la MC et qui n'a pas été retrouvée dans le cadre de la RCH (Ohmen et al., 1996 ; Cavanaugh et al., 2001). Une étude plus fine de la région IBD1 (Hugot et al., 2001) ainsi qu'une étude d'un gène localisé dans cette région et codant pour une protéine pouvant être impliquée dans la reconnaissance bactérienne (Ogura et al., 2001) ont permis d'identifier le premier gène prédisposant à la MC : NOD2. NOD2, rebaptisé par la suite CARD15 (Caspase Activation Recrutement Domain), code pour une protéine comprenant un domaine carboxy-terminal riche en leucine (Leucine Rich Region : LRR) nécessaire à la reconnaissance des motifs muramyl-dipeptide (MDP) de la paroi bactérienne, deux domaines impliqués dans l'oligomérisation de la protéine (NOD et NAD) et deux domaines CARD (Ogura et al., 2001). Trois mutations (R702W, G908R, et 1007fs) sont prépondérantes au niveau de ce gène (Lesage et al., 2002) et sont présentes chez environ 50% des patients atteints de MC, contre une fréquence de 10-20% dans la population générale ou chez les patients atteints de RCH (Lesage et al., 2002). Le risque relatif de développer une MC est de 2,20 à 4,09 chez les sujets hétérozygotes pour l'une de ces mutations et environ de 17,1 pour les homozygotes ou les hétérozygotes composites (Economou et al., 2004). Ces mutations, ainsi que la plupart (93%) des mutations actuellement décrites, sont localisées dans le domaine LRR de la protéine et entraîneraient une perte de reconnaissance des motifs MDP de la paroi bactérienne (Netea et al., 2005). L'implication de ce gène dans la susceptibilité génétique à la MC confirme ainsi l'importance des bactéries endoluminales et de la réponse immunitaire.

Les mutations de CARD15 n'expliqueraient toutefois que 20% de la prédisposition génétique à la MC et de nombreux autres gènes sont donc impliqués dans cette prédisposition.

4.2.3. Les autres gènes

Depuis l'identification d'IBD1, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence d'autres régions chromosomiques associées spécifiquement à la MC, à la RCH ou aux MICI en général. Une étude plus fine de certaines de ces régions (par l'étude d'un plus grand nombre de marqueurs génétiques) ou une approche par le gène candidat (un gène localisé dans cette région est choisi en considérant la fonction de sa protéine), ont permis de mettre en évidence plus de 170 loci de gènes impliqués dans cette prédisposition génétique (McGovern et al., 2015 ; Lees et al., 2011) **(Figure 4)**. Des polymorphismes associés à la MC ont été rapportés pour plusieurs gènes codant pour la réponse immunitaire innée comme NOD1 (CARD4) (McGovern et al., 2005) ou les récepteurs Toll avec les TLR4 et TLR9 (Franchimont et al. 2004). Des mutations du gène du récepteur de l'interleukine 23 (IL-23R) porté sur le chromosome 1 ont été rapportées comme ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la MC (Duerr et al., 2006; Cummings et al., 2007). Ces variants du gène de l'IL-23R confèrent une réduction par 4 du risque de développer une MC. Cependant, l'incidence de ces variants protecteurs de la MC est faible puisque seulement un individu sur 6 en est porteur. Ce gène code pour une sous-unité du récepteur de l'IL-23, cytokine inflammatoire essentielle à l'induction de l'inflammation dans des modèles de colites induites par la présence de bactéries (Hue et al. 2006). De même, le gène DLG5 (Disk Large Gene 5) a aussi été rapporté comme un gène de susceptibilité pour la MC et peut-être pour la RCH. La fonction de DLG5 est mal connue mais pourrait contribuer au maintien des structures épithéliales (Stoll et al., 2004). Des variants des gènes ATG16L1 (Autophagy-related 16-like 1) et IRGM (Immunity-related GTPase family, M) impliqués lors des processus d'autophagie ont également été identifiés comme facteur de risque de la MC (Barrett et al., 2008). Enfin, les mutations du gène NLRP3 (NOD-like receptor pryin domain containing 3) codant pour la cryopyrine, protéine qui est en fait un capteur bactérien intracellulaire jouant un rôle clé dans le déclenchement de la réponse immunitaire en contrôlant l'inflammasome, ont récemment été associées à la pathogénie de la MC (Villani et al. 2009).

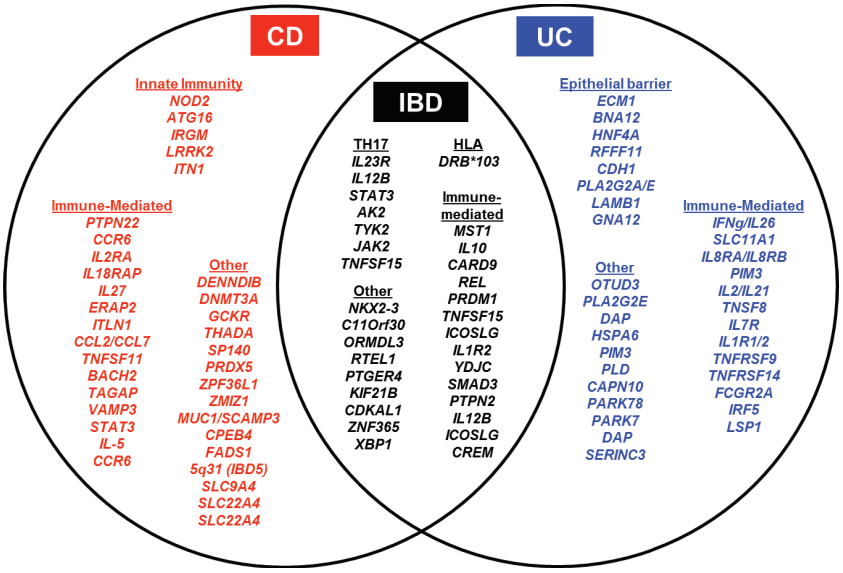


Figure 4 : Loci de susceptibilité génétique dans le cadre des MICI (d'après Lees et al. 2011).

4.2.4. Applications cliniques

Des corrélations phénotypes-génotypes de CARD15 ont été rapportées avec une apparition plus précoce de la MC, une localisation préférentiellement iléale et un phénotype sténosant observé plus souvent chez les patients ayant deux mutations par rapport aux patients non porteurs de mutations CARD15 (Lesage et al., 2006; Radford-Smith et al., 2006). Sur le plan thérapeutique, il est légitime de se demander si le génotypage de CARD15/NOD2 est utile à la prédiction de l'effet des traitements. Vermeire et al. ont ainsi montré que le génotypage de NOD2 ne permettait pas d'augurer ni la réponse, ni la toxicité au traitement par les anticorps anti-TNFα (infliximab) puisque le taux de réponse était similaire chez les patients porteurs ou non de la mutation (Vermeire et al., 2002). En conséquence, actuellement il n'y a pas d'intérêt, en pratique clinique courante, à génotyper les patients pour les gènes prédisposant à la MC. Dans un avenir proche, le génotypage des formes pédiatriques précoces dites « Very Early Onset IBD (VEOIBD) » impliquant plus volontiers des mutations du récepteur à l'Interleukine-10 (IL-10R) pourrait être proposé (Moran et al., 2013). De même, certains profils génétiques impliquant les lymphocytes T CD8 seraient associés à une évolution plus péjorative de la MC (Lee et al., 2011).

4.3. Flore intestinale

Le microbiote intestinal ou flore intestinale est l'ensemble des microorganismes présent dans le tube digestif. L'être humain héberge 10^{14} bactéries dans son tractus gastro-intestinal soit

environ 10 fois plus de microorganismes qu'il n'est constitué de cellules eucaryotes humaines (Sasaki et al., 2012). L'analyse de sa composition a été rendue possible par l'arrivée des techniques de séquençage de l'ADN permettant ainsi de s'affranchir des limites de la culture. Cette avancée considérable a permis de révéler l'incroyable richesse du microbiote intestinal. Ce dernier serait composé, chez un individu adulte, de 500 à 1000 espèces bactériennes différentes réparties selon 4 phyla (groupes) bactériens majoritaires : Firmicultes, Bacteroidetes, Actinobacteries et Protéobactéries. Le phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif) représente près de 80% du microbiote, il est constitué majoritairement des groupes *Clostridium coccoides* et *Clostridium leptum* avec notamment l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*. Les deux autres phyla, Bacteroidetes et Actinetobactéries représentent respectivement 17 et 7% des bactéries de la flore inestinale. Le dernier phyla, les Protéobactéries ne représentent que quelques pourcents des bactéries totales. La flore intestinale qui contribue au développement et à la maturation du GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) au cours de l'ontogénie, intervient également dans l'expression des MICI et la chronicité de l'inflammation intestinale (Guarner et al., 2003). En effet, dans la quasi-totalité des modèles animaux de colite spontanée ou induite par des agents chimiques ou chez des souris transgéniques, l'inflammation intestinale est absente ou réduite chez les souris axéniques et peut réapparaitre si l'animal est secondairement exposé à un environnement conventionnel (Elson et al., 1995). Chez l'homme, plusieurs observations confirment la contribution de la flore au développement de l'inflammation intestinale au cours des MICI. Tout d'abord, la topographie des lésions de la MC, préférentiellement iléales et coliques qui constituent les segments où les concentrations bactériennes sont les plus élevées est en faveur (Shanahan, 2000). Ensuite, l'efficacité préventive et curative des traitements antibiotiques (notamment la ciprofloxacine et le métronidazole) dans les MICI suggère que la flore intestinale participe à ces pathologies (Perencevich et al., 2006). Bien que l'on ne connaisse pas la nature des bactéries en cause, l'effet bénéfique des probiotiques sur l'inflammation intestinale, en particulier dans la pouchite (inflammation du réservoir iléal réalisé dans les suites d'une résection complète du côlon avec anastomose iléo-anale) laisse penser qu'un déséquilibre de la composition des bactéries commensales pourrait être en cause dans l'initiation et/ou la perpétuation de l'inflammation (Gionchetti et al., 2000). Les arguments les plus convaincants sont observés dans la rechute post-opératoire de la MC. En effet, les patients opérés avec une résection intestinale et chez lesquels une stomie d'amont permet de protéger l'anastomose intestinale du flux fécal, ne récidivent pas alors que la rechute de la MC est quasi systématique en l'absence de dérivation du flux fécal. Cet effet protecteur de la diversion du flux fécal est abrogé rapidement si l'on réinstille le contenu fécal

de la poche de stomie dans l'intestin d'aval ou si l'on rétablit la continuité digestive. Une étude a ainsi montré qu'une récidive précoce pouvait être observée dès la première semaine après le début de l'instillation (Rutgeerts et al., 1991). Cette récidive n'apparait pas si le contenu de la poche de stomie est filtré afin d'éliminer les bactéries intestinales (Harper et al., 1985). Enfin, des taux anormaux d'anticorps dirigés contre différentes bactéries de la flore commensale (*Bacteroides, Streptococcus faecalis, Escherichia coli*) sont détectés dans le sérum des patients atteints de MC (Tabaqchali et al., 1978) et une réactivité anormale des lymphocytes T (LT) de la *lamina propria* de l'intestin à la flore autologue a été mise en évidence dans la MC (Duchmann et al., 1995). Cependant, cette réponse immunitaire anti-flore pourrait être plus la conséquence que la cause de la rupture de la barrière épithéliale et ne permet pas d'expliquer l'évolution récidivante des MICI. On peut ainsi faire l'hypothèse que certaines bactéries de la flore de patients ayant une MICI (habituellement absente dans la flore de sujets sains) puissent activer le système immunitaire de l'intestin et conduire à l'inflammation et aux lésions de l'intestin. Plusieurs équipes ont identifié une souche d'*Escherichia coli*, les AIEC (*Adherent Invasive E. coli*), dans les lésions précoces et chroniques de l'iléon terminal chez 21 % des patients avec une MC contre 6 % des sujets normaux (Swidsinski et al., 2002; Martin et al., 2004). Des études ont par ailleurs montré une réduction de la biodiversité des espèces bactériennes dans l'intestin au cours des MICI (Ott et al., 2006; Sokol et al., 2006). Cette réduction affecte essentiellement la famille du *Clostridium coccoides* et *Leptum* dans la MC (Sokol et al., 2007). D'autres travaux ont rapporté des modifications de la composition de la flore avec une augmentation des entérobactéries, une diminution des bifidobactéries et la présence de bactéries dominantes inhabituelles au cours des MICI (Seksik et al., 2003; Sokol et al., 2006). Ainsi, un déficit en *Faecalibacterium prausnitzi*, bactérie douée de propriétés anti-inflammatoires, a été rapporté récemment dans la MC (Sokol et al., 2008). Toutes ces données sont en faveur d'une dysbiose, c'est-à-dire d'une altération dans la richesse et les fonctions du microbiote qui pourrait, dans les MICI, participer à l'initiation et/ou à l'entretien de la maladie. Il reste toutefois difficile de conclure quant au rôle inducteur et/ou amplificateur de la dysbiose au cours des MICI (Swidsinski et al., 2002; Walker et al., 2011).

4.4. Anomalies de la barrière intestinale

Chez l'animal**,** des anomalies de la barrière épithéliale intestinale, induites par l'administration d'un toxique (le dextran sodium sulfate) ou spontanées chez la souris N-cadhérine négative, conduisent au développement d'une colite. Ces données illustrent l'importance de l'épithélium intestinal comme principale interface vis-à-vis du contenu de la lumière

intestinale. Une rupture de cette barrière s'accompagne de l'entrée massive de micro-organismes intraluminaux dans la paroi de l'intestin suivie d'une activation du GALT et d'une inflammation de l'intestin. Chez l'homme, la barrière intestinale est altérée au cours des MICI en poussée. Le mucus, qui protège l'épithélium intestinal, les jonctions serrées, qui sont responsables de l'étanchéité épithéliale, la production de peptides antimicrobiens protégeant l'épithélium des infections et enfin la perméabilité intestinale sont anormales. Ainsi, des modifications de la production et de la composition du mucus (réduction des cellules à mucus, déséquilibre de la composition des mucines) sont observées dans la MC et dans la RCH (Podolsky et al., 1983). Le mucus sert à la fois de barrière physique et chimique face aux agents bactériens. Sa viscosité protège l'épithélium en limitant l'adhésion des microorganismes et la pénétration des toxines bactériennes et les différents éléments constituant le mucus notamment des immunoglobulines (IgA), des peptides antimicrobiens comme les défensines et les lectines assurent une activité antimicrobienne directe (Roda et al., 2010; Swidsinski et al., 2007). Les anomalies du mucus pourraient favoriser le contact de constituants toxiques contenus dans la lumière (composants ou produits bactériens, xénobiotiques, chimiques d'origine alimentaire) avec l'épithélium intestinal (Podolsky et al., 1988). De plus, des altérations des jonctions serrées de l'épithélium intestinal (E-cadhérine, N-cadhérine, Occludine) et un nombre accru de cellules épithéliales de l'intestin en apoptose ont été observés dans la MC en poussée (Schulzke et al., 2006). Ces anomalies des jonctions serrées ont été attribuées à l'excès d'IFNγ et de TNFα dans la muqueuse intestinale (Schulzke et al., 2006) et sont particulièrement présentes chez les patients porteurs de mutations du gène NOD2-CARD15 (Buhner et al., 2006). Enfin, la perméabilité intestinale est accrue dans la MC et la RCH en poussée, favorisant ainsi le passage paracellulaire des antigènes intraluminaux et leur contact avec les leucocytes de la muqueuse intestinale (Mankertz et al., 2007). Des travaux soulignent aussi la participation du TNFα dans l'altération de la barrière épithéliale. Ainsi, *in vitro*, le TNFα favorise le passage des antigènes à travers la barrière intestinale épithéliale en stimulant l'ouverture des jonctions serrées (Bruewer et al., 2003). *In vivo*, les anticorps anti-TNFα améliorent les anomalies de la perméabilité intestinale au cours de la MC en poussée (Suenaert et al., 2002). Cependant, l'augmentation de la perméabilité, qui favorise l'induction d'une réponse immunitaire T et B vis-à-vis des composants de la flore intestinale, n'est pas spécifique des MICI et peut être observée dans d'autres pathologies inflammatoires de l'intestin (maladie cœliaque, par exemple).

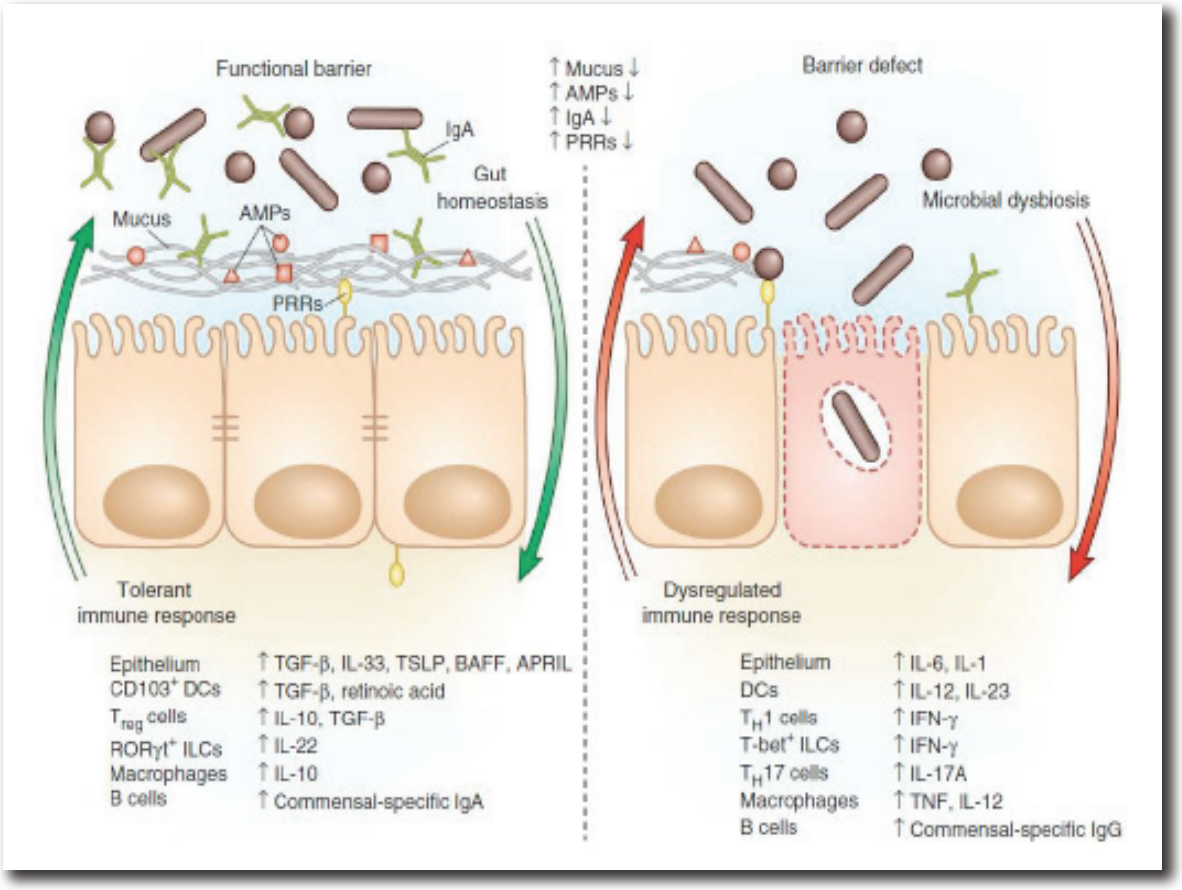


Figure 5 : Représentation de la barrière intestinale à l'état d'homéostasie et en situation pathologique (AMPs = Anti-Microbial peptides; PRPs = Patern Recognition Receptor).

4.5. Anomalies des cellules épithéliales

Comme nous l'avons décrit précédemment, les MICI sont caractérisées par des anomalies de l'épithélium. Ainsi au cours de la RCH, un des phénomènes le plus reconnu est la perte de la mucosécrétion qui est précoce, importante et très caractéristique de la maladie. La cellule à mucus semble donc une excellente candidate pour initier l'inflammation. De fait, les animaux, avec une altération des mucines, développent une colite spontanée. Dans un modèle murin muté pour le gène Muc2 (Heazlewood et al., 2008), il a été montré que l'inflammation était associée à un défaut de résolution du stress du réticulum endoplasmique (RE). La mutation de Muc2 entraîne une inhibition des modifications post-traductionnelles nécessaires à la maturation et à l'export de la protéine. Cela entraine un engorgement du RE où se déroule cette fonction et ainsi un stress cellulaire. La cellule à mucus met alors en place une réponse spécifique (unfolded protein response ou UPR) qui induit une inflammation colique. Récemment E. Ogier-Denis et X. Tréton ont décrit un modèle murin s'approchant de la physiopathologie de la RCH humaine avec une inflammation spontanée, superficielle,

continue, purement colique, débutant dans le rectum, associée à une perte de mucosécrétion et à des abcès cryptiques, évoluant vers des adénocarcinomes coliques et une cholangite sclérosante et répondant aux traitements usuels de la RCH (Tréton et al., 2014). Ce modèle est caractérisé au niveau moléculaire par un défaut de résolution du stress du RE. Cette anomalie du stress du RE est exactement superposable à ce qui est observé chez les malades (Tretons et al., 2011). Elle est aussi observée dans de multiples autres modèles animaux (IL10KO, IRE1BKO, XBP1KO, AGR2KO) (Mizoguchi et al., 2015). L'ensemble de ces observations récentes suggère qu'une sensibilité exacerbée au stress du RE de la cellule à mucus pourrait participer à la physiopathologie des MICI et en particulier de la RCH. Le stress cellulaire pouvant lui-même provenir d'une cause génétique, environnementale (xénobiotiques), infectieuse, etc. Toutes les cellules sécrétrices dont la fonction principale est la synthèse de protéines en grande quantité sont sensibles au stress du RE. Dans l'intestin, les cellules de Paneth sécrètent des peptides et protéines ayant pour fonction de contrôler la prolifération microbienne dans les cryptes et le mucus de surface. Une sensibilité des cellules de Paneth au stress du RE a été montrée et un déficit de la réponse UPR spécifique de ces cellules est associé à une iléite chez l'animal suggérant un rôle dans les MICI chez l'homme (Hosomi et al., 2015). L'idée que la cellule de Paneth joue un rôle clé dans la MC est ancienne. Chez l'homme, elle a été argumentée par l'observation d'un déficit de production de défensines dans la MC, d'une expression spécifique de NOD2 dans les cellules de Paneth et d'une association entre certains variants génétiques des défensines et la MC. Ainsi, des souris déficitaires pour les gènes ATG16L1 et XBP1 (variants également identifiés chez l'homme) présentent des anomalies morphologiques et fonctionnelles des cellules de Paneth (Adolph et al., 2013). Par ailleurs, les cellules de Paneth humaines ont des anomalies comparables, appelées crinophagies et caractérisées par une autophagie des granules de sécrétion (Thachil et al., 2012).

Les recherches génétiques ont permis d'identifier plusieurs gènes associés à la MC et impliqués dans l'autophagie (ATG16L1, IRGM, LRRK2, NOD2) (Salem et al., 2015). L'autophagie est un processus cellulaire de formation de vacuoles intra-cytoplasmiques qui aboutit à la séquestration puis la dégradation d'organelles ou de complexes protéiques dégradés. Ce processus peut aussi participer à la lutte contre les bactéries intracellulaires (on parle de xénophagie). Les mutations des gènes de l'autophagie associées à la MC sont caractérisées par une perte de fonction, suggérant qu'un défaut de clairance des bactéries intracellulaires est un facteur de risque de la maladie. Cette hypothèse renvoie à celle du rôle de bactéries potentiellement pathogènes dans la MC. Par ailleurs, autophagie et UPR sont des fonctions biologiques reliées et il est possible que les deux anomalies associées soient nécessaires pour que se développe une inflammation iléale (Hosomi et al., 2015) **(Figure 6)**.

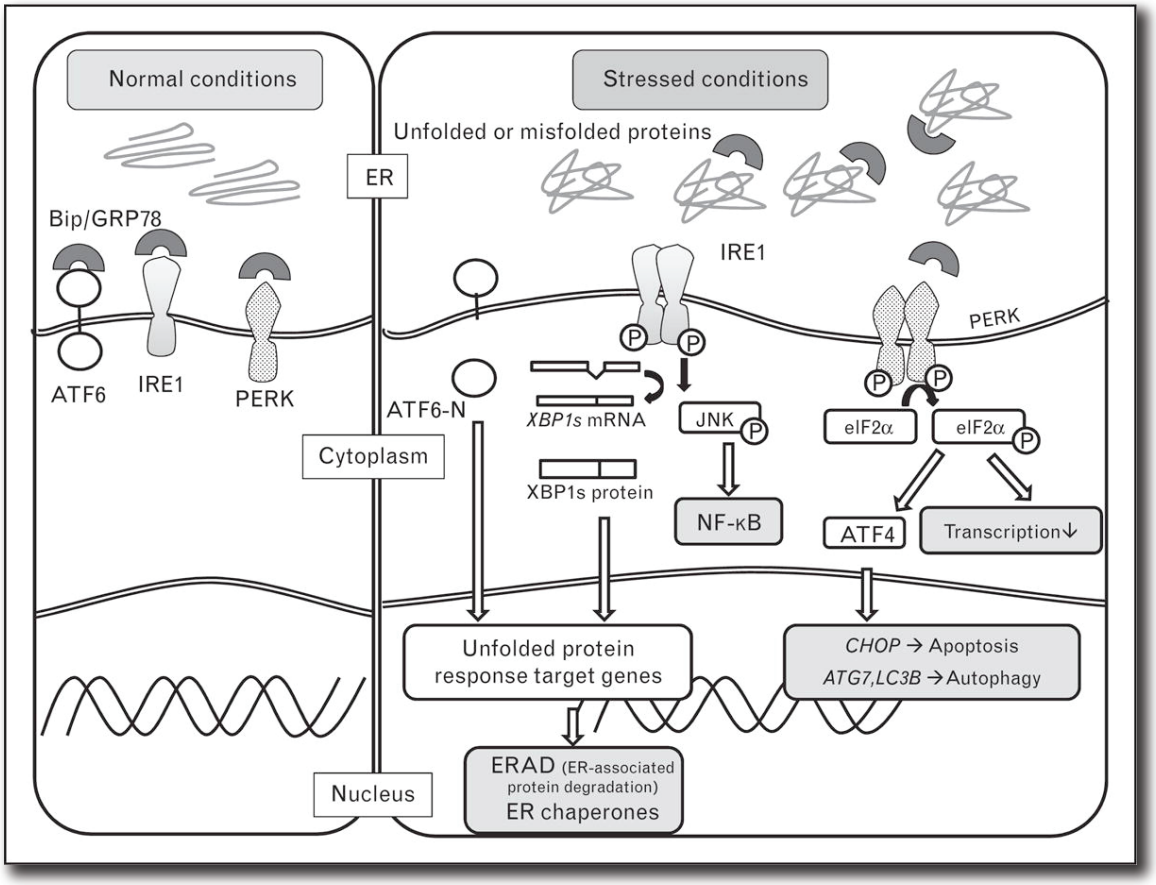


Figure 6 : Stress du réticulum endoplasmique et lien avec l'autophagie (d'après Hosomi et al., 2015).

4.6. Réponse immune et MICI

La dysrégulation du système immunitaire muqueux est caractérisée au cours des MICI par des anomalies des réponses immunitaires innées et spécifiques (adaptatives). Concernant la réponse immunitaire innée qui correspond à la première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes, une cascade de mécanismes est mise en jeu. Le premier est la stimulation anormale des cellules résidentes dans la muqueuse intestinale, à l'origine de l'activation de voies de transduction (voies NFκB et des kinases de stress). Cette activation permettra la production de médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines) qui seront également impliqués dans le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sanguines dans la paroi intestinale *via* la surexpression de molécules d'adhésion. Ces deux premiers mécanismes vont aboutir à la formation, dans la paroi intestinale, d'un infiltrat de cellules pro-inflammatoires activées. Un dernier mécanisme pathologique, caractérisé par une inhibition des mécanismes de mort naturelle des cellules (apoptose), entraîne une augmentation de la survie de ces cellules pro-inflammatoires dans la muqueuse intestinale et donc la chronicité de

l'inflammation. Concernant la réponse immunitaire spécifique, une rupture de la tolérance vis-à-vis de sa propre flore intestinale semble être impliquée faisant intervenir un déséquilibre entre différentes sous-populations de lymphocytes T (effecteurs et régulateurs).

4.6.1. Anomalies de l'immunité innée

4.6.1.1. Récepteurs NOD et TLR

L'identification du gène NOD2/CARD15 qui correspond comme nous l'avons vu précédemment à un récepteur de reconnaissance de la flore intestinale, a placé l'immunité innée au cœur de la physiopathologie des MICI (Cho, 2001 ; Fritz et al., 2006). Les familles des Toll-like récepteurs (TLR) et des récepteurs NOD (famille NLR) font partie d'un système de reconnaissance qui intervient en première ligne dans la défense anti-infectieuse de l'organisme (Meylan et al., 2006) et joue un rôle clé dans l'immunité innée. Les TLR et les NLR possèdent un domaine enrichi en leucine (domaine LRR), qui permet la reconnaissance spécifique de motifs moléculaires portés par certains composants des bactéries pathogènes ou commensales tels que le lipopolysaccharides (LPS), le muramyl dipeptide (MDP), le peptidoglycane, la flagelline… La localisation de ces protéines dans la cellule, transmembranaire pour les TLR et intracytoplasmique pour les récepteurs NOD, et la variété des cellules exprimant ces récepteurs permet à ce système non spécifique et complexe, bien qu'ancestral, d'intervenir précocement et de manière étendue contre les pathogènes. Dans le cadre de l'immunité innée, les récepteurs NOD et TLR jouent un rôle dans l'activation cellulaire par la voie NFκB et synergisent l'apoptose cellulaire par la voie des caspases.

Les souris invalidées pour NOD2 ne développent pas d'inflammation intestinale spontanée mais présentent une hyperplasie du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Barreau et al., 2010). Parallèlement, on observe également une augmentation de leur perméabilité intestinale et de la translocation bactérienne à travers les plaques de Peyer. Parmi les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse, on observe un excès de lymphocytes T $CD4^+$ activés sécrétant du TNFα et de l'IFNγ. Cet effet est probablement lié à la perte d'inhibition de NOD2 sur la voie d'activation Th17 à l'état normal (cf infra). Or, ces deux cytokines sont connues pour augmenter la perméabilité intestinale comme nous l'avons décrits précédemment. Il existe donc un cercle vicieux entre activation du système immunitaire muqueux et augmentation de la perméabilité intestinale, celle-ci laissant passer les antigènes et produits bactériens qui activent en retour la réponse immune.

De manière remarquable, NOD2 a récemment été identifié comme un puissant inducteur de l'autophagie. Ainsi, une interaction entre NOD2 et ATG16L1 semble être nécessaire pour la

destruction par autophagie de pathogènes intracellulaires (Travassos et al., 2010) **(Figure 7)**. Cette interaction entre NOD2 et ATG16L1 paraît également indispensable à la présentation d'antigènes bactériens par les cellules dendritiques et ainsi l'induction d'une immunité cellulaire T vis-à-vis des composés bactériens (Cooney et al., 2010).

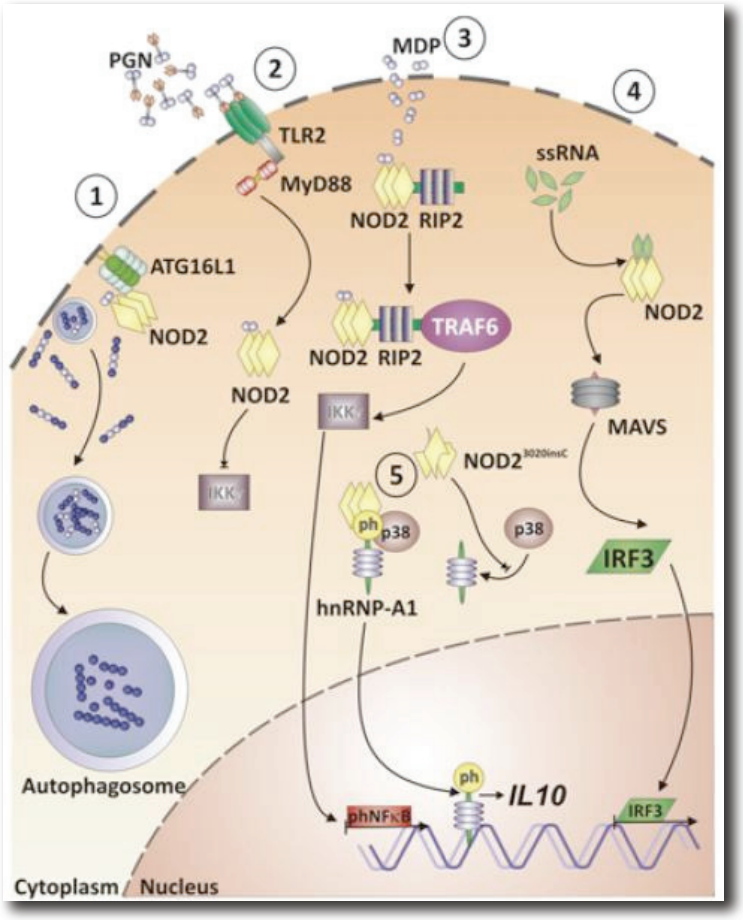


Figure 7 : Cascades de signalisations intracellulaires et liens NOD2 - autophagie (d'après Fritz et al., 2011).

4.6.1.2. Activation anormale des voies de signalisation

Certaines voies de transduction du signal sont impliquées dans les MICI comme les voies NFkB/IkB, les kinases de stress ou les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK). L'activation de la voie NFkB, est caractérisée par une cascade de phosphorylation à l'origine de la dégradation d'une protéine inhibitrice IkB qui conduit à la translocation de NFkB dans le noyau de la cellule. Une fois dans le noyau, NFkB va se fixer sur des séquences consensus de l'ADN et activer différents gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (TNFα, IL-6, IL-1β). Cette voie de signalisation joue un rôle dans les MICI en stimulant la production de cytokines proinflammatoires et en activant la sécrétion par les LT de cytokines de type 1 et 2 (Barnes et

al., 1997). La voie des MAPK comporte plusieurs dizaines de facteurs de transcription intra-cytoplasmiques qui sont activés par des facteurs du stress, modulant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la réaction inflammatoire intestinale et la prolifération cellulaire. Les MICI se caractérisent par une augmentation de l'activation des voies du NFκB/IκB et des MAPK dans la muqueuse intestinale. Même si les inhibiteurs de la voie du NFκB (oligonucléotide antisens codant pour la p65 de NFκB ou inhibiteur enzymatique) et des MAPK (anti-p35) ont une efficacité thérapeutique chez l'animal, les résultats d'essais de traitements par des inhibiteurs de la voie NFkB (oligonucléotides anti-sens codant pour la sous-unité p65) chez l'homme sont décevants. Ces discordances pourraient s'expliquer par la mise en évidence récente chez la souris du rôle clé de la voie NFkB dans le maintien de l'homéostasie intestinale et de l'intégrité de la barrière épithéliale (Nenci et al., 2007).

4.6.1.3. Les cytokines au cours des MICI

En cas de MC, les lésions intestinales sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines proinflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-6). Le TNFα, produit principalement par les macrophages activés de la *lamina propria,* est exprimé dans les lésions intestinales au niveau de la muqueuse, la sous-muqueuse et la séreuse. Le TNFα a également été détecté en immunohistochimie dans les granulomes inflammatoires, dans le centre germinatif des follicules lymphoïdes et au niveau de la graisse mésentérique (Dubuquoy et al., 2002). Le TNFα joue un rôle central dans la physiopathologie des MICI et d'autres maladies inflammatoires rhumatologiques et dermatologiques **(Figure 8)**.

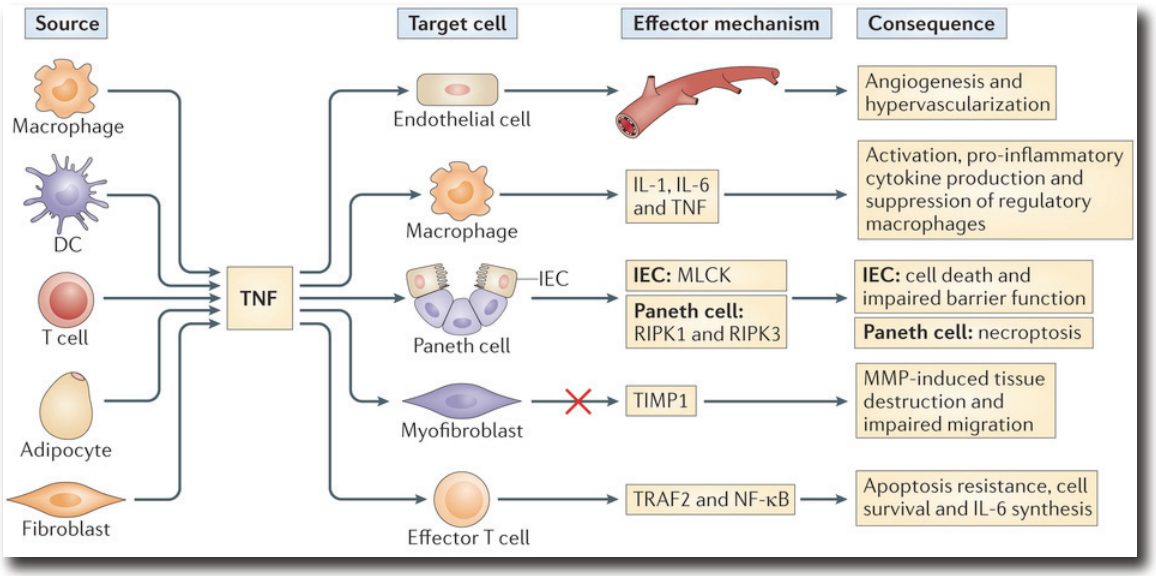


Figure 8 : TNFα, cellules cibles et mécanismes d'action (d'après Neurath et al., 2014).

Bien que des résultats contradictoires soient publiés, il semble que la concentration des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGFβ) soit normale dans la muqueuse intestinale des patients ayant une MICI en rémission. En somme, un déséquilibre de la balance entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires caractérise les zones inflammatoires des MICI et ne semble pas affecter la muqueuse non lésionnelle.

Parmi les modèles animaux d'inflammation intestinale, on distinguait classiquement les modèles dits Th1 des modèles Th2. Les premiers présentent plutôt des similitudes avec la MC (souris IL-$10^{-/-}$, Souris Scid reconstituées, colite au TNBS). Ils sont induits par des LT $CD4^{+}$, qui produisent dans l'intestin des cytokines de type Th1 (IFNγ, IL-2) sous le contrôle de l'IL-23 et de l'IL-12 produit par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Neurath et al., 2002). Les modèles de colite Th2 (colite à l'oxazolone) ressemblent plutôt à la RCH et se caractérisent par une production accrue d'IL-4 (Heller et al., 2002). Chez l'homme, des techniques quantitatives d'analyse de la concentration des cytokines présentes dans la muqueuse intestinale des patients ayant une MICI ont établi que les cytokines de type 1 (IFNγ) caractérisaient plutôt la MC tandis que celles du type 2 (IL-4, IL-13) étaient préférentiellement associées à la RCH. Dans certains modèles animaux de colite, le profil de sécrétion de cytokines varie en fonction de l'ancienneté des lésions intestinales. En effet, les lésions aiguës sont plutôt associées à une augmentation de la sécrétion de cytokines Th1 tandis que les lésions chroniques sont caractérisées par un profil Th2 (Spencer et al., 2002). Chez l'homme, cette variation de la sécrétion préférentielle des cytokines existe même si elle est inversée par rapport à celle chez l'animal comme l'ont montré Desreumaux et al. dans le modèle post-opératoire de la MC (Desreumaux et al., 1997).

En 2005, la description d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T (LT) auxiliaires appelés Th17, distincte des LT Th1 ou Th2 et caractérisée par sa capacité à sécréter de l'IL-17, a bouleversé le schéma de la réponse inflammatoire induite par les LT auxiliaires (Harrington et al., 2005; Weaver et al., 2006). On sait aujourd'hui que les LT Th17 sont impliqués dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires aussi variées que l'asthme, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, l'uvéite, le lupus érythémateux disséminé, le rejet de greffe et les MICI (Furuzawa-Carballeda et al., 2007). La lignée Th17 est caractérisée par la production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 par des LT $CD4^{+}$ mémoires stimulés par l'IL-6 et l'IL-23 (Mangan et al., 2006) **(Figure 9)**. Les cytokines de type Th17 induisent le recrutement des neutrophiles et la sécrétion de métalloprotéases par les fibroblastes mais aussi la synthèse d'IL-22 qui induit la sécrétion de peptides antimicrobiens, de molécules réparatrices (e.g. Reg3g) et de mucines. Une fréquence accrue de lymphocytes Th17, des taux élevés d'IL-17 et d'IL-23 dans l'intestin ont été identifiés dans les principaux modèles murins de colite (Zhang et

al. 2006) et au cours des poussées de MICI (Fujino et al., 2003). Le nombre de cellules exprimant le facteur RORγt, essentiel à la différenciation et à la fonction Th17, est aussi accru dans l'intestin des patients présentant une MC (Seiderer et al., 2008). Récemment, le CD161 et le NKG2D ont été identifiés comme deux marqueurs de surface des LT Th17 produisant de l'IL-17 au cours de la MC en poussée (Kleinschek et al., 2009; Pariente et al., 2011). Ces travaux suggèrent que la population Th17 pourrait jouer un rôle clé à la fois sur l'immunité innée et spécifique et pourrait participer à la réaction inflammatoire intestinale (Veldhoen et al., 2006; Bi et al., 2007). Toutefois, les cytokines Th17 ont donc plusieurs facettes d'activité et les anti-IL-17 n'ont pas montré d'efficacité dans la MC à ce jour (Hueber et al., 2012; Colombel et al., 2013). Les cytokines de la famille de l'IL-12 sont particulièrement augmentées dans la MC et le déficit de NOD2 dans les cellules dendritiques participe à la sécrétion d'IL-12. Elles contribuent à une orientation Th17 pro-inflammatoire des lymphocytes. Les anticorps dirigés contre la sous-unité IL-12p40 commune avec l'IL-23 (ustekinumab) ont par ailleurs une efficacité dans le traitement de la MC (Sandborn et al., 2012).

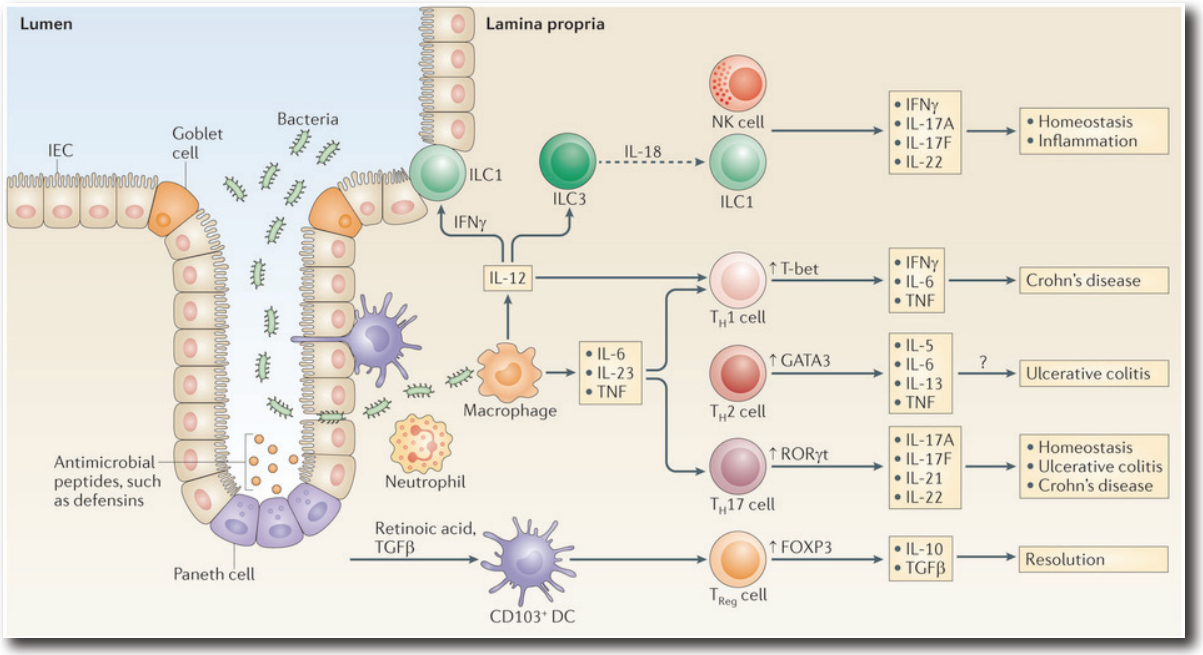


Figure 9 : Principales cytokines impliquées dans la physiopathologie des MICI (d'après Neurath, 2014).

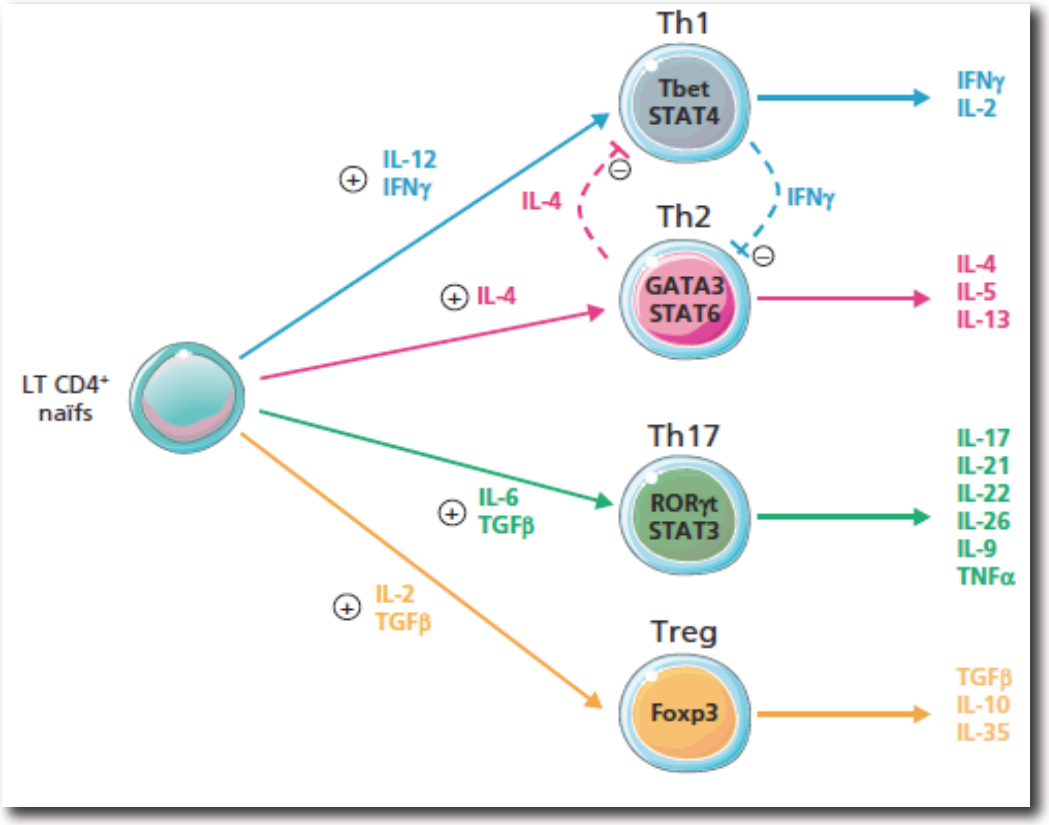


Figure 10 : Capacité de différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires (« helper ») de type Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs et profils respectifs de sécrétion de cytokines (d'après Boschetti et al., 2012).

4.6.1.4. Recrutement vers l'intestin des cellules de l'inflammation

L'infiltrat inflammatoire dans le chorion de l'intestin des patients atteints de MICI en phase active est caractérisé essentiellement par la présence de cellules mononuclées (LT, monocytes-macrophages) et de polynucléaires neutrophiles. Le recrutement plus ou moins sélectif des leucocytes activés du sang vers l'intestin est possible grâce à des interactions complexes entre des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (E- et P-sélectines, PNAD, MadCAM-1, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) et sur les leucocytes (intégrines $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_L\beta_{2...}$) (von Andrian et al., 2003). Chez l'homme, au cours des MICI en poussée, une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion est décrite, permettant d'amplifier et perpétuer la réponse inflammatoire par le recrutement intestinal des cellules inflammatoires. Ces molécules d'adhésion constituent une nouvelle cible thérapeutique des MICI (Ghosh et al., 2003; Lobaton et al., 2014) **(Figure 11)**.

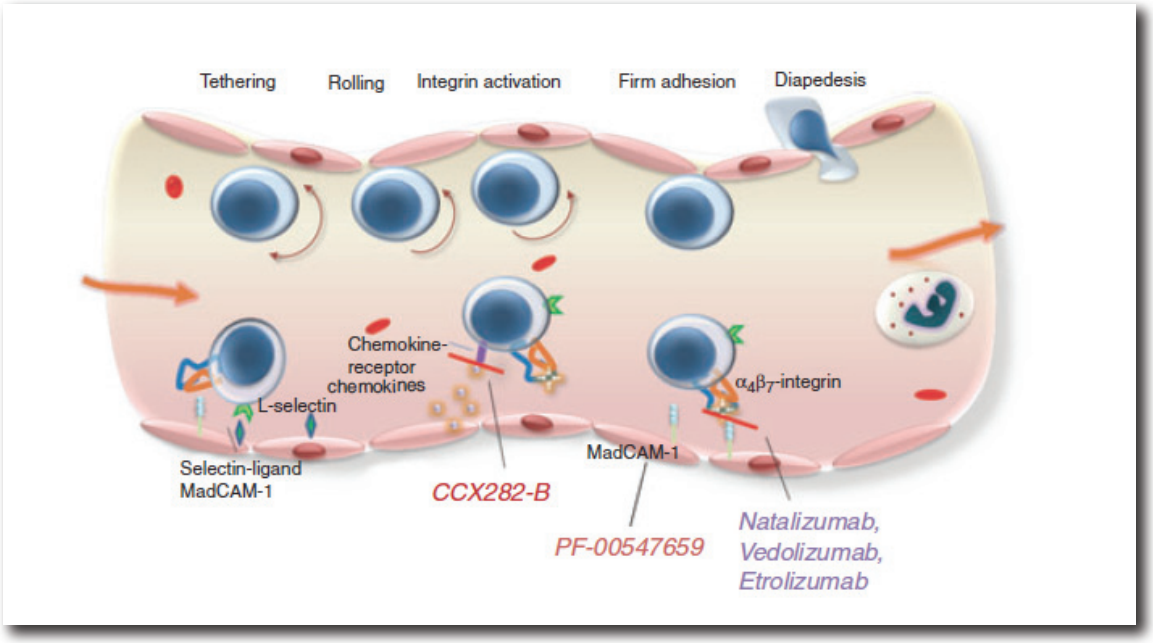


Figure 11 : Mécanisme d'action des molécules d'adhésion dans l'endothélium intestinal et leur blocage par les médicaments (d'après Lobaton et al., 2014).

4.6.1.5. Anomalies de l'apoptose au cours des MICI

Au cours des MICI, il existe ainsi une diminution de l'apoptose des LT présents dans la *lamina propria* (Lugering et al., 2006). Des voies différentes de l'apoptose sont anormales dans la MC comparativement à la RCH (Doering et al., 2004). Au cours de la MC, la voie mitochondriale (voie intrinsèque) de l'apoptose est altérée. En revanche, dans la RCH, c'est la voie extrinsèque impliquant les récepteurs de mort et en particulier l'interaction Fas-Fas-ligand (CD95-CD95L) qui est anormale (Souza et al., 2005). Une surexpression de l'inhibiteur FLIP du complexe Fas-FasL serait responsable d'une réduction de l'activation de la voie des caspases responsables de l'apoptose des LT. Ces anomalies s'accompagnent de l'activation inappropriée des facteurs anti-apoptotiques (STAT-3, bcl-2, bcl-xl). La résistance à l'apoptose des LT au cours des MICI pourrait favoriser la survie de cellules à potentiel inflammatoire. Un des mécanismes d'action des anticorps anti-TNFα serait l'induction de l'apoptose des LT *via* le $TNFR_{II}$ et les macrophages intestinaux (Atreya et al., 2011).

4.6.2. Anomalies de l'immunité spécifique

Au cours des MICI, un déséquilibre de la balance entre les cellules effectrices et régulatrices pourrait être à l'origine de l'inflammation et des lésions. Les modèles animaux d'inflammation

intestinale illustrent le concept qu'un excès de cellules T effectrices et/ou un défaut de cellules T régulatrices conduit au développement d'une inflammation intestinale (Bouma et al., 2003).

4.6.2.1. Implication d'un excès d'effecteurs

La plupart des modèles de colite chez la souris (Elson et al., 1995) ainsi que certaines données obtenues chez les patients avec une MC en poussée (Probert et al., 1996)**,** suggèrent que l'inflammation intestinale coïncide avec une augmentation dans le sang et surtout dans la muqueuse intestinale du nombre de lymphocytes T $CD4^+$ activés et de la production locale de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (Fuss et al., 1996). La participation des LT $CD4^+$ dans l'inflammation intestinale a été établie chez la souris dans différents modèles de colite à l'aide de transferts adoptifs chez les souris Scid ou $RAG^{-/-}$ (Neurath et al., 2002). Chez l'homme, la participation des LT $CD4^+$ à l'inflammation intestinale a conduit à des essais thérapeutiques ciblant sélectivement cette sous-population de LT. Deux approches distinctes ont été évaluées, l'une utilisant un traitement par des anticorps anti-CD4, l'autre testant l'efficacité de la ciclosporine A, un immunosuppresseur dont la cible principale est le LT $CD4^+$. Les résultats de ces 2 thérapeutiques ont été décevants dans la MC (Canva-Delcambre et al., 1996; Stronkhorst et al., 1997) suggérant que les LT $CD4^+$ ne constituent pas la seule sous-population de cellules immuno-compétentes responsables de la MC. Des travaux ont également détecté une activité cytotoxique accrue au niveau de l'épithélium lésé des patients ayant une MICI (Szczepanik et al., 2000; Bisping et al., 2001) évoquant une implication des LT $CD8^+$ ou des LT $CD4^+$ (Strater et al., 1997; Jenkins et al., 2000; Souzaet al., 2005; Allez et al., 2007). La contribution des LT $CD8^+$ cytotoxiques de la *lamina propria* de l'intestin est maintenant clairement établie dans le développement de la colite (Westendorf et al., 2006; Nancey et al., 2006). Ils interviennent précocement dans les processus inflammatoires par l'initiation de lésions épithéliales via la libération du contenu de leurs granules cytotoxiques (granzymes, perforines).

4.6.2.2. Implication d'un défaut de LT régulateurs dans les MICI

Plusieurs sous-populations de cellules T régulatrices ont été mises en évidence dans des modèles animaux et chez l'homme. Un défaut quantitatif et/ou fonctionnel des populations régulatrices pourrait déséquilibrer la balance entre les effecteurs et les régulateurs et conduire au développement d'une inflammation intestinale. Nous développerons dans la deuxième partie de ce travail les caractéristiques et les rôles des LT régulateurs (Treg) au cours des MICI.

4.6.2.3. Anomalies de la tolérance dans les MICI

La tolérance orale est un mécanisme immunologique actif conduisant à l'absence de réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène administré par voie orale. La tolérance orale implique certaines populations de cellules dendritiques en particulier plasmacytoïdes (Dubois et al., 2009). Une rupture de la tolérance à la flore commensale autologue a été établie dans la MC (Duchmann et al., 1995). En effet, la stimulation des LT isolés de la *lamina propria* de l'intestin de patients ayant une MC par la flore intestinale autologue était responsable d'une prolifération et d'une sécrétion d'IL-12 et d'IFNγ, tandis que les LT de sujets normaux n'étaient pas activés en réponse à leur propre flore mais s'activaient en réponse à la stimulation par une flore hétérologue. L'équilibre entre la défense vis-à-vis de pathogènes et la tolérance de la flore physiologique doit être maintenu pour éviter toute rupture de la barrière intestinale (Abraham et al., 2011) **(Figure 12)**.

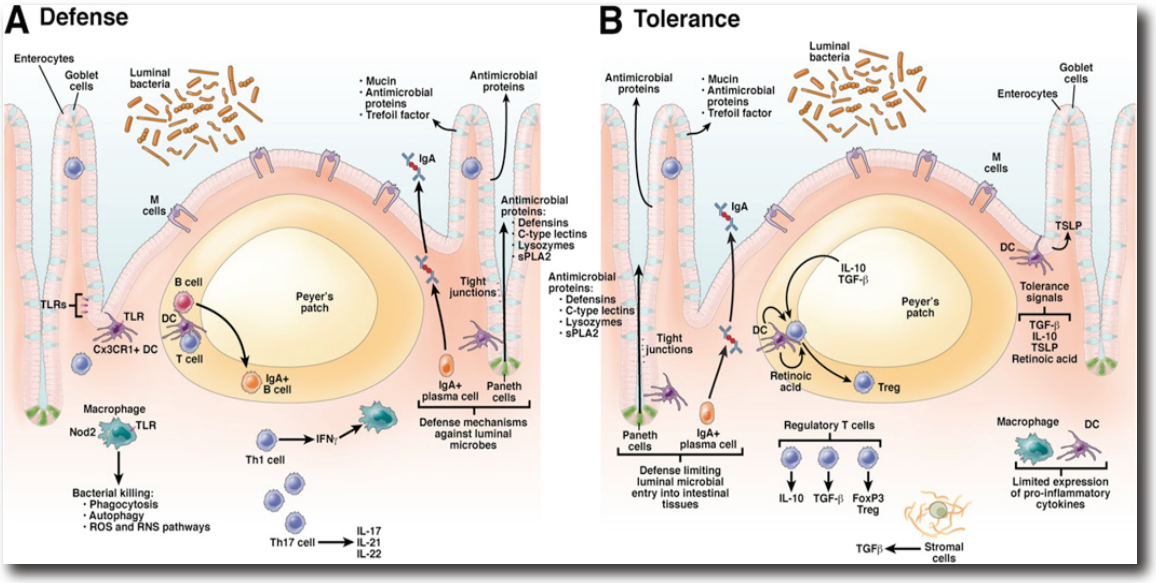


Figure 12 : Mécanisme de défense et de tolérance de l'hôte vis-à-vis de la flore intestinale (d'après Abraham et al., 2011).

5. TRAITEMENT ANTI-TNFα

5.1. Description et indications au cours des MICI

Le rationnel pour le choix du TNFα comme cible thérapeutique pour le traitement des MICI repose notamment sur la mise en évidence de concentrations élevées de cette cytokine dans le sang, les selles et la muqueuse intestinale des patients atteints de MC. Aujourd'hui, les anticorps anti-TNFα occupent une place importante dans l'arsenal thérapeutique des MICI. L'infliximab (Remicade®, Inflectra®, Remsima®), anticorps monoclonal chimérique humanisé à 75%, est utilisé depuis la fin des années 90 (Targan et al., 1997). Trois autres anti-TNFα ont une efficacité démontrée dans les MICI : 2 anticorps monoclonaux totalement humanisés, l'adalimumab (Humira®) et le golimumab (Simponi®), et le certolizumab pegol (Cimzia®) constitué du fragment Fab d'un anticorps monclonal humanisé conjugué à une molécule de polyéthylène glycol pour augmenter sa durée d'action. L'etanercept (Enbrel®) est également un inhibiteur du TNFα mais il s'agit d'une protéine de fusion associant la fraction P75 du récepteur du TNFα avec un fragment Fc d'une Immunoglobuline (IgG1) **(Figure 13)**. Alors que l'etanercept a une efficacité démontrée dans les rhumatismes inflammatoires, son utilisation dans les MICI s'est avérée inefficace dans un essai randomisé contrôlé contre placebo (Sandborn WJ et al., 2001).

L'infliximab est administré par voie intraveineuse alors que l'adalimumab, le golimumab et le certolizumab sont administrés par voie sous-cutanée. A l'heure actuelle, l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab ont une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans le traitement des MICI en France. L'infliximab est indiqué dans le traitement de la MC active, sévère, chez les patients qui n'ont pas répondu malgré un traitement approprié et bien conduit par un corticoïde et/ou un immunosuppresseur, ou chez lesquels ce traitement est contre-indiqué ou mal toléré. L'infliximab est également prescrit dans le traitement de la MC active fistulisée, chez les patients qui n'ont pas répondu malgré un traitement conventionnel approprié et bien conduit (comprenant antibiotiques, drainage et thérapie immunosuppressive). Depuis 2006, l'infliximab a obtenu l'AMM dans le traitement de la RCH active, modérée à sévère chez les patients qui n'ont pas répondu de manière adéquate à un traitement conventionnel comprenant les corticoïdes et l'azathioprine ou la 6-mercaptopurine, ou chez lesquels ce traitement est mal toléré ou contre-indiqué. L'adalimumab a l'AMM depuis 2007 pour le traitement de la MC active, sévère, chez les patients qui n'ont pas répondu malgré un traitement approprié et bien conduit par un corticoïde et/ou un

immunosuppresseur, ou chez lesquels ce traitement est contre-indiqué ou mal toléré. En 2012, l'adalimumab a obtenu l'AMM pour le traitement des patients adultes en cas de poussée modérée ou sévère de RCH, en dépit d'un traitement par corticoïdes et par immunosuppresseurs, ou chez lesquels ces traitements sont mal tolérés ou contre-indiqués. Le golimumab a une AMM dans le cadre des MICI depuis 2014 uniquement pour le traitement de la RCH modérée à sévère après échec des traitements conventionnels (corticoïdes, azathioprine, 6-mercaptopurine). Le certolizumab n'a pas reçu l'AMM en Europe pour le traitement des MICI.

Plusieurs essais thérapeutiques randomisés contre placebo ont démontré l'efficacité des anti-TNFα pour l'induction mais aussi le maintien de la rémission. Ainsi, dans l'essai ACCENT 1, l'infliximab induisait une rémission à 10 semaines chez 65% des malades après 3 perfusions (semaines 0, 2 et 6) (p=0,035) (Hanauer et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés dans des cohortes hospitalières avec une réponse clinique à court terme chez près de 90% des patients. L'adalimumab a également une efficacité démontrée. L'essai CLASSIC 1 a permis de définir le schéma optimal du traitement d'induction. Une rémission était observée chez 36% des patients recevant 160 mg d'adalimumab, puis 80 mg deux semaines plus tard et chez seulement 12% des patients sous placebo (p=0,001) (Hanauer et al., 2006). Dans l'étude CHARM, une réponse était obtenue chez près de deux patients sur trois (58%) à la semaine 4 après deux injections d'adalimumab 80 mg et 40 mg aux semaines 0 et 2 (Colombel et al., 2007). Le golimumab a démontré son efficacité pour l'induction d'une réponse clinique et l'obtention d'une rémission à la semaine 6 chez les patients présentant une RCH en poussée modérée à sévère après une injection SC de 200 mg et 100 mg aux semaines 0 et 2 (Sandborn et al., 2014). La réponse initiale obtenue par un traitement initial d'infliximab, d'adalimumab ou de golimumab peut être maintenue efficacement par des injections régulières (toutes les 8 semaines pour l'infliximab, toutes les 2 semaines pour l'adalimumab et toutes les 4 semaines pour le golimumab) constituant le traitement dit « d'entretien » (Sandborn et al., 2007; Sandborn et al., 2014).

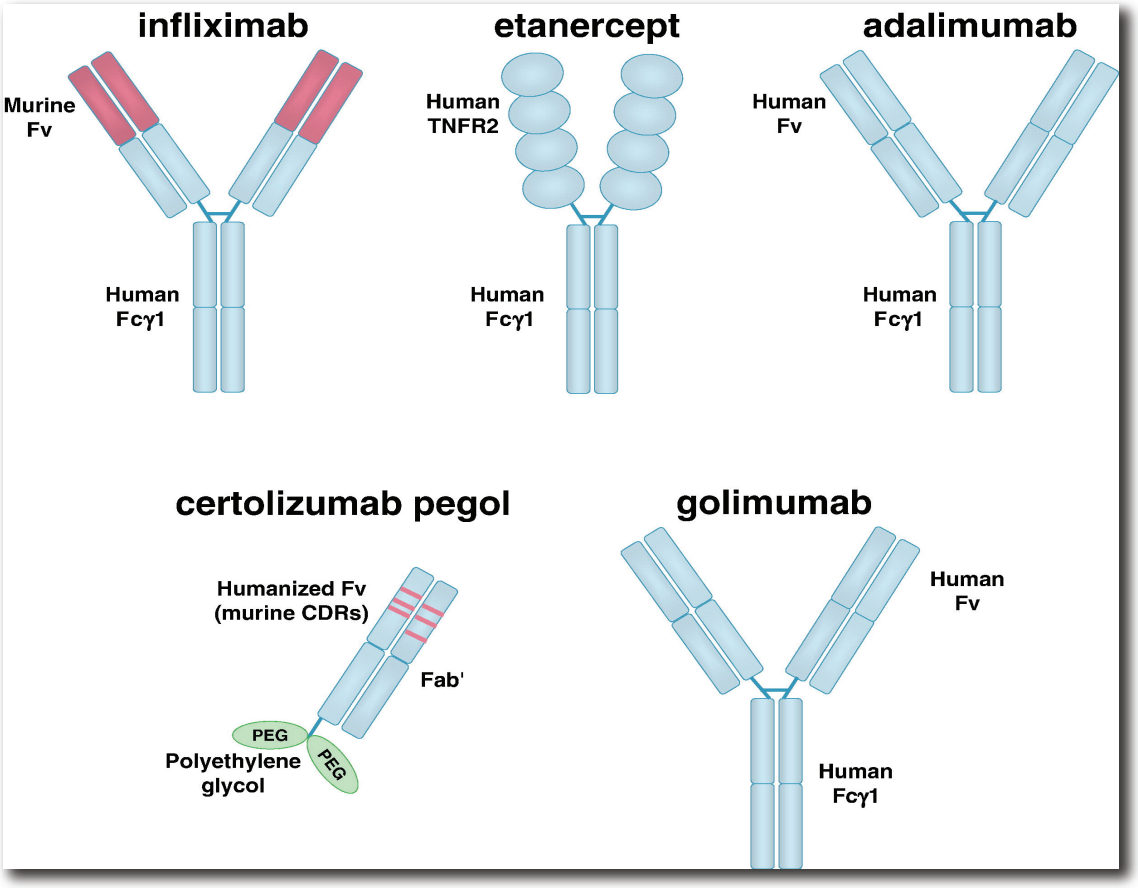


Figure 13 : Schéma représentant les différentes molécules anti-TNFα disponibles pour le traitement des maladies inflammatoires digestives et/ou rhumatologiques (d'après Tracey et al., 2007).

5.2. Principaux effets secondaires

Les anti-TNFα augmentent le risque de développer une infection, particulièrement à des pathogènes intracellulaires comme la tuberculose. Aussi, le bilan pré-thérapeutique des anticorps anti-TNFα comporte systématiquement une radiographie pulmonaire et une intradermoréaction (IDR) à la tuberculine ou un test sanguin de l'immunité cellulaire vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* (Quantiferon® ou tests apparentés) pour dépister les tuberculoses latentes (Keane et al., 2001). Les réactions d'hypersensibilité systémiques ou locales (au point d'injection) sont assez fréquemment observées. Les réactions systémiques d'hypersensibilité immédiate (palpitations, dyspnée, douleur thoracique, urticaire, hypotension) peuvent survenir avec tous les anti-TNFα. Sous infliximab, elles sont corrélées à l'apparition d'anticorps anti-infliximab. Une réaction d'hypersensibilité est survenue dans 4% des 28851 perfusions d'infliximab du registre TREAT, rarement sous forme sévère (0,1%) (Lichtenstein et al.,2006). La prévalence globale des néoplasies chez les patients ayant une MC

traitée par infliximab semble comparable à celle des patients n'en ayant pas reçu (Peyrin-Biroulet et al., 2008). Toutefois, le risque de développer un lymphome chez les patients atteints de MICI et traités par infliximab semble faible mais réel surtout en cas d'association avec des immunosuppresseurs de type thiopurines (Beaugerie et al., 2009). Ainsi, la description de 12 cas de lymphomes T hépatospléniques chez des jeunes patients sous infliximab et azathioprine pose la question de l'association systématique d'un immunosuppresseur à l'infliximab (Rosh et al., 2007). De rares cas de lupus induit (anticorps anti-nucléaires) (Beigel et al., 2011) et diverses manifestations cutanées (psoriasiformes, eczématiformes, lichen…) sont également décrits sous anti-TNFα (Ko et al., 2009; Seneschal et al., 2009).

5.3.Mécanismes d'action

Le TNFα est synthétisé majoritairement par les monocytes/macrophages, les lymphocytes T activés et les cellules épithéliales. Il est présent à la surface cellulaire sous forme d'un précurseur transmembranaire de 26KDa (mTNF), qui est ensuite clivé au niveau de son domaine extra cellulaire par ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloprotinase Domain 17) appelé aussi TACE (tumor necrosis factor-α-converting enzyme) libérant ainsi le TNFα soluble (17KDa).

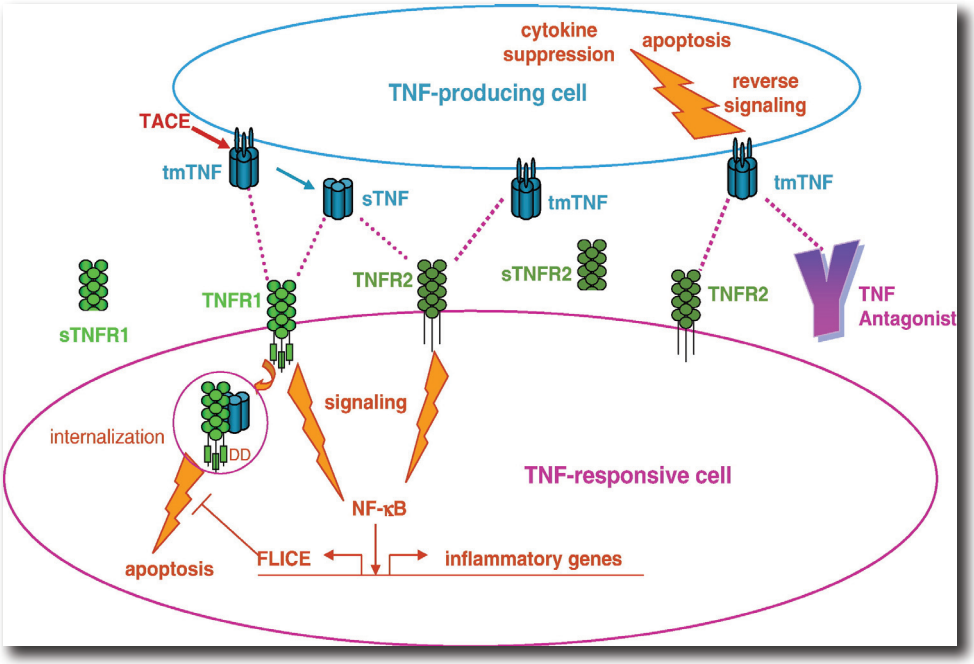


Figure 14 : Biologie du TNFα : production, interactions avec ses récepteurs et signalisation (d'après Tracey et al., 2008).

Après trimérisation, le TNFα exerce son activité biologique en se fixant sur les cellules cibles au niveau de récepteurs spécifiques au TNFα (TNFR) de type 1 et de type 2. Le $TNFR_I$ (p55) est ubiquitaire alors que le $TNFR_{II}$ (p75) est présent uniquement à la surface des cellules immunes et endothéliales **(Figure 14)**.

Les anticorps anti-TNFα sont capables de neutraliser le TNFα sous forme soluble mais également le TNFα membranaire. Cette neutralisation directe du TNFα n'explique toutefois pas à elle seule l'action des anti-TNFα. Ainsi, la demi vie de l'infliximab est d'environ 8 jours alors que l'efficacité du traitement se maintient en moyenne pendant 8 semaines. Plusieurs mécanismes sont actuellement décrits permettant d'appréhender au moins en partie l'action des anti-TNFα au cours des MICI (Danese, 2008; Peake et al., 2013) **(Figure 15)**. De nombreuses études ont montré que l'infliximab est capable d'induire l'apoptose des cellules immunitaires par liaison avec le TNFα membranaire. Ainsi, Ten Hove et al. ont rapporté une nette augmentation de l'apoptose des LT $CD3^+$ issus de la *lamina propria* de patients atteints de MC, après une perfusion d'infliximab (Ten Hove et al., 2002). Dans cette étude, le traitement par anti-TNFα ne semblait pas induire d'apoptose des LT circulants. Ces données ont depuis été confirmées par d'autres équipes (Di Sabatino et al., 2003) suggérant une action « ciblée» de l'infliximab sur les cellules immunes du site inflammatoire intestinal. L'activation de la voie des caspases (CD95/CD95L) semble être un des mécanismes d'induction de l'apoptose par les anti-TNFα au cours des MICI (Lügering et al., 2001). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les anti-TNFα agissent sur les cellules épithéliales en diminuant la perméabilité intestinale, restaurant ainsi la barrière intestinale (Suenaert et al., 2002). Outre son action sur les cellules immunes et les cellules épithéliales, le TNFα joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion par l'endothélium intestinal et les fibroblastes. Il a été montré que l'infliximab diminue l'expression des molécules CD40 et VCAM-1 par les cellules endothéliales du réseau microvasculaire intestinal. Ces données suggèrent donc que les anti-TNFα agissent en diminuant, au site de l'inflammation, le recrutement des cellules inflammatoires en particulier les LT activés (Danese, 2008). Taylor et al. ont montré également une réduction des chémokines après un traitment par infliximab (chemokines monocyte chemotactic protein 1, macrophage inflammatory protein-1a et RANTES) (Taylor et al., 2000). L'infliximab est aussi capable d'augmenter la migration des fibroblastes et d'inhiber leur production de collagène au cours de la MC. Ce mécanisme pourrait contribuer à la cicatrisation lésionnelle observée sous anti-TNFα.

La liste des différents mécanismes d'action des anti-TNFα n'est cependant pas exhaustive. Leur impact sur d'autres phénomènes immunologiques (réponse T, activation, fréquence et fonction de sous-populations de LT…), notamment au cours des processus de cicatrisation muqueuse, reste à déterminer.

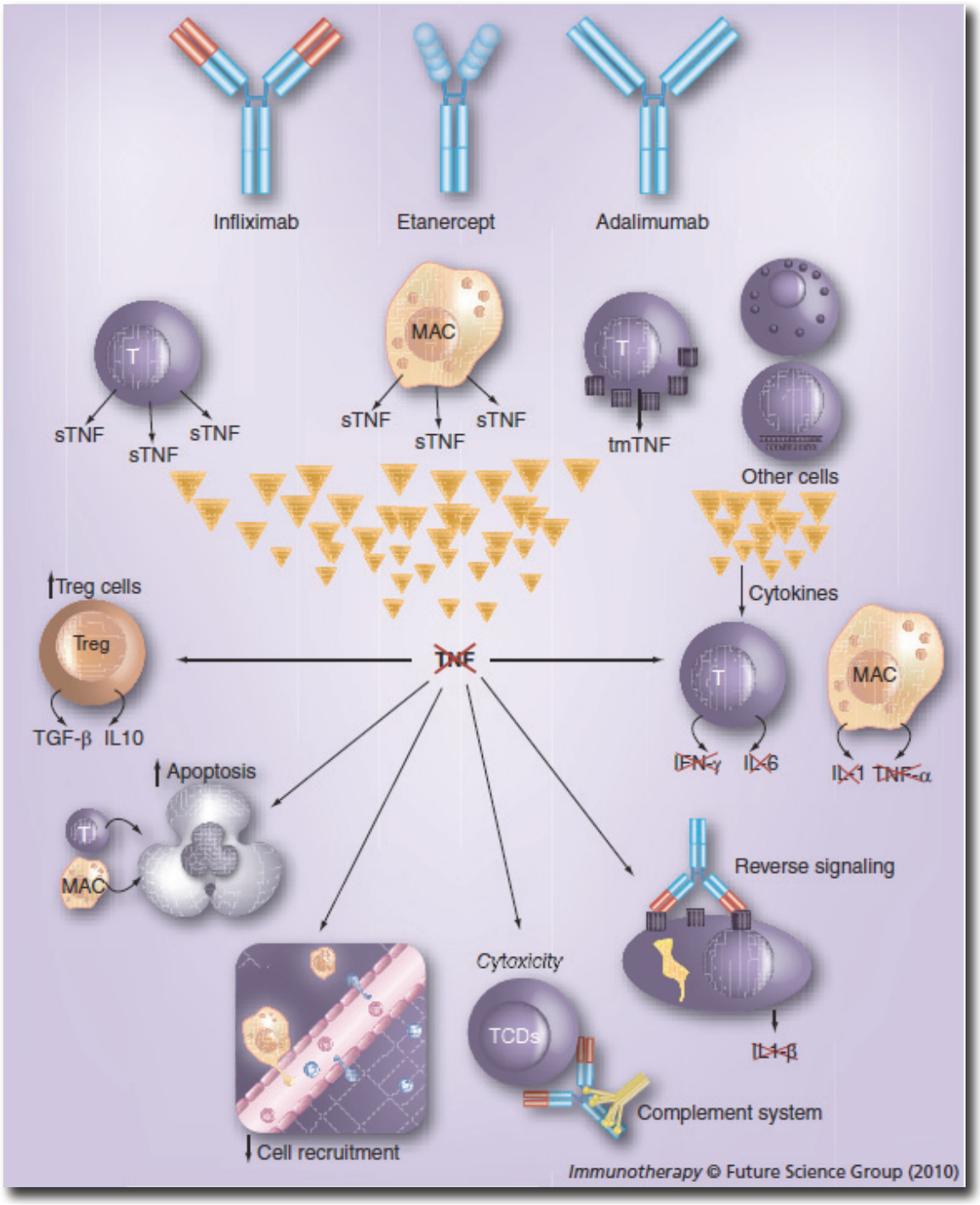


Figure 15 : Représentation schématique des principaux mécanismes d'action actuellement reconnus des traitements anti-TNFα au cours des MICI (d'après Silva et al., 2010).

LYMPHOCYTES T REGULATEURS ET MICI

Les MICI sont considérées comme des maladies à médiation cellulaire T et les LT CD4 sont les principaux responsables de l'orchestration de l'inflammation excessive observée au cours des MICI (Brand, 2009). Les cellules T jouent également un rôle primordial dans l'établissement et le maintien de la tolérance immunologique par la suppression de réponses immunitaires excessives ou anormales. Le concept de régulation de la réponse inflammatoire a émergé dans les années 70 avec la découverte d'une population cellulaire T dite « suppressive ». Il a toutefois fallu attendre plusieurs dizaines d'années pour identifier et mieux caractériser les différents LT capables de contrôler et supprimer des réponses immunitaires. On sait aujourd'hui que de nombreux sous-types de cellules T exercent des fonctions immunosuppressives au sein du tractus gastro-intestinal. On retrouve ainsi des cellules T au TCR$\alpha\beta$ classique telles que les LT CD4$^+$ Tr1 et certains LT CD8$^+$ (Izcue et al., 2009). D'autres cellules plus « atypiques » comme les LT CD8αα et les LT au TCRγδ ont montré un effet protecteur dans des modèles murins de colite (Saurer et al., 2009). Enfin, d'autres lymphocytes à fonction innée et au TCR invariant tels que les iNKT et les LT invariants associés aux muqueuses (MAIT) peuvent également jouer un rôle immunorégulateur dans l'intestin. Néanmoins, la population immunosuppressive prépondérante est représentée par les LT CD4$^+$ (Treg) au TCR$\alpha\beta$ qui sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Fontenot et al., 2003).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont une double origine, thymique pour les Treg dits « naturels » (nTreg) et extra-thymique pour les Treg dits « induits ou adaptatifs » (iTreg) par le biais d'une conversion périphérique à partir de LT conventionnels (Tconv). Contrairement à ces derniers, les Treg sont anergiques en réponse à des stimulations polyclonales, ne produisent pas d'IL-2 et présentent un certain degré de résistance à l'apoptose. Leur sélection dite « négative altérée » diffère de celle des autres cellules T par une affinité du récepteur T (TCR) pour les peptides du soi beaucoup plus importante que celle des Tconv. Les modèles animaux à l'origine d'une anomalie des Treg (fréquence, survie, fonction régulatrice, etc.) s'accompagnent du développement d'une inflammation intestinale spontanée suggérant un rôle clef de cette population dans le contrôle de l'homéostasie intestinale (Elson et al., 2005). Les Treg participent également au processus de tolérance orale (Dubois et al., 2009).

1. Les lymphocytes T régulateurs, classification et fonctions

En 2006, Shevach et al. ont proposé une classification des Treg en fonction de leur origine et/ou de leur mode d'action (Shevach et al., 2006) **(Figure 16)**. Pour des raisons didactiques, en dépit d'une diversité importante des Treg, nous focaliserons notre exposé sur les populations de LT $CD4^+$ régulatrices qui sont actuellement les mieux caractérisées.

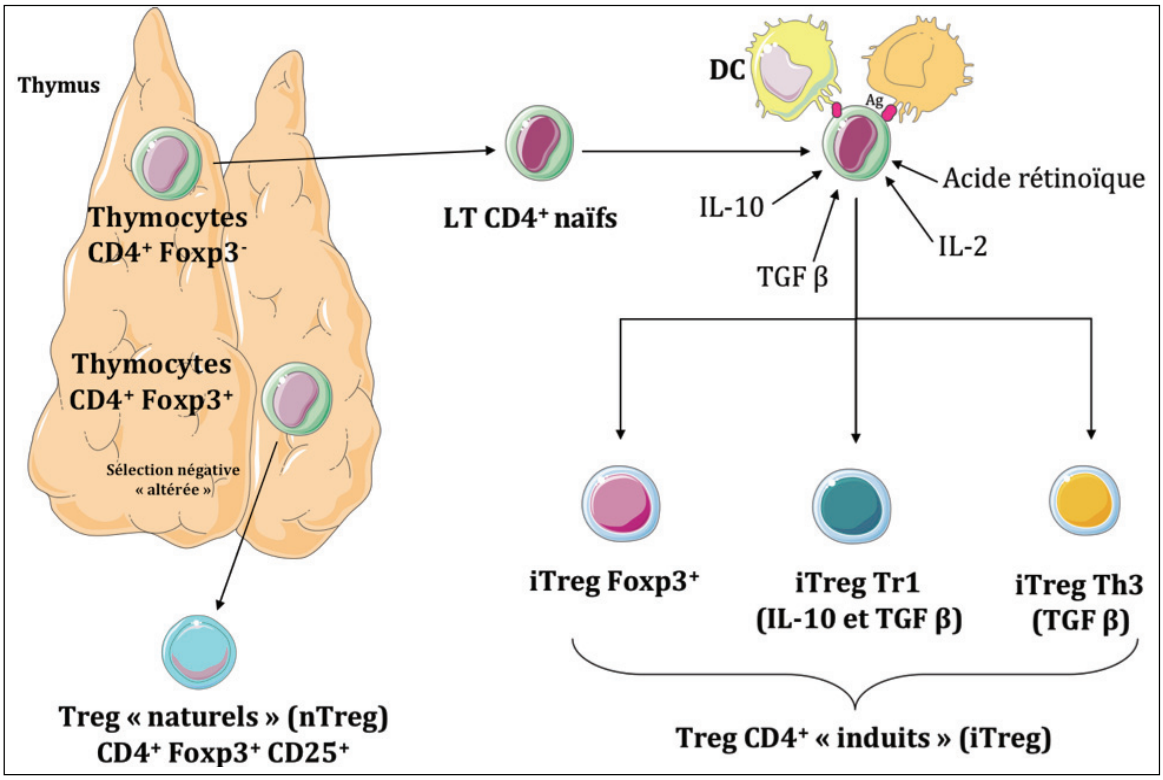


Figure 16 : Populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) $CD4^+$ et origine.

1.1. Les LT régulateurs $CD4^+$ $CD25^+$ naturels (nTreg)

Les nTreg expriment de manière constitutive la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et représentent en moyenne 5 à 10% des LT $CD4^+$ du sang périphérique chez l'homme et la souris (Sakaguchi et al., 1995). Mais l'expression de CD25 à la surface cellulaire est un marqueur d'activation des lymphocytes, qu'ils soient régulateurs ou non. Cela justifie, pour évaluer la proportion ou isoler en tri cellulaire les nTreg, de sélectionner exclusivement les cellules l'exprimant fortement ($CD25^{high}$) correspondant ainsi à celles qui ont réellement une fonction régulatrice (en moyenne 2 à 5% des LT $CD4^+$ périphériques). Chez la souris, le blocage de la signalisation de l'IL-2 par des anticorps neutralisants ou un déficit génétique en IL-2 ou récepteur à l'IL-2, s'accompagne d'un défaut de nTreg et de maladies auto-immunes

spontanées notamment intestinales (Almeida et al., 2002; Malek et al., 2002; Setoguchi et al., 2005). La signalisation en aval du récepteur à l'IL-2 est médiée par STAT5 qui va se fixer sur une région non codante appelée CNS2 (Conserved Non-coding Sequence 2) du promoteur du gène Foxp3 (Tanoue et al., 2012). Le facteur de transcription intranucléaire Foxp3 (Forkhead winged hélix box p3) représente à ce jour le marqueur le plus fiable des nTreg. Foxp3 est nécessaire non seulement au développement des nTreg mais également à l'acquisition de leurs fonctions suppressives. Ainsi, les mutations du gène codant pour Foxp3 conduisent à des désordres auto-immuns affectant différents organes et d'évolution le plus souvent létale. C'est le cas de la mutation « scurfy » chez la souris (Brunkow et al., 2001), ou du syndrome IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathy-Enteropathy-X-linked syndrome) chez l'homme (Bennet et al., 2001) qui sont tous deux caractérisés par un défaut de la population de nTreg. Les expériences d'invalidation du gène codant pour Foxp3 ont confirmé le rôle de ce facteur de transcription dans la génération des nTreg au niveau thymique et dans leur survie en périphérie. De plus, *in vitro,* l'expression ectopique de Foxp3 par des LT $CD4^+$ naïfs et effecteurs conduit ces cellules à acquérir un phénotype et une fonction régulatrice.

Les nTreg possèdent un répertoire du TCR différent des Tconv mais également des iTreg. En effet, des données montrent que les TCR des nTreg ont une affinité augmentée pour les peptides du soi (Feuerer et al., 2010; Haribhai et al., 2011). Une affinité forte du TCR est nécessaire pour le développement des nTreg. La signalisation *via* le TCR induit la voie NFκB et des mutations conditionnelles parmi les membres de cette voie entrainent un défaut de nTreg (Tanoue et al., 2012). c-Rel fait partie de la voie NFκB et se fixe directement sur la séquence CNS3 de la région du promoteur de Foxp3 prouvant le lien entre la signalisation *via* le TCR et l'expression de Foxp3 (Zheng et al., 2010).

1.2. Les LT régulateurs induits ou adaptatifs (iTreg)

1.2.1. Les lymphocytes T régulateurs $Foxp3^-$ induits (Tr1 et Th3)

Ces cellules régulatrices induites en périphérie à partir de Tconv naïfs n'expriment pas Foxp3 et sont définies par leur potentiel à produire différentes cytokines immunosuppressives ou anti-inflammatoires après une stimulation antigénique. Ainsi, les lymphocytes Treg dits « Tr1 » sont induits *in vitro* à partir de LT $CD4^+$ naïfs stimulés de manière répétée par un antigène présenté par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) dans un miler à forte concentration d'interleukine 10 (IL-10). Ces iTreg dits « Tr1 » sont caractérisés par une sécrétion importante d'IL-10, de TGFβ et d'IL-5 et contrôlent certaines réactions inflammatoires telle que la colite

induite chez la souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) reconstituée par le transfert de LT naïfs $CD4^+CD45RB^{high}$ (Groux et al., 1997).

En situation de tolérance orale, une population de iTreg nommés Th3 a été identifiée. Ces iTreg Th3 sont caractérisés par une production quasi exclusive de TGFβ en grande quantité et par leur capacité à réduire la sévérité de la colite induite par le TNBS (2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid) chez la souris (Weiner, 2001). Ces études avaient été menées avant la découverte de Foxp3, aussi, des données complémentaires ont permis de montrer qu'en fait la majorité des iTreg Th3 expriment Foxp3 même si une petite fraction de cellules Th3 $CD4^+TGF\beta^+Foxp3^-$ existe (Carrier et al., 2007).

1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs Foxp3$^+$ induits (iTreg Foxp3$^+$)

Certains Tconv naïfs $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ peuvent être convertis *in vitro* et *in vivo* en iTreg $Foxp3^+$ (Curotto de Lafaille et al., 2004). Chez la souris, la majorité des Treg $Foxp3^+$ détectés dans la rate et les ganglions sont des nTreg alors qu'une grande part des Treg de la *lamina propria* et du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT = gut-associated lymphoid tissue) sont des iTreg (Barnes et al., 2009; Bilate et al., 2011). Cette conversion est observée en présence d'IL-2 mais surtout de TGFβ qui augmente significativement l'expression de Foxp3 par les LT naïfs (Chen et al., 2003). La molécule de co-stimulation CD28 serait également nécessaire à la conversion périphérique des LT $CD4^+$ naïfs en iTreg. D'autres molécules de co-stimulation comme ICOS et CTLA-4 pourraient contribuer à l'acquisition de propriétés régulatrices. La conversion des Tconv en Treg est possible *in vitro* et cela sert de base aux essais de thérapie cellulaire pour les maladies auto-immunes et inflammatoires comme les MICI (Riley et al., 2009) **(Figure 18)**. De manière similaire à la conversion observée *in vitro*, l'induction périphérique *in vivo* de Foxp3 apparaît dépendante d'un engagement du TCR et de la présence de TGFβ. La fixation du TGFβ sur son récepteur induit notamment la phosphorylation de molécules SMAD qui se fixent ensuite au niveau de la région CNS1 du locus de Foxp3 (Tone et al., 2008). Outre la présence indispensable de TGFβ, l'acide rétinoïque (métabolite de la vitamine A) joue également un rôle dans l'induction de iTreg (Mucida et al., 2007). Une population particulière d'iTreg $Foxp3^+$ produisant une grande quantité d'IL-10, dénommée « Tr1-like » par analogie avec les Treg Tr1, a aussi été identifiée.

1.3. Distinction entre nTreg et iTreg

De nombreux autres marqueurs de surface permettant de caractériser les nTreg ont été identifiés **(Figure 17)**, toutefois, aucun d'entre eux n'est spécifique, certains étant exprimés également à la surface de Tconv rendant difficile la discrimination des différents sous-groupes de Treg (Zheng et al., 2007; Zenewicz et al., 2009).

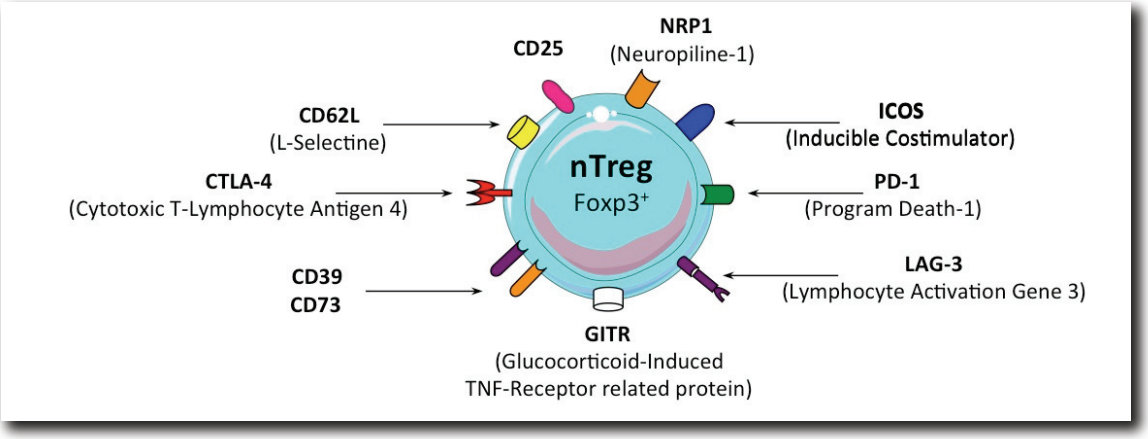


Figure 17 : Principaux marqueurs de surface des nTreg.

Il a été montré que la présence du récepteur à l'IL-7 (CD127) à la surface des LT $CD4^+$ est inversement corrélée à l'expression de Foxp3 et aux fonctions suppressives des Treg (Liu et al., 2006). Le phénotype $CD127^{low}$ n'est toutefois pas discriminant entre les nTreg et les iTreg.

La plupart des molécules dont l'expression est augmentée à la surface des Treg (y compris CD25, CTLA4 et GITR) dépendent de l'activation de Foxp3 et par conséquent ne permettent pas de distinguer les nTreg des iTreg. De plus, nTreg et iTreg contrôlent les réponses immunitaires par des mécanismes de suppression identiques (dépendant ou non d'antigène).

Helios est une des molécules récemment proposées pour différencier nTreg de iTreg. Il s'agit d'un facteur de transcription exprimé fortement par les nTreg et beaucoup plus faiblement par les iTreg (Thornton et al., 2010). Toutefois, les souris déficientes pour Helios ne présentent pas d'anomalie de différenciation ou de fonction des Treg (Cai et al. 2009). D'autres études ont d'ailleurs suggéré qu'Helios pourrait être un marqueur d'activation et de prolifération exprimé aussi bien par les Treg que les Tconv (Akimova et al., 2011). Enfin, il a été démontré récemment par certaines équipes, qu'une fraction seulement des iTreg convertis *in vivo* perdait l'expression d'Helios (Gottschalk et al., 2012).

La Neuropiline-1 (NRP1) est un autre marqueur pouvant permettre de distinguer les nTreg des iTreg, ainsi des études récentes ont montré que l'expression membranaire de NRP1 était limitée aux nTreg (Weiss et al., 2012). Les iTreg obtenus par conversion *in vitro* ou *in vivo*

expriment NRP1 à des niveaux faibles (Yadav et al., 2012). Toutefois, la génération des iTreg dans des conditions inflammatoires dans le poumon ou le système nerveux central semble s'accompagner d'une augmentation de l'expression de NRP1 par les iTreg (Weiss et al., 2012). Une autre limite majeure de l'utilisation de NRP1 en routine est son absence d'expression par les cellules humaines (Milpied et al., 2009).

D'autres méthodes basées sur la mesure du niveau de méthylation de régions non codantes du gène Foxp3 (CNS2) semblent très discriminantes entre les nTreg et les iTreg mais ces techniques ne peuvent, à l'heure actuelle, être effectuées que sur un échantillon contenant de nombreuses cellules (Janson et al., 2008; Polansky et al., 2008).

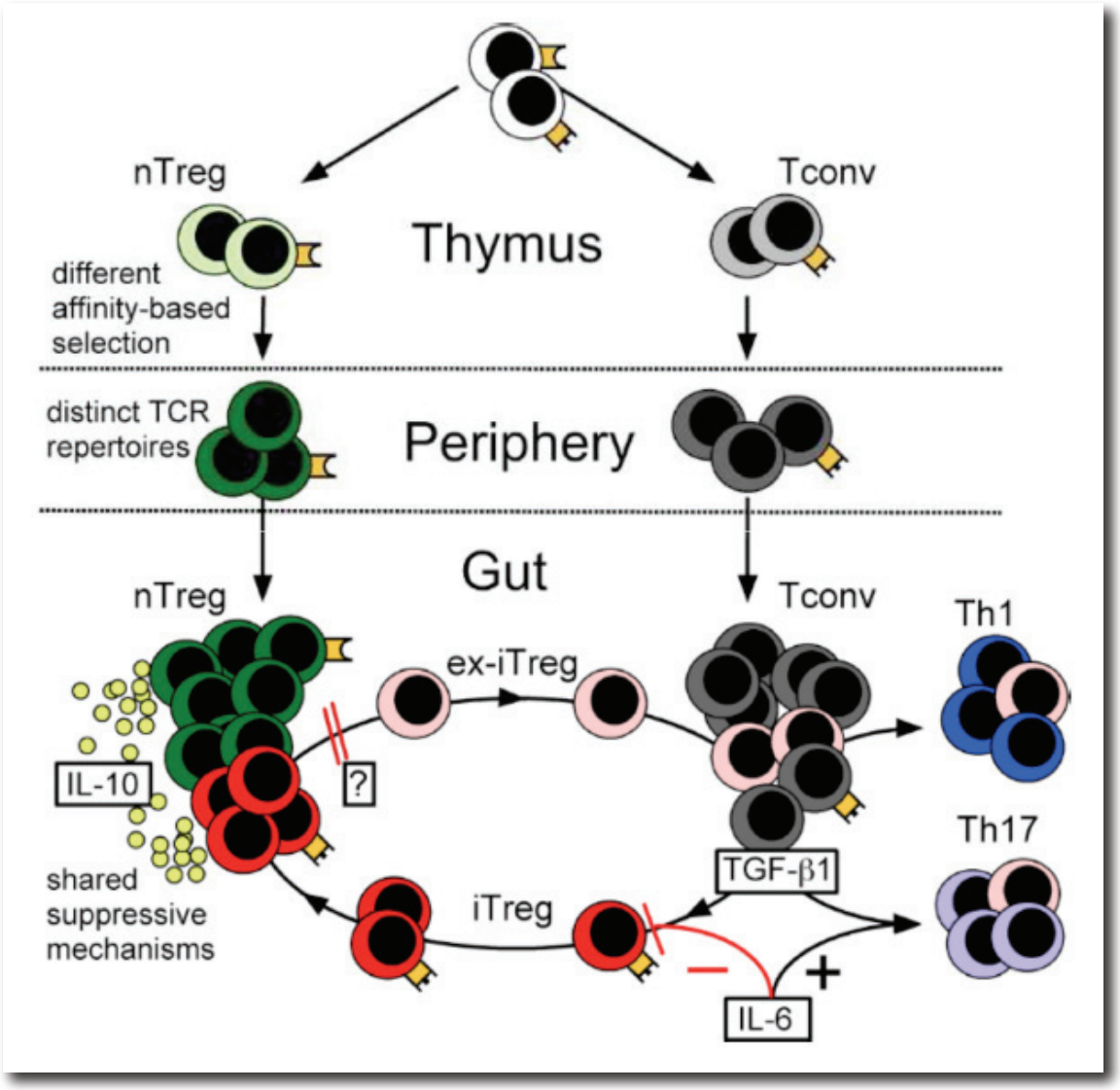


Figure 18 : Modèle de développement des nTreg et des iTreg (d'après Mayne et al., 2013).

1.4. Les fonctions suppressives des Treg

La caractéristique majeure des Treg est leur capacité à exercer un effet suppresseur sur une cible. *In vitro*, les Treg diminuent ainsi l'expansion des LT effecteurs (Teff) en réponse à une stimulation et leur sécrétion de cytokines. *In vivo*, l'absence ou le dysfonctionnement des Treg sont responsables du développement de pathologies auto-immunes et inflammatoires. Dans divers modèles animaux d'inflammation tels que l'arthrite induite au collagène, l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) et les colites induites ou spontanées, le transfert adoptif de Treg s'accompagne d'une réduction de la sévérité de ces pathologies. Les mécanismes à l'origine de la suppression des Teff sont nombreux. Ils varient en fonction de la cellule cible à réguler, du site de régulation (microenvironnement) et du type de réponse immune mise en jeu (Tang et al., 2008) **(Figure 19)**.

L'activité suppressive des Treg nécessite en premier lieu l'engagement du TCR. Mais dès lors qu'un Treg spécifique a été activé par l'antigène, il peut exercer son potentiel régulateur par un effet « bystander » sur un ensemble de Teff quelle que soit la spécificité antigénique de ceux-ci. Lors de tests *in vitro* de suppression de la prolifération de Teff stimulés, le ratio de Treg/Teff est très inférieur à un, suggérant qu'une seule cellule régulatrice est capable de contrôler plusieurs Teff.

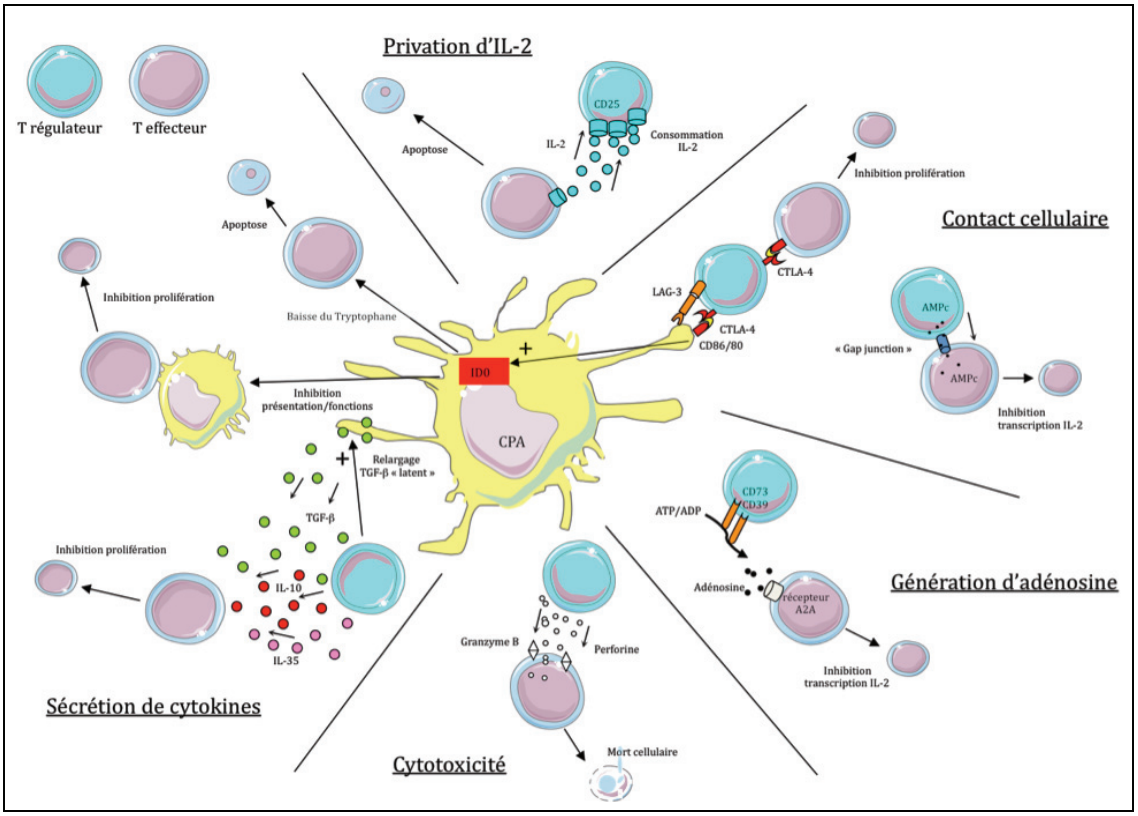


Figure 19 : Principaux mécanismes de suppression utilisés par les Treg pour inhiber les Teff (d'après Vocanson).

1.4.1. Effet suppresseur direct sur les cellules effectrices

L'inhibition de la prolifération des Teff par les Treg a été observée *in vitro* en l'absence de cellule présentatrice d'antigène. Ainsi, les nTreg disposent d'AMPc intracytoplasmique en grande quantité qu'ils peuvent délivrer directement aux Teff, par contact direct *via* des jonctions serrées, conduisant à une inhibition de la prolifération et de la production d'IL-2 par les cellules effectrices.

Les Treg peuvent aussi induire directement l'apoptose des cellules effectrices ($CD4^+$ Teff ou $CD8^+$ CTL) mais également des CPA, en sécrétant dans le microenvironnement des granules cytotoxiques de granzyme A ou B et perforine (Grossman et al., 2004; Gondek et al., 2008). Le rôle précis et la part de cette cytotoxicité directe des Treg dans leur capacité suppressive est inconnue à ce jour.

Par ailleurs, les nTreg en exprimant de manière constitutive le CD25, récepteur de haute affinité pour l'IL-2, captent ainsi l'IL-2 du microenvironnement. Compte tenu de leur incapacité à produire l'IL-2, les Treg sont donc responsables d'une diminution du taux d'IL-2 présente dans le microenvironnement. Ce mécanisme de « privation d'IL-2 » est à l'origine d'une apoptose des Teff médiée par Bim qui est un membre de la famille Bcl-2 (Thornton et al., 1998; Pandiyan et al., 2007). Toutefois, ce processus de « privation d'IL-2 » est très difficile à mettre en évidence *in vivo*.

Les Treg sont également capables de réguler *in vivo* certaines réponses immunes par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGFβ. En ce sens, Ito et al. ont mis en évidence deux sous-populations de Treg $Foxp3^+$ dont les mécanismes suppressifs diffèrent en fonction de leur statut ICOS. En effet, les Treg $Foxp3^+ICOS^+$ conditionnent des cellules dendritiques (DC) « tolérogènes » *via* l'IL-10 et contrôlent les Teff *via* le TGFβ, alors que la fonction suppressive des Treg $Foxp3^+ICOS^-$ est médiée exclusivement par le TGFβ (Ito et al., 2008). L'intestin est un milieu particulièrement riche en TGFβ. Toutefois, celui-ci est essentiellement présent sous une forme inactive devant être activée par des intégrines pour exercer ses fonctions physiologiques, notamment de conversion périphérique des Tconv en Treg (Paidassi et al., 2011). Aussi, des souris déficientes en intégrine αv ou β8 sur les cellules dendritiques développent des colites spontanées (Worthington et al., 2011). Récemment, Worthington et al. ont montré que les Treg expriment fortement l'intégrine αvβ8 ce qui leur permet également d'activer le TGFβ latent. La délétion de l'intégrine αvβ8 spécifiquement sur les Treg n'entraine pas d'inflammation spontanée chez les souris, suggérant que son action n'est pas indispensable en conditions homéostatiques. A l'inverse, cette délétion de l'intégrine αvβ8 sur les Treg les rend incapables de contrôler une réponse T inflammatoire (Worthington

et al., 2015) **(Figure 20)**. L'activation du TGFβ latent par les Treg semble donc être un mécanisme primordial de régulation au cours des réponses inflammatoires pathologiques.

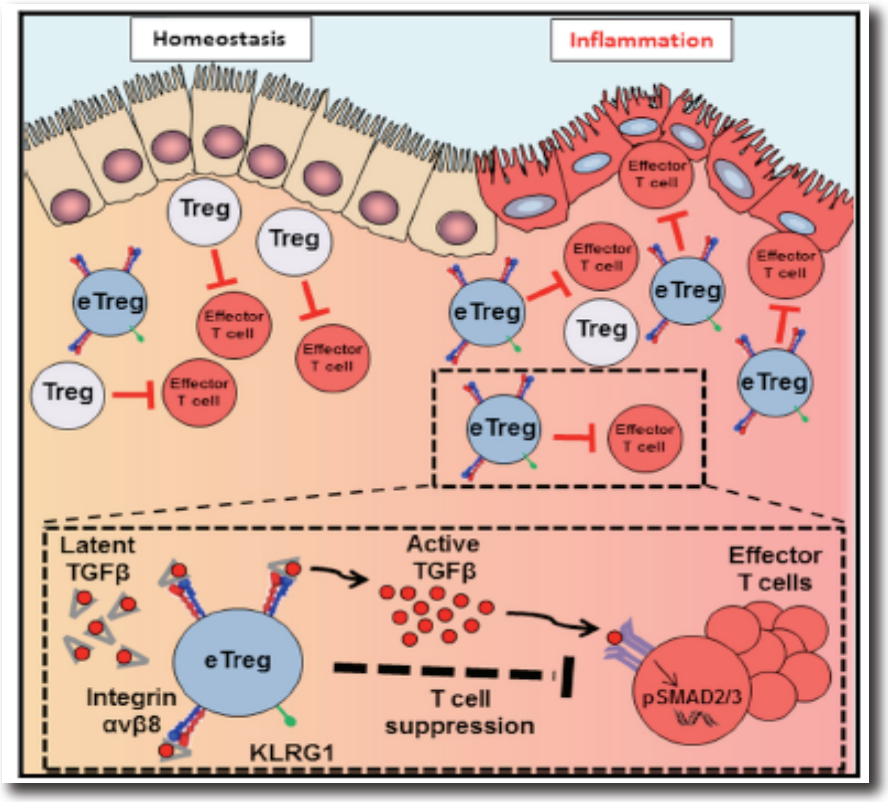


Figure 20 : Mécanisme de suppression des Teff par les Treg par activation du TGFβ latent *via* l'intégrine αvβ8 (d'après Worthington et al., 2015).

L'IL-10 est une cytokine produite par de nombreux types cellulaires y compris les Treg et joue un rôle particulier dans les MICI. En effet, les souris déficientes en IL-10 ou son récepteur ne souffrent pas de pathologie auto-immune systémique létale comme en cas de déficit en TGFβ mais développent une colite (Hagenbaugh et al., 1997; Spencer et al., 1998). Chez l'homme, on a pu identifier des variants du gène de l'IL-10 associés à la RCH alors que des mutations du gène du récepteur de l'IL-10 sont responsables du développement de MICI à un âge plus jeune et avec une pénétrance plus importante que dans le syndrome IPEX (Glocker et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-10 produite par les Treg mais aussi par d'autres types cellulaires joue un rôle primordial pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Comme nous l'avons évoqué précédemment les cellules Tr1 qui sécrètent de grandes quantités d'IL-10 font partie des cellules Treg mais n'expriment pas Foxp3. Dans le colon, la majeure partie des Treg sont Foxp3$^+$ alors que dans l'intestin grêle la majorité des lymphocytes intra-épithéliaux produisant de l'IL-10 n'expriment pas Foxp3, suggérant ainsi un rôle des Treg Tr1 à ce niveau (Maynard et al., 2007).

L'impact dans les processus de suppression d'autres cytokines comme l'IL-35, certaines galectines, l'hème oxygénase et l'IL-9 reste à préciser. Ainsi, l'IL-35 est une cytokine hétérodimérique constituée des sous-unités IL-12p35 et Ebi3. Elle est produite principalement par les Treg et est capable de supprimer *in vitro* la prolifération des Teff. De même, les Treg déficients pour IL-12p35 ou Ebi3 sont moins efficaces pour le contrôle d'une colite préétablie chez la souris (Collison et al., 2007).

Enfin, l'expression constitutionnelle à la surface des Treg du CD39 et du CD73, permet le catabolisme de l'ATP et de l'ADP extracellulaire en adénosine. Celle-ci exerce une activité immunosuppressive sur les Tconv $CD4^+$ ou $CD8^+$ notamment *via* la fixation au récepteur purinergique superficiel A2A (Nagnuma et al., 2006; Deaglio et al., 2007).

1.4.2. Effet suppresseur via les cellules présentatrices d'antigènes

Les Treg sont capables « d'éduquer » *in vivo* certaines cellules dendritiques (DC) à l'origine de modifications de leur capacité à interagir avec les Teff et à induire une réponse immunitaire. Ainsi, les Treg augmentent, à la surface des DC, l'activité de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) responsable du catabolisme du tryptophane dont la privation provoque un blocage voire une apoptose des Teff. Ce mécanisme implique CTLA-4, membre de la famille des récepteurs de co-stimulation CD28, exprimé constitutionnellement à la surface des Treg. La liaison de CTLA-4 à son ligand CD80 et/ou CD86, présent sur les DC et les LT activés, induit un arrêt de la prolifération des Teff directement mais aussi *via* les DC par activation de l'IDO. Dans un modèle de colite par transfert de cellules T, le blocage de CTLA-4 est responsable d'une atténuation de l'effet protecteur des Treg (Read et al., 2006). Chez l'homme, CTLA-4 semble particulièrement important dans l'homéostasie intestinale, puisque les traitements anti-CTLA-4 (ipilimumab ou tremelimumab) utilisés dans certains cancers pour diminuer la fonction immunosuppressive des Treg peuvent s'accompagner d'exacerbation des symptômes d'une MC préexistante ou déclencher des colites pouvant être létales (Peggs et al., 2009; Nancey et al., 2011). La molécule d'adhésion LAG-3 est également impliquée dans les mécanismes de suppression contact-dépendant en diminuant l'activation des LT naïfs et en permettant leur conversion périphérique en Treg. LAG-3 peut également se fixer à la surface des DC inhibant leur maturation et les rendant ainsi plus tolérogéniques (Liang et al., 2008).

Les Treg peuvent interagir également avec les CPA en stimulant le relargage dans le milieu par les DC de TGFβ « latent » à l'origine d'une action anti-inflammatoire locale.

2. Inflammation intestinale et Treg

La physiopathologie des MICI implique un défaut de régulation immunitaire dont au moins une part est liée à un défaut des Treg. Ce défaut peut-être intrinsèque c'est-à-dire inhérent à des Treg « anormaux » chez le patient. Mais il est probablement le plus souvent extrinsèque, secondaire à l'impact de l'environnement inflammatoire intestinal sur les Treg. Qu'il soit extrinsèque ou intrinsèque, le défaut de contrôle de l'inflammation par les Treg au cours des MICI peut être lié à au moins 4 phénomènes: 1) défaut du nombre de Treg, 2) anomalie fonctionnelle des Treg, 3) instabilité du phénotype régulateur, et 4) résistance des cellules effectrices cibles pathogènes (Buckner, 2010; Mayne et al., 2013).

2.1. Implication des Treg au cours de l'inflammation intestinale

La majorité des connaissances acquises concernant l'implication des Treg dans la physiopathologie des MICI proviennent des modèles murins. Chez l'animal, des anomalies de la fonction (souris IL-$10^{-/-}$ et TCR$\alpha\beta^{-/-}$), de la survie (souris IL-$2^{-/-}$) ou du nombre de Treg (souris Scurfy) (Fontenot et al., 2003) conduisent au développement spontané d'une inflammation intestinale. Le transfert de LT mémoires ($CD4^{+}CD45RB^{hi}$) à une souris immunodéprimée génère une colite en 4 à 6 semaines, tandis que le transfert de LT régulateurs ($CD4^{+}CD45RB^{low}$) chez des receveurs reconstitués par des LT naïfs abroge la colite (Powrie et al., 1993; Haribhai et al., 2009) **(Figure 21)**.

Category of IBD Model	Model Name	Role for Regulatory T cells
1) Barrier disruption	DSS (chemical-induced)	- Absence of T_{reg} or TGF-β1 signaling in T_{reg} cells increases severity
	TNBS/DNBS/Oxazolone (hapten-induced)	- Ethanol in absence of TNBS leads to resistance
		- *B. fragilis* PSA increases iT_{reg} cells leading to resistance
		- T_{reg} cells transiently decrease then home to intestine during remission
2) Genetic deficiency	IL-10 deficiency	- T_{reg}-produced IL-10 is necessary to prevent intestinal inflammation
	SAMP/YitFc (*PPARG* mutation)	- T_{reg} cells from these mice are defective in suppressing colitis upon transfer
	Mdr1 deficiency	- mutation leads to decreased *in vivo* and *in vitro* differentiation of iT_{reg}
3) Overexpression of inflammatory mediators	$TNF^{\Delta ARE}$ (TNF-α overexpression)	- increased differentiation of iT_{reg} attenuates disease
	STAT4 overexpression	- unknown, T_{reg} cells hypothesized to be normal
4) Lymphopenic T cell transfer	Naïve T_{conv} transfer into SCID/ $RAG^{-/-}$ mice	- co-transfer of nT_{reg} cells prevents disease
		- nT_{reg} + *in vivo* or *in vitro* iT_{reg} cells treat disease

Tableau 1 : Rôles des Treg dans les principaux modèles murins de colites (Mayne et al., 2013).

Chez l'homme, l'implication des Treg dans le contrôle de l'inflammation est illustrée par le développement précoce d'une entéropathie sévère au cours du syndrome IPEX (Wildin et al., 2001; Gambineri et al., 2003) et chez les patients atteints de MICI en poussée. En effet, des anomalies du compartiment T régulateur pouvant participer à l'apparition et/ou la persistance de la maladie ont été mises en évidence au cours des MICI. La proportion de nTreg circulants est diminuée chez les patients atteints de MC et de RCH actives suggérant une corrélation inverse entre le nombre de nTreg circulants et l'intensité de la maladie (Maul et al., 2005). *A contrario*, le taux de Treg dans la *lamina propria* et les ganglions mésentériques de patients avec une MICI en poussée est faiblement augmenté en comparaison de celui trouvé chez des contrôles sains (Makita et al. 2004; Maul et al., 2005; Holmen et al., 2006). Ceci est d'ailleurs corrélé avec d'autres observations qui montrent une augmentation quantitative de la population de Treg dans la muqueuse digestive inflammatoire au cours de certaines infections (diverticulite, colite à CMV, colite pseudomembraneuse, etc.). Toutefois, cette fréquence accrue de nTreg dans l'intestin au cours des MICI reste proportionnellement plus faible que celle observée lors des pathologies digestives infectieuses, suggérant un déficit « relatif » de nTreg dans l'intestin au cours des MICI en phase active et une redistribution des Treg entre les compartiments circulants et tissulaires.

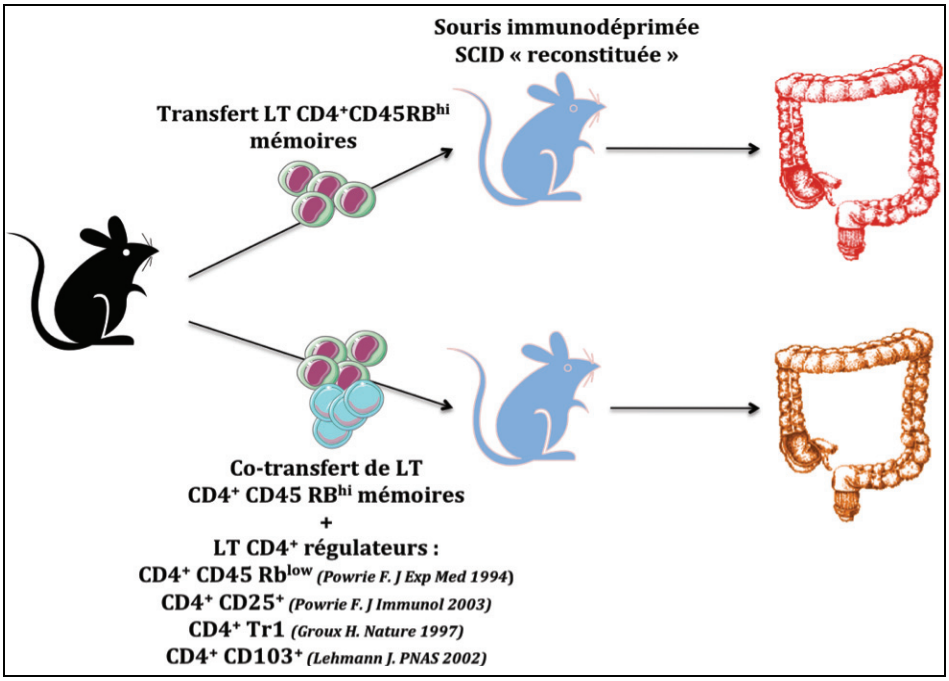


Figure 21 : Différentes sous-populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) abrogent la colite induite par transfert de LT CD4^{+}CD45RB^{hi} mémoires dans le modèle de souris SCID reconstituée.

Enfin, des tests fonctionnels *in vitro* de suppression de la prolifération de Tconv à l'aide de Treg issus du sang périphérique et de la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI ont montré que la capacité suppressive des Treg est conservée (Makita et al., 2004; Maul et al., 2005; Holmen et al., 2006). Cette absence d'altération des fonctions régulatrices des Treg est en opposition avec les résultats obtenus dans d'autres pathologies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde) qui mettent en évidence un déficit fonctionnel des Treg chez les malades par rapport aux sujets contrôles (Ehrenstein et al., 2004). Une physiopathologie différente entre ces deux maladies inflammatoires ou bien des Treg *in vitro* fonctionnels mais *in vivo* rendus anergiques par le microenvironnement intestinal, sont quelques-unes des hypothèses qui pourraient expliquer les discordances observées en terme de fonctions suppressives des Treg dans ces pathologies.

Le recours aux modèles animaux de colite qui reproduisent les caractéristiques des MICI, permet d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui participent à l'initiation et/ou à la chronicisation d'une inflammation intestinale. Bien que la majorité des processus détaillés ci-après soient observés chez la souris, ceux-ci restent à l'état d'hypothèses chez l'homme.

2.2. Recrutement des Treg dans l'intestin

Dans des conditions non inflammatoires, les Treg sont présents dans la *lamina propria* du colon et les ganglions mésentériques. Leur proportion semble légèrement augmentée chez l'homme au cours des MICI en poussée comparé aux sujets sains. Leur présence dans l'intestin suggère que les Treg sont recrutés du compartiment circulant ou des organes lymphoïdes secondaires vers le site intestinal inflammatoire. Les deux principales molécules impliquées dans le recrutement des lymphocytes (régulateurs et/ou effecteurs) vers l'intestin sont d'une part l'intégrine $\alpha4\beta7$ et d'autre part le récepteur de chimiokine CCR9. Cette dernière se lie à la chimiokine CCL25, exprimée par les cellules épithéliales intestinales et les cellules endothéliales de la *lamina propria* (Wurbel et al., 2001). Le ligand de $\alpha4\beta7$ est la molécule d'adhésion muqueuse MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) présente notamment à la surface de l'endothélium intestinal. La liaison à MAdCAM-1 induit les processus de roulement puis attachement à la paroi vasculaire, étapes initiales indispensables à l'extravasation des lymphocytes vers les tissus. La L-sélectine (CD62-L) pourrait également jouer un rôle dans la migration lymphocytaire vers les plaques de Peyer en interaction avec l'intégrine $\beta7$. L'expression de l'intégrine αE (CD103) à la surface des LT $CD4^+$, LT $CD8^+$ et des DC, contribuerait au recrutement de ces cellules immunes vers le site intestinal. Tandis que le phénotype est majoritairement $CD103^+$ pour les nTreg migrant vers les tissus, les nTreg

circulants ont préférentiellement un phénotype $CD103^-$ (Huehn et al., 2004). Le transfert à des souris immunodéficientes reconstituées par des LT $CD4^+$ naïfs issus de souris invalidées pour CD103, induit une colite, suggérant que l'expression de CD103 n'est pas requise pour le recrutement d'effecteurs dans l'intestin. Par ailleurs, les nTreg de souris déficientes pour CD103 sont aussi efficaces que les nTreg issus de souris sauvages pour prévenir ou contrôler une colite médiée par les LT (Annacker et al., 2005). Ces données montrent que l'expression par les nTreg de la molécule CD103 n'est pas indispensable à leur recrutement dans la muqueuse intestinale. Toutefois, lorsque des nTreg et des LT naïfs sont co-transférés à des souris invalidées pour CD103, ces nTreg sont incapables d'inhiber la colite. De manière identique, un traitement par anticorps anti-CD103 inhibe le contrôle de la colite par les nTreg. Aussi, même si l'expression de CD103 à la surface des nTreg n'est pas nécessaire à leur migration vers l'intestin, son absence ou son blocage chez la souris reconstituée abroge leur fonction suppressive. En ce sens, l'expression de CD103 à la surface des DC semble impliquée dans le recrutement des LT vers l'intestin. Les molécules indispensables au recrutement sélectif des nTreg du sang circulant ou des ganglions vers l'intestin restent donc à déterminer aussi bien dans les modèles murins que chez l'homme.

2.3. Néoconversion de Treg dans l'intestin

Il est actuellement admis que les Treg présents dans les ganglions mésentériques et la muqueuse digestive ont une double origine. Comme nous l'avons exposé précédemment, on distingue les nTreg produits dans le thymus puis recrutés secondairement dans l'intestin, des Treg induits directement en périphérie dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin à partir de LT naïfs. Coombes et al. ont mis en évidence que chez la souris normale, une fraction significative de DC issues de la *lamina propria* du colon et des ganglions mésentériques expriment la molécule CD103 aussi appelée intégrine αE (Coombes et al., 2007). *In vitro*, ils ont montré dans un système de co-culture de LT $CD4^+$ isolés à partir de rate de souris sensibilisées à l'ovalbumine et de DC exprimant ou non CD103, que seules les DC $CD103^+$ sont capables en présence d'ovalbumine d'induire l'expression de Foxp3 par les LT $CD4^+$. Cette capacité de néoconversion des LT naïfs en Treg a été confirmée dans l'intestin grâce à un modèle murin de transfert adoptif utilisant des souris exprimant le gène eGFP sous le contrôle du promoteur de Foxp3 (souris Foxp3GFP). Ainsi, chez des souris $Rag^{-/-}$, dépourvues en LT et LB, le co-transfert de LT $CD4^+eGFP^-$ et de LT $CD4+CD25^{high}$ aboutit en quelques semaines à la mise en évidence, dans les ganglions mésentériques et la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris receveuses, d'une population néoconvertie de LT $CD4^+eGFP^+$, exprimant alors Foxp3 (Sun et al., 2007).

Cette néoconversion a également été identifiée dans la *lamina propria* du colon dans un système murin de transfert identique (F. Hacini, D. Kaiserlian ; données personnelles non publiées). Ce processus nécessite la présence d'antigènes et de DC $CD103^+$ dans un microenvironnement contenant du TGFβ mais également de l'acide rétinoïque (RA). Le TGFβ est produit par les cellules sous une forme complexée et inactive. L'activation du TGFβ est essentielle pour qu'il puisse exercer ses fonctions biologiques. Comme nous l'avons vu précédemment, deux équipes ont montré en 2011, qu'une population particulière de DC $CD103^+$ issue de l'intestin exprimant l'intégrine αvβ8 était capable d'activer le TGFβ latent et d'induire la conversion des LT naïfs en Treg (Païdassi et al., 2011; Worthington et al., 2011). L'inflammation intestinale s'accompagne chez la souris d'une abrogation de la capacité des DC $CD103^+$ issus des ganglions mésentériques à induire *in vitro* la conversion des LT naïfs en Treg (Laffont et al., 2010). Toutefois, l'impact de l'inflammation intestinale sur la population particulière de DC exprimant l'intégrine αvβ8 n'est pas connue à ce jour.

Le RA est un métabolite de la vitamine A produit par les DC, les cellules épithéliales intestinales et certains macrophages. Coombes et al. ont montré, *in vitro*, que l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur du RA bloque la conversion de LT $CD4^+Foxp3^-$ en LT $Foxp3^+$ par les DC $CD103^+$ (Coombes et al., 2007). Les mécanismes par lesquels le RA augmente l'expression de Foxp3 par les Treg sont probablement multifactoriels. Tout d'abord, le RA diminue très nettement l'expression du récepteur à l'IL-6 à la surface des LT $CD4^+$ naïfs, or l'IL-6 en présence de TGFβ est capable d'induire une différenciation en cellules effectrices productrices d'IL-17 (Th17) (Veldhoen et al., 2006). De plus, Hill et al. ont montré que le RA diminue la sécrétion de certains facteurs inhibant la néoconversion des Treg produits par les cellules mémoires $CD4^+CD44^{hi}$. Le RA agit donc de manière indirecte sur la conversion des Treg périphériques en levant l'inhibition par les LT mémoires (Hill et al., 2008). Enfin, l'importance du TGFβ et du RA pour générer des Treg, est également illustrée par l'identification d'une population de macrophages dans le côlon capable d'induire des iTreg en sécrétant de l'IL-10, du TGFβ et du RA (Denning et al., 2007) **(figure 22)**. Une activité diminuée de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui métabolise la vitamine A en RA a été retrouvée dans les DC et les macrophages issus du colon de patients porteurs d'une RCH (Magnusson et al., 2015).

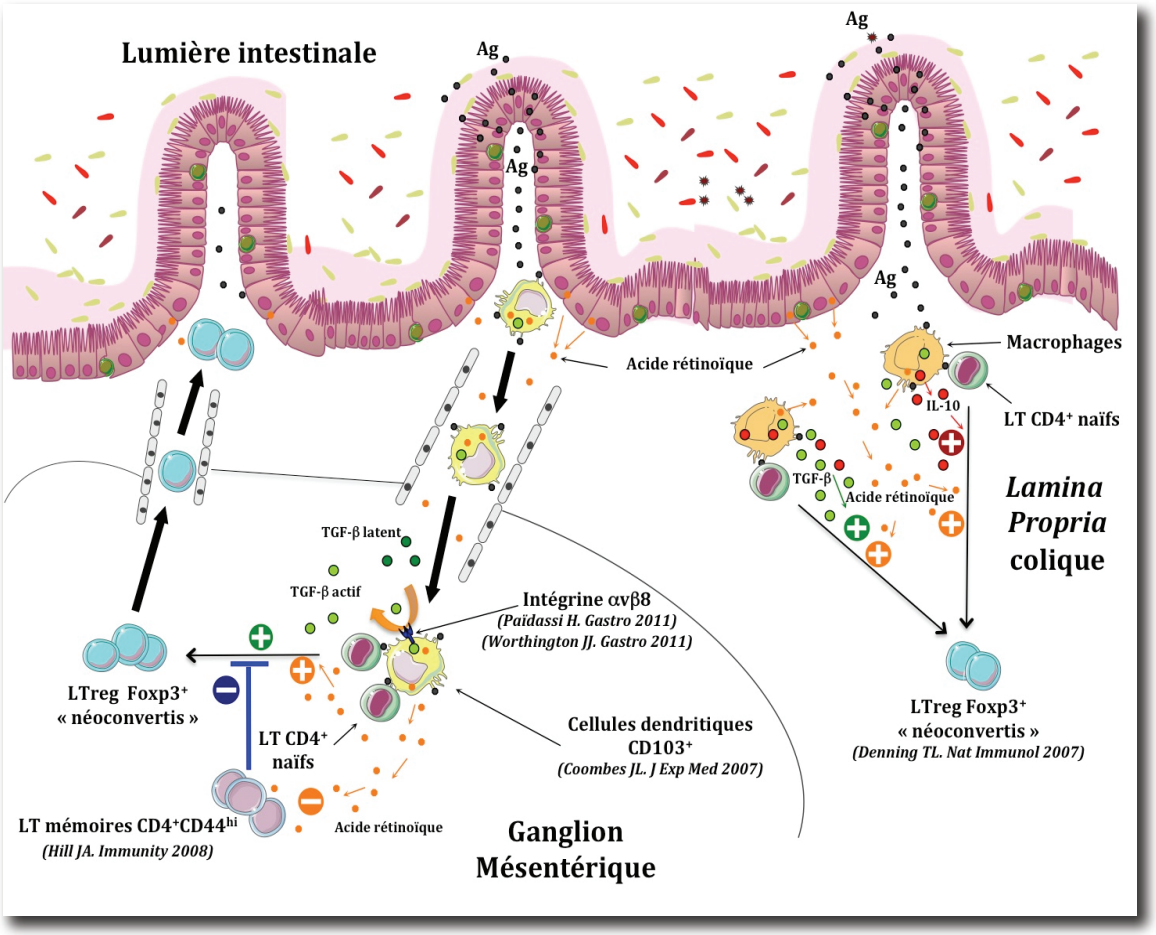


Figure 22 : Néoconversion des Treg dans les ganglions mésentériques et la *lamina propria* colique.

Outre la formation d'iTreg Foxp3$^+$, l'induction périphérique de Treg Foxp3$^-$ produisant de l'IL-10, nommés Tr1, est impliquée dans la régulation de l'inflammation intestinale. Non seulement le co-transfert de cellules Tr1 générées *in vitro* (Groux et al., 1997) à des souris SCID reconstituées par des LT naïfs abroge la colite, mais des travaux récents ont aussi caractérisé les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'inflammation intestinale induite par les Tr1. Awasthi et al. ont ainsi observé *in vitro* des DC capables de sécréter de l'IL-10, du TGFβ et de l'IL-27. L'IL-27, qui appartient à la famille de l'IL-12, induit la différenciation de LT naïfs en cellules Tr1 dont les propriétés suppressives sont médiées par l'IL-10 (Awasthi et al., 2007). Ce mécanisme d'induction de cellules Tr1 par l'IL-27 a été confirmé dans un modèle de colite par transfert de cellules T (Mishima et al., 2015). Le rôle de l'IL-27 reste cependant à vérifier *in vivo* au cours des maladies inflammatoires digestives, d'autant plus qu'il ne semble pas univoque. Ainsi, certaines équipes ont décrit l'IL-27 comme une cytokine inductrice de LT Th17 remettant en cause son action anti-inflammatoire (Visperas et al., 2014).

La capacité et l'importance de la néoconversion des Treg *in vivo* dans l'intestin dans des conditions inflammatoires restent à déterminer, en particulier en terme de fréquence et de vitesse d'induction mais également en terme de capacité suppressive des iTreg ainsi générés. L'induction de cellules régulatrices au sein des structures intestinales apparaît comme une voie thérapeutique possible pour les MICI, mais l'absence d'efficacité des essais thérapeutiques chez l'homme de traitement par le RA, pourtant prometteur, illustre la nécessité d'approfondir les processus de néoconversion *in vivo* en particulier chez l'homme et de mieux appréhender la contribution des Treg soumis au microenvironnement inflammatoire de l'intestin.

2.4. Survie des Treg dans l'intestin

Après avoir été recrutés ou néoconvertis dans l'intestin, la survie des Treg est nécessaire pour qu'ils puissent exercer leur fonction régulatrice. Un défaut de survie de cette population régulatrice pourrait ainsi expliquer l'incapacité des Treg à contrôler l'inflammation intestinale. A l'état normal, les nTreg survivent dans le sang circulant pendant de longues périodes même sans être stimulés à nouveau par l'antigène. En effet, le transfert de nTreg spécifiques d'antigène à des souris dépourvues de cet antigène s'accompagne de la persistance de ces nTreg. Deux cytokines, l'IL-2 et le TGFβ semblent jouer un rôle fondamental dans la survie des Treg. Ainsi, les souris déficientes en IL-2 ou TGFβ ou traitées par un anticorps anti IL-2, ont une fréquence de LT $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ circulants diminués. Toutefois, l'IL-2 contribue aussi à une amplification des réponses effectrices. En ce sens, il a été montré chez la souris en situation d'homéostasie, une proportionnalité entre le pool de Treg et celui de Teff sécrétant de l'IL-2 (Almeida et al., 2006). Il n'existe pas de données dans la littérature concernant la survie des Treg dans la muqueuse digestive en situation normale chez la souris et *a fortiori* chez l'homme. Une altération de la survie des nTreg dans l'intestin dans des conditions inflammatoires ne peut être exclue et pourrait participer au déséquilibre de la balance régulateurs/effecteurs.

2.5. Fonctions suppressives des Treg dans l'intestin inflammatoire

Comme nous l'avons évoqué précédemment, on connaît à ce jour un grand nombre de processus par lesquels les Treg peuvent exercer leur activité suppressive sur les cellules effectrices. Les dysfonctions de certains de ces mécanismes sont impliquées dans l'apparition d'une inflammation intestinale chez la souris. Chez l'homme, il n'a pas été mis en évidence *in vitro* d'anomalie de fonction des Treg au cours des MICI (Maul et al., 2005). Cependant on peut imaginer que dans un microenvironnement inflammatoire, les capacités régulatrices des Treg soient inappropriées, dépassées voire bloquées. Ainsi, de nombreux gènes de susceptibilité

des MICI comme ceux concernant l'autophagie, NOD2 ou le récepteur de l'IL-23 sont à même d'induire des modifications du microenvironnement intestinal pouvant moduler la fonctionnalité des Treg *in vivo*.

Certains Treg sécrètent de l'IL-10 et du TGFβ, cytokines aux propriétés anti-inflammatoires. En 2006, Powrie et al. ont montré dans des expériences de transfert chez la souris que la proportion, dans le colon, de Treg Foxp3$^+$ produisant de l'IL10 (TR1-like) est corrélée à l'abrogation de la colite (Uhlig et al., 2006). De même, plusieurs essais *in vivo* de blocage de l'IL-10 et/ou du TGFβ dans des modèles murins ont conduit au développement d'une colite par dysfonctionnement des Treg (Maloy et al., 2003). Chez la souris, l'injection d'IL-10 recombinante s'est révélée très efficace pour traiter une colite, mais les essais thérapeutiques chez l'homme ont été décevants. Par ailleurs, *in vitro* les Treg issus de souris déficientes pour l'IL-10 ou le TGFβ ont une capacité suppressive normale suggérant que les Treg sont dotés de mécanismes de suppléance pour contrôler les réponses immunes.

En 2007, Collison et al. ont identifié une nouvelle cytokine anti-inflammatoire, l'IL-35, qui participe à la fonction régulatrice des Treg (Collison et al., 2007). En effet, l'IL-35 est un hétérodimère composé de l'IL-12α (p35) et d'Ebi3 (IL-27 ; p28) produit quasi exclusivement par les Treg. Son expression est régulée par Foxp3. Les Treg de souris invalidées pour les sous-unités p35 ou p28 ont des capacités suppressives *in vitro* diminuées et contrôlent de façon moins efficace une colite médiée par des Teff. L'induction d'apoptose par les Treg sur les Teff par privation d'IL-2 constitue un mécanisme suppressif décrit dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires. Ce mécanisme de suppression a été observé dans des expériences *in vitro* mais également *in vivo* de colite chez la souris. La contribution des autres mécanismes de suppression des Treg (production de granzyme A ou B et perforine, rôle de l'IL-9, de l'adénosine et des galectines) mis en évidence en périphérie, n'ont pas à ce jour été spécifiquement étudiés dans le compartiment intestinal.

La résistance des Teff aux mécanismes de suppression des Treg est également une hypothèse permettant d'expliquer le défaut de contrôle de l'inflammation par les Treg alors même que leur fonction intrinsèque semble conservée. Monteleone et al. ont ainsi montré que les Teff des patients porteurs d'une MICI sur expriment SMAD7 les rendant ainsi résistants au TGFβ sécrété par les Treg (Monteleone et al., 2001). Deux études ont toutefois infirmé cette hypothèse avec une absence de différence de réponse à la suppression entre les Teff issus de patients MICI *vs* contrôles (Holmen et al., 2006; Rahman et al., 2010).

2.6. Inhibition et réversibilité du statut régulateur au site inflammatoire

Nous avons décrit précédemment le recrutement des Treg, leur possible induction dans l'intestin à partir de LT naïfs, mais également leurs diverses fonctions suppressives. Alors même que ces différentes étapes se déroulent correctement, il est possible que les modifications du microenvironnement intestinal dans un contexte inflammatoire soient responsables d'anomalies fonctionnelles des Treg. De façon intéressante, l'expression de Foxp3 est réversible sous l'influence de certaines cytokines présentes au cours de l'inflammation. En effet, Horwitz et al. ont montré *in vitro* que des nTreg peuvent devenir producteurs d'IL-17 dans un milieu comprenant du TGFβ et de l'IL-6 (Horwitz et al., 2008). Cette capacité des Treg à se différencier en Teff est réduite lorsqu'une expérience identique est réalisée à partir de Treg induits par de l'IL-2 et du TGFβ (Zheng et al., 2008). Ces résultats mettent en exergue la plasticité fonctionnelle entre le statut régulateur et effecteur d'un même LT en fonction des conditions immunologiques locales auxquelles il est soumis. Schmitt et al. ont ainsi montré que des iTreg obtenus par conversion *in vitro* et transférés secondairement à une souris colitique, perdaient dans la grande majorité des cas (85 %) leur expression de Foxp3 devenant des ex-iTreg aux propriétés inflammatoires Schmitt et al., 2012). Ces données pointent aussi le rôle clé du microenvironnement, en particulier celui de certaines cytokines comme le TGFβ. Ce dernier participe à l'obtention et au maintien de fonctions suppressives des Treg, mais est également impliqué, en présence d'IL-6, dans la perte de leur statut régulateur et l'induction de cellules effectrices Th17 (Xu et al., 2007). Ainsi, le TGFβ a une dualité fonctionnelle, pouvant exercer alternativement une action anti ou pro-inflammatoire en fonction des cytokines présentent dans le milieu (Zheng et al., 2008). L'IL-21 est aussi capable de bloquer l'induction de Foxp3 par le TGFβ chez les LT $CD4^+$ naïfs. Dans des modèles de colite chez des souris SCID reconstituées, l'IL-21 est responsable de l'acquisition par les LT naïfs d'un phénotype Th17 en présence de TGFβ (Fantini et al., 2007).

Bien que le rôle de l'IL-23 ait été initialement décrit dans la stabilisation de la voie effectrice Th17, l'IL-23 semble aussi capable d'inhiber l'expression de Foxp3 par les LT $CD4^+$ dans l'intestin. Izcue et al. ont notamment montré que le pourcentage de cellules exprimant Foxp3 est significativement supérieur, dans les ganglions mésentériques et la *lamina propria* de l'intestin grêle, après transfert de LT naïfs chez une souris double déficiente ($Rag1^{-/-}$ $IL\text{-}23^{-/-}$) par rapport à une souris $Rag1^{-/-}$ non déficiente pour l'IL-23 (Izcue et al., 2008). Bien que les mécanismes à l'origine de ce blocage fonctionnel des Treg soient encore imprécis, l'équilibre entre effecteurs et régulateurs dans l'intestin est conditionné par le microenvironnement tissulaire notamment les cytokines.

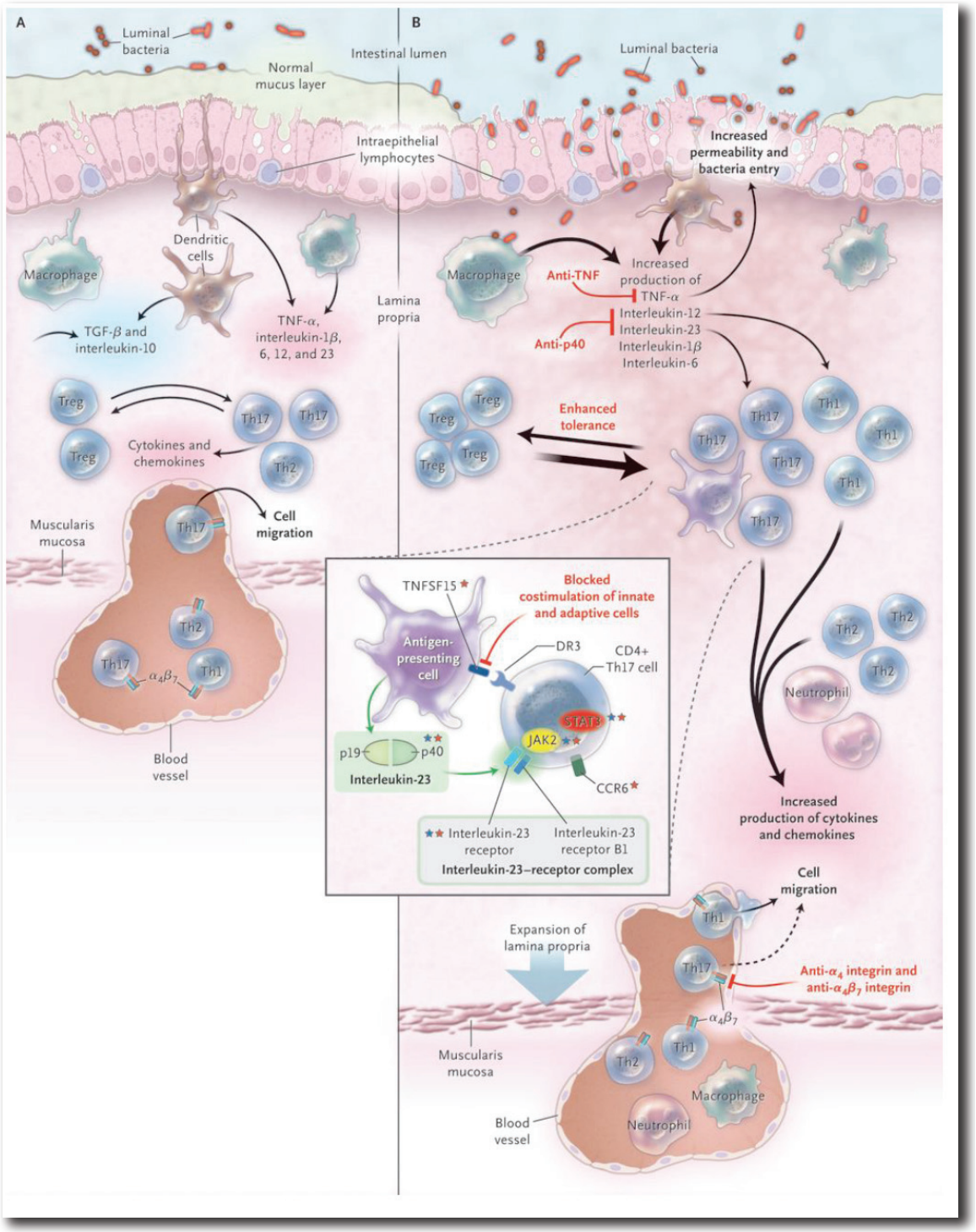


Figure 23: Système immunitaire intestinal en situation d'homéostasie (A) et en cas de MICI (B) (d'après Abraham et al., 2011).

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

PUBLICATION N°1

"Therapy with anti-TNFα antibody enhances number and function of Foxp3$^+$ regulatory T cells in Inflammatory Bowel Diseases"

Gilles Boschetti, Stephane Nancey, Fatima Sardi, Xavier Roblin,

Bernard Flourié et Dominique Kaiserlian

Manuscrit publié dans *Inflammatory Bowel Diseases* en 2011

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une sécrétion exagérée de TNFα, une hyperactivation des lymphocytes T effecteurs (Teff) et un contrôle insuffisant par les lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg). L'objectif de ce travail prospectif était d'étudier l'impact à court terme du traitement par anticorps anti-TNFα (infliximab ou adalimumab) sur la proportion, le phénotype et la fonction suppressive de Treg circulants issus de patients souffrant de MICI en poussée.

Seize patients atteints de maladie de Crohn et 9 patients souffrant de rectocolite hémorragique, tous naïfs d'anti-TNFα, étaient prospectivement inclus. Des prélèvements sanguins étaient réalisés juste avant et 14 jours après la première administration du traitement par anti-TNFα. Les prélèvements sanguins de 11 volontaires sains étaient utilisés comme contrôle. La proportion des Treg au sein des lymphocytes T circulants et leur phénotype étaient analysés par cytométrie en flux ; leur fonction suppressive était évaluée *in vitro* par la capacité des Treg purifiés ($CD4^+CD25^+CD127^-$) à inhiber la prolifération de lymphocytes T effecteurs ($CD4^+CD25^-$) allogéniques stimulés.

Les patients avec une MICI en poussée avaient une proportion significativement diminuée de Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ circulants par rapport aux sujets sains (2,8±0,4% *vs* 4,6±0,6%; p=0,01). Chez ces patients, une administration unique d'anti-TNFα augmentait de manière significative la proportion des Treg circulants (4,0±0,5% *vs* 2,8±0,4% avant traitement; p=0,01) ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence du facteur de transcription Foxp3 (498±159 *vs* 203±51 avant traitement; p=0,02). Les Treg purifiés issus de patients traités par anti-TNFα avaient une capacité fonctionnelle suppressive accrue vis-à-vis des lymphocytes T effecteurs allogéniques (pourcentage d'inhibition de la prolifération *in vitro* des lymphocytes T effecteurs au ratio 1

Treg pour 8 lymphocytes T effecteurs : 66±10% *vs* 28±5% avant traitement, p=0,04). Il n'y avait pas de corrélation entre la réponse clinique au traitement et l'augmentation de la fréquence et/ou de la fonction des Treg circulants.

Nos données montrent que le traitement par anticorps anti-TNFα s'accompagne d'une augmentation rapide et significative des Treg Foxp3^{+} circulant dans le sang de patients atteints de MICI en poussée et d'une potentialisation de la fonction suppressive des Treg. Ce travail met en évidence un nouveau mécanisme pouvant contribuer à expliquer l'effet bénéfique des anti-TNFα au cours des MICI.

Therapy with anti-TNFα Antibody Enhances Number and Function of Foxp3$^+$ Regulatory T Cells in Inflammatory Bowel Diseases

Gilles Boschetti,†* *Stéphane Nancey,*†* *Fatima Sardi,** *Xavier Roblin,‡* *Bernard Flourié,*†* *and Dominique Kaiserlian**

Background: Inflammatory bowel diseases (IBDs) are associated with up-regulation of TNFα, hyperactivation of proinflammatory effector T cells (Teffs) and inefficient control by regulatory CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ T cells (Tregs). The aim of this prospective study was to investigate the short-term impact of treatment of IBD patients with anti-TNFα antibodies (infliximab or adalimumab) on the frequency, phenotype, and suppressive function of Tregs.

Methods: Active IBD patients including 16 with Crohn's disease and 9 with ulcerative colitis were treated with anti-TNFα mAb. PBMCs were harvested immediately before and 2 weeks after the first injection. The frequency and phenotype of circulating CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ Tregs were analyzed by flow cytometry, and their suppressive function was assessed by the ability of purified CD4$^+$CD25$^+$CD127$^-$ Tregs to inhibit the proliferation of allogenic CD4$^+$CD25$^-$ Teffs.

Results: CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ Treg frequency was significantly lower in active IBD patients than in controls (2.8% ± 0.4% vs. 4.6% ± 0.6%, respectively; $P = 0.01$). On day 14 following the first anti-TNFα infusion, the frequency of circulating Tregs was significantly enhanced in IBD patients (4.0% ± 0.5% vs. 2.8% ± 0.4%, before treatment; $P = 0.001$), with a 2- to 3-fold increase in the intensity of Foxp3 expression. In addition, infliximab treatment enhanced the suppressive function of circulating Tregs, as shown by inhibition of Teff proliferation at a 1:8 Treg/Teff ratio (28% ± 5% vs. 66% ± 10%, after treatment; $P = 0$ .04).

Conclusions: These data demonstrate that anti-TNFα treatment of active IBD rapidly enhances the frequency of functional Foxp3$^+$ Tregs in blood and potentiates their suppressive function. This indicates that Treg potentiation may represent an unanticipated outcome of anti-TNFα biotherapy in IBD.

(Inflamm Bowel Dis 2011;17:160–170)

Key Words: anti-TNFα, regulatory T cells, infliximab, adalimumab, Inflammatory bowel diseases

Inflammatory bowel diseases (IBD) encompassing Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are supposed to be linked to impaired mucosal tolerance to the gut microbial flora, leading to the development of an intestinal delayed-type hypersensitivity reaction, ultimately responsible for severe and irreversible intestinal lesions. The inflammatory T-cell response is induced via the local release of proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor α (TNFα), IL-12/IL-23, and IFNγ[1–4] and mediated by both pathogenic Th1- and Tc1-type CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells.[5–7] Anti-TNFα mAbs including both infliximab (IFX), a chimeric mouse antibody, and adalimumab (ADA), a humanized antibody, have demonstrated their efficacy for the induction and maintenance of remission in a significant proportion of patients refractory to conventional therapy.[8,9] However, some patients failed to respond or lost response with time to the treatment.

In vitro studies using normal human cells and ex vivo studies with cells from treated IBD patients indicate that several mechanisms can contribute to the clinical efficacy of anti-TNFα mAb therapy. These include neutralization of soluble TNFα present in serum and mucosal gut lamina propria,[10] binding to the membrane-anchored TNFα precursor[11] or to TNFα bound to its high-affinity receptor, TNF-R$_{II}$. Anti-TNFα mAbs have been shown to promote apoptosis of monocytes and T cells in vitro[12] and to correct the defect in T-cell apoptosis characteristic of IBD.[13,14] In addition, anti-TNFα mAb treatment promotes restoration of the gut barrier[15] and healing of intestinal lesions.[16]

Increasing evidence has shown the protective role of Foxp3$^+$ CD4$^+$ regulatory T cells (Tregs) in autoimmune and inflammatory diseases and their critical role as

Received for publication February 5, 2010; Accepted March 5, 2010.

From the *INSERM U 851 "Immunité et Vaccination," CERVI, IFR 128 Biosciences Lyon Gerland, Lyon, France, †Hospices Civils de Lyon, Service de Gastroentérologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France, ‡Service de Gastroentérologie, CHU Hôpital Nord, Saint-Etienne, France.

Gilles Boschetti and Stéphane Nancey are co–first authors.

Supported by an institutional grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by the Association François Aupetit.

Reprints: Dr. Dominique Kaiserlian, INSERM-U851, 21 Av. Tony Garnier, 69365 LYON CX 07, FRANCE (e-mail: dominique.kaiserlian@inserm.fr)

Copyright © 2010 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.21308

Published online 6 May 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

regulators of peripheral self-tolerance.[17] Tregs contribute to oral tolerance,[18,19] maintenance of gut homeostasis, and protection against intestinal inflammation.[20] Alterations in the number, survival, or suppressive function of Tregs in mice with genetic disruption of IL-2,[21] MHC class II,[22] TGFβ,[23] or IL-10[24] induce spontaneous development of chronic inflammatory intestinal disorders resembling IBD. Constitutive $CD4^+$ Tregs express Foxp3, a member of the forkhead-winged helix family of transcription factor that plays a critical role in the development and suppressive function of Tregs.[25,26] That Foxp3 is a key molecule in Treg protection from intestinal inflammation is supported by the observation that scurfy mice with a mutated *Foxp3* gene, as well as Foxp3-deficient[26,27] mice, develop gut lesions mimicking IBD. Along these lines, mutation of Foxp3 in human is linked to a selective defect in Tregs and is responsible for an immunodeficiency syndrome called IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked). This disorder is characterized by development early in life of severe and often lethal enterocolitis, demonstrating the importance of Tregs in maintenance of gut homeostasis and self-tolerance.[28,29] Of the few studies on the status of Tregs in active IBD patients, 1 study documented a slight decrease in circulating Foxp3 Tregs that was only partly compensated for by an increase in their numbers within lamina propria.[30] Another study reported normal suppressive function of $CD4^+CD25^{high}$ T cells of mesenteric lymph nodes from IBD patients during active disease.[31]

This prompted us to investigate whether anti-TNFα therapy in active IBD patients could have an impact on the frequency and/or function of peripheral Tregs. We show here that a single administration of anti-TNFα is associated with enhancement of the proportion of $Foxp3^+$ Tregs and of the expression of the Foxp3 protein and the suppressive function of $Foxp3^+$ Tregs.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and Healthy Volunteers

Twenty-five consecutive IBD patients (age 36 ± 3 years, mean ± SEM, range 19–73 years) who should be treated by anti-TNFα according to the recommended inductive protocol were prospectively included. They had been previously diagnosed for IBD (16 with CD and 9 with UC) based on clinical, biological, endoscopic, and histological signs of the disease, according to the Lennard-Jones criteria.[32] The baseline characteristics are summarized in Table 1. At inclusion, all patients had active IBD, as determined by a Crohn's disease activity index (CDAI) > 150 for CD and a Lichtiger index ≥ 6 for UC. All patients were unresponsive to or dependent on conventional treatment (i.e., steroids, immunosuppressors), and none of them had received prior anti-TNFα biotherapy. Clinical response to anti-TNFα treatment was defined as a decrease in the CDAI of at least 70 points or a decrease in the Lichtiger's score of at least 3 points; clinical remission was defined as a CDAI < 150 points or a Lichtiger score < 3. Clinical response or remission was evaluated 2 and 6 weeks after the first anti-TNFα infusion. Blood samples from 11 healthy volunteers paired for sex and age (6 females and 5 males, range 18–55 years) were used as controls. All IBD patients and healthy volunteers gave their written informed consent to the protocol, which has been previously accepted by the local Ethical Committee of Lyon.

TABLE 1. Baseline Characteristics of IBD Patients and Controls

	CD	UC	Healthy volunteers
Number	16	9	11
F/M	9/7	6/3	6/5
Mean age, years (range)	35 (19–73)	38 (21–67)	30 (18–55)
Duration of disease, years	10	9	
CD location, *n* (%)			
Ileocolonic	11 (69)		
Ileal	4 (25)		
Colonic	1 (6)		
Anoperineal lesions, *n* (%)	11 (69)		
Concomitant medication, *n* (%)			
Aminosalicylates	2 (13)	7 (78)	
Corticosteroids	9 (56)	5 (56)	
Immunosuppressors			
—Azathioprine/6-MP	10 (63)	3 (33)	
—Methotrexate	1 (6)	3 (33)	
Disease activity			
CDAI	198 ± 20		
Lichtiger's score		8 ± 0.7	
Anti-TNFα treatment, *n* (%)			
Infliximab (IFX)	10 (62)	9 (100)	
Adalimumab (ADA)	6 (38)	0	

Anti-TNFα Treatment

The anti-TNFα mAb, infliximab (IFX; Remicade, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) was administered intravenously at a dose of 5 mg/kg to 10 of 16 CD patients and all 9 UC patients. The anti-TNFα mAb, adalimumab (ADA; Humira, Abbott, Abbott Park, IL, USA) was injected subcutaneously at a dose of 160 mg to 6 of 16 CD patients. Concomitant treatments (including oral steroids, immunosuppressors, and 5-ASA) were maintained stably

until the end of the study, that is, 6 weeks after the first anti-TNFα infusion. Patient follow-up during the protocol period included clinical examination and routine biological analysis (hematocrit and leukocyte count).

Blood Samples

Blood samples were harvested from the patients immediately before and 2 weeks after the first anti-TNFα mAb injection, that is, just before the planned second injection with IFX or ADA. Blood samples from 11 healthy volunteers were harvested only once.

Flow-Cytometry Assay

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), freshly isolated from blood by density gradient centrifugation (lymphocyte separation medium, Eurobio, Les Ulis, France) were surface-stained with FITC-conjugated CD4, CD62L, lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3), PE-conjugated CD8, CD4, inducible costimulator (ICOS), PECy5-conjugated CD3, CD25, and PeCy7-conjugated CD4. An intracellular Foxp3 staining was performed according to the manufacturer's instructions (eBiosciences, San Diego, CA). Briefly, cells were permeabilized, fixed, and then stained with APC-conjugated Foxp3 (clone PCH 101). For each surface and intracellular staining, the relevant isotype control was used. Immunostaining was analyzed by flow cytometry on a LSRII analyzer with FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Treg Purification

$CD4^+CD25^+$ Tregs were purified from PBMC by magnetic cell separation (MACS) using a $CD4^+CD25^+$ $CD127^-$ regulatory T-cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). $CD4^+$ $CD127^-$ T cells were first isolated by MACS-negative selection using a cocktail of lineage-negative biotinylated mAb and antibiotin microbeads. $CD4^+CD25^+CD127^-$ T cells were subsequently isolated by positive selection using anti-CD25 mAb-coated microbeads. The resulting $CD4^+CD25^+$ $CD127^-$ Tregs eluted from the column routinely contained $> 90\%$ $Foxp3^+$ cells assessed by flow cytometry.

FACS Sorting of Naive T Cells

Naive $CD4^+CD25^-$ T cells (Teffs) were FACS-sorted from PBMC of a single healthy human blood donor. $CD4^+$ T cells were preenriched by MACS using a $CD4^+$ T-cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Birgisch Gladbach, Germany), and $CD4^+CD25^-$ T cells were then FACS-sorted (FACSAria cell sorter; Becton Dickinson, San Jose, CA) using FITC-conjugated CD4 and PE-conjugated CD25. The purity of $CD4^+CD25^-$ T cells with this method was routinely $> 96\%$. Sorted $CD4^+CD25^-$ Teff cells were frozen in liquid nitrogen until use as Teffs in suppression assays.

In Vitro Suppression Assays

Because expression of Foxp3 is not an absolute marker of Tregs, we investigated the impact of treatment with anti-TNFα on Treg suppressive function. Graded numbers of $CD4^+CD25^+CD127^-$ T cells, containing $> 90\%$ $Foxp3^+$ cells (Tregs), were cocultured for 5 days at 37°C in 5% CO_2 in triplicate wells in the presence of allogenic $CD4^+CD25^-$ T cells (2.10^4 cells) and soluble anti-CD3/CD28 beads (1 bead/10 Teffs; Dynal Biotech, Oslo, Norway) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics. Tregs and Teffs were cocultured at 1:2 to 1:64 Treg/Teff ratios. ^{3}[H]-thymidine (1 μCi/well) was added during the last 18 hours of culture. Proliferation was assessed on day 5 of culture by ^{3}[H]-thymidine incorporation, using a β-plate liquid scintillation counter Topcount NXT (Packard instrument, Rungis, France). Cultures containing anti-CD3/CD28-stimulated Tregs alone or Teffs alone were used as negative and positive controls, respectively. The Treg suppression assay was performed in 4 IBD patients, before and after IFX, and in 4 healthy donors as controls. Percentage suppression of proliferation was determined as $1 -$ (cpm coculture Treg-Teff/cpm Teff population alone) $\times$ 100%.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann–Whitney U test (unpaired comparisons), the Wilcoxon signed rank test, or the paired t test (paired data) as appropriate. Results were considered statistically significant at a 95% level of confidence ($P < 0.05$, 2-sided). Data are expressed as means ± SEMs.

RESULTS

Active IBD Patients had Low-Frequency of Tregs

The frequency of peripheral blood Tregs was analyzed in 25 IBD patients prior to anti-TNFα treatment and 11 age-matched healthy volunteers. FACS analysis of PBMC showed a lower proportion of circulating $CD4^+CD25^{high}$ Tregs in active IBD patients, compared with in healthy volunteers (2.3% ± 0.2% vs. 4.3% ± 1.3%, respectively; $P = 0.03$; Fig. 1A,B). The frequency of $Foxp3^+$-expressing $CD4^+CD25^+$ Tregs among $CD4^+$ T cells was also significantly lower in active IBD patients (both CD and UC) compared with the controls (2.8% ± 0.4% vs. 4.6% ± 0.6%, respectively; $P = 0.01$; Fig. 1C,D). Tregs were similarly decreased in the blood of CD patients (3.1% ± 0.4%) and UC patients (2.5% ± 0.6%; $P = 0.3$; Fig. 1D). No significant correlation was found between $Foxp3^+$ Treg frequency and IBD activity, location of intestinal lesions, or drug intake (i.e., steroids,

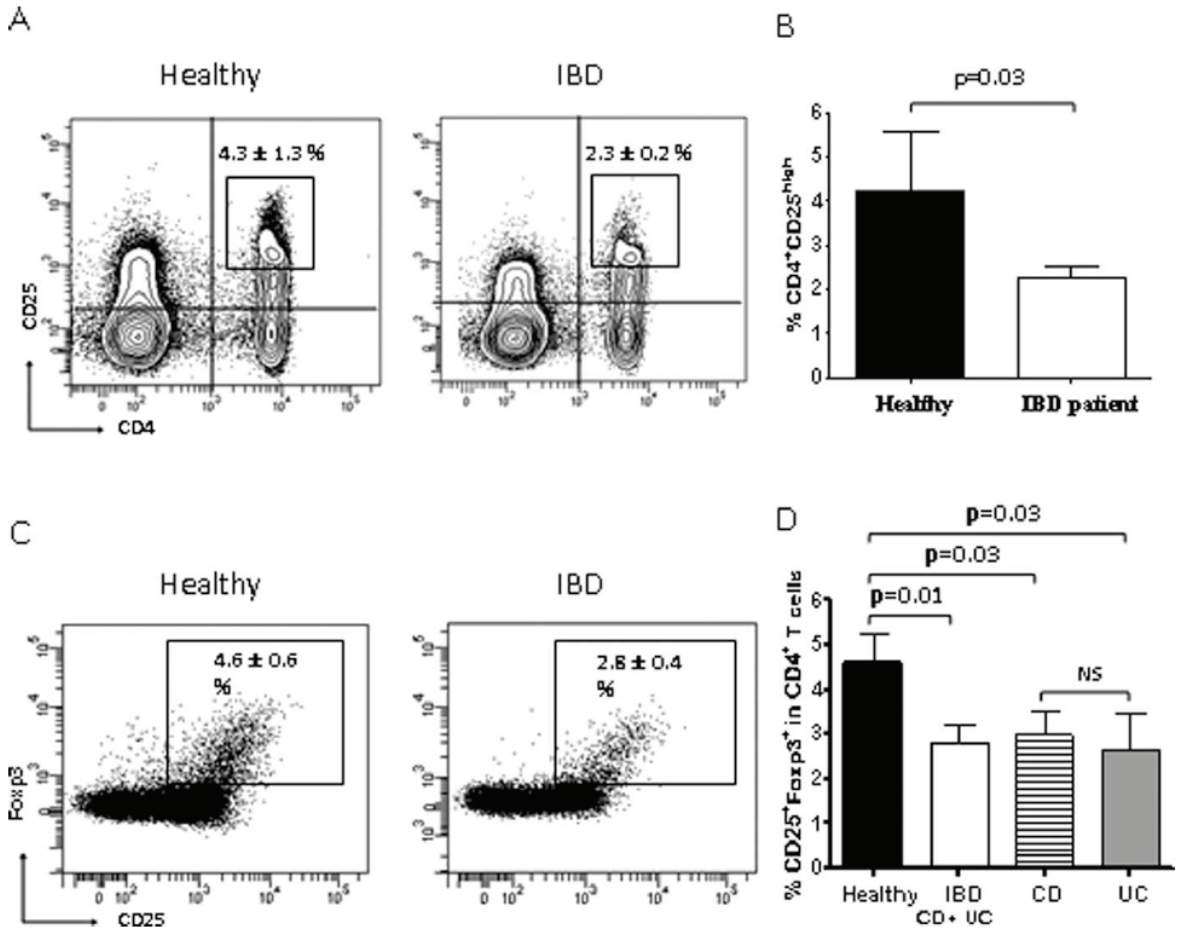


FIGURE 1. Tregs are diminished in patients with active IBD prior to anti-TNFα treatment. Representative dot plot analysis of Tregs from peripheral blood of healthy volunteers ($n = 11$; A, C, left) and active IBD patients ($n = 25$; A, C, right). The histograms (B, D) represent mean ± SEM proportion of the percent $CD4^+CD25^{high}$ T cells in total leukocytes (B) and percent $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T cells in gated $CD4^+$ T cells (D) from either healthy controls (B, D, black bars), total IBD patients (B, D, white bars), CD patients ($n = 16$; D, hatched bar), and UC patients ($n = 9$; D, gray bar).

azathioprine, 6-mercaptopurine, methotrexate, or 5-ASA; data not shown).

Anti-TNFα mAb Treatment Was Associated with Restoration of Normal Frequency and Absolute Number of Tregs

The effect of anti-TNFα mAb treatment on Tregs was analyzed by comparing the frequency, absolute number, and phenotype of Tregs 2 weeks after the first injection, as compared to before infusion. A single exposure to anti-TNFα mAb was associated with a significant increase in the percentage of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ cells in 20 of 25 IBD patients on day 14 (mean 4.0% ± 0.5%) compared with the pretreatment value (2.8% ± 0.4%; $P = 0.001$; Fig. 2A). Likewise, an increase in Treg proportion among $CD4^+$ T cells was observed in 14 of 16 CD patients (mean 4.4% ± 0.6% after vs. 2.9% ± 0.5% prior to treatment; $P = 0.003$) and 6 of 9 UC patients (3.7% ± 0.7% after vs. 2.6% ± 0.7% prior to treatment; $P = 0.05$; Fig. 2B). In CD, enhancement of Tregs was observed in 9 of 10 and 5 of 6 patients who received IFX and ADA, respectively (Fig. 2C).

Anti-TNFα mAb treatment enhanced the ratios of Tregs to either naive Teffs ($CD4^+CD25^-Foxp3^-$; 0.05 ± 0.01 vs. 0.07 ± 0.01; $P = 0.01$; Fig. 3A) or activated Teffs ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$; 0.14 ± 0.03 vs. 0.27 ± 0.05; $P = 0.001$; Fig. 3B). This was a result of the rise in absolute numbers of Tregs after treatment (19.8 ± 3.7 × 10^6/L vs. 32.9 ± 6.2 × 10^6/L; $P = 0.004$; Fig. 3C), whereas the proportions of

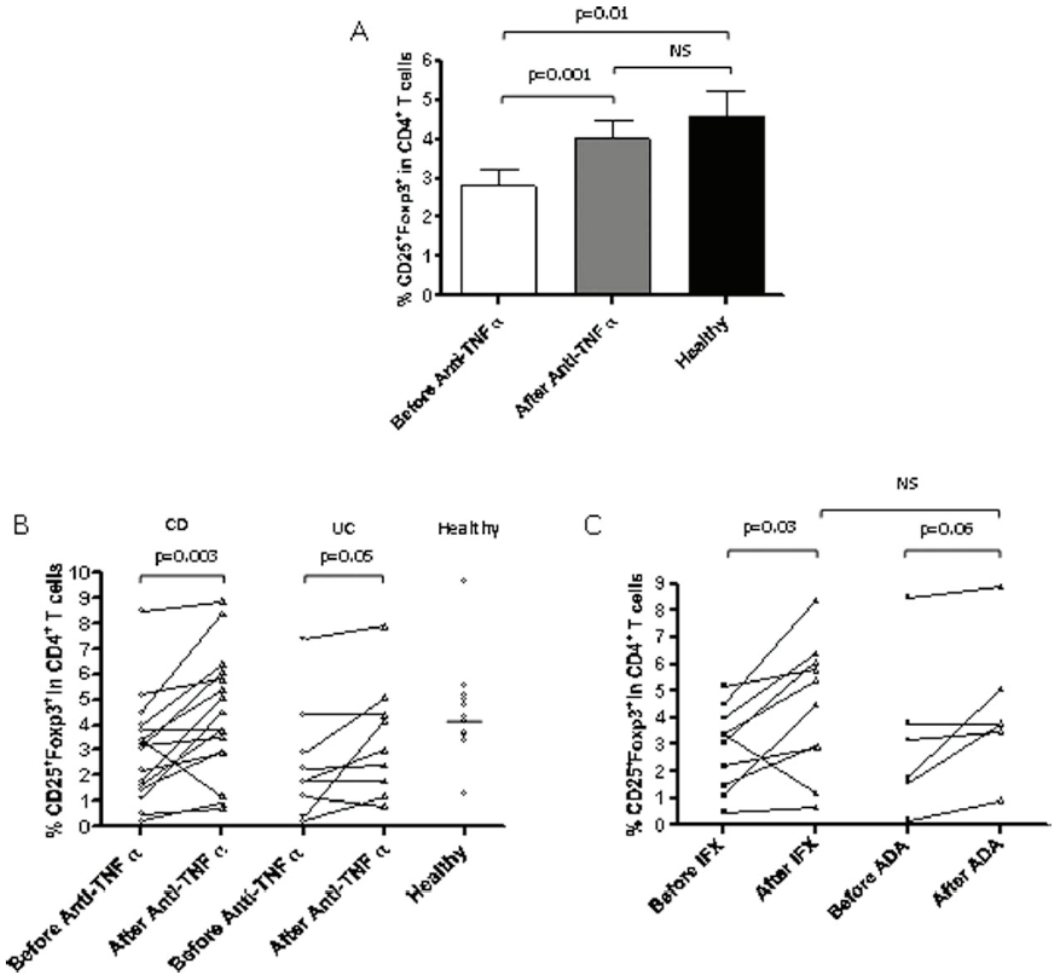


FIGURE 2. Anti-TNFα mAb treatment restores normal levels of peripheral Tregs in IBD. The frequency of peripheral $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in gated $CD4^+$ T cells was analyzed prior to and 2 weeks after the first anti-TNFα mAb injection in IBD patients (A–C) and compared with that of healthy volunteers (A, B). A: Histogram analysis of Tregs (mean ± SEM) in IBD before (white bar) and after (grey bar) anti-TNFα therapy and in healthy controls (black bar). B: Evolution of Tregs before and after treatment for each patient with either CD (left) or UC (middle), compared with healthy volunteers (right). Horizontal bar represents the median. C: Evolution of Tregs in CD patients after IFX (left) or ADA (right).

neither naive nor activated Teffs were affected (Fig. 3D). Thus, anti-TNFα mAb therapy selectively enhanced the frequency and absolute number of Tregs, without affecting the proportion of conventional Teffs.

Peripheral Treg Frequency and Clinical Response or Remission to anti-TNFα mAb Treatment

A single administration of anti-TNFα mAb resulted within 2 weeks in clinical improvement in 22 of 25 IBD patients (88%), which persisted for up to 6 weeks. Among the 22 responder patients, 15 were improved, and 7 achieved remission; peripheral Treg frequency was increased in 13 and 6 of those patients, respectively. Among the 3 nonresponder patients, peripheral Treg frequency was not affected by treatment in 2 patients but was increased in the last patient (1.1% prior vs. 4.4% after anti-TNFα treatment). Conversely, 3 of 5 patients in whom peripheral Treg proportion did not change after anti-TNFα mAb had an excellent clinical response (improvement $n = 2$, remission $n = 1$) to treatment after 2 and 6 weeks. Overall, no correlation was found between the change in the frequency of peripheral Tregs and the percentage change in the clinical score (CDAI or Lichtiger) before and after anti-TNFα mAb ($r = 0.19$; $P = 0.37$).

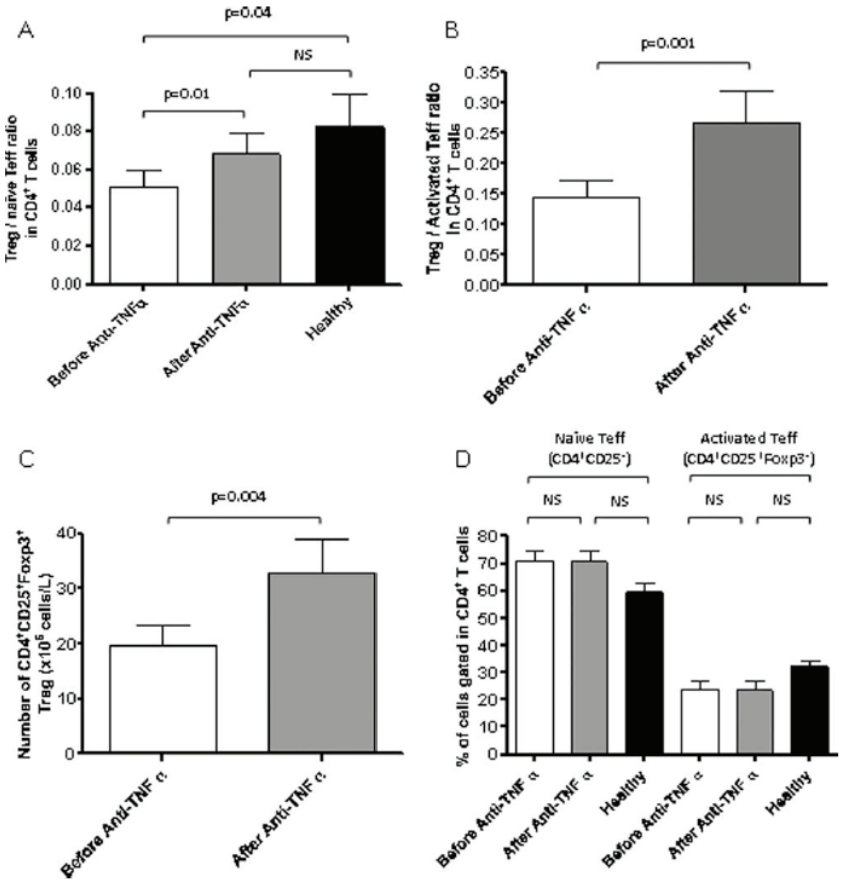


FIGURE 3. Relative impact of anti-TNFα mAb treatment on Tregs and Teffs in IBD. Histograms of FACS analysis (mean ± SEM) of Tregs/naive Teffs (A) and Tregs/activated Teffs (B) before (A–D, white bars) and after (A–D, gray bars) anti-TNFα mAb injection and in healthy controls (A and D, black bars). Number of peripheral $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in CD (C, left), UC (C, middle), and total IBD patients (C, right) prior to and after anti-TNFα mAb. Histogram represents the mean ± SEM proportion of naive Teffs ($CD4^+CD25^-$; D, left) and activated Teffs ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$; D, right) in gated $CD4^+$ T cells of IBD patients prior to and after anti-TNFα and in healthy volunteers.

Treg Phenotype and Up-Regulation of Foxp3 Expression after Anti-TNFα Therapy

Flow cytometry analysis of Foxp3 expression level in total $CD4^+$ T cells revealed a robust increase (i.e., 2- to 3-fold) in mean fluorescence intensity (MFI) following the treatment with anti-TNFα (203 ± 51 before vs. 498 ± 159 after; $P = 0.02$; Fig 4). Phenotypic analysis of Tregs was also carried out in patients before and after anti-TNFα mAb therapy. CD62-L expression on $CD4^+CD25^{high}$ of IBD patients decreased at a nonsignificant statistical level after anti-TNFα treatment (MFI: 1135 ± 138 after vs. 1404 ± 275 before; $P = 0.5$; Fig. 5A,B), without changes in the percentage of $CD62L^+$ Tregs (data not shown). In contrast, anti-TNFα treatment resulted in a moderate increase in the frequency of $ICOS^+$ Tregs (8.3% ± 2.5% before vs. 12.3% ± 4.4% after, respectively; $P = 0.42$; Fig. 5C,D) and up-regulated ICOS expression on $CD4^+CD25^{high}$ Tregs (81 ± 19 before vs. 142 ± 45 after treatment, respectively; $P = 0.33$; Fig. 5E). There was no detectable change in Treg expression of LAG-3 after anti-TNFα treatment (data not shown).

Anti-TNFα mAb Treatment Potentiated Treg Function

Because expression of Foxp3 was not an absolute marker of Tregs, we investigated the impact of treatment with anti-TNFα on Treg suppressive function. We analyzed the suppressive function of purified $CD4^+CD25^+CD127^-$ T cells[33] highly enriched (>90%) in $Foxp3^+$ cells, using

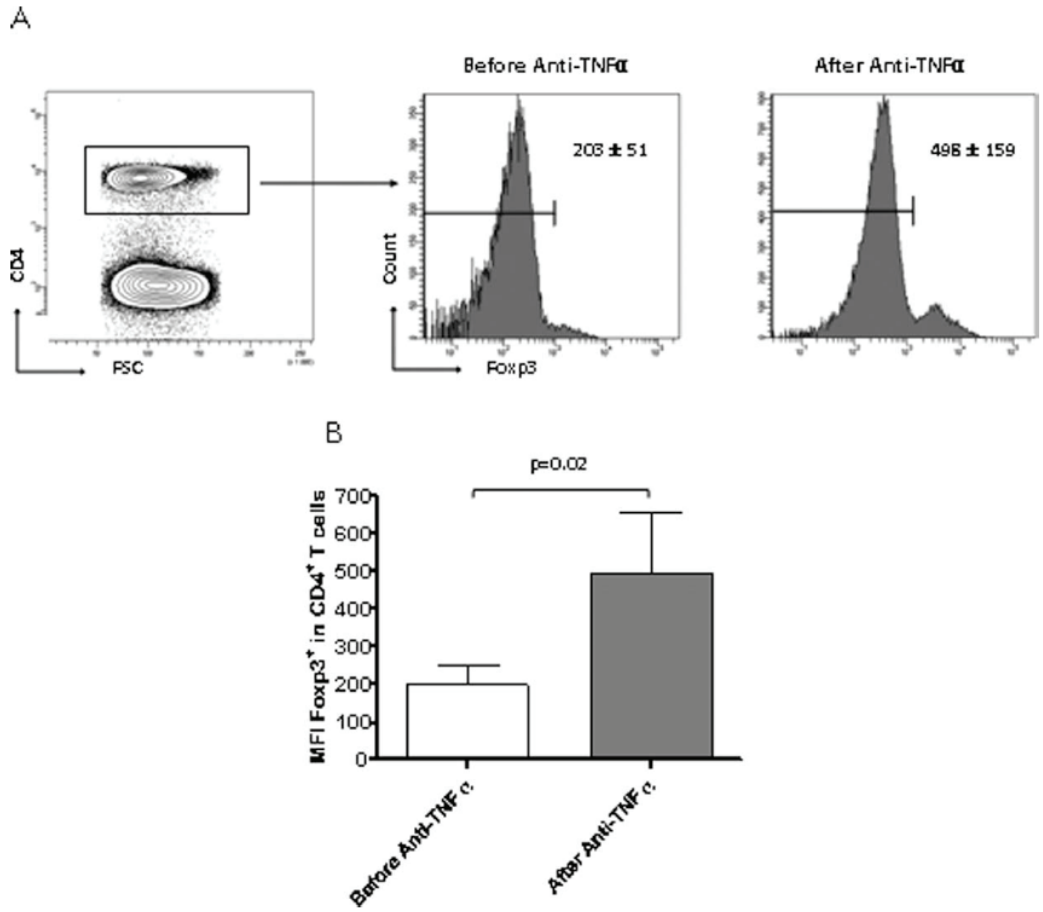


FIGURE 4. Enhanced intensity of Foxp3 on peripheral Tregs after anti-TNFα mAb. Mean fluorescence intensity (MFI) of Foxp3 was analyzed in IBD patients before and after anti-TNFα therapy. A: Representative histograms of cells expressing Foxp3. Cells were gated on a CD4+ population depicting Foxp3-positive cells before (middle) and after (right) anti-TNFα. The MFI of Foxp3-expressing $CD4^+$ T cells is indicated. B: Representative histogram of the average of MFI of Foxp3+-expressing cells gated on $CD4^+$ T cells before (white) and after (gray) anti-TNFα.

allogeneic $CD4^+CD25^-$ T cells (sorted from a single healthy donor) as responder $CD4^+$ T cells (Teffs). A comparable dose-dependent suppression was observed with Tregs from IBD patients and with those from healthy volunteers (data not shown). However, IFX treatment induced a significant increase in the suppressive function of Tregs, as shown by 50% inhibition of Teff proliferation achieved by Tregs at a Treg/Teff ratio of 1:4 prior treatment compared with 1:12 after treatment (Fig. 6A). The suppressive potential of Tregs calculated at the 1:8 Treg/Teff ratio was significantly higher after (66% ± 10%), compared with before (28% ± 5%) IFX administration ($P = 0.04$; Fig. 6B). Representative analysis of the suppressive efficacy of Tregs from 1 CD patient of the 4 IBD patients tested is illustrated in Figure 6C.

DISCUSSION

This prospective study provides, to our knowledge, the first clear-cut evidence that therapy with anti-TNFα mAb rapidly enhances the number and suppressive function of peripheral blood $Foxp3^+$ Tregs in patients with active IBD. This effect observed in both CD and UC patients was induced with comparable efficacy with IFX and ADA and was detectable as early as 2 weeks following the first antibody injection. The impact of anti-TNFα mAb therapy appeared selective for Tregs, as shown by (1) the increased

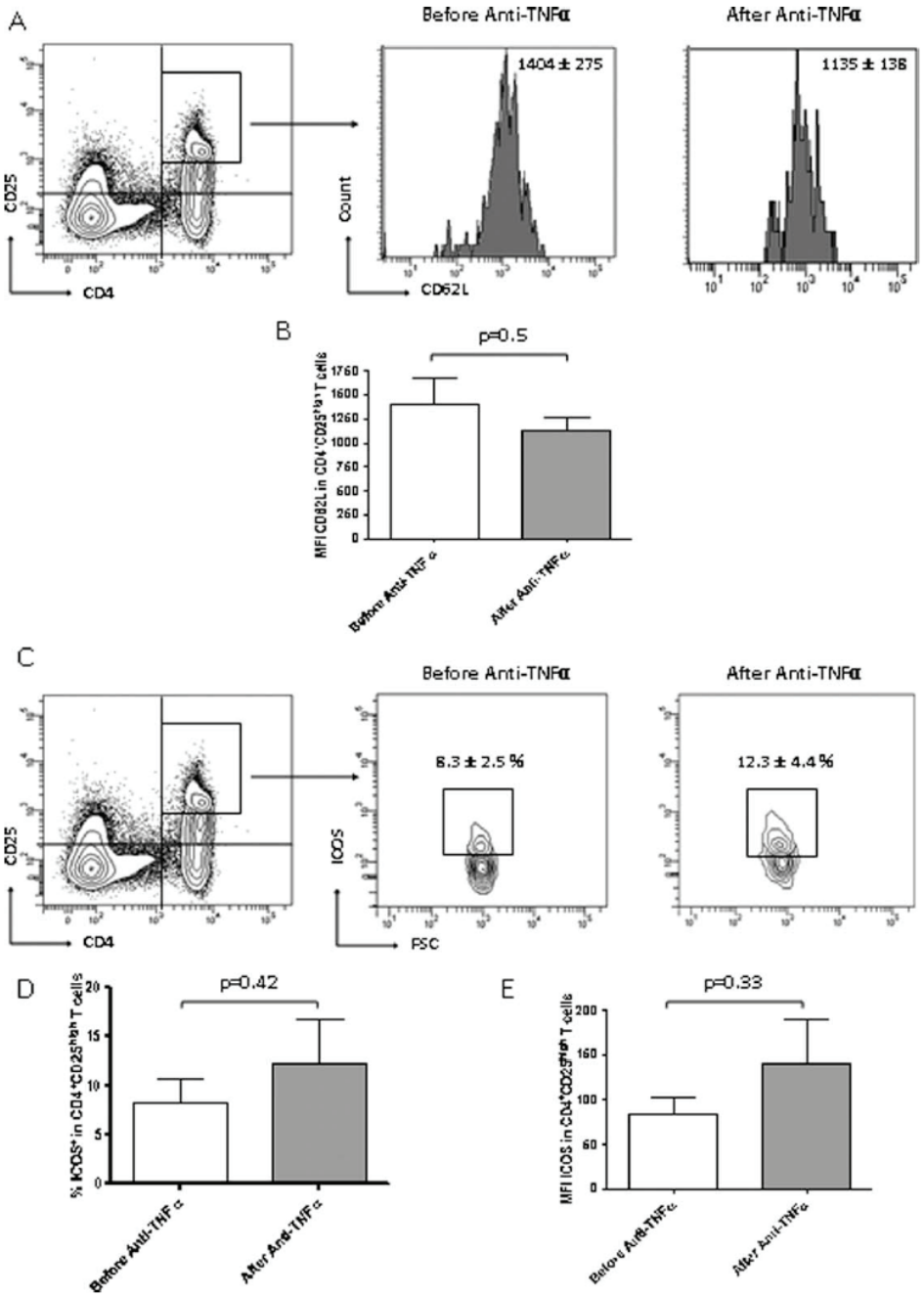


FIGURE 5. Surface expression of CD62L and ICOS on peripheral Tregs after anti-TNFα mAb. $CD4^{+}CD25^{high}$ regulatory T cells from IBD patients before and after anti-TNFα treatment. A: Histograms were gated on $CD4^{+}CD25^{high}$ cells (as indicated); the MFI of CD62L is shown. B: MFI of CD62L in the $CD4^{+}CD25^{high}$ Treg cells prior to and after treatment is shown in the charts. C: Representative FACS plot of ICOS expression on the $CD4^{+}CD25^{high}$ cells is shown. D: Frequency of ICOS from all patients before and after TNFα mAb. E: MFI of ICOS from all patients before and after TNFα mAb is shown in the chart.

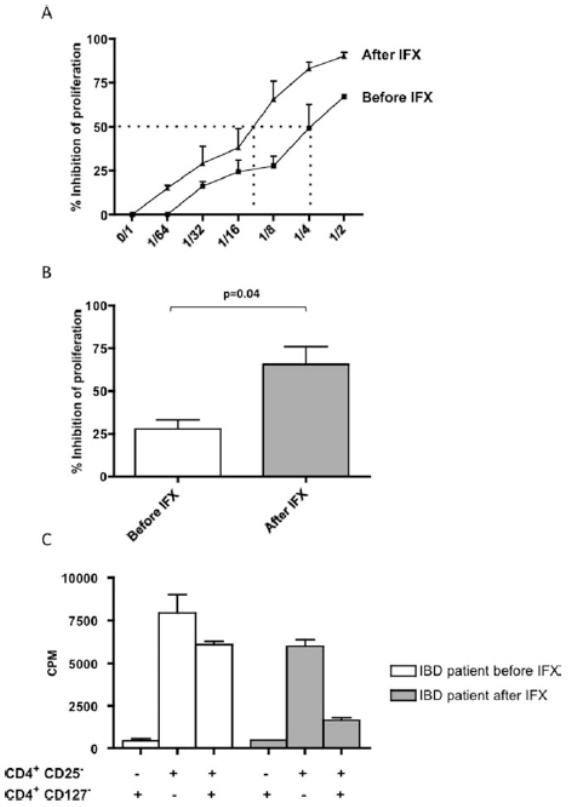


FIGURE 6. IFX treatment potentiates $CD4^+CD25^+CD127^-$ regulatory T-cell ability to suppress the proliferation of $CD4^+CD25^-$ effector T cells. Regulatory T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells from 4 IBD patients by MACS selection. Effector T cells were FACS-sorted from a single healthy volunteer. $CD4^+CD25^-$ Teffs (2×10^4 cells/well) were stimulated with anti-CD3/CD28 beads and cocultured in the presence of $CD4^+CD25^+$ $CD127^-$ Treg cells at different responder/suppressor ratios. Proliferation (triplicate cultures) was measured by ^{3}[H]-thymidine incorporation. A: Results (percent inhibition of proliferation) represent data from 4 patients with IBD prior to and after IFX. Dotted lines show 50% of inhibition of proliferation. B: Percent inhibition of proliferation at a ratio of 1:8 regulator/suppressor cells from IBD patients ($n = 4$) prior to and after IFX. C: Representative thymidine incorporation (CPM) at a ratio of 1:8 from a CD patient before and after IFX.

proportion as well as absolute number of $Foxp3^+$ $CD4^+CD25^+$, without changes in the frequency of resting $CD4^+CD25^-$ Teffs and activated $CD4^+CD25^-$ $Foxp3^-$ Teffs, (2) the enhanced Foxp3 expression level in $Foxp3^+$ Tregs, and (3) the enhanced suppressive function of purified $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ $CD127^-$ Tregs.

We first observed that IBD patients (both CD and UC) exhibited a lower frequency of total and Foxp3-expressing $CD4^+CD25^{high}$ T cells, compared with that in age-matched normal individuals. This is in agreement with previous studies showing that active IBD feature a selective defect in circulating $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ T cells[34] that is only partly compensated for by a rise in $Foxp3^+$ cells in the inflamed gut lamina propria.[30,31,35] As previously described in patients with rheumatoid arthritis (RA),[36] anti-TNFα mAb treatment caused an increase in circulating $Foxp3^+$ Tregs up to levels close to those of healthy individuals. Moreover, $Foxp3^+$ Tregs from treated patients expressed a 2- to 3-fold increase in Foxp3 protein expression. Finally, purified $Foxp3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ exhibited increased in vitro suppressive function toward allogeneic $CD4^+CD25^-$ responder T cells. Given that Foxp3 can be expressed at a low level by conventional $CD4^+$ T cells in humans,[25] our data strongly support that anti-TNFα treatment resulted in a selective enhancement of functional Tregs.

Several mechanisms may have contributed to the potentiation of Tregs by anti-TNFα mAb therapy. First, anti-TNFα mAb treatment could have promoted the survival of Tregs, for example, by reducing the rate of apoptosis, as observed after IFX treatment in RA.[37] Second, the quantitative increase in Tregs expressing elevated levels of $Foxp3^+$ and suppressive function could be a result of activation and proliferation of preexisting $Foxp3^+$ Tregs or of their differentiation by conversion from $Foxp3^-$ precursors.[38] Third, although TNFα at a high dose inhibits Treg function,[39] exposure to a low dose of TNFα rather promotes survival, activation, and expansion of Tregs, by signaling via its high-affinity receptor $TNFR_{II}$.[40] It may be speculated that whereas anti-TNFα mAb may neutralize serum TNFα efficiently, its more limited access into the inflamed mucosa might allow binding of residual cytokine to Tregs compatible with their enhanced survival and functionality.

The precise mechanisms responsible for the enhanced suppressive function of Tregs in anti-TNFα-treated IBD patients remain elusive. Numerous studies have well established that the function of Tregs is governed by the transcription factor Foxp3[25,41] because (1) lack of Foxp3 expression leads to autoimmune and chronic inflammatory disorders in humans[28] and animals[27] and (2) T cells transfected with Foxp3 acquire regulatory abilities. In the present study, we documented a significant enhancement of Foxp3 expression (MFI) in IBD patients' Tregs after anti-TNFα therapy, which is consistent with potentiation of Treg suppressive function. Several Treg cell-surface molecules, such as ICOS, LAG3, and CD62L, have been associated with Treg's suppressive potential. We observed that CD62L (i.e., L-selectin), which dictates T-cell entry into

lymph nodes, was constitutively expressed on IBD Tregs, and down-regulated after anti-TNFα mAb treatment. This observation is in accordance with a recent study in RA showing that IFX induces a distinct subset of $Foxp3^{+}CD62L^{-}$ Tregs with a more robust suppressive function.[42] It may be proposed that this effect reflects a tendency of blood Tregs to reach peripheral tissues, particularly the inflamed gut, as previously reported for L-selectin-negative Tregs up-regulating skin or gut homing integrins.[43] In addition, we observed that anti-TNFα mAb treatment tended to enhance ICOS expression on Tregs. Previous studies have shown that ICOS is up-regulated on Ag-induced Tregs with enhanced proliferation and suppressive properties.[44,45] Thus, it is possible that anti-TNFα mAb induced an increase in more potent Ag-specific Tregs. Alternatively, treatment did not affect expression of LAG-3, a CD4-related Treg molecule that binds MHC class II and modulates both in vitro and in vivo suppressive Treg function.[46]

It should be emphasized that potentiation of circulating Tregs by anti-TNFα therapy described in this study (1) may not necessarily concern Tregs present in the intestinal mucosa and (2) could be the consequence rather than the cause of clinical improvement. Indeed, a marked clinical response was seen within 2 weeks after the first injection of IFX or ADA, concurrent with Treg potentiation. It is thus equally possible (1) that Tregs contribute to the efficacy of anti-TNFα mAb and/or (2) that the restoration of a normal Treg compartment is consecutive to anti-TNFα therapy-induced recovery of intestinal homeostasis. Further kinetic studies will be necessary to determine whether Treg potentiation is the cause or consequence (or both) of anti-TNFα treatment's efficacy in IBD. Indeed, we cannot exclude that Treg number and function potentiation are more the consequence of anti-TNFα mAb–induced clinical improvement than that of anti-TNFα treatment by itself. Even if the observation that 1 IBD patient who failed to achieve a clinical response to anti-TNFα has enhanced Treg number in peripheral blood supports a specific effect of the anti-TNFα therapy, we acknowledge that our study was not designed to and powerful enough to definitely conclude this. In addition, as some IBD patients ($n = 3$) achieved a clinical response (and even a remission in 1 case) to anti-TNFα treatment without a rise in Treg frequency, other ways by which active IBD might be improved by anti-TNFα merit further considerations. These data are in accordance with those found by Ehrenstein et al[36] in rheumatoid arthritis patients; they failed to detect a systematic concordance between response to anti-TNF (infliximab and adalimumab) therapy and Treg changes.

In any case, this study documents a novel potential mechanism that could contribute to the beneficial effect of anti-TNFα therapy in IBD. Tregs might thus represent an important target for optimization of existing therapies against TNFα or its receptor, or for the development of novel biotherapies focusing on other proinflammatory cytokines relevant in IBD.

REFERENCES

1. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994;106:1455–1466.
2. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995; 182:1281–1290.
3. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996;157:1261–1270.
4. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116:1310–1316.
5. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, et al. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol*. 1997;159:6276–6282.
6. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest*. 2001;107:695–702.
7. Nancey S, Holvoet S, Graber I, et al. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology*. 2006;131:485–496.
8. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004;126: 1593–1610.
9. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, et al. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6:644–653.
10. Scallon B, Cai A, Solowski N, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:418–426.
11. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H. Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor-alpha. *Gastroenterology*. 2004;126:934–935; author reply 5–6.
12. Shen C, Assche GV, Colpaert S, et al. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21:251–258.
13. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, et al. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*. 2002;50:206–211.
14. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124: 1774–1785.
15. Suenaert P, Bulteel V, Lemmens L, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:2000–2004.
16. D'Haens G, Van Deventer S, Van Hogezand R, et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: a European multicenter trial. *Gastroenterology*. 1999;116:1029–1034.
17. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6:345–352.
18. Dubois B, Chapat L, Goubier A, et al. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood*. 2003;102:3295–3301.
19. Dubois B, Joubert G, de Aguero MG, et al. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory t cells in oral tolerance. *Gastroenterology*. 2009;137:1019–1028.

20. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*. 2006;212:256–271.
21. Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, et al. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol*. 1997;158:566–573.
22. Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*. 1994;1:553–562.
23. Powrie F, Carlino J, Leach MW, et al. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996;183:2669–2674.
24. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263–274.
25. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057–1061.
26. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–336.
27. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27:68–73.
28. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27:18–20.
29. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:430–435.
30. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005;128:1868–1878.
31. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, et al. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol*. 2007;125:281–290.
32. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2–6; discussion 16–19.
33. Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2006;27:541–544.
34. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, et al. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2006;51:677–686.
35. Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, et al. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:191–199.
36. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*. 2004;200:277–285.
37. Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, et al. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:506–514.
38. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204:1757–1764.
39. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 2006;108:253–261.
40. Chen X, Baumel M, Mannel DN, et al. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2007;179:154–161.
41. Kryczek I, Liu R, Wang G, et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res*. 2009;69:3995–4000.
42. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*. 2007;204:33–39.
43. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*. 2006;108:426–431.
44. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*. 2008;28:870–880.
45. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, et al. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol*. 2008;180:2967–2980.
46. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21:503–513.

PUBLICATION N°2

"Gut inflammation promotes functional activation of Foxp3$^+$ regulatory T cells but impairs their conversion from CD4$^+$ T cells"

Gilles Boschetti, Reem Kanjarawi, Emilie Bardel, Ludovic Moro-Sibilot, Thibaut Almeras, Remi Duclaux-Loras, Sophie Collardeau-Frachon, Dania Chanab, Bernard Flourié, Helena Paidassi, Stephane Nancey et Dominique Kaiserlian

Manuscrit soumis au *Journal of Crohn's and Colitis*

Les lymphocytes T régulateurs Foxp3$^+$CD4$^+$ (Treg) sont impliqués dans le contrôle de l'inflammation intestinale dans les modèles de colites par transfert de lymphocytes T, toutefois leur capacité à réguler une colite induite par l'immunité innée et l'impact de l'inflammation intestinale sur leur devenir et leur fonction sont, à ce jour, peu documentés.

Nous montrons dans ce travail que les Treg ne contrôlent que partiellement la colite induite par le dextran sodium sulfalte (DSS) chez les souris DEREG, suggérant un impact délétère de l'environnement intestinal inflammatoire sur les Treg. Chez les souris "sauvages", la colite induite par le DSS s'accompagne d'une augmentation importante du nombre absolu de Treg et dans le même temps d'une diminution de leur fréquence liée à une infiltration massive de globules blancs dans les ganglions mésentriques et la *laminia propria* (*LP*) colique. De manière concomitante, nous avons mis en évidence dans ces 2 compartiments une augmentation significative de l'expression de Ki67 par les Treg. La colite DSS est associée à une potentialisation de la fonction suppressive *ex vivo* des Treg issus de la *LP* du colon et plus particulièrement de la sous-population de Treg issus des ganglions mésentériques n'exprimant pas la neuropiline 1. A l'inverse, nous avons montré une diminution de la néo-conversion *in vivo* de lymphocytes T naïfs en Treg chez les souris colitiques. Ceci coïncidait d'une part, avec une diminution de la fréquence des cellules dendritiques CD103$^+$ (incluant les populations CD11b$^+$ et CD11b$^-$) et d'autre part, avec une capacité diminuée de conversion *in vitro* des cellules dendritiques issues des ganglions mésentériques de souris colitiques.

Nos données suggèrent que le contrôle imparfait de la colite par les Treg n'est pas secondaire à un effet négatif de l'inflammation sur leur prolifération ou leur fonction suppressive mais est lié à une diminution de la néo-conversion de Treg au sein de l'intestin inflammatoire.

Gut inflammation promotes functional activation of Foxp3+ regulatory T cells but impairs their conversion from CD4+ T cells

Gilles Boschetti[1-6], Reem Kanjarawi[1-5], Emilie Bardel[1-5], Ludovic Moro-Sibilot[1-5],Thibaut Almeras[1-5], Remi Duclaux-Loras[1-5], Sophie Collardeau-Frachon[1-5,7], Dania Chanab[1-5], Bernard Flourié[1-6], Helena Paidassi[1-5], Stephane Nancey[1-6*] and Dominique Kaiserlian[1-5*]

[*] *The 2 last authors equally contributed to this work*

[1]CIRI, International Center for Infectiology Research, "Mucosal immunity, Vaccination & Biotherapies" Team, Université de Lyon, Lyon, France.

[2]Inserm, U1111, Lyon, France.

[3]Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

[4]Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

[5]CNRS, UMR5308, Lyon, France.

[6] Hospices Civils de Lyon, Department of Gastroenterology, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France

[7] Hospices Civils de Lyon, Department of Pathology, Hopital Femme-Mere-Enfant, Lyon, France

Short title : Regulatory T cells and colonic inflammation

Address correspondence to:

Dominique Kaiserlian

INSERM-U1111-CIRI

21 Avenue Tony Garnier

69365 LYON, FRANCE

dominique.kaiserlian@inserm.fr

CONFLICT OF INTEREST/FUNDING

Specific author contributions: Study design (DK, SN, BF) ; performance of experiments (GB, RK, EB, LMS, TA, RDL, SCF, DC, HP), acquisition of data, analysis and interpretation of data (GB, DK, SN, BF, RK, HP) ; writing the manuscript (GB, DK, SN, BF, HP).

Funding : This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Conflict of interest : None for all the authors.

Acknowledgements: We are grateful to the Cytometry core facility of the UMR5308 for help with FACS analysis and to the PBES (Ecole Normale Supérieure de Lyon) for breeding mice colonies.

ABSTRACT 241 WORDS

BACKGROUND AND AIMS: Regulatory Foxp3^{+}CD4^{+} T cells (Tregs) have been implicated in the control of colitis in T-cell transfer models, yet their ability to regulate colitis induced by innate immunity and the impact of gut inflammation on their fate and function has been poorly documented.

METHODS AND RESULTS: Here we show using DEREG transgenic mice that DSS-induced colitis is only partially alleviated by Tregs, suggesting that the inflamed gut microenvironment is deleterious for Tregs. In wild type mice, DSS-induced gut inflammation increased the absolute number of Tregs both in mesenteric lymph nodes (MLN) and colon *lamina propria (LP)*, but decreased their frequency due to massive concomitant leukocytes infiltration. This coincided with a dramatic enhancement of Ki67^{+} expression by Tregs at both sites, indicative of cell activation. Colitis was associated with an enhanced *ex vivo* suppressive function of the whole Treg population from the colon LP, and especially the neuropillin-1- Treg subset from the MLN.

In contrast, colitic mice exhibited impaired efficacy of Treg neoconversion from naive T cells in vivo. This coincided with a lower proportion of intestinal CD103+ dendritic cells (DC), including both CD11b+ and CD11b- cells and with a decreased conversion capacity of intestinal DC in colitic mice.

CONCLUSIONS: Together, our data suggest that incomplete control of colitis by Tregs does not merely result from a negative outcome of inflammation on their proliferation or suppressive function but at least partly results from impaired Treg differentiation in the inflamed intestine.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic T-cell-mediated disorders affecting the small and large intestine, which involves both innate and adaptive arms of the gut immune system. Although there is no animal model that fully mimics human IBD, various experimental models have allowed to get better insight into its pathophysiology[1]. The T-cell transfer model of colitis in immune-deficient mice and the DSS-induced colitis model are the two most commonly used. The advantage of the DSS-induced colitis model is that acute colitis is generated by activation and recruitment of innate immune cells, and develops in a few days independently of effector T cells in immunocompetent mice, thus allowing to examine the direct impact of gut inflammation on Foxp3$^+$ regulatory T cells (Tregs). Although this animal model has limitations regarding the accurate representation of the clinical course of IBD, it nevertheless recapitulates the common clinical features of inflammation and histopathology seen in the human disease[2]. DSS-induced colitis manifests by body weight loss, rectal bleeding and diarrhea. Macroscopic and histological examinations reveal shortening of the intestine, severe epithelial damage with sub-mucosal ulcerations and a dense inflammatory cell infiltration of the colonic mucosa along with excessive production of proinflammatory cytokines.

Regulatory T cells play a pivotal role in the induction and maintenance of mucosal tolerance and gut homeostasis to flora and dietary antigens[3]. Several populations with regulatory properties have been described, however T cells characterized by expression of CD25, the IL-2 receptor a chain, and the transcription factor Foxp3 (which conditions development and function of Tregs in mice) is the major population of regulatory T cells[4 5 6]. Pioneer studies by the group of F. Powrie have established the critical role of Tregs to prevent development of chronic colitis in T-cell transfer models in immuno-compromised mice[7], however much less is known regarding the efficacy of Tregs to control acute non-T-cell-mediated colitis. Mutation or deficiency of the *FOXP3* gene is responsible for Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome in human[8 9] and for wasting disease in scurfy mice[10]. Tregs can be divided into thymus-derived naturally occurring Tregs (nTregs) and Tregs induced in peripheral tissues from the conversion of naïve conventional CD4$^+$ T cells (iTregs)[11]. These iTregs suppress immune responses to both self and self-associated antigens, including those from food and commensal microbes. This seems of particular importance in the intestine as, unlike defects in nTregs which lead to widespread autoimmunity and inflammation, defects in iTregs lead primarily to intestinal inflammation.

These iTregs are generated by interaction with dendritic cells (DCs) and their development is dependent on the immunoregulatory cytokine TGF-β. Several populations of DCs are present in the *lamina propria* (LP) and the associated lymphoid tissues, such as mesenteric lymph nodes (MLN), and among them, $CD103^+$ DCs have the preferential ability to generate iTregs via TGF-ß and retinoic acid[12 13]. iTregs seem to play a dominant role in the control of gut homeostasis, as demonstrated by the emergence of spontaneous colitis in mice lacking the CNS2 promoter region of the *FOXP3* gene[14] or harboring a defect of iTregs consecutive to defect in the integrin ß8 in DCs[15 16]. Human studies have shown a partial defect in circulating Tregs in active IBD[17 18] that was compensated by increased Tregs in the gut *LP*[19] that retained a suppressive function. However, there is so far scarce information concerning the outcome of gut inflammation on the fate and function of intestinal Tregs.

In this study, we document that Tregs only partially alleviate DSS-induced colitis and that colon inflammation primarily impairs *de novo* conversion of Tregs in MLN.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C57Bl/6 (B6) mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresles, France). DEREG mice (DEpletion of REGulatory T cells) expressing both a diphtheria toxin receptor (DTR) and the eGFP fusion protein under the control of the *Foxp3* locus have been described [20]. Foxp3-IRES-eGFP knock-in mice [21] (kindly provided by B. Malissen, CIML, Marseille, France), CD3ε$^{-/-}$, OT-2, OT-2-RAG2$^{-/-}$ and Ly5a (CD45.1) mice (all on a C57Bl/6 background) were bred in our animal facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, PBES, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France). All mice were used between 6 and 11 weeks of age and were fed with standard chow pellets *ad libidum*. All mice studies were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15) in accordance with European guidelines for animal experiments.

DSS-induced colitis

Colitis was induced by administration of 3% DSS (w/v) (MW, 36,000-50,000; MP Biomedicals, Santa Ana, USA) in drinking water for 6 days, while control mice received water only. Mice were examined daily with respect to their general conditions, body weight and consistency of stools. Mice were sacrificed on day 6. Colon length and weight were measured and colon histology was carried out after fixation in 4% paraformaldehyde and Haematoxylin and Eosin (H&E) staining of paraffin-embedded sections (4µm).

Foxp3 immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Colon tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. We used Foxp3 polyclonal antibody (ab128800, Abcam, Cambridge, UK) at a dilution of 1:100. The immunohistochemical procedure was performed using a Ventana Benchmark autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). The detection system used diaminobenzidine as the chromogen. Slides were counterstained with hematoxylin. Stained slides were evaluated by a blinded experienced pathologist, and enumeration of Foxp3 positively stained cells was accomplished by count on 5 high power microscopic fields (X200).

Depletion of regulatory T cells in DEREG mice

For conditional ablation of Tregs, DEREG mice were injected i.p twice with 1 µg of diphtheria toxin (DT) (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) one day before and on the first day of DSS treatment [20]. DT-treated WT littermates were used as controls. Efficacy of depletion of Tregs was > 95%, as shown by representative FACS analysis (Figure 1A) on day 2 after first DT injection. Lymphocytes from mesenteric lymph nodes and colon *LP* were stained with PE-conjugated anti-CD25 mAb (clone PC61), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4 mAb (clone RM4-5) both from (BD Pharmingen, Pont de Claix, France) and Foxp3 expression was analyzed by GFP expression.

***In vivo* transfer of Foxp3$^+$ Treg into DEREG mice**

Lymphocytes from peripheral lymph nodes (axillary, inguinal) and spleen were isolated from Foxp3-IRES-eGFP KI naïve mice. CD4$^+$ T cells were first enriched by positive selection using anti-CD4 mAb-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), then Foxp3-eGFP$^+$ Treg were isolated by FACS sorting, with purity routinely > 92%. Four million of CD4$^+$Foxp3$^+$ cells from naïve Foxp3-IRES-eGFP KI mice were transferred i.v to DEREG mice one day after the first DT injection. Just after transfer, mice were orally administered 3 % DSS in drinking water.

Isolation of colon *lamina propria (LP)* leukocytes

Colon fragments were incubated with 5 mM EDTA in PBS to remove epithelial cells and *LP* leukocytes were then extracted from the remaining tissue by 45 min incubation at 37°C in 35 µg/ml Liberase (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 10 U/ml DNAse (Roche Diagnostics), as described [22]. Leukocytes were enriched by centrifugation over 40% Percoll® (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The resulting cell suspension contained > 90% of viable cells.

Flow cytometry analysis

Cells were incubated for 15 min at 4°C with anti-CD16/CD32 antibody (clone 2.4G2) and then stained using the following mAbs from BD Pharmingen: anti-CD25 (clone 7D4), anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD127 (clone SB/199), anti-CD103 (clone M290), anti-CTLA-4 (clone UC10-4F10-11), anti-ICOS (clone 7E.17G9), anti-L-selectine (clone MEL-14), anti-TNFR-2 (clone TR75-89), anti-CD11c (clone HL3), anti-CD45.2 (clone 104), anti-CD45.1 (clone A20) or with relevant isotype-matched conjugates. Other antibodies used in the experiments are: anti-CD101 (clone Moushi101), anti-LAG-3 (clone C9B7W) and anti-CD11b (clone C9B7W) from eBiosciences (San

Diego, CA, USA), anti-CD39 (clone Duha59) and anti-GARP (clone F011-5) from Biolegend (San Diego, CA, USA) and Anti-NRP1 from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Intracellular Foxp3 staining was performed according to manufacturer's instructions (eBiosciences). Briefly, cells were permeabilized, fixed and then stained with APC- or PE-conjugated anti-Foxp3 (clone FJK-16s). Antibody for other intranuclear stainings, AF647-anti-Ki67 (clone SolA15) was added with anti-Foxp3, as appropriate. Immunostainings were acquired and analyzed by flow cytometry on a LSR Fortessa analyzer with the FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star Inc.).

Treg *in vitro* proliferation assay

$CD4^+$ T cells were negatively selected (Miltenyi Biotec) from MLN of DSS-treated mice or control and stained with CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). These stained $CD4^+$ T cells were stimulated by culture with syngeneic irradiated bone marrow DC (BMDC) in the presence of 1µg/ml of soluble anti-mouse CD3 mAb (Clone 145-2C11, BD Pharmingen). Staining of $CD4^+$ T cells with CellTrace was controlled by flow cytometry before culture and was routinely > 98% (*data not shown*). After 96 hours of culture, the cells were stained for Foxp3 and cell proliferation was assessed by flow cytometry.

Treg *in vitro* suppression assay

$CD4^+CD25^+eGFP^+$ (Treg) and conventional T cell subsets $CD4^+CD25^-eGFP^-$ (Tconv) were purified from MLN of $Foxp3^+$-IRES-eGFP mice by FACS-sorting (FacsAria, Becton Dickinson) after staining with APC anti-CD4 (clone RM4-5) and PE-Cy7 anti-CD25 (clone 7D4). $NRP1^+$ or $NRP1^-$ Treg were FACS-sorted using the same method after additional staining with PE anti-NRP1 (R&D systems). $CD4^+CD25^+eGFP^+$ Treg were FACS-sorted from colon *LP* cells stained with APC-anti-CD45 (clone 30-F11). Treg purity was routinely > 98% as assessed by eGFP positivity. Tconv were stimulated by culture with irradiated lymph node $CD11c^+$ cells as antigen presenting cells (APC), previously purified using the mouse CD11c kit (Miltenyi Biotech), at a ratio of 1 APC/10 Tconv in the presence of 1µg/ml of soluble anti-mouse CD3 mAb (BD Pharmingen). Treg were added into the culture at 1/1 to 1/32 ratios of Treg / Tconv. Proliferation (cpm) was determined on day 5 of culture by ^{3}H-thymidine (1µCi) incorporation over the last 12 hours of culture. Radioactivity was counted by using a b-plate liquid scintillation counter Topcount NXT (Packard instrument, Rungis, France).

***In vivo* Treg conversion experiments**

Two experimental settings were used to measure Treg conversion. Ly5a (CD45.1) recipient mice were injected intravenously with 2.10^6 FACS-sorted $CD4^+CD25^-$ cells from pooled peripheral lymph nodes from naïve OVA TCR–transgenic OT-2 mice (CD45.2). Ly5a mice were gavaged twice with 50 mg of ovalbumin (OVA), at 24 and 48 hours after cell transfer. DSS was added in drinking water 1 day after cell transfer and Ly5a mice were sacrificed 4 days later. Frequencies of $CD45.2^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (transferred) and $CD45.1^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (resident) cells were measured in MLN by flow cytometry. In another experiment, naïve CD3ε KO recipient mice were injected intravenously with $1.5.10^5$ FACS-sorted $CD4^+CD25^+Foxp3eGFP^-$ cells from pooled peripheral lymph nodes of naïve Foxp3-IRES-eGFP mice. These cells were considered as pre-$Foxp3^+$ Treg, as previously documented [23]. Immediately after cell transfer, mice received oral 3 % DSS or drinking water alone for 6 days. CD3ε KO mice were sacrificed 12 days after transfer and the frequency of Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3eGFP^+$) cells in MLN was further assessed by flow cytometry.

***In vitro* Treg conversion assay**

Negatively selected $CD4^+$ T cells isolated from MLN of $RAG^{-/-}$ OT-2 mice were cultured with MACS-sorted $CD11c^+$ cells from MLN of either naïve or day 6 DSS-treated B6 mice, in the presence of 1 µg/mL of OVA MHC class-II $peptide_{323–339}$ (Invivogen, Toulouse, France) and 1ng/ml of TGFb. In some experiments, OVA MHC class-II peptide was not added or replaced with soluble anti-mouse CD3 mAb (BD Pharmingen) in order to obtain respectively negative or positive control. At day 5, cells were harvested and the frequency of $Foxp3^+$ OT-2 cells was analyzed by flow cytometry.

Quantification of β8 integrin expression in DC

β8 integrin gene expression of MLN DC subsets was analyzed by quantitative RT-PCR as previously described[16]. Briefly, cells were isolated from MLN by digestion. DCs were then enriched using an optiprep gradient (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and $CD103^+CD11b^-$, $CD103^+CD11b^+$ and $CD103^-CD11b^+$ DC subsets were further sorted by FACS into TRIzol LS (Sigma-Aldrich) for RNA extraction. β8 integrin transcripts levels were quantified using Eppendorf real-time PCR system according to manufacturer's instructions in SYBR green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was normalized to the housekeeping gene β-actin.

Statistics

Statistics were performed using the Statistical Package and Graph Pad Prism software (San Diego, CA), according to non-parametric Mann & Whitney U-test or non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test to generate p values for selected pairwise comparisons, as appropriate. Data were presented as mean ± SEM and a p value ≤ 0.05 was considered as statistically significant (ns: $p>0.05$, *$p>0,05$, **$p<0.01$ and ***$p<0.001$).

RESULTS

Foxp3$^+$ Tregs alleviate the severity of DSS-induced colitis

To determine whether Tregs were able to control DSS-induced colitis, we used DEREG mice that express the DT receptor under the control of the Foxp3 promoter, which allows to delete Tregs upon DT treatment. As expected, DT injection depleted more than 95% of Tregs in MLN and colon *LP* cells (Figure 1A). Depletion of Tregs by DT injection resulted in dramatic increased in the severity of DSS-induced colitis in DEREG mice (figure 1B-D). Indeed, DEREG mice treated with DSS and DTT showed increased body weight loss compared to naive DEREG mice or DT-treated wild type littermates (WT) both DSS-treated (figure 1B). In addition, they exhibited a significant increase of the colon weight/length ratio at day 6 (3.5 ± 0.2 mg/mm), compared to DT-untreated DSS DEREG mice (2.6 ± 0.1 mg/mm; p=0.01) or DSS WT mice (2.7 ± 0.2 mg/m; p=0.03) (Figure 1C). These findings were corroborated by histologic evaluation of H&E stained colon cross sections. We found a more severe colitis characterized by oedema, dense transmural lymphocytic inflammatory infiltrate and mucosal erosions in DT-treated DEREG mice orally exposed to DSS (Figure 1D, *picture 3*) when compared with DT-treated WT mice exposed with DSS (Figure 1D, *picture 1*) or DT-untreated DSS DEREG mice (Figure 1D, *picture 2*). DT-treated DEREG mice without DSS were free of clinical and histological sign of colitis, excluding a colitogenic effect of DT (Figure 1B, C and D *picture 4*).

To further confirm that Tregs play a critical role in the control of DSS-induced colitis, we examined whether CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ T cell transfer could improve DSS-induced colitis in DEREG mice. FACS-sorted CD4$^+$CD25$^+$Foxp3-eGFP$^+$ T cells harvested from naive Foxp3IRES-eGFP donor mice were adoptively transferred into DEREG recipients one day after first DT injection. As shown in Figure 1E, transfer of CD4$^+$CD25$^+$Foxp3-eGFP$^+$ T cells resulted in less severe DSS-induced colitis in DT-treated DEREG recipient mice, as demonstrated by a significant decrease of body weight loss (13.3 ± 2.8 % with Treg transfer *vs* 24.4 ± 3.5 % without Treg transfer; p=0.04) and of colon weight/length ratio (2.7 ± 0.1 with Treg transfer *vs* 3.9 ± 0.3 mg/mm without Treg transfer; p=0.01). Thus, Tregs are required to limit the severity of DSS-induced colitis, even though they do not seem sufficient to prevent the development of gut inflammation, as Treg-repleted mice still develop colitis in this experimental setting.

DSS-induced colitis is associated with increased number of Tregs in MLN and colon *LP*

We next examined whether gut inflammation affected the frequency or number of Tregs. Leukocytes isolated from spleen, MLN, and colon *LP* were analyzed by flow cytometry after 3

or 6 days of DSS administration. While the body weight and the colon weight/length ratio changed significantly after 6 days of DSS compared to control mice, no evident sign of colitis was observed after 3 days of DSS exposure (Figure 2A *right and left panels*).

FACS analysis of leukocytes isolated from MLN showed a significant lower proportion of $CD4^+$ T cells leukocytes after 6 days of DSS, as compared with controls (38.0 ± 0.9 % *vs* 26.7 ± 1.0 %, respectively; p=0.002) (Figure 2B and C, *left panel*). The frequency of Tregs among leukocytes was also significantly lower in colitic mice when compared to controls (6.2 ± 0.2 % *vs* 4.2 ± 0.2 %, respectively; p=0.002) (Figure 2B and C, *middle panel*). No significant difference was observed in the frequency of $CD4^+$ or $Foxp3^+$ T cells among MLN leukocytes after 3 days of DSS treatment (Figure 2B and C, *left and middle panels*).

Conversely, we found a significant increase in the absolute number of Tregs in MLN after 6 days of DSS (300 998 ± 27 391 cells), as compared to that in control mice (85 172 ± 18 653 cells; p=0.02) or in mice after 3 days of DSS (114 838 ± 13 983 cells; p=0.02) (Figure 2C, *right panel*). Likewise, while DSS-induced colitis did not result in significant changes in $CD4^+$ or $Foxp3^+$ T cells frequency among colon *LP* leukocytes (Figure 2D, *left and middle panels*), higher numbers of Tregs were found in the colon *LP* of DSS-exposed compared to control mice (31 929 ± 2 497 cells *vs* 17 250 ± 1 813 cells respectively; p=0.008) (Figure 2D, *right panel*). No significant change was found in $CD4^+$ T cells nor $Foxp3^+$ Treg frequency or number in the spleen of colitic mice when compared to control mice (*data not shown*). Immunohistochemical analysis for $Foxp3^+$ cells in colon section showed that, in both control and DSS-treated mice, Tregs were preferentially located in the colon *LP* (figure 2E, *left panel*) and their numbers were significantly increased in DSS-treated mice compared to control mice (7.0 ± 1.7 *vs* 1.0 ± 0.2 cells/field, respectively; p=0.02) (Figure 2E, *right panel*).

Altogether, these results show that colitis in DSS-treated is not associated with a loss of Tregs, but on the contrary with an increase in Treg numbers both in MLN and colon *LP*.

DSS colitis promotes Treg proliferation

We next tested whether DSS-induced inflammation had an impact on the phenotype and proliferation of intestinal Tregs. DSS-induced colitis did not generate major phenotypic changes of various activation markers including CD101, CD127, CD103, GARP, LAG-3, CTLA-4, ICOS, L-Selectin, TNFR-2 and CD39 on the surface of MLN extracted Tregs (*data not shown*). In contrast, colitic mice harboured an increase in proliferative Tregs compared with controls, as shown by rise in the frequency of $Ki67^+$ Tregs in MLN (18.2 ± 0.9 % *vs* 14.9 ± 0.9 %; p=0.008)

(Figure 3A-B) and colon *LP* (55.2 ± 8.8 % *vs* 28.1 ± 10.3 %; p=0.03) (Figure 3C-D). Ki67 expression levels in Tregs from either MLN (Figure 3B) or colon *LP* (Figure 3D and 3E) were also higher in colitic *vs* control mice.

Although Ki67 is a specific and quantitative indicator of recently expanded cells, its increase in Tregs of colitic mice does not formally indicate whether they retained their proliferative capacity. To address this issue, Tregs from MLN of DSS-treated or control mice, were stained with CellTrace Violet and co-cultured for 5 days with naive syngeneic DCs and anti-CD3 mAb. As shown in Figure 3F, Tregs from colitic and naïve mice exhibited a similar proliferative capacity. These data show that gut inflammation promotes Treg proliferation and that expanded cells retain their ability to divide.

Enhanced suppressive function of colonic Tregs from DSS colitic mice

We next examined whether gut inflammation had an impact on the suppressive function of Tregs. To do so, we compared the ability of naïve and colitis Tregs to suppress conventional T cells *ex-vivo*. As shown in Figure 4A, FACS-sorted $CD4^+CD25^+eGFP^+$ T cells (Treg) from MLN or colon *LP* of naïve mice displayed a dose-dependent suppression of conventional $CD4^+CD25^-eGFP^-$ T cells (Tconv) proliferation in response to anti-CD3 stimulation, detected from the ratio of 1/8 MLN Treg/Tconv (Figure 4A, *left panel*). While DSS administration did not affect the suppressive efficacy of MLN Tregs, it enhanced the suppressive activity of colon *LP* Tregs by roughly 4 fold (Figure 4A, *right panel*).

We then tested whether nTregs and/or iTregs accounted for the enhanced suppressive activity of colitic colon *LP* Tregs. To this end, we repeated the *ex-vivo* suppression assay using Tregs sorted on the basis of neuropillin-1 (NRP1) expression, a surface marker associated with nTregs[24 25]. In control mice, $CD4^+CD25^+eGFP^+NRP1^+$ Tregs and $CD4^+CD25^+eGFP^+NRP1^-$ Tregs exhibited similar *in vitro* suppressive function (Figure 4B). However, DSS treatment selectively enhanced the suppressive function of $NRP1^-$ Tregs (Figure 4B, *right panel*), without affecting the suppressive potential of $NRP1^+$ Tregs (Figure 4B, *left panel*).

These data suggest that in the context of DSS-induced colitis, the suppressive function of $NRP1^-$ Tregs is selectively enhanced.

***In vivo* neoconversion of Tregs is impaired during DSS-induced colitis**

We then examined the impact of colonic inflammation on Treg conversion, using 2 different *in vivo* Treg conversion models. In the first classical model, $CD4^+CD25^-$ T cells from ovalbumin

(OVA)-specific TCR transgenic OT-2 mice (CD45.2) were transferred into congenic Ly5a mice (CD45.1), which were fed twice with OVA (Figure 5A). Four days later, $Foxp3^+$ OT-2 T cell conversion was assessed by flow cytometry. Conversion of $CD4^+CD25^-$ T cells into $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in MLN was less efficient in colitic mice compared with control mice both in terms of frequency (2.7 ± 0.6 % *vs* 4.1 ± 0.5 %, respectively; p=0.03) (Figure 5B, *upper left panel*) and number of converted Tregs (28 203 ± 1 460 *vs* 33 962 ± 1 184 cells, respectively; p=0.04) (Figure 5B, *upper right panel*). Of note, there was no difference in the frequency of recipient Tregs ($CD45.1^+CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$) in MLN from DSS-treated *vs* control mice (Figure 5B, *lower panel*).

In the second Treg differentiation model, we adoptively transferred FACS-sorted $CD4^+CD25^+Foxp3eGFP^-$ cells in CD3ε KO mice (Figure 5C). These cells were previously described by Schallenber S. *et al.* to be immediate precursors of $Foxp3^+$ Tregs in homeostatic conditions[22]. 12 days after *in vivo* i.v. transfer, we compared the frequency of converted $Foxp3^+$ Tregs detected in MLN of CD3ε KO mice orally exposed with or without DSS. There was a roughly 2-fold less $Foxp3^+$ Treg conversion in MLN from colitic mice compared to control (1.8 ± 0.5 % *vs* 3.6 ± 0.7 %, respectively; p=0.03) (Figure 5D). These data show that gut inflammation significantly reduces *in vivo* $Foxp3^+$ Treg conversion in MLN.

Compromised Treg conversion property of DCs from DSS mice

DCs being integral to the differentiation of Tregs in the periphery, we next tested whether DCs from colitic mice were defective in their ability to induce Tregs *in vitro*. To this end, total $CD11c^+$ DCs from MLN of DSS-treated or control mice were co-cultured with naïve $CD4^+CD25^-$ T cells sorted from $RAG^{-/-}$ OT-2 mice, in presence of TGF-β and OVA class-II peptide, and the frequency of $Foxp3^+$ Tregs was assessed by flow cytometry after 5 days. We observed that DCs from colitic mice had a significantly reduced ability to induce $Foxp3^+$ Tregs compared to control mice (3.9 ± 0.5 % *vs* 7.1 ± 0.8 %, respectively; p=0.005) (Figure 6A).

MLN DCs can be subdivided into different subsets with distinct functions, and among them, CD103-expressing DCs are specialized for Treg generation[12 13] *via* expression of the TGF-β-activating αvβ8 integrin[15 16]. Interestingly, we found a 2-fold decrease in the frequency of $CD103^+$ DC from MLN of DSS-treated mice compared to control mice (46.0 ± 0.9 % *vs* 26.7 ± 2.6 %, respectively; p=0.002) (Figure 6B). $CD103^+$ MLN DCs can be further divided according to CD11b expression, and the frequency of both $CD103^+CD11b^+$ DC (Figure 6C, *right panel*) and $CD103^+CD11b^-$ DC (Figure 6C, *left panel*) were reduced in DSS-treated mice. Furthermore, while

β8 integrin was preferentially expressed by $CD103^{+}CD11b^{-}$ MLN DCs in naïve mice, its expression exhibited a significant 2-fold reduction upon DSS treatment (Figure 6D). Thus, in the context of DSS-induced colitis, defect in intestinal Treg generation is associated with decreased proportion of $CD103^{+}$ DCs and expression of β8 integrin.

DISCUSSION

Using the model of acute colitis induced by the gut barrier-disrupting agent DSS, we show that Tregs are required to limit the severity of intestinal inflammation. Indeed, extemporaneous depletion of Foxp3$^+$ Tregs in DEREG mice increased the severity of colitis upon DSS treatment, which could be alleviated by adoptive transfer of Tregs. These data are in agreement with previous studies[26 27] but point out that while Tregs retain a suppressive potential under gut inflammatory conditions, they are unable to completely prevent or control colitis in immune-competent mice. This raises the issue as to whether and how the inflamed gut microenvironment affects the *in vivo* behavior of the mucosal Treg compartment. Several mechanisms may account for the inability of Tregs to prevent colitis including i) impaired activation and inability to proliferate, ii) inability to migrate into intestinal tissues, iii) reduced suppressive function and even plasticity towards Th17/Th1 effector function and iv) lower efficacy to convert from CD4$^+$ T cells.

Here, we show that colitic mice exhibit increased numbers of Tregs in the colon *LP*, as shown by both immunohistochemistry and FACS analysis. This was associated with increased *in vitro* proliferative capacity of both MLN and colon *LP* Tregs from DSS-treated mice, as evidenced by Ki67 staining, while there was no evidence for increased Treg apoptosis in colitic mice (*data not shown).* In addition, we show that MLN Tregs from DSS-treated mice do not exhibit phenotypic changes. Moreover, analysis of the suppressive function of intestinal Tregs revealed that MLN Tregs from colitic mice were able to suppress *in vitro* proliferation of effector CD4$^+$ T cells as efficiently as MLN Tregs from control mice. Furthermore, colonic Tregs displayed enhanced suppressive potential as compared to those from naïve mice, indicating that inflammation promotes their functional activation. Whether these Tregs also have increased suppressive function *in vivo* will need to be further investigated. Indeed, it cannot be excluded that in the inflamed gut environment Tregs may loose their regulatory function. In this respect, proinflammatory cytokines up-regulated during colitis, such as IL-6, besides skewing differentiation of naive T cells towards Th17 cells, might also inhibit Treg function[28]. The observation of a small but detectable subset of Foxp3$^+$ cells co-expressing IL17 as well as of Foxp3$^-$CD4$^+$IL17$^+$ T cells in the colonic mucosa of colitic mice (*data not shown*), supported the concept of Tregs plasticity toward an effector phenotype in an inflamed gut. Along these lines, studies from human IBD have shown that CD4$^+$CD25$^+$ Treg clones established from gut biopsies extracted during active disease exhibited a mixed Th17/Foxp3 phenotype although they harbored an *in vitro* suppressive function[29]. Another possibility is that inability of Tregs to cope

with colitis may be due to outnumbering of innate effectors of DSS colitis, which include neutrophils and macrophages[30 31 32].

Interestingly, it has been shown that nTregs and iTregs play a synergistic role in the control of colitis and that iTregs allow nTregs regulatory properties[33]. We found that during inflammation the suppressive function of NRP1$^-$ Tregs in MLN, presumably representing iTreg[34] was selectively increased, while that of NRP1$^+$ Tregs likely corresponding to constitutive nTregs was unaffected by colitis. This may suggest that gut inflammation primarily influenced NRP1$^-$ iTregs, although recent studies showed that NRP1 expression does not formally discriminate nTregs from iTregs and can be even transiently induced during the differentiation of iTregs from CD4$^+$ T cells[35]. This difference in activation of iTregs versus nTregs might be due to the differential repertoire specificity of these cells, with nTregs being directed towards self-antigens while iTregs are specific for intestinal-associated antigens such as those derived from food or commensal flora.

Peripheral Treg conversion takes place especially in MLN and in the gut *LP*[12 13]. We found that *in vivo* conversion of Foxp3$^+$ Tregs was impaired in colitic mice indicating that inability of Tregs to completely alleviate colitis might be due to opposing influence of inflammation on Tregs. This consisted on one hand on an inhibitory effect on the neoconversion process (observed in two distinct *in vivo* models) and on the other hand of an enhancement of the suppressive potential of Foxp3$^+$ colonic Tregs (which primarily contain iTreg) [36] and MLN NRP1$^-$ Treg. Interestingly, it has been well demonstrated that CD103$^+$ MLN DCs play a critical role in Treg conversion, thanks to their unique ability to activate TFG-β *via* the integrin $\alpha v\beta 8$[16]. We observed that the reduced ability of CD11c$^+$ MLN DCs from colitic mice to promote Treg generation *in vitro* is associated with a decreased frequency of CD103$^+$ DC subsets and reduced expression of the TGFβ-activation $\alpha v\beta 8$ integrin.

Altogether, these data clearly show that gut inflammation promotes activation, proliferation and suppressive function of Tregs in the colon, while it impairs *de novo* conversion of naïve T cells into Tregs thus likely contributing to inability to fully overcome intestinal inflammation. It could be proposed that Treg in IBD patients may not be intrinsically flawed, but may fail to suppress disease due to local factors inhibiting their permanent conversion from CD4$^+$ T cells in the gut.

Legends to figures

Figure 1: Foxp3$^+$ Treg cells protect DEREG mice from DSS-induced colitis.

DEREG mice (4-5/group) were injected i.p with 1 µg of DT on day-1 and day 0 of DSS start. DT-treated WT littermates receiving DSS and DT-treated DEREG mice receiving water without DSS were used as controls. Representative dot plot FACS analysis of CD4$^+$ and Foxp3$^+$ T cell staining showing efficacy of Treg depletion in MLN (A: *left panel*) and colon *LP* (A: *right panel*) of DEREG mice on day +1. Colitis was assessed by body weight change (B), colon weight/length ratio at day 6 (C) and histologic H&E staining of distal colon sections at day 6 (*Final magnification X100*) (D) in the different groups.

DT-treated DEREG mice were either un-transferred (*black circles*) or transferred intravenously one day after first DT injection (*white circles*) with sorted CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^-$eGFP$^+$ T cells from naive Foxp3-IRES-eGFP donor mice. All recipient mice received DSS for 6 days. Body weight change (E: *left panel*) was recorded at various times and colon weight/length ratio was measured at day 6 of DSS treatment (E: *right panel*). Results are expressed as mean ± SEM and are representative of one out of three experiments (Statistics: ns $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$).

Figure 2: Treg were increased in MLN and colon *LP* of DSS colitic mice.

C57Bl/6 mice (5-6/group) were treated with 3% DSS in drinking water for 3 or 6 days. Control mice received water alone. Body weight change was recorded daily (A: *left panel*). Colon weight/length ratio (A: *right panel*) was assessed at days 3 and 6 of DSS treatment. FACS analysis of the frequency and number of CD4$^+$Foxp3$^+$ Treg in MLN (B, C) and colon *LP* (D). Representative dot plot analysis of Treg in MLN of control mice (B: *left panel*) and in mice at day 3 (B: *middle panel*) and day 6 (B: *right panel*) of DSS treatment (B). Scatter dot plots (C,D) of frequencies of CD4$^+$ T cells (*left*) or Foxp3$^+$ cells (*middle*) among leukocytes and absolute number of Foxp3$^+$ CD4$^+$T cells (*right*) in MLN (C) or colon *LP* (D). Immunohistochemical stainings of Foxp3 positive cells (*black arrows*) in colon sections at day 6 from mice with or without DSS treatment (E *left*, x200 final magnification); Statistical analysis in DSS-treated or water-treated groups (E, *right*). Data are representative of one of three experiments (Statistics: ns $p>0.05$, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

Figure 3: Activation and proliferation of Treg during DSS colitis.

Representative dot plot FACS analysis of $Foxp3^+$ and $Ki67^+$ T cell staining of MLN (A, B) or colon *LP* (C,D,E) in gated $CD4^+$ T cells from either control (A: left *panel*) or DSS-treated (A: right *panel*) mice (5-6/group). Scatter dot-plots showing the mean ± SEM percentage (B: *left panel and D*) and MFI (B: *right panel*) of $Ki67^+$ cells in gated $CD4^+Foxp3^+$ T cells from control (B and D, *black squares*), day 3 DSS-treated (B and D, *white circles*) and day 6 DSS-treated (B and D, *black triangles*) mice. Representative histogram of $Ki67^+$ expressing cells in gated $CD4^+Foxp3^+$ T cells from colon *LP* of mice day 6 DSS (red) or control (blue) mice (E). Proliferative capacity of $CD4^+Foxp3^+$ Treg cells from MLN of control or DSS-treated mice, was evaluated by CellTrace violet staining of Treg after 5 day culture with syngeneic dendritic cells (DC). Representative dot plot FACS analysis for Foxp3 and Cell Trace violet stainings of gated $CD4^+$ T cells from MLN of control (F: left *panel*) or day 6 DSS-treated (F: right *panel*) mice. Data are representative of one of three experiments. Results are expressed as the mean ± SEM of values from individual mice (Statistics: ns $p>0.05$, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

Figure 4: Suppressive function of colonic and mesenteric Treg from DSS mice.

In vitro suppression assays were carried out using pooled MLN or colon *LP* cells sorted from $Foxp3^+$-IRES-eGFP mice treated or not with DSS. FACS-sorted MLN $CD4^+CD25^-eGFP^-$ Tconv were co-cultivated with irradiated $CD11c^+$ spleen cells and soluble anti-CD3 mAb (1µg/ml), with or without graded numbers of either MLN $CD4^+CD25^+eGFP^+$Treg (A: *left panel*) or colon *LP* $CD45^+CD4^+eGFP^+$Treg (A: *right panel*) from DSS-treated mice (*white triangles*) or control (*black squares*). Comparison of suppressive function of sorted $NRP1^+$ Treg (B: *left panel*) from MLN of colitic mice (*white squares*) or control (*black squares*) and $NRP1^-$ Treg (B: *right panel*) from DSS mice (*white circles*) or control (*black circles*). Proliferation was determined on day 5 of culture by ^{3}H-thymidine incorporation during the last 12 hours of culture. Results are expressed as mean cpm ± SEM of triplicate wells. Background proliferation in culture of Tregs with APC and anti-CD3 mAb was < 500 cpm. Positive control cultures of Tconv with APC and Con A (5 µg/ml) was > 25000 cpm. Data are representative of one of two experiments (Statistics: ns $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$).

Figure 5: *In vivo* neoconversion of Treg in colon inflammatory condition.

Sorted $CD4^+CD25^-$ OT-2 cells (CD45.2) were transferred intravenously on day -1 in Ly5a (CD45.1) mice. Ly5a mice (4-5/group) were fed twice with ovalbumin on day 0 and 1, treated with DSS from day 0 and then sacrificed at day 4 (A). The scatter dot-plots represent the mean

± SEM frequency of $Foxp3^+$ cells in either gated $CD45.2^+CD4^+$ donor T cells (B: *upper left panel*) or $CD45.1^+CD4^+$ host T cells (B: *lower panel*) and number of $Foxp3^+CD4^+CD45.2^+$ cells (B: *upper right panel*) from MLN of either control (B: *black squares*) and DSS-treated (B: *black triangles*) Ly5a mice.

CD3ε KO mice (4-5/group) were transferred intravenously with sorted $CD4^+CD25^+Foxp3eGFP^-$ T cells ($1.5.10^5$ cells/mouse) from naive Foxp3IRES-eGFP donor mice and colitis was induced by 6 days DSS treatment and all mice were sacrificed at day 12 (C). Representative dot plot FACS analysis of $CD3^+$, $CD4^+$ and $Foxp3^+$ T cell frequency in MLN of either or control (D: *left panel*) or DSS (D: *middle panel*) CD3ε KO mice. Scatter dot-plot represents mean ± SEM frequency of $Foxp3^+$ cells in gated $CD3^+CD4^+$ T cells from MLN of control (D: *black squares*) or DSS-treated (D: *black triangles*) CD3ε KO mice. Data are representative of one of three experiments (Statistics: ns $p>0.05$ and * $p<0.05$).

Figure 6: Impact of DSS on *in vitro* Treg conversion capacity of MLN DC

Representative dot plot FACS analysis of the percentage of $CD4^+$ $Foxp3^+$ OT-2 T cells in day 5 co-culture of MLN $CD4^+CD25^-$ T cells from OT-2xRAG$^{-/-}$ mice with $CD11c^+$ DC from MLN of either naïve (A: *left panel*) or day 6 DSS-treated B6 mice (A: *middle panel*). Scatter dot-plot (A: *right panel*) showing the mean ± SEM frequency of $Foxp3^+$ converted cells in gated $CD4^+$ T cells from MLN of either control (A: *black circles*) and DSS-treated (A: *black squares*) mice. Representative dot plot FACS analysis of MLN $CD103^+$ $CD11b^+$ and $CD103^+$ $CD11b^-$ DC subsets from control (B: *left panel*) or DSS-treated (B: *right panel*) B6 mice. Scatter dot-plot representing the mean ± SEM frequency of $CD103^+$ DC (B: *right panel*), $CD103^+CD11b^+$ (C: *right panel*) and $CD103^+$ $CD11b^-$ (C: *left panel*) in gated $CD11c^+$ DC from MLN of control (B and C: *black circles*) and day 6 DSS colitic (B and C: *black squares*) mice. RT-PcR analysis of the ß8 integrin gene expression in various MLN DC subsets of colitic mice (D). Scatter dot-plot showing the mean ± SEM of ß8 integrin transcripts relative expression by $CD11b^-CD103^+$ DC, $CD11b^+CD103^+$ DC and $CD103^-$ DC from MLN of either control (*black circles*) or DSS-treated mice (*white circles*). Data are representative of one of three experiments (Statistics: ns $p>0.05$, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$).

Figure 1

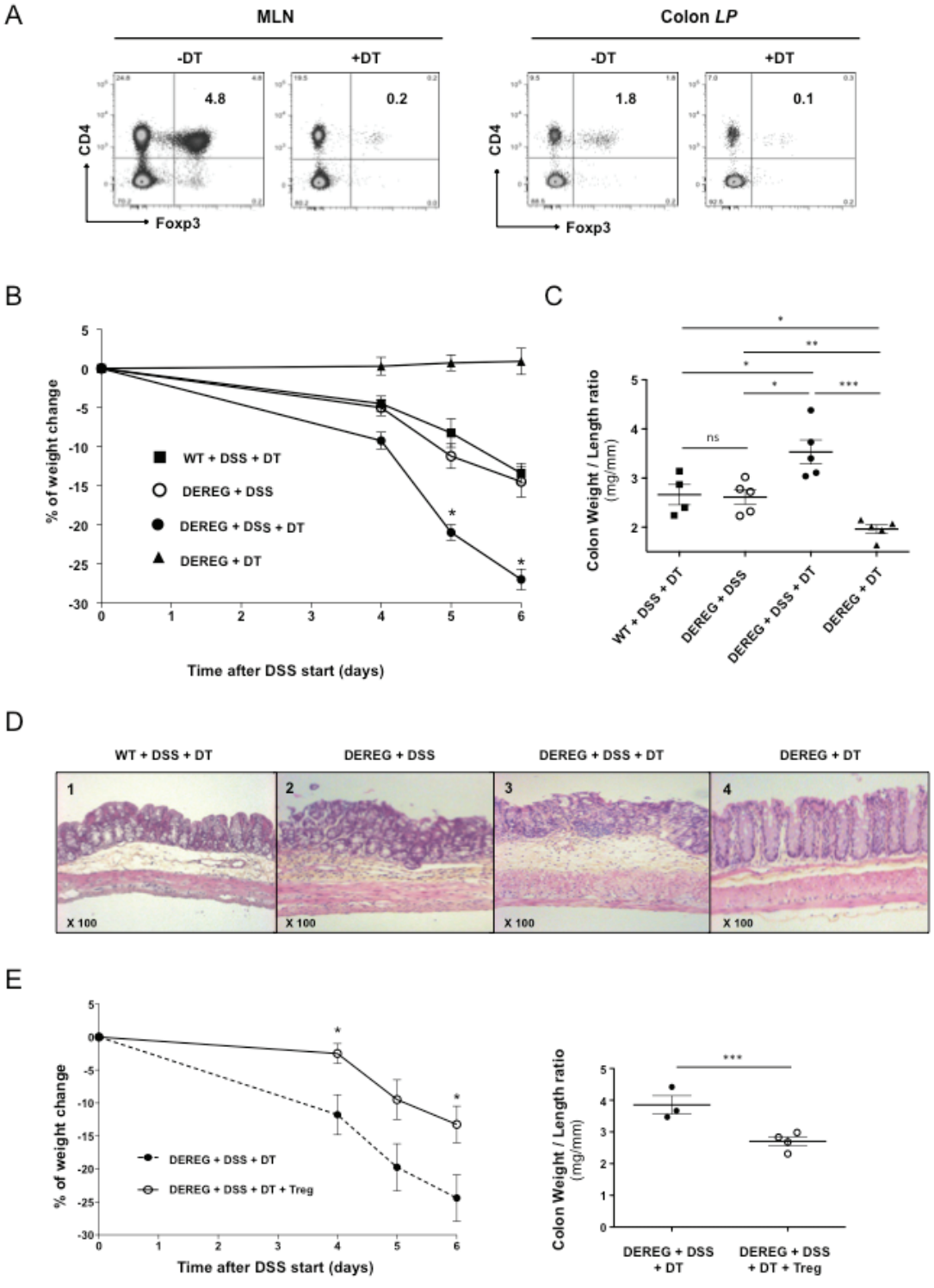

A
MLN
Colon LP
-DT
+DT
4.8
0.2
1.8
0.1
CD4
Foxp3
B
% of weight change
WT + DSS + DT
DEREG + DSS
DEREG + DSS + DT
DEREG + DT
Time after DSS start (days)
C
Colon Weight / Length ratio (mg/mm)
ns
WT + DSS + DT
DEREG + DSS
DEREG + DSS + DT
DEREG + DT
D
WT + DSS + DT
DEREG + DSS
DEREG + DSS + DT
DEREG + DT
X 100
E
% of weight change
DEREG + DSS + DT
DEREG + DSS + DT + Treg
Time after DSS start (days)
Colon Weight / Length ratio (mg/mm)
DEREG + DSS + DT
DEREG + DSS + DT + Treg

Figure 2

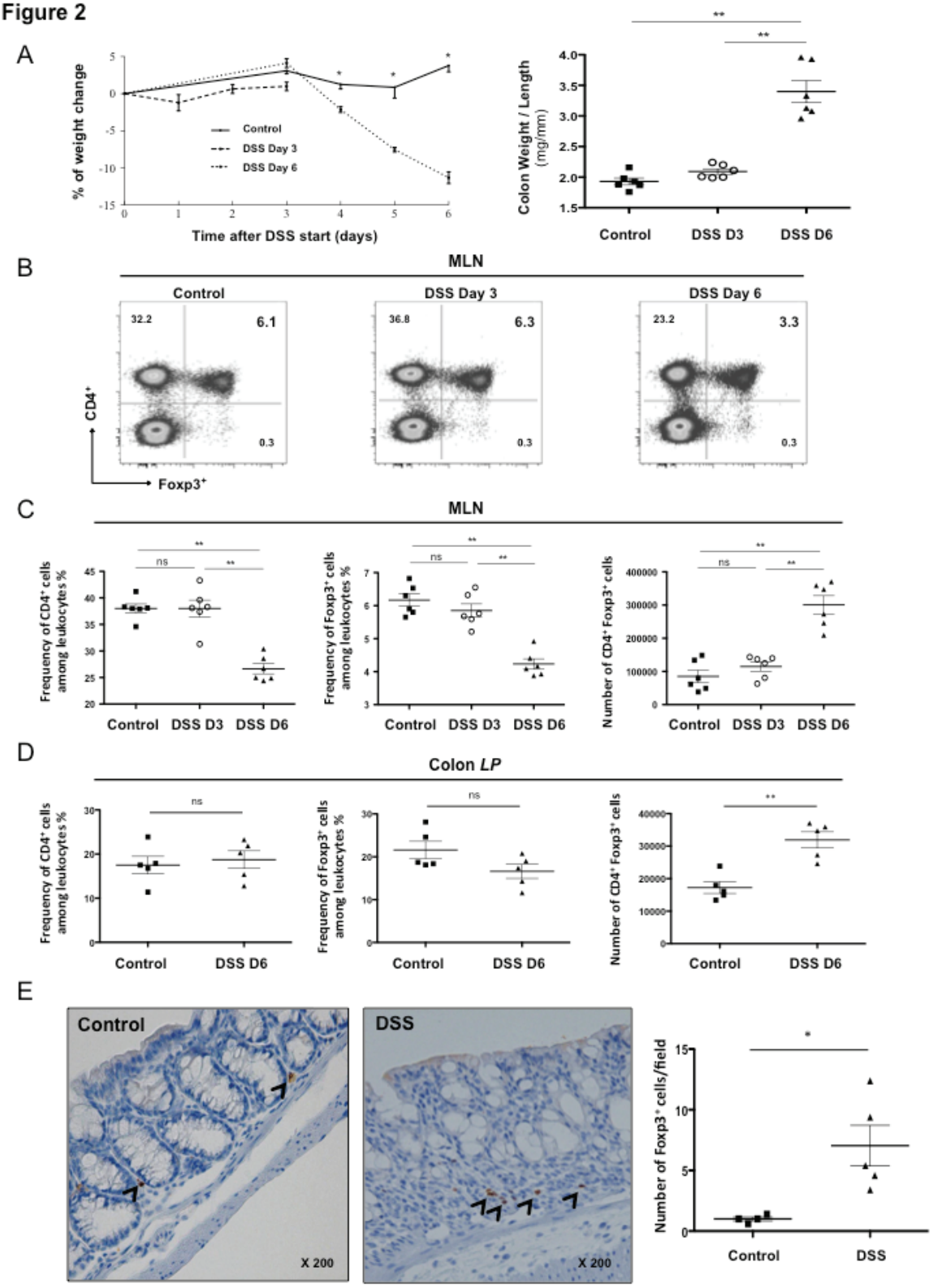

A
% of weight change
Time after DSS start (days)
Control
DSS Day 3
DSS Day 6
Colon Weight / Length (mg/mm)
Control
DSS D3
DSS D6
B
MLN
Control
DSS Day 3
DSS Day 6
32.2
6.1
0.3
36.8
6.3
0.3
23.2
3.3
0.3
CD4+
Foxp3+
C
MLN
Frequency of CD4+ cells among leukocytes %
Frequency of Foxp3+ cells among leukocytes %
Number of CD4+ Foxp3+ cells
ns
Control
DSS D3
DSS D6
D
Colon LP
Frequency of CD4+ cells among leukocytes %
Frequency of Foxp3+ cells among leukocytes %
Number of CD4+ Foxp3+ cells
ns
Control
DSS D6
E
Control
DSS
X 200
X 200
Number of Foxp3+ cells/field
Control
DSS

Figure 3

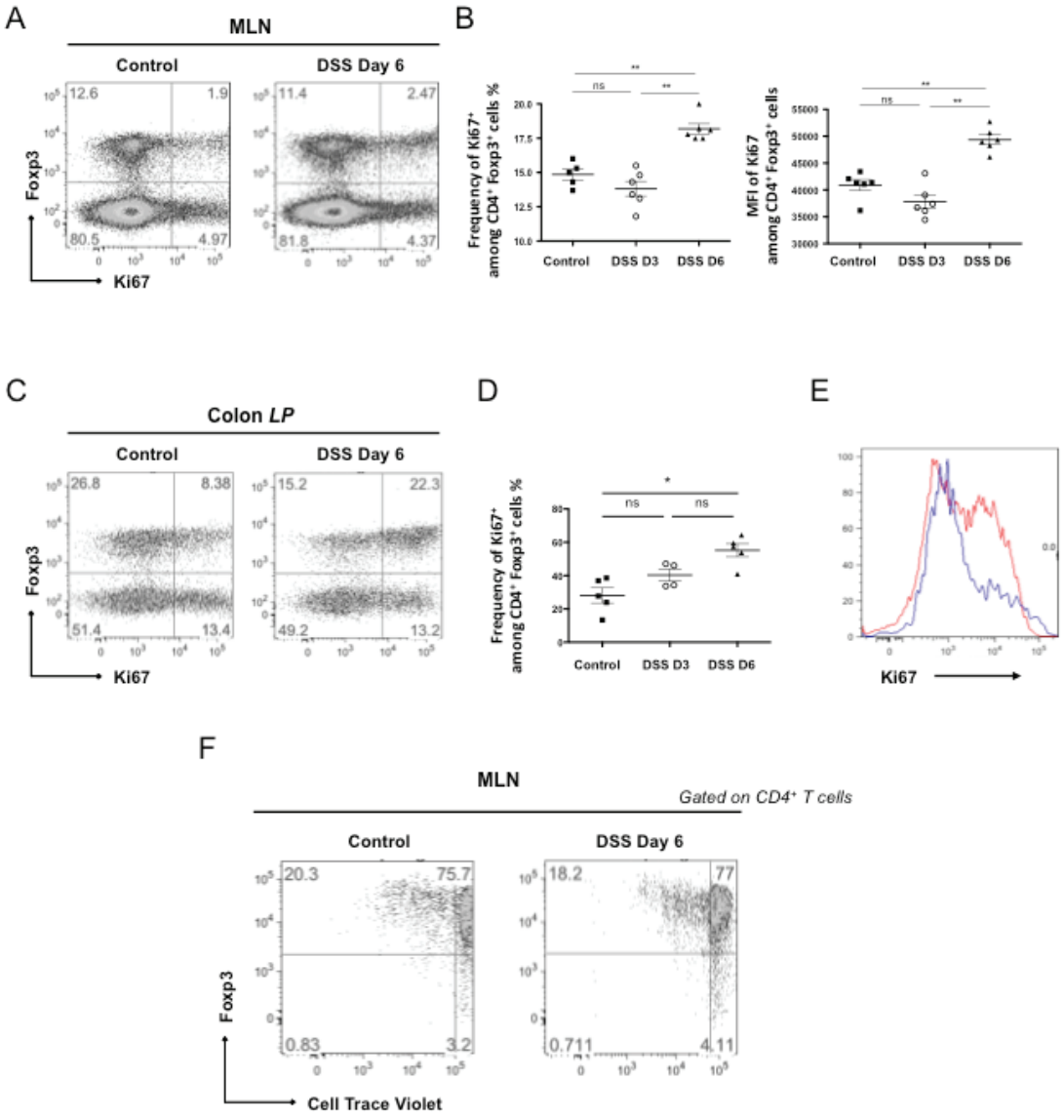

A
MLN
Control
DSS Day 6
12.6
1.9
80.5
4.97
11.4
2.47
81.8
4.37
Foxp3
Ki67
B
Frequency of Ki67+ among CD4+ Foxp3+ cells %
MFI of Ki67 among CD4+ Foxp3+ cells
ns
**
Control
DSS D3
DSS D6
C
Colon LP
Control
DSS Day 6
26.8
8.38
51.4
13.4
15.2
22.3
49.2
13.2
Foxp3
Ki67
D
Frequency of Ki67+ among CD4+ Foxp3+ cells %
*
ns
Control
DSS D3
DSS D6
E
Ki67
F
MLN
Gated on CD4+ T cells
Control
DSS Day 6
20.3
75.7
0.83
3.2
18.2
77
0.711
4.11
Foxp3
Cell Trace Violet

Figure 4

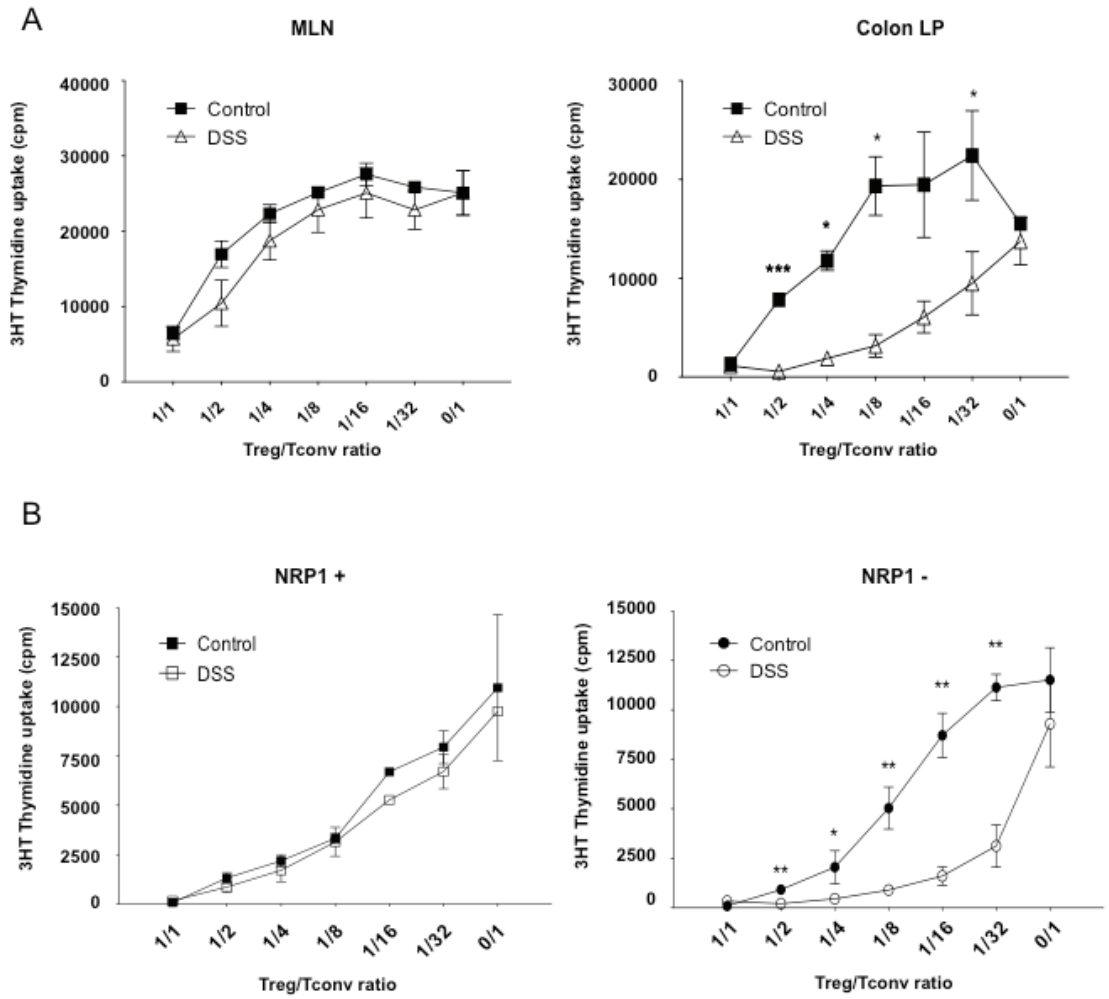

A
MLN
Colon LP
3HT Thymidine uptake (cpm)
Control
DSS
Treg/Tconv ratio
1/1
1/2
1/4
1/8
1/16
1/32
0/1
B
NRP1 +
NRP1 -

Figure 5

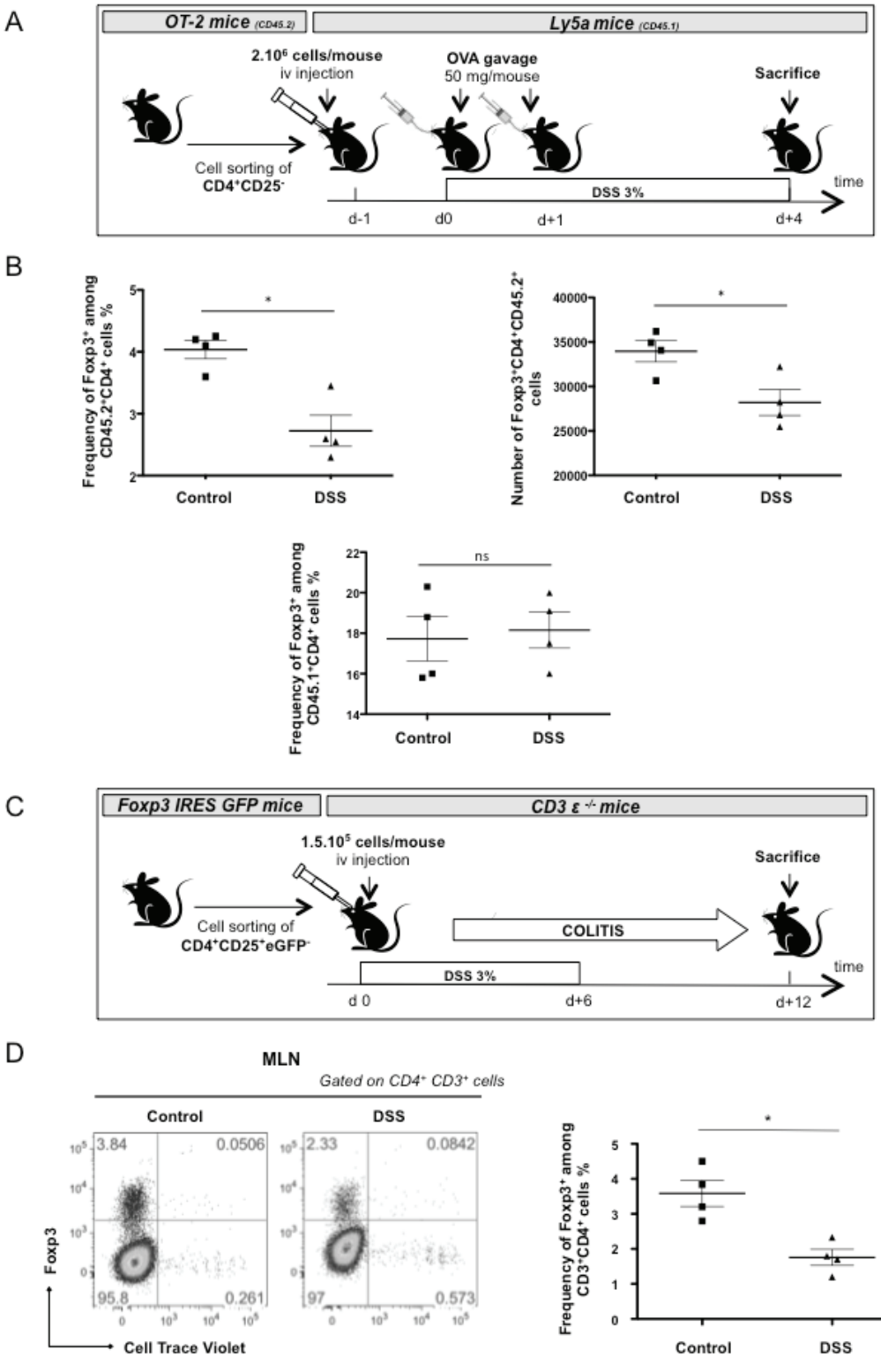
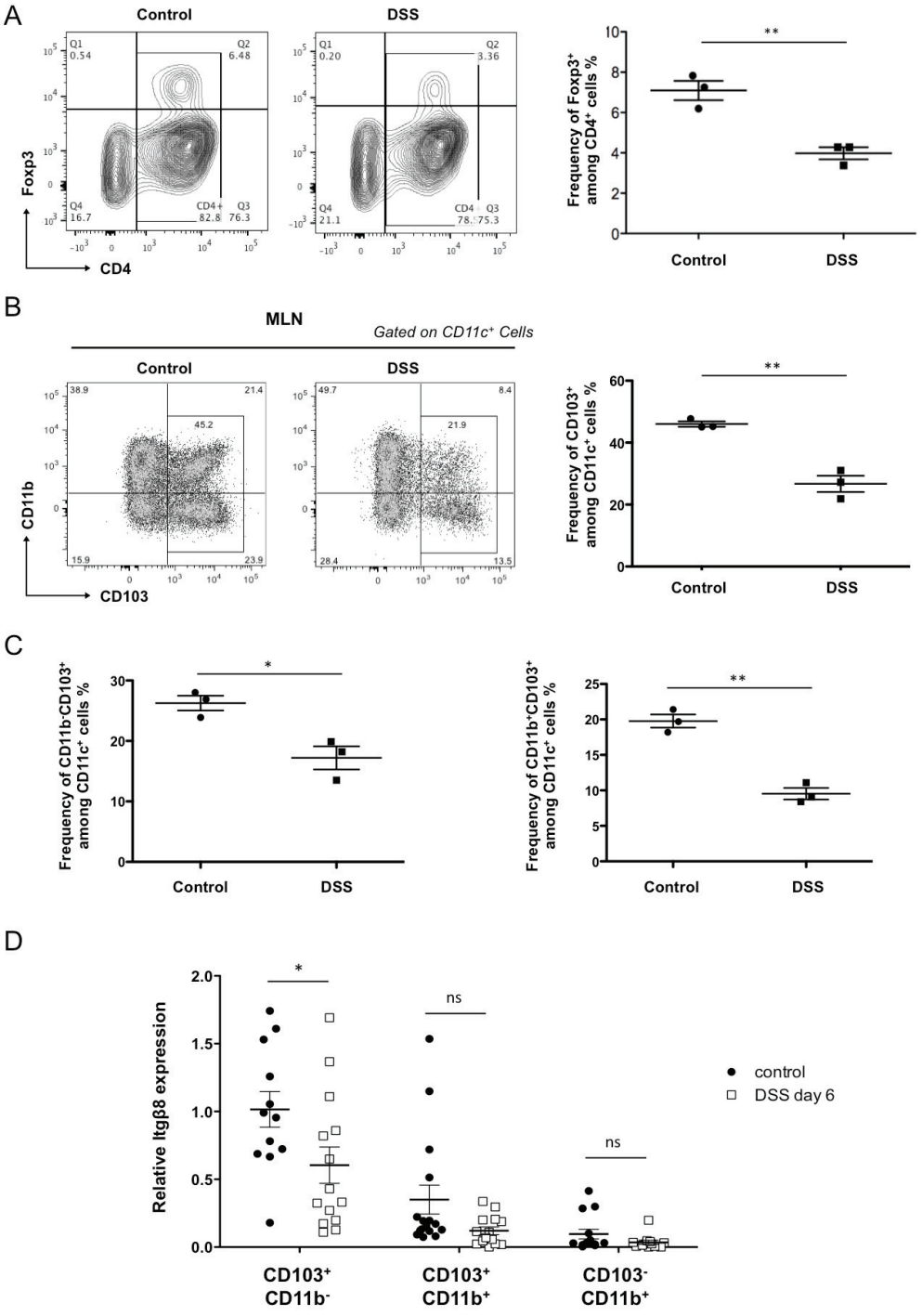

A
OT-2 mice (CD45.2)
Ly5a mice (CD45.1)
2.10⁶ cells/mouse
iv injection
OVA gavage
50 mg/mouse
Sacrifice
Cell sorting of
CD4⁺CD25⁻
DSS 3%
time
d-1
d0
d+1
d+4
B
Frequency of Foxp3⁺ among CD45.2⁺CD4⁺ cells %
Control
DSS
Number of Foxp3⁺CD4⁺CD45.2⁺ cells
Frequency of Foxp3⁺ among CD45.1⁺CD4⁺ cells %
ns
C
Foxp3 IRES GFP mice
CD3 ε -/- mice
1.5.10⁵ cells/mouse
iv injection
Sacrifice
Cell sorting of
CD4⁺CD25⁺eGFP⁻
COLITIS
DSS 3%
d 0
d+6
d+12
D
MLN
Gated on CD4⁺ CD3⁺ cells
Control
DSS
3.84
0.0506
95.8
0.261
2.33
0.0842
97
0.573
Foxp3
Cell Trace Violet
Frequency of Foxp3⁺ among CD3⁺CD4⁺ cells %

Figure 6


A
Control
DSS
Q1 0.54
Q2 6.48
Q4 16.7
CD4+ 82.8
Q3 76.3
Q1 0.20
Q2 3.36
Q4 21.1
CD4+ 78.7
Q3 75.3
Foxp3
CD4
Frequency of Foxp3+ among CD4+ cells %
**
Control
DSS
B
MLN
Gated on CD11c+ Cells
Control
DSS
38.9
21.4
45.2
15.9
23.9
49.7
8.4
21.9
28.4
13.5
CD11b
CD103
Frequency of CD103+ among CD11c+ cells %
**
Control
DSS
C
Frequency of CD11b-CD103+ among CD11c+ cells %
*
Control
DSS
Frequency of CD11b+CD103+ among CD11c+ cells %
**
Control
DSS
D
Relative Itgβ8 expression
*
ns
ns
control
DSS day 6
CD103+ CD11b-
CD103+ CD11b+
CD103- CD11b+

References

1. Jones-Hall YL, Grisham MB. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. Pathophysiology. 2014; 21:267-88.
2. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. J Biomed Biotecnol. 2012; doi:10.1155/2012/718617.
3. Allez M, Mayer L. Regulatory T cells : peace keepers in the gut. Inflamm Bowel Dis. 2004 Sep;10:666-76.
4. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. 2000 May 26;101:455-8.
5. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003;4:330-6.
6. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003;299:1057-61.
7. Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. Immunity 1994;1:553-62.
8. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Genet 2001;27:18-20.
9. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. Curr Opin Rheumatol 2003;15:430-5.
10. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet 2001;27:68-73.
11. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, et al. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. Cell. 2012 Jul 6;150:29-38.
12. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J Exp Med 2007;204:1757-64.
13. Sun CM et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid. J Exp Med. 2007; 204:1737-9.
14. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. Nature. 2010; 463:808-12.
15. Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, et al. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-β and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin αvβ8. Gastroenterology. 2011; 141:1802-12.
16. Païdassi H, Acharya M, Zhang A, et al. Preferential expression of integrin αvβ8 promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. Gastroenterology. 2011; 141:1813-20.
17. Boschetti G, Nancey S, Sardi F, et al. Therapy with anti-TNFa antibody enhances number and function of Foxp3+ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases.

Inflamm Bowel Dis. 2011; 17:160-70.
18. Li Z, Vermeire S, Bullens D, et al. Restoration of Foxp3+ Regulatory T-cell Subsets and Foxp3- Type 1 Regulatory-like T Cells in Inflammatory Bowel Diseases During Anti-tumor Necrosis Factor Therapy. Inflamm Bowel Dis. 2015; 21:2418-28.
19. Li Z, Arijs I, De Hertogh G, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. Inflamm Bowel Dis. 2010; 16:1299-310.
20. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med. 2007; 204: 57-63.
21. Wang Y, Kissenpfennig A, Mingueneau M, et al. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol. 2008; 180:1565-75.
22. Nancey S, Holvoet S, Graber I, et al. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. Gastroenterology. 2006; 131:485-496.
23. Schallenberg S, Tsai PY, Riewaldt J, et al. Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. J Exp Med. 2010; 5 : 1393-407.
24. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ Treg cells. J Exp Med. 2012 ; 209 : 1723-42.
25. Lin X et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. Int J Clin Exp Pathol. 2013 ; 6 : 116-123.
26. Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting Edge: TGF-β signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. J Immunol. 2004; 173:6526–6531.
27. Boehm F, Martin M, Kesselring R, et al. Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. BMC Gastroenterol. 2012 ; 12: 97.
28. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. Science. 2003; 299:1033-6.
29. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR. et al. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011; 140:957-65.
30. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 1990; 98:694-702.
31. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest 1993;69:238 –249.
32. Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. Gastroenterology. 2002; 123:256-70.
33. Haribhai D, Lin W, Edwards B, et al. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. J Immunol. 2009; 182:3461–3468.

34. Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2013; 19:1772-88.
35. Szurek E, Cebula A, Wojciech L, et al. Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells. PLoS One. 2015; 10
36. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. Immunity. 2009; 31:401-11.

PUBLICATION N°3

"Enrichment of circulating double positive interleukin-17 producing Foxp3$^+$ CD4$^+$ T cell subsets are associated with a higher risk of further relapse in crohn's disease in remission: an observational, prospective multicenter study"

Gilles Boschetti, Bernard Flourié, Xavier Roblin, Stéphane Paul, Jacques Bienvenu, Gilles Bommelaer, Anthony Buisson, Emilie Del Tedesco, Cendrine Josson, Stéphane Legastelois, Dominique Kaiserlian et Stéphane Nancey

Manuscrit en préparation

L'équilibre entre les lymphocytes T régulateurs Foxp3$^+$ (Treg) et les lymphocytes T effecteurs (Teff), en particulier Th1 et Th17, est indispensable pour assurer la protection vis-à-vis des infections mais également pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Ces différentes sous-populations de lymphocytes T (LT) contribuent aussi à la pathogénie de la maladie de Crohn (MC). La dynamique des principales populations de Teff et Treg durant les périodes de rémission de la MC et leur relation avec le risque de rechute demeurent inconnues. Nous avons donc systématiquement analysé l'évolution dans le temps des fréquences et nombre des lymphocytes Treg, Th1 et Th17 circulants dans une cohorte de patients avec une MC en rémission clinique.

Cent treize patients souffrants d'une MC en rémission clinique ont été suivis tous les 3 mois pendant 1 an. A chaque visite, un prélèvement sanguin était effectué pour la mesure des marqueurs classiques d'inflammation y compris la CRP ultrasensible (CRPus) et le dosage dans le sérum de différentes cytokines par la méthode ultrasensible Erenna (IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-23, TNFα, IFNγ et TGFβ). La fréquence des populations circulantes de LT CD4$^+$ Th1, Th17 et Treg ainsi que les populations double positives IFNγ-IL17, Foxp3-IFNγ et Foxp3-IL-17 étaient analysées en cytométrie en flux grâce à des multiples marquages de surface et intracellulaire.

Trente-quatre patients (30%) parmi les 113 ont présenté une rechute clinique durant la période de suivi. En dépit d'une variabilité intra et interindividuelle substantielle, la fréquence

des LT $CD4^+$ sécrétant de l'IFNγ (Th1), de l'IL-17 (Th17) ou exprimant Foxp3 (Treg) aussi bien que les concentrations des différentes cytokines mesurées dans le sérum (IL-6, IL-8, IL-17A, TGFβ, TNFα, IFNγ, IL-13, IL-23) n'étaient pas significativement différentes chez les patients restés en rémission comparés à ceux qui ont rechuté durant la période de suivi. Les populations de LT $CD4^+$ co-exprimant Foxp3 et IL-17, Foxp3 et IFNγ mais aussi Foxp3, $IL\text{-}17^+$ et $IFN\gamma^+$ étaient détectées chez les patients en rémission. La fréquence de la sous-population de LT $CD4^+$ co-exprimant IL-17 et Foxp3 étaient deux fois plus élevée dans le groupe des patients en rémission qui récidivaient 3 mois plus tard comparés à ceux qui restaient en rémission. En analyse multivariée, une CRPus élevée, un taux sérique faible d'IL-10 et une fréquence élevée de LT $CD4^+$ co-exprimant IL-17 et Foxp3 étaient 3 facteurs indépendants significativement associés à un risque de rechute clinique chez des patients en rémission.

La détection de sous-populations de LT $CD4^+$ co-exprimant Foxp3, IL-17 et IFNγ plaide en faveur du concept de plasticité des LT au cours des MICI. Une augmentation significative de la fréquence de LT $CD4^+$ double positifs $Foxp3^+$ et $IL\text{-}17^+$ plusieurs mois avant la survenue de la rechute clinique suggère une possible contribution de cette sous-population particulière dans la pathogénie de la MC.

ENRICHMENT OF CIRCULATING DOUBLE POSITIVE INTERLEUKIN-17 PRODUCING FOXP3^{+} CD4^{+} T CELL SUBSETS ARE ASSOCIATED WITH A HIGHER RISK OF FURTHER RELAPSE IN CROHN'S DISEASE IN REMISSION: AN OBSERVATIONAL, PROSPECTIVE MULTICENTER STUDY

Gilles BOSCHETTI[1,2], Bernard FLOURIE[1,2], Xavier ROBLIN[3], Stéphane PAUL[4], Jacques BIENVENU[5], Gilles BOMMELAER[6], Anthony BUISSON[6], Emilie DEL TEDESCO[3], Cendrine JOSSON[6], Stéphane LEGASTELOIS[6], Dominique KAISERLIAN[1*] and Stéphane NANCEY[1,2*]

[*] *The 2 last authors equally contributed to this work*

[1] INSERM U1111, International Center for Research in Infectiology, Lyon, France and [2] Department of Gastroenterology, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France and University Claude Bernard Lyon 1, France

[3] Department of Gastroenterology, University Hospital, Saint-Etienne, France

[4] Laboratory of Immunology and Immunomonitoring, University Hospital & GIMAP EA3064 Université de Lyon, Saint-Etienne, France

[5] Laboratory of Immunology, Hospices Civils de Lyon, Hopital Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

[6] Department of Gastroenterology, University Hospital, Clermont-Ferrand, France

[7] Indicia, Lyon, France

Corresponding author:

Pr S NANCEY, MD, PhD
Department of Gastroenterology
Hospices Civils de Lyon, Lyon-Sud Hospital
69495 Pierre-Bénite, France
stephane.nancey@chu-lyon.fr

ABSTRACT

Background

The balance between Foxp3$^+$ regulatory T cells (Tregs) and effector T cells, including Th1 and Th17 CD4$^+$ T cell subsets are critical for protecting the host from infection while maintaining gut homeostasis. All these T cell subsets contribute to the pathogenesis of Crohn's disease (CD). The dynamics of most of the peripheral effector and regulator T cell subsets during the course of CD in remission and their relationships with the risk of relapse remain unknown. We aimed to systematically analyse the evolution of frequencies of circulating Th1, Th17 and Tregs with respect to disease remission relapse in CD.

Patients and Methods

A cohort of 113 CD patients in clinical remission were regularly followed up on a 3-month basis. Blood samples were collected at each visit for routine monitoring inflammatory markers, including ultrasensitive CRP and for measurements of various serum cytokines, including IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-23, TNFα, IFNγ, TGFβ, by an ultrasensitive Erenna method. The frequencies of circulating single positive Th1, Th17 and Tregs CD4$^+$ T cell subsets, as well as double positive CD4+ T cell subsets co-expressing IFNγ-IL17, Foxp3-IFNγ and Foxp3-IL-17 were analysed by multicolour flow cytometry.

Results

Among the whole cohort, 34 (30%) out of 113 patients relapsed within the follow-up period. The prevalence of circulating IFNγ-secreting CD4$^+$ T cells (Th1), IL-17-secreting CD4$^+$ T cells (Th17) and Foxp3-expressing CD4+ T cells (Treg) as well as the concentrations of a wide broad of cytokines (IL-6, IL-8, 17A, TGFβ, TNFα, IFNγ, IL-13, IL-23) measured in the serum were not significantly different all over the time between patients who relapsed and those who stay in clinical remission. Various circulating double positive CD4$^+$ T cell subsets co-expressing Foxp3 and IL-17, Foxp3 and IFNγ and triple positive Foxp3$^+$ IL-17$^+$ and IFNγ^+ were detectable in CD patients in remission. The subset of CD4$^+$ T cells co-expressing IL-17 and Foxp3 was found significantly enriched (≈ 2-fold increase) in the circulating compartment in the cohort of patients in remission who further experienced a clinical relapse 3 months later compared with that of CD patients who stayed in remission all over the follow-up period. In a multivariate analysis, elevated serum usCRP, low serum IL-10 and high number of double positive IL-17 and

Foxp3 $CD4^+$ T cells were 3 independent factors significantly associated with the risk of further clinical relapse in CD patients in remission.

Conclusion

Detectable circulating crossover immune $CD4^+$ T cell subsets co-expressing Foxp3, IL-17 and IFNγ in CD patients in remission argues in favour of the recent concept of T cell plasticity. A significant enrichment of a unique $CD4^+$ T cell subset co-expressing Foxp3 and IL-17 that preceding the occurrence of a flare suggests the potential contribution of this double positive T cell subset in the pathogenesis of CD.

BACKGROUND

Crohn's disease (CD) is a chronic relapsing inflammatory disorder featured by an alternance of flare and remission periods. The occurrence of a relapse in CD patients in clinical remission is a frequent event (≈ 50 % at one year) that remains largely unpredictable. Identification of novel accurate markers capable to predict the risk of relapse remains an unmet need in inflammatory bowel diseases (IBD). CD pathogenesis results from an aberrant mucosal immune responses to gut microbiota occurring on a genetic predisposition [1]. Several studies in mice have highlighted a clear mucosal immunologic imbalance between effector and regulator T cell subsets that drive gut inflammation and lesions [2]. Naïve $CD4^+$ T helper cells that encounter their specific antigens presented *via* the major histocompatibility complex molecules by professional antigen-presenting cells differentiate into effector cells that are featured by their ability to produce various cytokines and by their immunoregulatory/suppressive functions. Besides the Th1 and Th2 $CD4^+$ effector subsets described in 1986 by Mosmann and Coffman [3], a more recent effector $CD4^+$ T cell subset (Th17) producing IL-17 infiltrate mucosal tissues and contributes to gut inflammation and damages [4]. The differentiation of the IL-17 producing $CD4^+$ T cell subpopulations is dependent on the transcription factor RORγt and the presence of TGFβ and IL-6 in the cytokine microenvironment [5]. In contrast, the regulatory T cells (Tregs) that are characterized by expression of the transcription factor Foxp3 and that represent the main and the most widely studied $CD4^+$ T cell immunoregulatory subsets promote tissue homeostasis [6]. These regulatory T cells infiltrate the *lamina propria* of the digestive tract where they modulate immune responses to commensal microbes by suppressing the activation, proliferation, and effector functions of adaptive immune cells but are also present in the circulating compartment. They comprise two distinct entities, one that derived from the thymus (natural Tregs) and the others that can be induced in the periphery (induced Tregs), especially in the gut, from naive $CD4^+$ T cells upon exposure to TGFβ. Interestingly, Th17 and Treg cells are reciprocally regulated and the canonical TGFβ is involved both in the differentiation of both T cell subsets [7]. Several findings suggest that a dysbalance between Th17 and Treg subsets contributes in the pathogenesis of IBD. In addition, more recently, a novel crossover immune $CD4^+$ T cells, producing IL-17 and sharing Treg signature has been detected in IBD and the circulating frequency of this IL-17 and Foxp3 double expressing $CD4^+$ T cells was reported higher in CD when compared with that in healthy volunteers suggesting a potential contribution of the concept of T cell plasticity in IBD [8]. In addition, Tregs were shown to acquire the capacity to express either IL-17 or IFNγ under different conditions of stimulation [9].

However, data on the frequencies of these novel circulating double positive T cell subsets are scarce in patients with CD as well as the potential impact of their dynamics on the disease outcome remains to be characterized. In the present study, we have systematically monitored and analysed both the frequencies of circulating double positive T cell subsets (i.e., IL-17 producing Foxp3^{+} CD4^{+} T cells, IFNγ producing Foxp3^{+} CD4^{+} T cells, and double expressing IL-17 and IFNγ CD4^{+} T cells) and a wide panel of serum cytokines in a cohort of patients with CD in clinical remission followed every 3 months within one year or before in case of disease relapse.

PATIENTS AND METHODS

Study design

All consecutive outpatients with a diagnosis of CD since more than 6 months were screened for eligibility and were prospectively recruited between 2011 and 2013 in 3 tertiary referral centers in IBD (Lyon, Saint-Etienne and Clermont-Ferrand) if they met the inclusion/exclusion criteria. All patients should be in medically-induced clinical remission defined according to the validated clinical Harvey Bradshaw Index (HBI). The enrolled patients were followed for a 1 year period, or less in case of relapse. Inclusion criteria included: adult (18-75 years old) CD patients based on the Lennard Jones criteria; clinical remission for at least 3 months prior to the inclusion, defined by a HBI < 4 points. Exclusion criteria are the following: symptomatic CD at enrolment with a HBI ≥ 4 points or complications including bowel obstruction, intraabdominal abscess; exclusive or predominant perianal CD; ileo- or colostomy; pregnancy; previous extended bowel resection; patients receiving steroids within 3 months prior enrolment; changes of the medication dose for immunosuppressants (azathioprine, 6-mercaptopurine, methotrexate) within 3 months; No novel medication should be added or changes of the dosage of their maintenance medications during the whole follow-up except in case of disease relapse. Clinical relapse was defined by an index HBI > 4 points at least 7 consecutive days and the presence of an objective marker of inflammation (elevated serum CRP, fecal calprotectin, and/or thickness of bowel wall by ultrasonography or MRI). All patients were systematically followed every 3 months with a medical history and a physical examination. CD activity was also recorded and a blood samples was collected for measurement of routine serum ultrasensitive CRP (usCRP), for measurement of various $CD4^+$ T cell subsets and for determination of the levels of serum cytokines. The protocol was reviewed and approved by the local Research and Ethics Committee of the Hospices Civils de Lyon, and written informed consent was obtained from each participant prior to study enrolment.

Cell isolation and culture

Fresh blood samples were rapidly transported into the laboratory for analysis. Heparinised venous blood samples were diluted 1:3 with PBS and layered on a Ficoll-Hypaque density gradient, then centrifuged for 30 min at 900 g and Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from the interface. PBMCs were suspended in RPMI 1640 culture medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2mM L-glutamine, and 10 % heat-inactivated fetal bovine serum and cultured in the presence or absence of phorbol-12-myristate-acetate (PMA, 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)

and ionomycin (5nM; Sigma-Aldrich) for 5 hours in the presence of a protein transport inhibitor solution containing monensin (BD GolgiStop; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The incubator was set at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere.

Flow cytometry acquisition and analysis

Peripheral frequencies and number of the following $CD4^+$ T cell subsets were investigated: IL-17^+ producing T cells; IFNγ producing T cells; $Foxp3^+$ positive T cells; double positive IFNγ^+ $Foxp3^+$ T cells; IFNγ and IL-17 producing T cells and IL-17 producing $Foxp3^+$ T cells.

After 5 hours of stimulation, cells were extensively washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then surface stained with Alexa Fluor 700-conjugated CD3 (clone UCHT1) and PeCy7-conjugated CD4 (clone SK3). Intracellular and intranuclear stainings were performed according to manufacturer's instructions (BD Biosiences). Briefly, cells were permeabilized, fixed and then stained with Alexa Fluor 647-conjugated Foxp3 (clone 236A/E7), PE-conjugated IL-17a (clone N49-653) and Fitc-conjugated IFNγ. For each surface and intracellular staining the relevant isotype control was used. All mAbs used for stainings were purchased from BD Pharmingen (Pont de Claix, France). Flow-Count Fluorospheres® (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used for absolute counts of cells. Immunostainings were acquired and analyzed by flow cytometry on a LSRII analyzer with the FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR). Th1 cells were identified as $CD3^+CD4^+$IFNγ^+, Th17 cells as $CD3^+CD4^+$IL-17^+ and Tregs as $CD3^+CD4^+Foxp3^+$ cells.

Serum cytokine measurements

The ultrasensitive Singulex Erenna® Immunoassay was used to measure various cytokines levels in the serum. Briefly, Erenna® Immunoassay represents a quantitative fluorescent sandwich immunoassay technique to measure serum samples at very low threshold. A capture antibody specific for cytokines has been pre-coated onto paramagnetic microparticles (MP). The user pipettes MP, standards, and samples into uncoated microplate wells. During incubation, cytokines present in the sample binds to the capture antibody on the coated MP. Unbound molecules are washed away during the subsequent buffer exchange and wash steps. Fluor-labeled detection antibody is added to each well and incubated. This detection antibody recognizes and binds to cytokines that has been captured onto the MP. During the following wash step the MPs are transferred to a clean plate. Elution buffer is then added and incubated.

The elution buffer dissociates the bound protein sandwich from the MP surface, releasing the labeled antibodies. These antibodies are separated during transfer to a final microplate. The plate is loaded into the Erenna System where the labeled molecules are detected and counted. The number of fluor-labeled detection antibodies counted is directly proportional to the amount of cytokine present in the sample when captured. The amount of cytokines in unknown samples is interpolated from a standard curve. Prior to measurements, and for each cytokine, all characteristics of dosage have been validated and correlation with the Luminex assay has been performed.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using both using both GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) and SAS® 9.2 (Cary, NC, USA) softwares. The non-parametric Mann-Whitney test and the one-way ANOVA test with Bonferroni correction were used as appropriate. Chi square test was used to compare patients' characteristics in Table 1. Results were considered statistically significant at a 95% level of confidence ($p<0.05$). Data are presented as mean ± S.E.M. Logistic regressions were performed to predict the relapse (outcome) during the observation period. Univariate logistic regressions were performed on all available variables to identify potential predictive factors of relapse. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve methods were generated to define the optimal cut-off to convert continuous factors into binary factors. Multivariate logistic regressions were performed using binary factors from univariate analyses. The stepwise method was used with a significant level for entering and removing effects of 10%.

RESULTS

Characteristics of the cohort of patients with CD in remission

A total of 113 CD patients (mean age 38.1 years; 41 Male (36 %)) were prospectively enrolled. The flow chart of patients is given in Figure 1. Baseline characteristics of the whole population are summarized in Table 1. The median disease duration was 4 years; Thirty-two patients (28 %) had prior history of intestinal resection and 24 % were active smokers. Twenty-three percent of patients were treated with stable dose of immunosuppressants and 41 % were under anti-TNF therapy. The mean time interval between enrolment and the last flares of CD was 2.3 years, IC 95 % [1.9-2.8]. Thirty-five patients (30.9%) experienced a relapse within the one-year period of follow up. The relapse occurred in 31 % of cases during the first 3 months of the follow up, in 34 % between 3 and 6 months, in 11 % between 6 and 9 months and for the remaining 23 % between 9 and 12 months of clinical follow up.

Dynamics of peripheral $CD4^+$ T helper cell subsets in patients with CD in remission

We firstly investigated the frequency and numbers of Th1, Th17 and Treg cell subsets in peripheral blood of patients with CD with regard to the occurrence of a clinical relapse. We compared the prevalence of each $CD4^+$ T cell subsets at the time of relapse and 3 months prior the occurrence of relapse to that in patients who stay in remission all over the study period.

At the time of relapse, whereas the circulating Th1 T cell subsets, as defined as IFNγ producing $CD4^+$ T cells, were found in similar proportion (respectively, 11.6 % ± 1.4 *versus* 12.8 % ± 1.1 among total $CD4^+$) between relapsers and non-relapser CD patients, the circulating IL-17-producing $CD4^+$ Th17 cells tended toward to be higher in CD patients who experienced a clinical relapse when compared with those who stay in clinical remission (1.7 ± 0.2 % *versus* 1.4 ± 0.15 %, respectively). In addition, the frequency and absolute number of circulating $CD4^+$ $Foxp3^+$ Treg tended to be higher in relapsers (8.1 ±0.5 % *versus* 7.5 ± 0.3 % and 79.3 ±9.0 /mm^3 *versus* 66.8 ± 8.0/mm^3, respectively). Among the $CD4^+$ T cells, at the time of clinical relapse, the mean fluorescence intensity (MFI) for the transcription factor Foxp3 tended to be increased in patients who relapse compared with that in patients who stay in remission (4718 ± 568 and 4177± 295, respectively). In contrast, the MFI of IL17 and IFNγ among the whole $CD4^+$ T cells tended to be lower in case of clinical relapse (7275 ±788 compared with 9092 ± 515 in remission for IL-17 and 23175 ±1259 and 26264 ± 990, respectively for IFNγ).

The comparisons of the absolute numbers of circulating Th1, Th17, and Tregs at the time of relapse as well as 3 months prior the occurrence of relapse between patients who relapsed during the follow up period and those who stayed in remission are represented in Figure 2.

When comparing the frequencies and number of circulating Th1, Th17 and Tregs subsets 3 months prior relapse in relapsers and 3 months prior the end of the study in remitted patients, we failed to detect any significant difference in the balance between CD patients who will relapse or not. The proportion of each subset is represented in Figure 2. The dynamics of the frequencies of Th1, Th17 and Tregs within the one year follow-up are relatively stable all over the time in CD patients who remained in clinical remission (Figure 3).

Double positive $CD4^+$ T cell subsets with double polarization Th1/Treg, Th17/Treg, and Th1/Th17 are detected in blood from patients with CD in remission and in case of disease relapse

Next, we investigated whether circulating double positive $CD4^+$ T cells subsets co-expressing IFNγ and Foxp3, IL-17 and Foxp3 or IFNγ and IL-17 were detectable in patients with CD in remission and also whether the proportion of these subsets were significantly changed in case of clinical relapse (Figure 4). Interestingly, although their mean frequencies among the whole circulating $CD4^+$ T cells are relatively weak, each of these circulating double positive Th1/Treg, Th17/Treg and Th1/Th17 $CD4^+$ T cell subsets was detectable in CD patients in remission (1.04 ± 0.15 %, 0.17±0.01 % and 0.23 ± 0.03 %, respectively). In patients who relapsed, the mean frequencies of these latter circulating $CD4^+$ T cell subsets were 0.94 ±0.12 %, 0.19 ±0.04 % and 0.18±0.02 %, respectively for Th1/Treg, Th17/Treg and Th1/Th17. In addition, $CD4^+$ T cell subsets co-expressing $Foxp3^+$ and IFNγ plus IL-17 were detected in blood of CD patients in remission and also in those who relapsed (mean frequency 0.47 ± 0.05 % and 0.58± 0.08 %, respectively).

Enrichment of circulating double positive IL-17 producing $Foxp3^+$ T cell subsets could identify CD patients in remission at high risk of further clinical relapse

Interestingly, a 2-fold increase of the absolute number of circulating double positive IL-17 producing $Foxp3^+$ $CD4^+$ T cells was observed 3 months prior the occurrence of a clinical relapse in relapser CD patients (with a mean of 2.0 ± 0.39 cells /mm^3) when compared with that in patients who stay in clinical remission (0.97 ± 0.16 cells /mm^3; $p<0.05$) (Figure 4B). At the time of relapse, the absolute number of these subsets was similar in both patients who relapsed or not (1.31 ± 0.20 cells/mm^3 versus 1.44 ± 0.16 cells/mm^3) (Figure 4C).

Immunomonitoring of a wide panel of serum cytokines in patients with CD in remission

We have further monitored the circulating levels of a wide panel of cytokines using an ultrasensitive method allowing detection of cytokines as low as the femtogram / mL levels, a 100 to 1000 fold improvement in sensitivity over the existing approaches. When comparing the levels of cytokines at the time of relapse for relapser patients with those from patients who stay in remission, we found that the levels of proinflammatory cytokines, including IL-6, IL-17 and IL-8 tended to be higher in case of clinical relapse (respectively 2.2±0.38 pg/mL vs 0.86±0.11 pg/mL for IL-6;p=0.6; 0.80±0.17 pg/mL vs 0.60±0.16 pg/mL for IL-17; p=0.8 and 7.9±1.11 pg/mL vs 6.8±1.0 pg/mL for IL-8; p=0.7). The concentrations of serum TNFα did not differ between relapsing patients and those in remission (3.7 ±0.42 pg/mL vs 3.8±0.48 pg/mL, respectively). The distribution of each serum cytokine within the year of follow up in CD patients in remission is represented in Figure 5.

Multivariate model of predictors of CD relapse

The Figure 6 presents the results of the multivariate analysis model. A statistical significant association was detected between usCRP levels and the risk of further relapse (OR= 3.37; IC 95% = 1.54-7.36; p=0.002). Another significant predictor of relapse was the number of $CD4^+$ double positive $Foxp3^+IL\text{-}17^+$ in peripheral blood. A high number of circulating double positive $Foxp3^+IL\text{-}17^+$ $CD4^+$ T cells was associated with a higher risk of relapse (OR = 2.89; IC95% = 1.24-6.77; p=0.01). A low IL-10 concentration less than 1.34 pg/mL tended to be associated with a higher risk of clinical relapse in the 3 following months (OR=2.57 IC 95% [0.95-6.96]; p=0.06). Among the other serum cytokine that were assessed in the multivariate model, none of them were associated with the risk of disease clinical relapse.

DISCUSSION

In the present work, we have systematically investigated a wide panel of circulating T cell subsets, including most of the $CD4^+$ T cells known to be involved in CD pathogenesis (Th1, Th17 and Treg) and also double expressing IL-17-IFNγ, IL-17-Foxp3 and IFNγ-Foxp3 $CD4^+$ T cell subsets in a large cohort of CD in remission. We completed the analysis of circulating T cell subsets with the measurement of most of the serum cytokine levels, using an ultrasensitive tool capable to detect very low concentrations of the proteome when compared with common assays (ELISA or Luminex). Our findings result from the analysis of a prospective and well clinically characterized cohort of patients with CD in clinical remission (e.g. the "Femtokine" cohort) followed in 3 IBD referral tertiary centers and altogether, these factors represents the major strength of the present study. Moreover, we defined the relapses of CD flares according to the widely used in clinical practice Harvey Bradshaw index repeated within the 7 following days but clinical relapse was systematically confirmed by abnormalities detected in objective radiologic and endoscopic tools, including bowel ultrasonography or ileocolonoscopy, and that to avoid considering CD relapsers as patients with irritable bowel syndrome-related symptoms.

In this study, besides identification of detectable peripheral double positive T cell subsets co expressing IL-17 and IFNγ, we have detected weak but present circulating $CD4^+$ T cells co-expressing the factor of transcription Foxp3 that is critical for the differentiation and function of Tregs and either the proinflammatory cytokines IFNγ or IL-17 featuring the Th1 and Th17 cell lineage, respectively in patients with CD. We report that a significantly higher number of circulating double positive IL-17 producing $Foxp3^+$ $CD4^+$ T cells precedes the occurrence of a clinical relapse in CD within 3 months in patients in sustained clinical remission. These findings could suggest that this T cell subset could be involved in the early steps of the pathogenesis of CD and could drive mucosal inflammation due to a Treg defect. Double positive T helper cells (Th1 and Th17) producing both IFNγ and IL-17 have been previously detected in mouse and humans, in peripheral and mucosal compartment [10].. The origin of these former T cell subsets remains unknown in humans, however these subsets illustrates the concept of T cell plasticity between Tregs and Th1 in one hand and Tregs and Th17 in the other hand. One can speculate that in a specific microenvironment, Foxp3 expressing Tregs could become capable to produce proinflammatory cytokines, and by this way, lose, at least in part, their intrinsic suppressive and immunomodulatory functions. However, we cannot exclude that Th17 cells could become able in specific conditions to acquire the expression of Foxp3. Our findings illustrate the Treg cell plasticity and extend previous data from Ueno, et al. showing that CD patients had

increased prevalence of circulating IL-17 secreting Foxp3 expressing $CD4^+$ T cells when compared with healthy control subjects. Interestingly, they found that the higher prevalence of this double positive Th17-Treg subsets in blood of CD coincide with defective suppressive function of Foxp3 $CD4^+$ Tregs supporting a possible conversion from Tregs into Th17 cells.

We used for detection and monitoring the levels of a wide panel of circulating cytokines involved in the pathophysiology of IBD the SINGULEX Erenna platform is able to detect proteins as low as the femtogram / mL levels, a 1000 fold improvement in sensitivity over all existing approaches. This digital ELISA approach uses a well-established assay reagent format coupled with the Erenna instrument that employs single photon digital capture of the assay signal to achieve the ultra-sensitive levels of detection of proteins. We have chosen this method to be able to monitor very low levels (undetectable using standard methods) of various circulating cytokines in our cohort of patients with CD in clinical remission. In our best knowledges, it is the first study that used this ultrasensitive method to monitor cytokine levels in the field of IBD.

Treg cells were shown to coexpress IL-17 and to be able to modulate their suppressive functions when they are exposed to environmental factors. Treg and Th17 cells derived from the same cell lineage and their differentiation is dependent on the presence of the canonical immunomodulatory cytokine TGFβ in the microenvironment, especially in the intestine. We failed to detect any relationship between the levels of serum TGFβ and the frequencies and numbers of circulating Treg cells and Th17 $CD4^+$ T cell subsets, including the double positive IL-17 producing Foxp3 $CD4^+$ T cells. Interestingly, very low levels of IL-10 detected in the serum by an ultrasensitive Erenna-based technology was found as an independent factor associated with more clinical relapse in CD.

However, we acknowledge that the conclusions done in the circulating compartment do not systematically mirror the observation in the mucosal sites. We can speculate that the temporal relationship between higher number of circulating IL-17 producing $Foxp3^+$ $CD4^+$ T cell subset and the occurrence of a CD clinical relapse within 3 months might reflect the pathogenicity of this subset that might derived either from Th17 $CD4^+$ T cells having acquired the transcription factor Foxp3 or from Foxp3 $CD4^+$ T cells having acquire an effector function with IL-17 production. We also acknowledge that the suppressive function of the double positive T cell subset has not been specifically studied and that the presence of these double positive $CD4^+$ T cell subsets has not been investigated in the intestinal compartment.

In conclusion, these findings are of great importance for the understanding of the pathogenesis of CD and suggest that despite their weak number and frequencies in peripheral blood, when compared with other more classical $CD4^+$ T helper cells, IL-17 producing $Foxp3^+$ $CD4^+$ T cell subsets could exert a critical role in the relapse of CD and subsequently these subsets could become a therapeutic target in CD.

Table 1: Demographic and baseline disease characteristics of the cohort of CD patients

Characteristics	**CD patients** (n = 113)
Age, yrs	34.3 ± 12.4
Male gender, no (%)	55 (48%)
BMI, kg/m²	20.9 ± 4.5
Smoking habits, no (%)	
Past smoker	34 (30 %)
Active smoker	28 (24 %)
Duration of disease, yrs	8.1 ± 4.2
Disease location, no (%)	
Ileal	23 (20 %)
Colonic	12 (10 %)
Ileocolonic	78 (69 %)
Disease phenotype, no (%)	
Non structuring – Non penetrating	35 (31 %)
Stricturing	41 (36 %)
Penetrating	37 (32 %)
Perianal disease, no (%)	51 (45%)

Legends to figures

Figure 1: Flow chart of the cohort of CD patients

Figure 2: Comparison of the frequencies of total cells among $CD3^+$ T cells (A, C) and absolute number of cells (X 10^6 cells/L) (B, D) of Th1 (IFNg expressing $CD4^+$ T cells), Th17 (IL-17 expressing $CD4^+$ T cells) and Tregs ($Foxp3^+$ expressing $CD4^+$ T cells) between patients who experienced a clinical relapse (shaded) and those who stay in remission (white) (A and B) and between patients in remission who further experienced a relapse during the 3 following months (squared) and those who stay in remission all over the time of the follow-up (white) (C and D). The box plots show median, upper, and lower quartiles of the data; the whiskers indicate the 95% confidence interval (CI) of the values.

Figure 3: Time course within the one year follow-up of the frequencies of the circulating IFNγ producing $CD4^+$ T cells (A), of the IL-17 producing $CD4^+$ T cells (B) and of the $Foxp3^+$ expressing $CD4^+$ T cells (C) in patients who stay in clinical remission all over the period of follow-up (left panel, white) and in patients who experienced a relapse within the year of monitoring (right panel, shaded). The box plots show median, upper, and lower quartiles of the data; the whiskers indicate the 95% confidence interval (CI) of the values.

Figure 4: (A) Representating dot plot analysis of circulating double positive Foxp3 and IFNγ $CD4^+$ T cell subsets (left), Foxp3 and IL-17 $CD4^+$ T cell subsets (middle) and double expressing IL-17 and IFNγ $CD4^+$ T cell subsets (right panel). (B) Comparison of absolute number (B) and the frequencies (C) of the double positive Th1/Foxp3, Th17/Foxp3 and Th1/Th17 $CD4^+$ T cell subsets between CD patients who stay in remission all over the follow up (white) and those who were in remission at the time of the measurement but who experience a clinical relapse during the 3 following months (squared). The box plots show median, upper, and lower quartiles of the data; the whiskers indicate the 95% confidence interval (CI) of the values.

Figure 5: Time-course of the serum levels of various cytokines measured within the follow-up period in CD patients in remission. The box plots show median, upper, and lower quartiles of the data; the whiskers indicate the 95% confidence interval (CI) of the values.

Figure 6: Results of the multivariate analysis model.

Figure 1

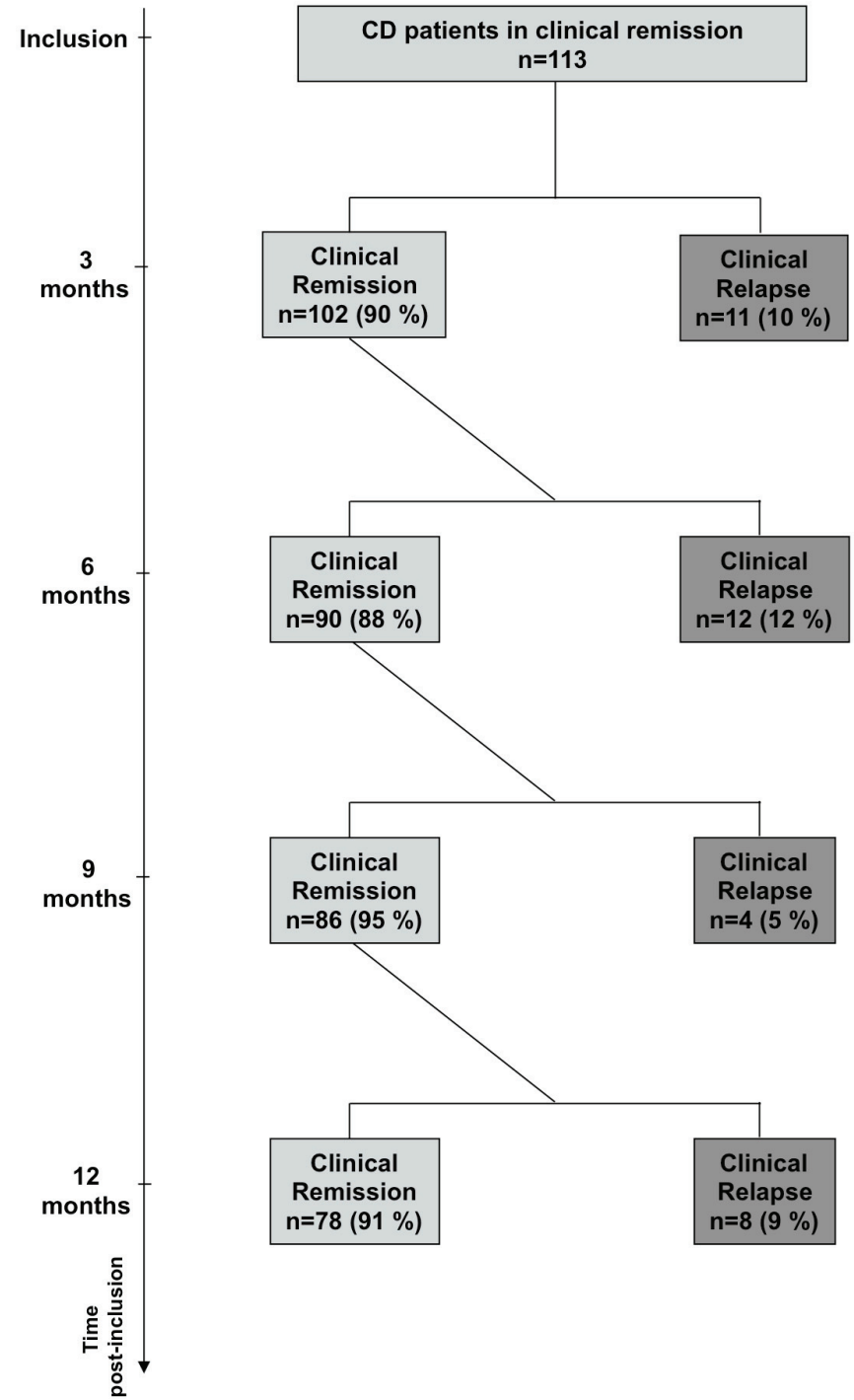

Inclusion
CD patients in clinical remission
n=113
3
months
Clinical
Remission
n=102 (90 %)
Clinical
Relapse
n=11 (10 %)
6
months
Clinical
Remission
n=90 (88 %)
Clinical
Relapse
n=12 (12 %)
9
months
Clinical
Remission
n=86 (95 %)
Clinical
Relapse
n=4 (5 %)
12
months
Clinical
Remission
n=78 (91 %)
Clinical
Relapse
n=8 (9 %)
Time
post-inclusion

Figure 2

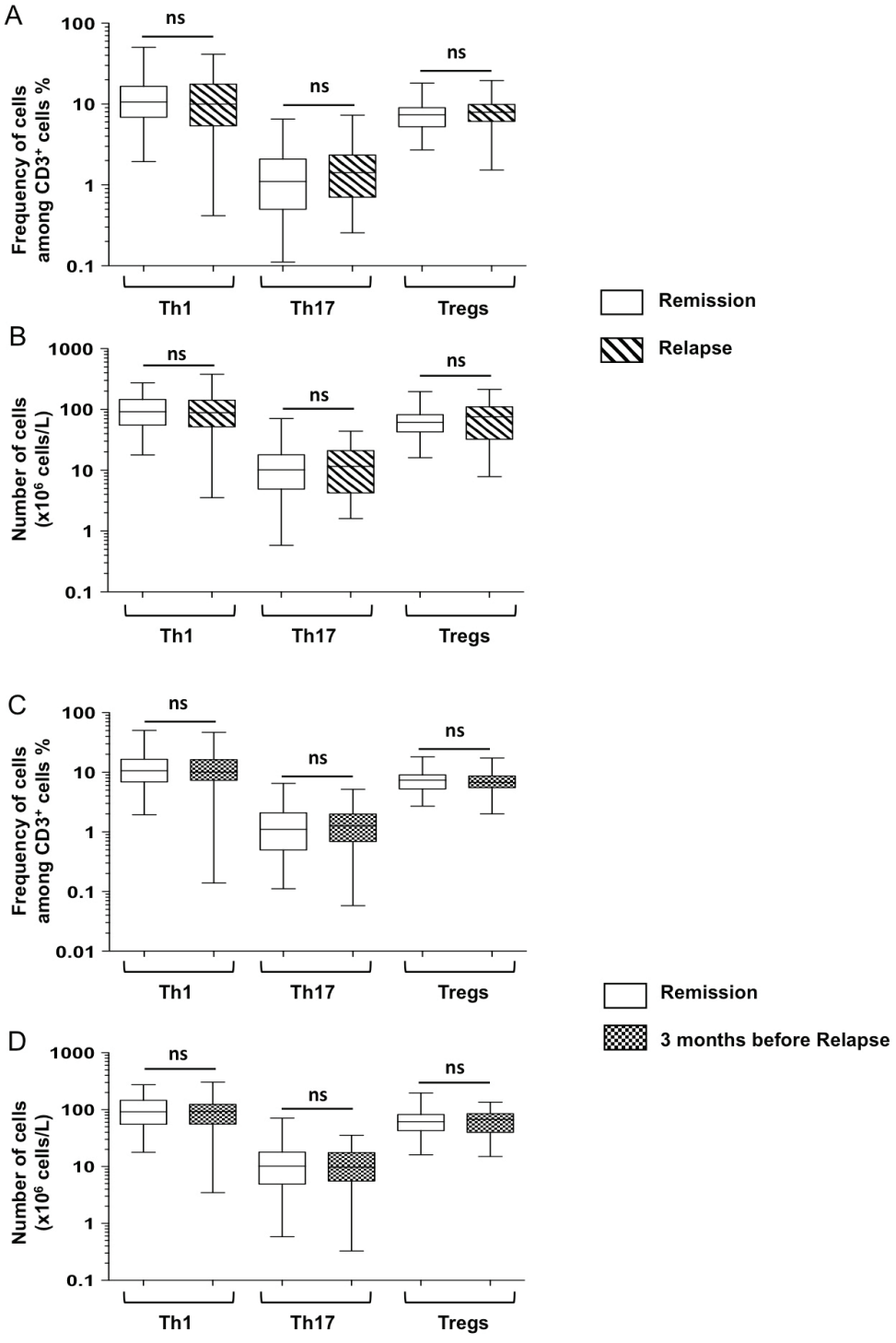

A
Frequency of cells among CD3+ cells %
100
10
1
0.1
ns
ns
ns
Th1
Th17
Tregs
B
Number of cells (x10⁶ cells/L)
1000
100
10
1
0.1
ns
ns
ns
Th1
Th17
Tregs
Remission
Relapse
C
Frequency of cells among CD3+ cells %
100
10
1
0.1
0.01
ns
ns
ns
Th1
Th17
Tregs
D
Number of cells (x10⁶ cells/L)
1000
100
10
1
0.1
ns
ns
ns
Th1
Th17
Tregs
Remission
3 months before Relapse

Figure 3

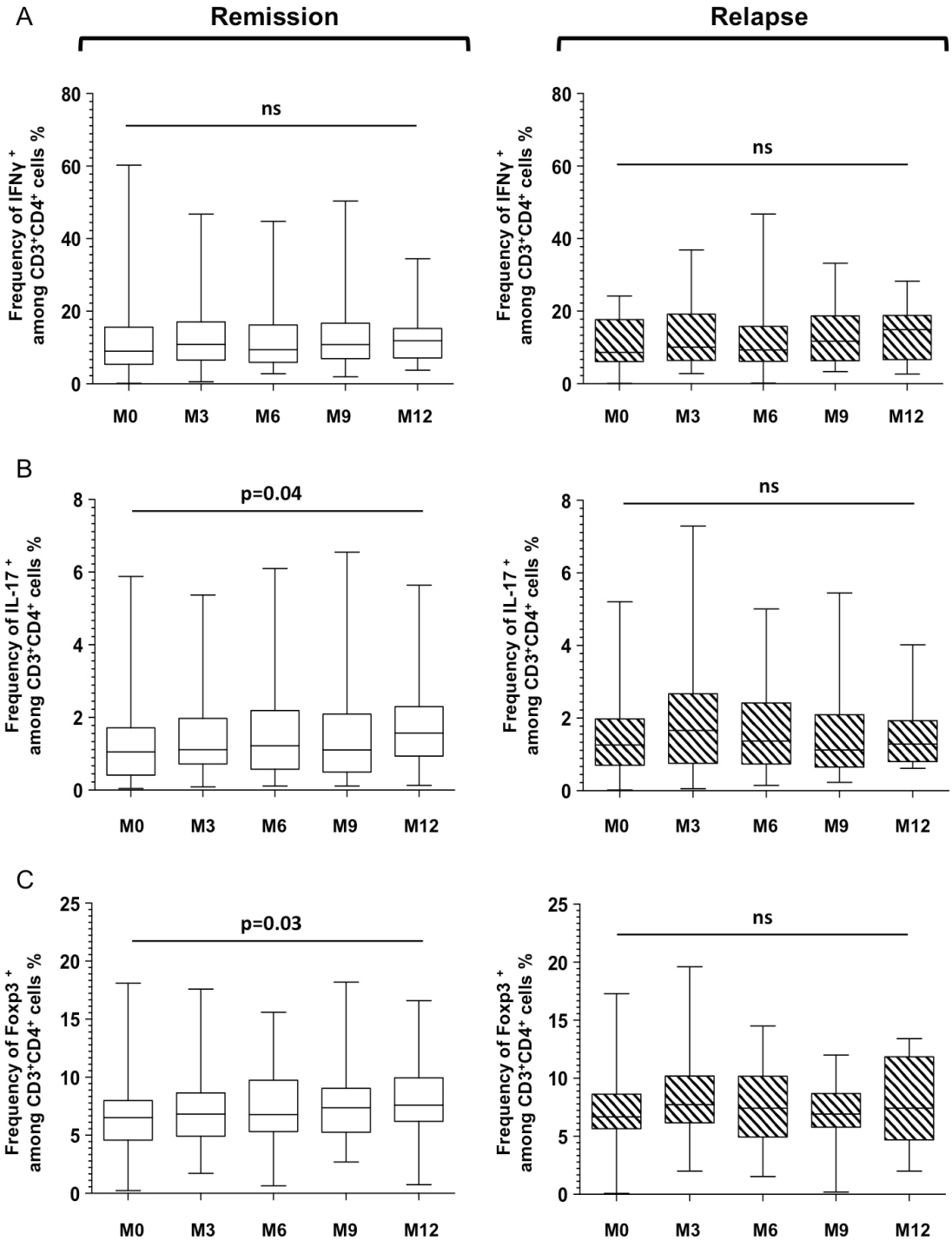
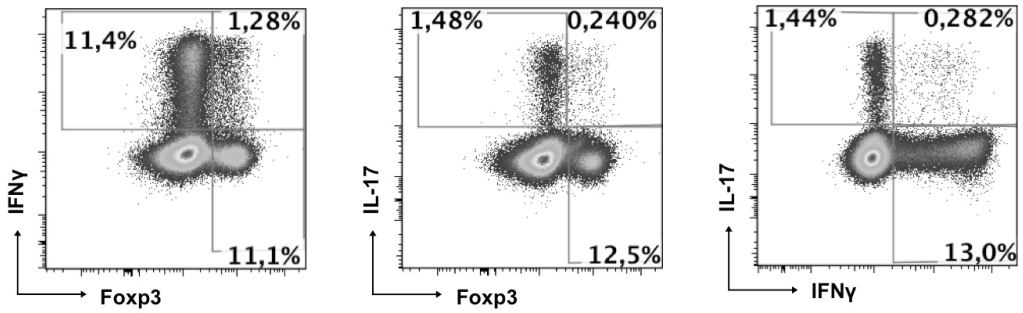
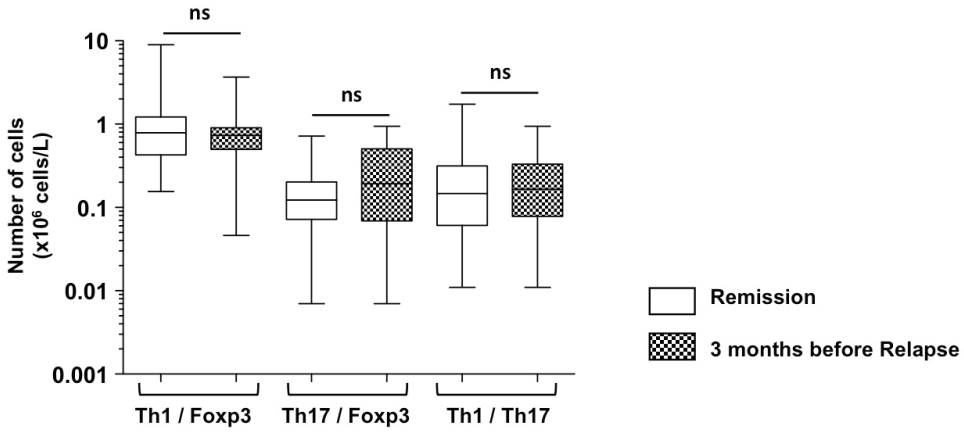

A
Remission
Relapse
Frequency of IFNγ+ among CD3+CD4+ cells %
ns
ns
B
Frequency of IL-17+ among CD3+CD4+ cells %
p=0.04
ns
C
Frequency of Foxp3+ among CD3+CD4+ cells %
p=0.03
ns
M0
M3
M6
M9
M12

Figure 4

A


11,4%
1,28%
11,1%
IFNγ
Foxp3
1,48%
0,240%
12,5%
IL-17
Foxp3
1,44%
0,282%
13,0%
IL-17
IFNγ

B


ns
ns
ns
10
1
0.1
0.01
0.001
Number of cells (x10⁶ cells/L)
Th1 / Foxp3
Th17 / Foxp3
Th1 / Th17
Remission
3 months before Relapse

C

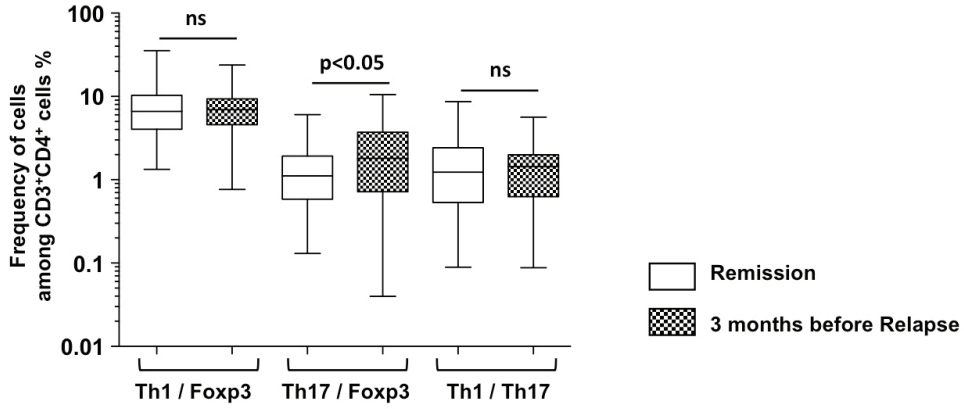

ns
p<0.05
ns
100
10
1
0.1
0.01
Frequency of cells among CD3⁺CD4⁺ cells %
Th1 / Foxp3
Th17 / Foxp3
Th1 / Th17
Remission
3 months before Relapse

Figure 5

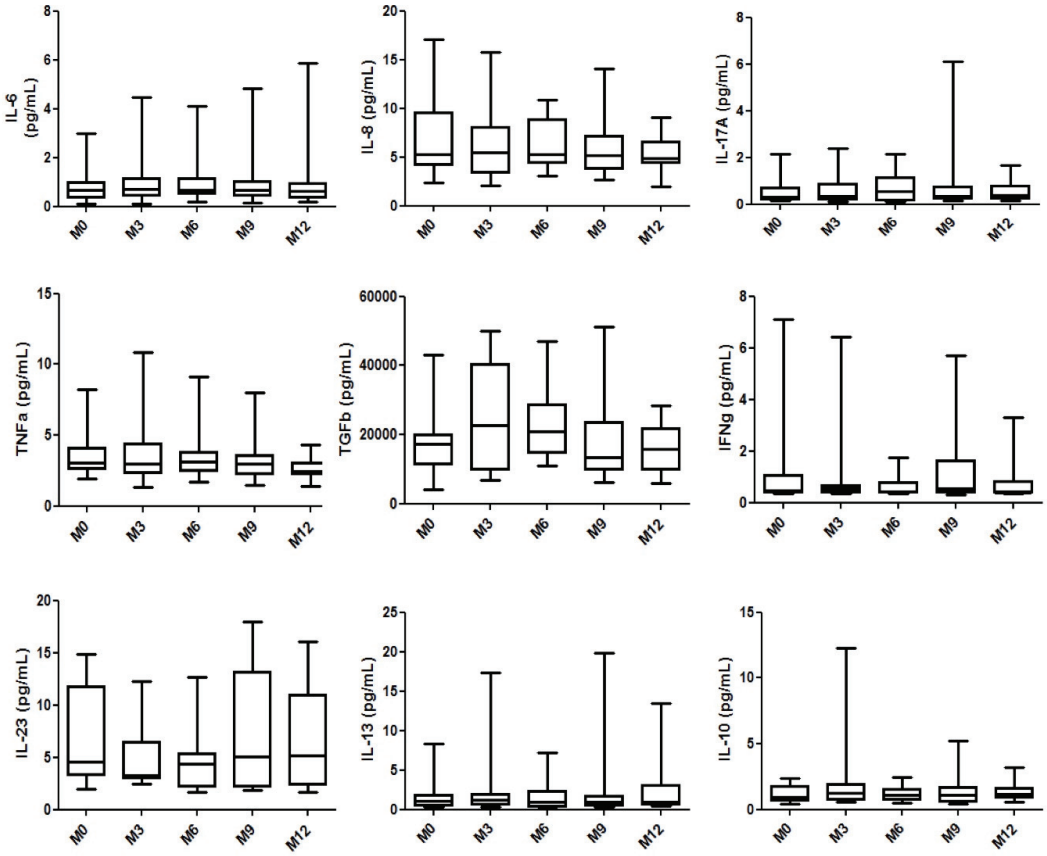

IL-6 (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
IL-17A (pg/mL)
TNFa (pg/mL)
TGFb (pg/mL)
IFNg (pg/mL)
IL-23 (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
M0
M3
M6
M9
M12

Figure 6

Parameters	OR [IC 95%] p < 0.10
IL-6 (pg/ml) < 0.54	2.02 [0.75 ; 5.48] p = 0.165
IL-8 (pg/ml) < 4.64	0.62 [0.24 ; 1.60] p = 0.320
IL-13 (pg/ml) < 1.57	0.69 [0.26 ; 1.84] p = 0.458
IL-17A (pg/ml) <0.28	0.60 [0.22 ; 1.65] p = 0.323
TGFβ (pg/ml) < 18652	1.51 [0.58 ; 3.89] p = 0.396
IL-10 (pg/ml) < 1.34	2.57 [0.95 ; 6.96] p = 0.063
CRP < 3,44	3.37 [1.54 ; 7.36] p = 0.002
$CD4^+Foxp3^+IL17^+$ < 1,40 (num)	2.89 [1.24 ; 6.77] p = 0.014

REFERENCES

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007;448:427-34.
2. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. J Exp Med. 1994;179:589-600.
3. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986;136:2348-57.
4. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. J Exp Med. 2006;203:2473-83.
5. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. Immunol Res. 2008;41:87-102.
6. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med. 2004;10:801-5.
7. Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. J Immunol 2008;180:7112-6.
8. Ueno A, Jijon H, Chan R, et al. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. Inflamm Bowel Dis 2013; 19 : 2522-34
9. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140:957-65.
10. Globig AM, Hennecke N, Martin B, Seidl M, et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFNg+IL-17+ coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2014; 20 : 2321-29.

DISCUSSION

1. Le traitement par anticorps anti-TNFα s'accompagne d'une augmentation de la fréquence et de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs Foxp3^{+} circulant au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

1.1. Un défaut de fréquence et de fonction des Treg comme élément physiopathologique des MICI ?

Dans ce premier travail, nous nous sommes intéressés, chez des patients souffrant d'une MC ou d'une RCH en poussée, à la proportion des principaux Treg circulants caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (les plus étudiés). Nous avons montré, en cytométrie en flux, qu'une fréquence significativement diminuée des Treg chez les patients porteurs d'une MICI en poussée était observée comparativement à la celle des sujets contrôles. Cette fréquence était diminuée quels que soient le type de MICI (MC ou RCH), le marqueur utilisé pour caractériser les Treg (CD25^{high} et/ou Foxp3) ou le traitement concomitant des patients (corticoïdes, immunosuppresseurs…). Ces données, qui concernent le compartiment circulant des Treg, confirment les observations d'autres équipes (Maul et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Saruta et al., 2007) rapportant également une corrélation inverse entre la fréquence de Treg circulants et l'activité de la MICI. Une étude récente de l'équipe de Louvain rapporte un déficit numérique du compartiment régulateur plus global affectant différentes populations de Treg ; notamment parmi les Treg exprimant Foxp3, les populations activées ou non et parmi les Treg Foxp3^{-}, les Tregs Tr1 producteurs d'interleukine-10 (Li et al., 2015). L'ensemble de ces données sont en faveur du rôle d'un déficit en nombre des Treg expliquant au moins en partie l'échec de ceux-ci à contrôler l'inflammation. Toutefois, une limite majeure de notre travail est l'absence d'analyse en parallèle du compartiment muqueux intestinal. Plusieurs équipes ont ainsi suggéré que le défaut de Treg circulants serait le « miroir » d'une augmentation de fréquence des Treg au sein de la *lamina propria* intestinale et des ganglions mésentériques (Makita et al. 2004; Maul et al., 2005; Holmen et al., 2006). Ainsi, la diminution de fréquence des Treg sanguins résulterait, non pas d'une diminution du « pool » total de Treg, mais serait secondaire au recrutement des Treg au sein de la muqueuse

inflammatoire. Ces constatations ne remettent pas en cause le fait que la diminution des Treg circulants soit un marqueur d'activité des MICI mais incitent à la prudence vis-à-vis de la notion de défaut « numérique » des Treg comme principal élément contributif dans la physiopathologie des MICI. L'augmentation de fréquence des Treg muqueux semble toutefois relativement faible par rapport à l'infiltrat inflammatoire global mais également plus faible qu'en situation pathologique infectieuse aiguë (diverticulite, colite infectieuse…) (Rieger et al., 2006). Ce concept introduit la notion de déficit « relatif » des Treg muqueux, prenant en compte l'équilibre entre les Treg et les Teff dans les différents compartiments pour le maintien de l'homéostasie, mais ce concept reste à ce jour insuffisamment étayée.

La distinction chez l'homme entre les nTreg et les iTreg reste très difficile, principalement en raison de l'absence de marqueurs spécifiques permettant de différencier d'une manière fiable ces 2 sous-populations. Comme nous l'avons exposé précédemment, les iTreg sont classiquement retrouvés au niveau du site d'induction intestinale (Mayne et al., 2013). Ainsi, dans notre étude, la plupart des Treg circulants analysés correspondaient vraisemblablement à des nTreg (exprimant fortement Foxp3 et détectés dans le sang) ; néanmoins, il n'est pas possible de distinguer la part relative de nTreg *vs* iTreg et l'impact potentiellement différent de l'inflammation sur les différentes sous-populations de Treg. On ne peut donc exclure que la fréquence de nTreg soit diminuée, aussi bien dans le sang que dans la muqueuse, mais partiellement compensée par une augmentation de la fréquence d'iTreg.

Au-delà d'un défaut de nombre et/ou de fréquence des Treg, l'analyse de la fonctionnalité des Treg est cruciale au cours des maladies inflammatoires. Une fonction altérée *ex vivo* des Treg a été mise en évidence au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR) incitant à rechercher un déficit fonctionnel des Treg au cours des MICI (Ehrenstein et al., 2004). Dans notre étude, les Treg ($CD4^+CD25^+CD127^-$) circulants, issus de patients en poussée de MICI et isolés par sélection magnétique conservent une capacité à contrôler *in vitro* la prolifération de Teff allogéniques. Nous n'avons toutefois pas comparé de manière directe la fonctionnalité des Treg issus de patients en poussée de MICI par rapport à ceux issus des contrôles. La persistance d'une fonctionnalité suppressive des Treg au cours des MICI a été mise en évidence par d'autres équipes (Maul et al., 2005; Yu et al., 2007) aussi bien au cours de la MC que dans la RCH. L'absence de déficit fonctionnel des Treg au cours des MICI contrastent avec les constatations au cours de la PR et posent plusieurs questions, notamment la capacité des tests *in vitro* à se rapprocher des conditions de fonctionnement des Treg dans le microenvironnement intestinal. Ainsi, la complexité de l'environnement cytokinique au sein de la *lamina propria* intestinale rend difficile l'interprétation d'une fonction suppressive analysée *in vitro* par culture cellulaire après une stimulation polyclonale intense. Alors que de nombreuses études ont auparavant

échoué à montrer l'existence d'un déficit de fonction suppressive des Treg au cours des MICI, Ueno et al. ont récemment rapporté une diminution de la fonctionnalité des Treg circulants chez les patients par rapport aux témoins sains (Ueno et al., 2013). Cette étude vient donc appuyer le concept d'impact négatif de l'environnement inflammatoire sur la fonctionnalité des Treg.

1.2. Les Treg sont-ils des cibles du traitement par anticorps anti-TNFα ?

Les traitements par anticorps anti-TNFα constituent des traitements majeurs des maladies inflammatoires de l'intestin. Le ou les mécanismes d'action des biothérapies anti-TNFα ne sont, à ce jour, pas complètement élucidés et vont bien au-delà d'une neutralisation du TNFα soluble et/ou membranaire pour expliquer leur efficacité. Le rôle des biothérapies anti-TNF sur l'induction d'une apoptose des lymphocytes T a été rapporté (Atreya et al., 2011). Or, des données montrent que les Treg sont relativement plus résistants à l'apoptose comparé aux Teff. Ces données nous ont conduits à poser l'hypothèse que les biothérapies anti-TNF pouvaient contribuer à restaurer l'équilibre entre les populations effectrices et régulatrices.
Dans notre travail, le traitement par infliximab ou adalimumab a été suivi d'une augmentation significative de la fréquence et du nombre absolu de Treg circulants, mais également d'une potentialisation de la fonction suppressive des Treg par rapport à la situation pré-thérapeutique. Bien que cet effet « bénéfique » des anticorps anti-TNFα sur les Treg ait déjà été mis en évidence au cours de la PR (Ehrenstein et al., 2004), les données concernant les MICI n'étaient pas disponibles. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation claire entre la proportion de Treg circulants et la réponse clinique au traitement et ne pouvons donc pas exclure que l'effet observé sur la fréquence des Treg soit secondaire à la réduction de l'inflammation plutôt qu'un effet direct des anti-TNFα. Néanmoins, Li Z, et al ont récemment pu montrer une corrélation entre l'augmentation de la fréquence des Treg (incluant les Treg Foxp3 et les Foxp3$^-$ Tr1) sous anti-TNF et la réponse clinique et biologique au traitement. De plus, la proportion de Treg circulants était inversement corrélée à la concentration de la CRP et positivement associée aux taux résiduels d'infliximab mesurés en fin d'induction (Li Z, et al., 2015). Enfin, ces auteurs montraient que la fréquence des Treg circulants, au moment de l'induction d'une biothérapie, pouvait constituer un marqueur prédictif de réponse au traitement (évaluée entre 3 et 6 mois post-induction) permettant de distinguer les répondeurs des non-répondeurs avec une performance évaluée par l'aire sous la courbe ROC de 0.82 (Li Z et al., 2015). D'autres éléments sont en faveur d'un effet spécifique des anticorps anti-TNFα sur les Treg. Tout d'abord, l'ensemble des effets observés en terme de fréquence et de

fonctionnalité ont pu être mis en évidence très précocement dès la première injection de traitement. D'autre part, l'effet des anti-TNFα sur la fréquence et le nombre des Treg ne s'accompagnait pas de modification de fréquence des autres populations de LT $CD4^+$ en particulier $CD4^+CD25^-$ et $CD4^+CD25^+Foxp3^-$. La résistance relative à l'apoptose des Treg induite par les anti-TNFα pourraient constituer un des mécanismes par lequel les anti-TNFα induisent une augmentation relative du nombre de Treg. Des observations en ce sens ont aussi été rapportées au cours de la polyarthrite rhumatoïde (Toubi et al., 2005) mais également plus récemment au cours des MICI (Veltkamp et al., 2011).

L'impact des anti-TNFα sur la fonction suppressive des Treg est aussi un point critique de notre travail. Cette potentialisation de la fonction suppressive *ex vivo* est étayée par une augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de Foxp3 par les Treg après traitement. En effet, la fonctionnalité des Treg est fortement corrélée au niveau d'expression de Foxp3 (Fontenot et al., 2003). De manière similaire, l'observation de la diminution d'expression de CD62-L (L-selectine) et de l'augmentation d'expression d'ICOS sont aussi des arguments en faveur d'une potentialisation de la fonction suppressive des Treg après traitement par anti-TNFα (Nadkani et al., 2007; Ito et al., 2008; Strauss et al., 2008).

La neutralisation directe du TNFα est probablement un des mécanismes par lesquels les anti-TNFα agissent sur la fonction suppressive des Treg. Les effets du TNFα sur les LT sont médiés par 2 récepteurs membranaires spécifiques, les $TNFR_I$ (55kDa) et $TNFR_{II}$ (75kDa) dont la partie extracellulaire peut être clivée par une métalloprotéase libérant ainsi les formes solubles de ces récepteurs ($sTNFR_I$ et $sTNFR_{Ii}$, respectivement) qui peuvent neutraliser le TNFα soluble. Nous avons étudié les niveaux d'expression de ces récepteurs à la surface des Treg à l'état basal, après stimulation *in vitro* mais aussi la fonction suppressive des Treg après exposition *in vitro* à différentes concentrations de TNFα (non cytotoxiques). Nous avons observé que les Treg circulants expriment à leur surface des niveaux élevés de $TNFR_{II}$ qui peuvent être clivés dans le sérum sous forme soluble ($sTNFR_{II}$) neutralisante pour le TNFα **(Figure 24)**.

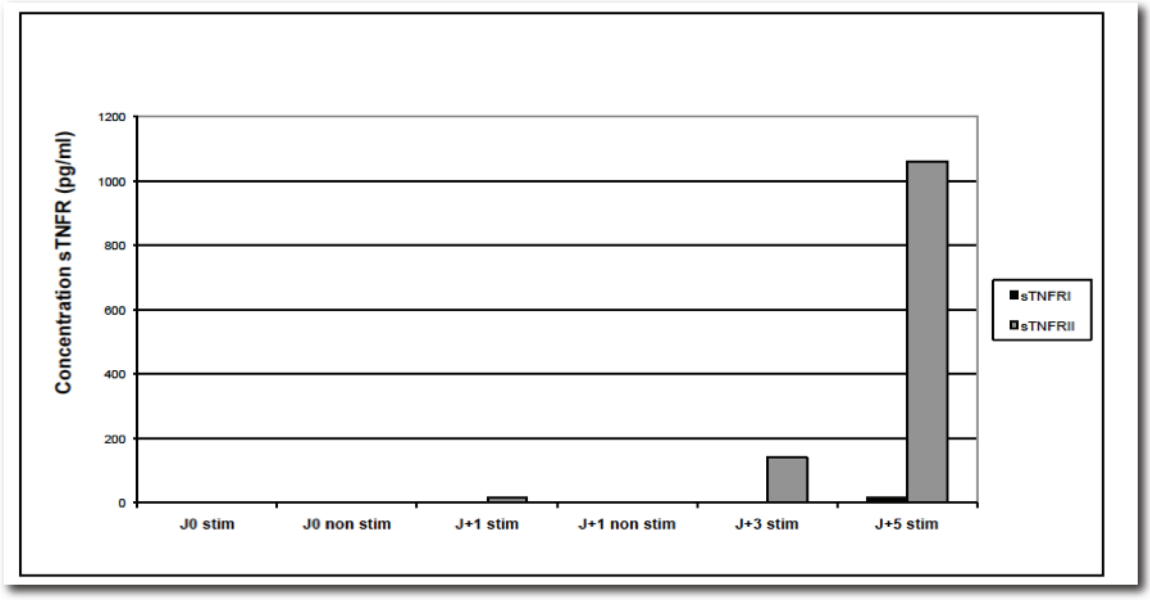


Figure 24 : Concentrations de $sTNFR_I$ et $sTNFR_{II}$ mesurées par ELISA dans le milieu de culture de Treg purifiés à partir du sang de donneurs sains après stimulation par αCD3 (d'après Boschetti et al. données personnelles non publiées).

De façon intéressante, l'exposition *in vitro* des Treg au TNFα module non seulement l'expression membranaire du $TNFR_{II}$ mais aussi leur fonction suppressive. Ainsi, l'environnement inflammatoire impacte la fonction suppressive des Treg.

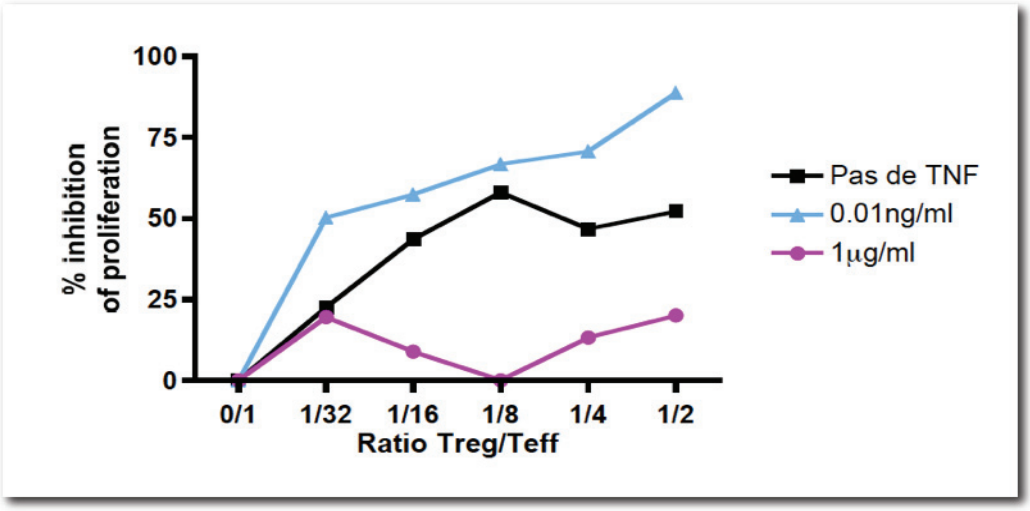


Figure 25 : Capacité suppressive *in vitro* des Treg purifiés à partir du sang de donneurs sains après culture en présence de TNF à différentes concentrations (non cytotoxiques) (d'après Boschetti et al. données personnelles non publiées).

Tandis que les Treg purifiés à partir du sang des sujets sains avaient une fonction suppressive *in vitro* accrue lorsqu'ils étaient exposés au TNFα aux faibles concentrations, leur capacité à inhiber la prolifération des Teff se réduisait après exposition à des concentrations plus élevées

de TNFα (52%, 90% et 20% d'inhibition de la prolifération par les Treg exposés, respectivement au TNFα aux concentrations de 0, 0,01 et 1000 ng/ml) **(Figure 25)**. Ces observations concordent avec les résultats d'une étude montrant la neutralisation des Treg par de hautes concentrations de TNFα (Valencia et al., 2006) alors que de plus faibles concentrations de TNFα, dans un autre travail, semblaient promouvoir la survie, l'activation et la prolifération des Treg via le $TNFR_{II}$ (Chen et al., 2007). En ce sens, une étude récente de B. Salomon et al., montre que les Teff induisent une prolifération et une augmentation de la fonction suppressive des Treg par un mécanisme nécessitant outre une stimulation antigénique, la présence d'IL-2 et de TNFα. La signalisation au niveau des Treg est d'ailleurs dans cette étude dépendante du $TNFR_{II}$ (Baeyens et al., 2015).

Pour résumer, nos résultats suggèrent que lors des poussées de MICI, l'excès de TNFα concourt à réduire l'activité suppressive des Treg conduisant à leur incapacité à contrôler l'inflammation intestinale. La neutralisation du TNFα par les anticorps anti-TNFα induit une restauration de la fonction suppressive des Treg, contribuant ainsi à rétablir l'équilibre entre Treg et Teff au sein de la muqueuse inflammatoire et permettant ainsi d'expliquer, au moins en partie, l'effet bénéfique des anti-TNFα au cours des MICI. Cette restauration du nombre et de la fonction suppressive des Treg nécessiterait non pas une neutralisation complète du TNFα mais la restauration d'un environnement cytokinique « favorable » comprenant du TNFα mais également de l'IL-2 assurant ainsi un rétrocontrôle des Treg vis-à vis des Teff.

2. L'inflammation intestinale induit une activation fonctionnelle des Treg Foxp3$^+$ mais diminue leur conversion à partir de LT CD4$^+$

2.1. Les Treg participent au contrôle de la colite induite par le DSS

Le rôle des Treg dans le contrôle de l'inflammation intestinale est très bien étayé dans les modèles murins de colites par transfert de LT chez des souris immunodéprimées (Powrie et al., 1993), mais à l'inverse, l'implication des Treg dans les colites indépendantes des LT reste très peu documentée. Le modèle de colite utilisant le dextran sodium sulfate (DSS) est utilisé très largement depuis de nombreuses années (Wirtz et al., 2007). Il s'agit d'un modèle « toxique » dans lequel le DSS entraine des lésions épithéliales avec rupture de la barrière intestinale et pénétration massive de bactéries dans la muqueuse intestinale mettant en jeu principalement les cellules de l'immunité innée (Perše et al., 2012). Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle DSS « aigu » à 3% qui entraine une colite induite chez des souris immunocompétentes après quelques jours d'exposition au DSS. Il s'agit d'un modèle classiquement indépendant des LT, comme le prouve la possibilité d'induire une colite par le DSS chez des souris CD3ε KO, dépourvues de LT (Boschetti et al., données personnelles).Les Treg participent au contrôle de l'immunité innée dans de nombreux modèles notamment infectieux (Antunes et al., 2010) mais nous disposons de très peu de données quant à l'implication des Treg au cours des colites T indépendantes.

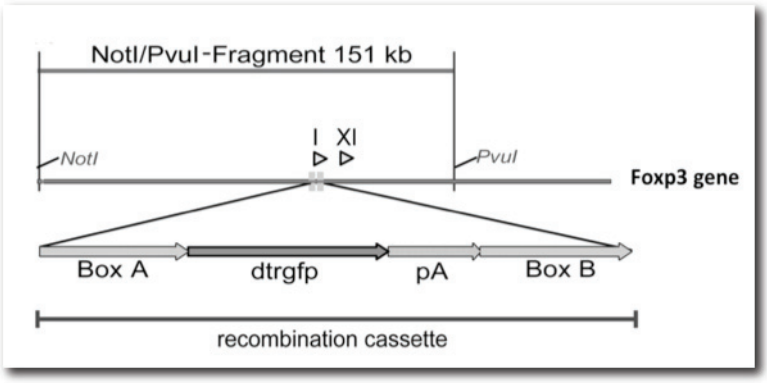


Figure 26: Cartographie du transgène de type BAC (chromosome artificiel bactérien) utilisé pour la génération des souris DEREG (d'après Lahl et al., 2007).

A notre connaissance, seuls Boehm et al. ont montré que la déplétion conditionnelle des Treg par la toxine diphtérique (DT) chez des souris présentant un récepteur de la DT en amont du promoteur du gène Foxp3, induisait une aggravation de la colite DSS (Boehm et al., 2012). Dans notre travail, nous confirmons ces données chez les souris DEREG **(Figure 26)** (Sparwasser et al., 2007) soumises au DSS et traitées par la DT avec une aggravation significative de la colite en terme de perte de poids et de sévérité des lésions intestinales (évaluées par des critères macroscopiques et histologiques). Nous montrons également que le transfert de Treg (issus de souris naïves) s'accompagne d'une amélioration significative de la colite même si celle-ci n'est pas complètement abrogée. L'intensité des lésions épithéliales induites par le DSS permet vraisemblablement d'expliquer l'effet protecteur seulement partiel des Treg. Ces derniers semblent toutefois capables d'induire une véritable réparation tissulaire dans un contexte inflammatoire. Ce phénomène est lié tout d'abord à une action indirecte des Treg par contrôle des cellules immunes effectrices, rendant ainsi l'environnement local « propice » à une régénération cellulaire (Lei et al., 2015). En plus de cette action indirecte des Treg, plusieurs travaux récents suggèrent que ceux-ci peuvent agir directement sur les cellules d'un tissu pour induire la réparation du tissu qu'elles constituent. Ainsi, des travaux concernant les tissus osseux, médullaire, rénal et pulmonaire confortent cet effet direct sur la réparation tissulaire par les Treg (Lei et al., 2015; Rothstein et al., 2015; Arpaia et al., 2015). Toutefois, les mécanismes directs qui pourraient être impliqués dans la protection et la réparation épithéliale intestinale par le biais des Treg restent à préciser.

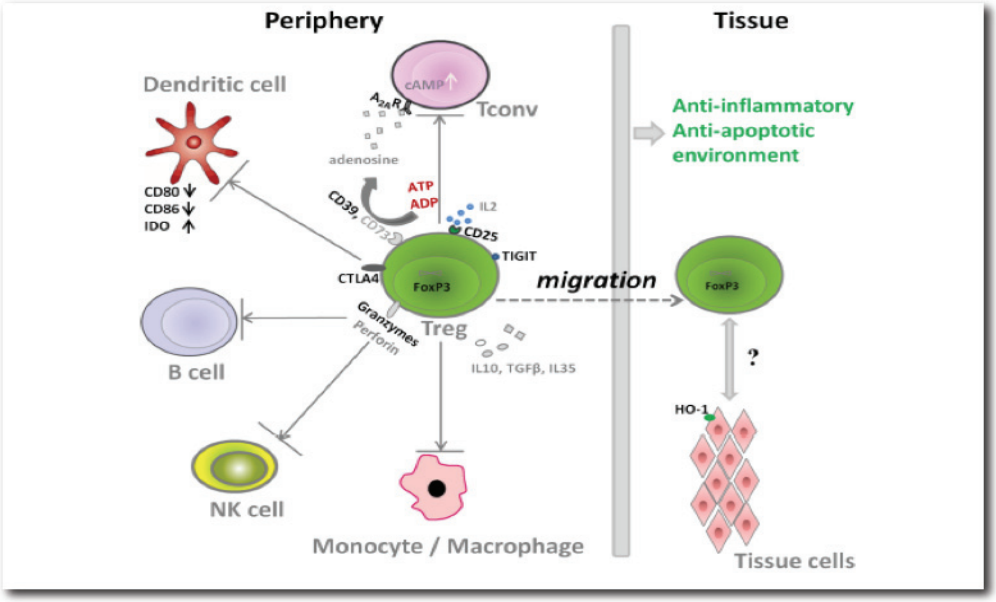


Figure 27: Représentation schématique des mécanismes indirects et directs induits par les Treg et favorables à une réparation tissulaire (d'après Lei et al., 2015).

2.2.La colite DSS entraine une prolifération locale de Treg fonctionnels

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons mis en évidence une importante augmentation du nombre de Treg au site inflammatoire (ganglions mésentériques et *LP* colique). Cette augmentation du nombre de Treg n'est pas isolée puisque, dans le même temps, la fréquence des LT $CD4^+$ est fortement diminuée au sein des ganglions mésentériques et stable dans la *lamina propria* colique. Ainsi, comme il a été décrit précédemment, un important infiltrat polymorphe de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, macrophages…) est retrouvé au cours de la colite DSS (Okayasu et al., 1990; Cooper et al., 1993; Ohkawara et al., 2002). L'augmentation du nombre de Treg au site inflammatoire est donc significatif mais on peut penser que celui-ci n'est pas suffisamment important pour contrecarrer l'afflux d'autres cellules inflammatoires. L'entrée des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire est d'ailleurs maintenant une cible thérapeutique à part entière dans les MICI avec le développement de nombreuses molécules « anti-adhésion » (Ghosh et al., 2003; Lobaton et al., 2014). L'augmentation du nombre de Treg est également secondaire à une prolifération massive des Treg, comme l'atteste une fréquence significativement plus élevée de Treg exprimant $Ki67^+$ dans les ganglions et surtout dans la *lamina propria* colique. Aussi, contrairement à de nombreuses hypothèses concernant l'impact négatif de l'inflammation sur les Treg, nous mettons en évidence dans le modèle DSS un état d'hyperactivation des Treg. Nos données concernant l'absence d'augmentation de l'apoptose des Treg et leur capacité à proliférer *in vitro* après avoir été isolés du milieu inflammatoire, confirment un effet apparemment positif et inattendu du DSS sur les Treg. Une stimulation antigénique majeure par la flore digestive à la suite de la pénétration de celle-ci à la faveur des lésions épithéliales induites par le DSS, est probablement une des hypothèses pour expliciter ce phénomène. En ce sens, Geuking et al. ont montré que l'induction de Treg était dépendante de la flore intestinale et était d'ailleurs un mécanisme indispensable à l'homéostasie intestinale (Geuking et al., 2011).

Dans notre travail, alors que les Treg issus des ganglions ne présentaient pas de différence de fonction lorsqu'ils provenaient d'une souris colitique, les Treg isolés du colon après DSS présentaient une fonction suppressive significativement plus importante que ceux issus des souris contrôles. L'hypothèse selon laquelle la fonction suppressive des Treg serait réduite par l'inflammation semble ici remise en cause. Toutefois, l'augmentation d'une fonction *in vitro* ne se traduit pas toujours par un réel effet *in vivo*, d'autant plus que notre test de suppression n'explore que certains aspects de la fonction suppressive des Treg (Tang et al., 2008). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'existence d'une différence de fonctionnalité des iTreg *vs*

nTreg. Le marqueur de surface le plus fiable reste à ce jour la NRP1 qui présente l'avantage d'être extracellulaire, contrairement à Hélios qui est un facteur de transcription donc inutilisable chez des souris sauvages pour des expériences de tri cellulaire. En situation d'homéostasie, les fonctions suppressives *ex vivo* des Treg $NRP1^+$ (nTreg) et des Treg $NRP1^-$ (iTreg) étaient identiques comme il est généralement admis dans la littérature (MacDonald et al., 2011). De manière intéressante, nous avons mis en évidence une augmentation significative de la fonction suppressive des iTreg provenant de ganglions de souris colitiques alors que dans le même temps la fonction suppressive des nTreg de ces mêmes souris colitiques ne présentaient aucun changement de leur fonctionnalité. Cette observation semble donc en accord avec les constations précédentes faisant état d'une activation des Treg en condition inflammatoire (prolifération et fonction suppressive). La génération d'iTreg se faisant préférentiellement aux interfaces muqueuses, il n'est pas étonnant que cette population soit sélectivement impactée par l'inflammation colique. Dans un contexte de maladie autoimune comme le diabète, B Salomon et al., ont montré que lorsque les Treg avaient une activité augmentée par un effet paradoxal médié par les Teff (via le TNFα) ceux-ci avaient également une expression diminuée de NRP1 (Grinberg-Bleyer et al., 2010). Toutefois, de nombreux éléments manquent à notre observation pour en confirmer le mécanisme et la relevance. Tout d'abord, on peut mettre en doute la capacité de NRP1 à distinguer nTreg de iTreg puisque plusieurs publications récentes ont remis en cause la spécificité de ce marqueur (Yadav et al., 2012; Weiss et al., 2012). Ainsi, en situation d'inflammation pulmonaire, l'expression de NRP1 serait augmentée à la surface des iTreg (Weiss et al., 2012). Nous avons formulé également l'hypothèse que l'inflammation intestinale puisse moduler l'expression de NRP1 à la surface des Treg et les résultats d'une expérience de transfert de Treg $NRP1^+$ ou $NRP1^-$ à des souris CD3ε KO, soumises secondairement ou non à une colite DSS, nous permettra d'analyser le devenir de l'expression de NRP1 en condition inflammatoire. Les caractéristiques des différentes sous populations de Treg ($NRP1^+$ ou $^-$; issues de souris colitiques ou non) en terme de profil de sécrétion de cytokines pourraient permettre également une meilleure caractérisation de ces cellules. Une étude de la fonction suppressive des Treg NRP1+ ou NRP1- issus de la *lamina propria* de souris colitiques ou non serait du plus grand intérêt, mais reste difficile pour des raisons techniques (nombre de souris nécessaires proche de la centaine…).

2.3. Inhibition de la néo-conversion des Treg

Un des principaux points soulevé par notre travail est l'existence d'une diminution du phénomène de néo-conversion des Treg en situation inflammatoire. Cette néo-conversion est à l'origine de la génération en périphérie de iTreg à partir de Tconv interagissant avec des DC en présence de TGFβ et d'acide rétinoïque. Plusieurs sous-populations de DC sont présentes dans la *lamina propria* et les ganglions mésentériques mais parmi elles, les DC $CD103^+$ ont été rapportées comme les plus efficaces pour la génération de iTreg (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Il a été précédemment démontré, dans un modèle de colite par transfert de LT, que les DC issues de ganglions mésentériques de souris colitiques perdaient leur capacité à générer des iTreg *in vitro* (Laffont et al., 2010). Nous avons pu, dans notre travail, montrer qu'un phénomène similaire était observé dans le cadre d'une colite T indépendante de type DSS avec une diminution significative de la conversion *in vitro* de Tconv en Treg par les DC issues de ganglions mésentériques de souris colitiques. De manière originale, nous confirmons dans 2 modèles différents l'impact négatif de l'inflammation colique sur le phénomène de conversion *in vivo* des Treg. Le premier modèle est utilisé classiquement pour la génération de Treg par transfert de Tconv au TCR spécifique de l'ovalbumine à une souris recevant un gavage avec cet antigène. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un effet propre de l'inflammation induite par le DSS sur la conversion des Treg. On observe ainsi une diminution, non seulement de la fréquence de Treg convertis mais également de leur nombre, ce qui contraste avec l'absence d'effet de la colite sur la fréquence de Treg résidents. Le deuxième modèle est basé sur l'observation d'une population particulière de LT $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ décrits comme des cellules précurseurs de Treg capables d'acquérir spontanément l'expression de Foxp3 et ainsi douées des propriétés régulatrices (Schallenberg et al., 2010). Nous démontrons que ce phénomène est diminué chez des souris CD3e KO soumises au DSS. Ce défaut de néo-conversion des Treg en condition inflammatoire pourrait donc participer au déficit relatif en Treg au niveau de la muqueuse intestinale, mais également à une diminution spécifique de la présence de iTreg. Or, il est de plus en plus évident que la régulation des phénomènes inflammatoires par les Treg requiert la participation des Treg naturels et induits (Haribhai et al., 2011; Bilate et al., 2011). La part respective des nTreg et iTreg dans le contrôle de l'inflammation reste toutefois inconnue. Des données issues de l'analyse des répertoires T suggèrent que les nTreg sont nécessaires à la tolérance vis-à-vis d'antigène du soi alors que les iTreg induits aux interfaces muqueuses sont plus spécialisés dans la réponse envers les antigènes alimentaires et du microbiote (Lathrop et al., 2011). De manière intéressante, les patients atteints de MICI présentent une réactivité exacerbée de leurs LT vis-à-vis des antigènes du soi, mais aussi de la

flore intestinale suggérant un rôle spécifique des deux populations de Treg (Lodes et al., 2004; Vermeulen et al., 2011). Chez la souris, la nécessité d'une "coopération" entre les iTreg et nTreg a été mise en évidence par une colite plus sévère lorsque celle-ci était induite par des Tconv incapables de se convertir en iTreg. De manière similaire, la colite était mieux contrôlée après transfert de nTreg chez les souris dont les Tconv gardaient la possibilté de se convertir en iTreg. Enfin, chez des souris ne possédant pas de iTreg, un co-transfert de nTreg et iTreg générés *in vitro* permettait de guérir la colite (Haribhai et al., 2009).

Comme nous l'avons exposé précédemment, les DC, en particulier $CD103^+$, jouent un rôle central dans le processus de conversion des Tconv en Treg. En effet, cette population particulière exprime l'intégrine $\alpha v\beta 8$ qui est nécessaire à l'activation du TGFβ latent et par conséquent à la néo-conversion des Treg (Worthington et al., 2011; Païdassi et al., 2011). Nous avons ainsi pu montrer une diminution significative des DC $CD103^+$ au sein des ganglions mésentériques de souris colitiques. De manière plus originale, l'analyse par PCR quantitative du niveau d'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ par les différentes populations de DC ($CD103^+CD11b^-$, $CD103^+CD11b^+$ et $CD103^-CD11b^+$) a permis de montrer une expression prépondérante de cette intégrine par les DC $CD103^+CD11b^-$. La colite au DSS s'accompagne non seulement d'une diminution de la fréquence de cette sous-population de DC au sein des ganglions mésentériques mais également d'un défaut d'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ par ces DC. Le lien direct entre la diminution d'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ par les DC $CD103^+CD11b^-$ issues de souris colitiques et leur capacité à activer le TGFβ voire à convertir les Tconv en Treg reste à démontrer. La description récente du rôle de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ dans les mécanismes de suppression des réponses T par les Treg (Worthington et al., 2015) met en exergue l'intéret de cette molécule exprimée à la fois à la surface de certaines DC et des Treg. Malheureusement, l'absence d'anticorps spécifique de cette intégrine utilisable en cytométrie en flux, rend son étude difficile chez la souris et *a fortiori* chez l'homme. Ainsi, nous menons actuellement une étude clinique pour connaitre les niveaux d'expression d'$\alpha v\beta 8$ par les DC de la *lamina propria* du colon et de l'iléon des sujets souffrant de MICI en poussée et en rémission comparés à des témoins sains. Mais la nécessité d'un tri cellulaire de cellules issues de biopsies endoscopiques avant extraction pour qPCR reste un facteur limitant à cette étude.

3. Plasticité des Treg

Dans cette troisième partie de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la dynamique d'évolution de différentes populations de LT Th1, Th17 et Treg circulantes à partir d'une cohorte de patients avec une MC en rémission suivie tous les 3 mois pendant un an. Nous avons mis en évidence dans le sang de patients avec une MC en rémission d'une population de LT $CD4^+$ co-exprimant Foxp3 et IL-17. Des travaux ont précédemment identifié dans l'intestin, cette population double positive dans les MICI (Hovhannisyan et al. 2011; Ueno et al., 2013; Kryczek et al., 2011). Cette sous-population de LT $CD4^+$ partageant des propriétés de Treg et de Th17 pourrait avoir des effets pathogéniques et promouvoir l'inflammation. De façon intéressante, les LT Th17 requièrent le TGFβ pour se différencier ainsi qu'un environnement riche en IL-6 alors que les Treg requièrent la présence de TGFβ. L'environnement cytokinique peut donc induire à partir d'un même précurseur cellulaire (exprimant probablement à la fois Foxp3 et RORγt) soit des LT Th17 soit des iTreg **(Figure 28)**.

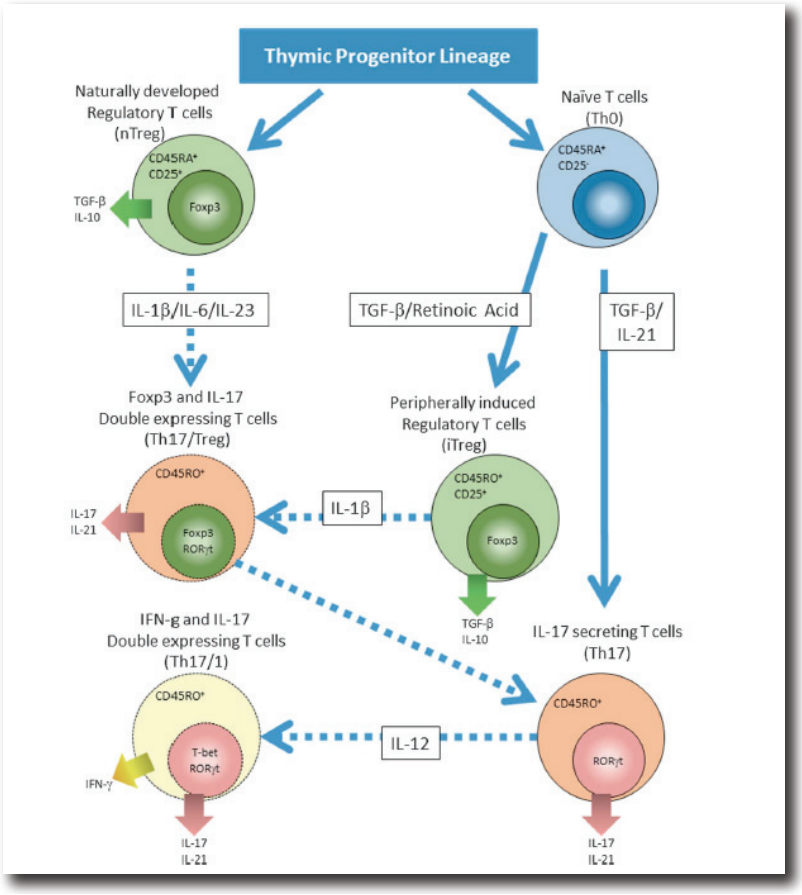


Figure 28: Développement des sous populations de LT helper et Treg en fonction des cytokines présentes dans le milieu (d'après Ueno et al., 2013).

Dans des conditions normales les Th17 recrutent des polynucléaires neutrophiles pour lutter contre les infections bactériennes et/ou fongiques. Toutefois le rôle pathogène des Th17 au cours des MICI est maintenant bien démontré même si les thérapeutiques ciblant spécifiquement ces cellules sont à l'origine de résultats contradictoires. Les iTreg semblent avoir un phénotype moins stable que les nTreg et une propension plus importante à aquérir un phénotype mixte Treg/Th17 voire à perdre totalement l'expression de Foxp3. De surcroit, des données récentes ont permis d'identifier l'existence dans des sites inflammatoires de la muqueuse intestinale (mais absents des MLN et du sang) de patients souffrant de MC, de cellules T co-exprimant Foxp3, IL-17 et IFNγ et exprimant un même TcR que des Treg $Foxp3^+$ des mêmes patients, suggérant qu'ils dérivent de ces Treg. L'établissement de clones de ces Treg $Foxp3^+IL\text{-}17^+$ a permis de montrer qu'ils conservaient une fonction suppressive (Hovhannisyan et al. 2011). Ces éléments suggèrent que certaines sous-populations de Treg peuvent se différencier en Teff sous l'influence de cytokines proinflammatoires et que ce mécanisme pourrait contribuer à perpétuer l'inflammation. Dans notre étude nous avons montré que l'augmentation de fréquence de cette population mixte Treg/Th17 précédait la survenue d'une poussée de la MC suggérant un possible rôle dans le déclenchement de la poussée.

4. Traiter les MICI par les Treg ?

L'amélioration des connaissances concernant l'implication des Treg dans la physiopathologie des MICI doit permettre d 'élaborer des stratégies thérapeutiques spécifiquement ciblées sur les Treg (Pelvy et al., 2011). Deux approches sont possibles, i) transférer des Treg préalablement stimulés ou multipliés *in vitro*, ii) utiliser une approche pharmacologique influençant le fonctionnement et/ou le nombre de Treg *in vivo*.

Les thérapies cellulaires sont conditionnées par le faible nombre de Treg obtenus par prélèvement sanguin chez l'homme et nécessitent donc des techniques d'expansion *in vitro* avant re-transfert chez le patient lui-même. Ainsi, soit les Treg sont stimulés et cultivés pendant plusieurs semaines (Schmetterer et al., 2012), soit des iTreg sont obtenus à partir de Tconv stimulés par engagement du TCR en présence de TGFβ (Hippen et al., 2011). Ces techniques sont toutefois limitées par la spécificité antigénique très réduite des Treg ainsi obtenus. Une approche utilisant des tétramères pourrait permettre de développer des Treg spécifiques d'un antigène donné, mais la cible antigénique dans les MICI n'est pas univoque (Jiang et al., 2003). L'addition de rapamycine aux cultures de Treg semble prometteuse pour augmenter le nombre de Treg obtenus et pour stabiliser leur phénotype (Tresoldi et al., 2011). Outre le nombre de cellules générées, un autre facteur limitant des thérapies cellulaires est le fait que les cellules transférées puissent ne pas se localiser secondairement au niveau du site inflammatoire. Aussi, le développement de Treg présentant des molécules de « homing » de type intégrine, spécifiques de l'intestin, pourrait permettre un traitement plus « ciblé ». Ces limites étant exposées, les résultats prometteurs, en terme de sécurité mais également d'efficacité d'une thérapie cellulaire utilisant des Treg spécifiques de l'ovalbumine et cultivés *in vitro,* valident cette approche de traitement par les Treg dans les MICI (Desreumaux et al., 2012). D'autres types cellulaires comme des DC à activité tolérogénique (Thomson et al. 2008) ou des cellules souches mésenchymateuses (Gonzalez et al., 2009) pourraient permettre d'induire la différenciation *in vivo* d'iTreg. L'optimisation des thérapies cellulaires à base de Treg passe peut-être également par le co-transfert de nTreg et iTreg qui semblent exercer une activité synergique pour le contrôle des réponses inflammatoires (Haribhai et al., 2011; Bilate et al., 2011).

Les approches pharmacologiques ciblant les Treg peuvent correspondre à l'utilisation de probiotiques, dont plusieurs publications ont montré qu'ils induisaient chez l'homme une augmentation du nombre de Treg intestinaux, mais à ce jour sans effet clinique significatif au cours des MICI (de Roock et al., 2010). Les vitamines A ou D pourraient également constituer

des agents thérapeutiques intéressants. De nombreuses publications viennent étayer le rôle de ces vitamines et principalement de la vitamine A dans l'induction de Treg chez l'animal comme chez l'homme (Bai et al., 2009; Hewison, 2012). Les anticorps monoclonaux sont aussi des traitements potentiellement actifs sur les Treg. Ainsi, outre les anti-TNF dont nous avons longuement exposé l'intérêt précédemment sur la population de Treg, les anti-IL-12/23 (anti-p40) comme l'ustekinumab, pourraient avoir un impact indirect sur les Treg. En effet, la limitation des réponses Th17 et Th1 par le blocage des cytokines IL-12 et IL-23 semble bénéfique pour la population de Treg comme le prouve l'augmentation significative des Treg en particulier dans l'intestin des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) (Abern et al., 2010; Izcue et al., 2008).

5. Synthèse et perpectives

Mon travail de thèse s'est tout d'abord attaché à caractériser l'impact de l'inflammation intestinale sur les Tregs dans le modèle de la colite DSS. L'utilisation de ce modèle bien qu'artéfactuel car toxique, nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre de Tregs Foxp3^{+} proliférants au sein des ganglions mésentériques et de la *lamina propria* chez les souris colitiques. Cette augmentation du nombre de Tregs est en accord avec des données obtenues chez l'homme en poussée de MICI ; elle est également en accord avec les données obtenues dans un contexte de tolérance orale où les Tregs, après leur conversion dans les ganglions mésentériques, doivent migrer et être capables de proliférer pour réguler l'inflammation/allergie au site muqueux intestinal (Pabst et al. 2011). Dans notre travail, nous n'avons toutefois pas étudié spécifiquement la migration des Tregs vers la muqueuse et il serait intéressant de compléter notre travail par cette évaluation. La notion de migration des lymphocytes T est en effet de plus en plus importante sur le plan thérapeutique puisqu'on dispose aujourd'hui de molécules bloquant leur recrutement au sein du tissu inflammatoire (anticorps anti-intégrines) pour le traitement des MICI. L'identification de molécules de « homing » spécifiques ou surexprimées par les Teffs et non par les Tregs pourrait permettre de développer des traitements réduisant l'entrée dans le tissus des cellules inflammatoires mais pas celle des cellules régulatrices nécessaires au contrôle de l'inflammation.

Nous avons également étudié la fonctionnalité des Tregs dans un contexte inflammatoire et montré de manière inattendue que les Tregs issus de la *lamina propria* de souris colitiques avaient une fonction suppressive augmentée. Cette observation va dans le sens d'une absence de défaut intrinsèque des Tregs dans le contexte des MICI. Toutefois, notre travail a étudié la fonctionnalité des Tregs par le biais de tests fonctionnels *ex vivo*, c'est à dire sans tenir compte totalement du microenvironnement local et en évaluant la capacité de ces Tregs à contrôler des réponses cellulaires T. Ainsi, un des points majeurs serait de tester la fonctionnalité des Tregs issus de souris colitiques *in vivo* dans le cadre d'expérience de transfert mais également en utilisant des critères de jugement comme la fonctionnalité des Tregs vis à vis d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales ou les cellules de l'immunité innée. En effet, l'augmentation de fonctionnalité des Tregs pourrait être en réalité atténuée *in vivo* par le microenvironnement local ou s'avérer inefficace car ne contrôlant que des réponses immunes médiées par les lymphocytes T qui ne sont pas impliquées dans la genèse des lésions dans le

modèle DSS. Nous avons pu également observer une augmentation spécifique de l'activité suppressive des Tregs NRP1$^-$ issus de ganglions de souris colitiques. La NRP1 constitue, comme nous l'avons exposé précédemment, un des marqueurs de Tregs « naturels » alors qu'elle est peu exprimée par les Tregs « induits ». Cette augmentation sélective de l'activité suppressive des Tregs NRP1$^-$ est à nuancer par le fait que NRP1 n'est pas univoque et que certains auteurs ont rapporté son expression à la surface des Tregs induits en périphérie en condition inflammatoire (Weiss et al., 2012). Nos données récemment obtenues en situation de colite DSS après transfert de Tregs NRP1$^+$ ou NRP1$^-$ chez des souris CD3εKO, vont toutefois dans le sens d'une stabilité de l'expression de NRP1 par les Tregs NRP1$^+$ et d'une absence d'induction de cette expression par les Tregs NRP1$^-$. L'une des raisons de la capacité suppressive augmentée des Tregs NRP1$^-$ *ex vivo* pourrait être une production accrue d'IL-10. En effet, nos données récentes (Kaiserlian et al. *Résultats personnels*) montrent chez des souris IL-10 eGFP une expression augmentée de cette cytokine par les Tregs NRP1$^-$ issus des ganglions mésentériques de souris colitiques alors que l'expression de l'IL-10 par les Tregs NRP1$^+$ n'est pas modifiée. Une exploration plus extensive du phénotype, du profil cytokinique et des facteurs de transcription (GATA3, tBet, RORγt) des sous-populations de Treg Foxp3$^+$ NRP1$^+$ et NRP1$^-$ pourrait permettre de mieux caractériser ces cellules en situation de colite. En effet, il serait important de savoir si cette sous population NRP1$^-$ productrice d'lL-10 correspond a une sous population de Treg KLRG1$^+$ Gata3$^+$, mise en évidence récemment par A. Izcue et al. L'étude du phénotype fonctionnel, mais aussi de la capacité prolifération et du renouvellement dans le tissus des Tregs NRP1$^-$ issus de la *lamina propria* de souris colitiques comparées à des souris témoins, permettrait en outre de préciser si les Treg NRP1$^-$ de la *LP* présentent des propriétés communes avec leur homologue des ganglions mésentériques ou s'ils représentent une population particulière de Tregs « effectrice ». Ainsi, le travail initié mériterait d'être approfondi par l'étude du rôle du microenvironnement tissulaire inflammatoire muqueux et donc de l'immunité innée sur les aspects de localisation, de dynamique et de fonctions des populations de Tregs NRP1$^+$ et NRP1$^-$. Ces informations permettraient ensuite de rechercher chez l'homme les populations partageant le même type de signature transcriptionnelle ainsi que de fonctions dans des situations pathologiques appropriées. , Contrairement aux modèles animaux, on n'est pas capable actuellement chez l'homme de distinguer les populations de Tregs constitutifs (nTregs) des Tregs induits (iTregs). L'application de notre travail à la physiopathologie humaine serait donc d'identifier chez les patients souffrant de MICI une population de Tregs homologue à la population NRP1$^-$ des souris colitiques. Malheureusement, NRP1 ne semble pas exprimé sur les Tregs de l'homme et à ce jour aucun marqueur « simple » (visualisable en cytométrie en flux par exemple) n'est connu pour distinguer nTregs de iTregs.

L'utilisation de la cytométrie de masse (CyTOF), autorisant l'analyse simultanée d'une quarantaine de marqueurs de surface, intracellulaires ou de cytokines, pourrait permettre par une étude exhaustive, systématique et comparative des Tregs circulants et muqueux chez les patients en poussée ou non de MICI d'identifier des sous-populations distinctes de Tregs. Une étude fonctionnelle de celles-ci, mais également la mesure du niveau de méthylation de régions non codantes du gène Foxp3 (CNS2) et/ou l'analyse du répertoire T, pourraient permettre chez l'homme, l'identification et la caractérisation des populations de Tregs naturels et induits. En effet comme nous l'avons exposé précédemment, un niveau faible de méthylation du gène Foxp3 mais également des TCR à forte affinité pour les peptides du soi semblent constituer deux éléments caractéristiques des nTregs. Enfin, un séquençage sur cellule unique (single cell RNAseq) des Tregs après tri cellulaire à partir du sang voire de la muqueuse digestive (même si le nombre de cellules semble une limitation majeure) pourrait aider à la mise en évidence de différentes sous-populations de Tregs pouvant correspondre aux Tregs naturels et induits.

Chez l'homme, L. Mayer a montré que des clones de Tregs Foxp3 établis *ex vivo* à partir de biopsies intestinales de patients présentant une maladie de Crohn co-exprimaient l'IL-17 et Foxp3 et conservaient une fonction suppressive *in vitro*. Cette étude pionnière dans la mise en évidence d'une plasticité potentielle des Treg dans la maladie de Crohn nous a conduit à explorer différentes sous-populations de Treg Foxp3 co-exprimant l'IL17 et/ou l'IFNγ (Etude Femtokine). Dans cette étude, nous avons observé une augmentation dans le sang d'une sous-population de LT co-exprimant Foxp3 et IL-17, qui était associée à un sur-risque de rechute clinique dans les 3 mois suivant cette augmentation. Cette observation plaide en faveur d'une plasticité des LT en général et des Tregs en particulier avec un rôle possible de cette population comme précurseur de LT Th17 inflammatoires. Bien que nos résultats doivent être confirmés dans une cohorte indépendante, il semble nécessaire de caractériser plus précisément cette population notamment en termes de phénotype mais également de fonctionnalité. Une approche identique à celle exposée précédemment pourrait en outre permettre de savoir si cette population « double-positive » dérive des iTregs plutôt que des nTregs. Il est en effet rapporté dans la littérature une instabilité phénotypique plus importante des iTregs par rapport aux nTregs pouvant contribuer ainsi, en dépit de notre observation chez la souris d'une fonctionnalité plus importante des iTregs, à une perte rapide de celle-ci au profit d'un phénotype Th17 en condition inflammatoire.

D'un point de vue thérapeutique notre étude clinique concernant l'impact du traitement par anti-TNFα sur les Tregs chez des patients souffrant de MICI nous a permis de mettre en

évidence non seulement une augmentation de la fréquence et du nombre des Tregs, mais également une augmentation de leur fonction suppressive. Cette étude clinique renforce encore l'intérêt d'un ciblage des Tregs pour optimiser les traitements des MICI. Toutefois, plusieurs éléments mériteraient d'être approfondis : concernant le phénotype précis des Tregs obtenus après anti-TNFα, s'agit-il d'une prolifération de nTregs préexistants ou bien la génération *de novo* de nTregs voire d'iTregs ? Par quels mécanismes ces Tregs sont-ils plus fonctionnels ? S'agit-il d'un effet direct de la neutralisation du TNFα sur les Tregs ou bien indirect par le biais d'autres cellules ?

Notre travail ouvre donc des perspectives en termes de suivi des patients puisqu'il montre que plusieurs populations de LT ont une valeur prédictive sur le cours évolutif de la maladie. La combinaison de ces profils immunologiques avec d'autres marqueurs, notamment inflammatoires, pourrait permettre d'améliorer le suivi des patients atteints de MICI. Les perspectives en termes de traitement des patients reposent sur l'identification de populations précocement impliquées dans les lésions intestinales, mais aussi de populations dont la potentialisation pourrait permettre un meilleur contrôle de l'inflammation intestinale. En ce sens, la stabilisation du phénotype des iTregs, au fort potentiel suppressif, semble être un point crucial qui pourrait concourir au rétablissement d'un équilibre Treg/Teff.

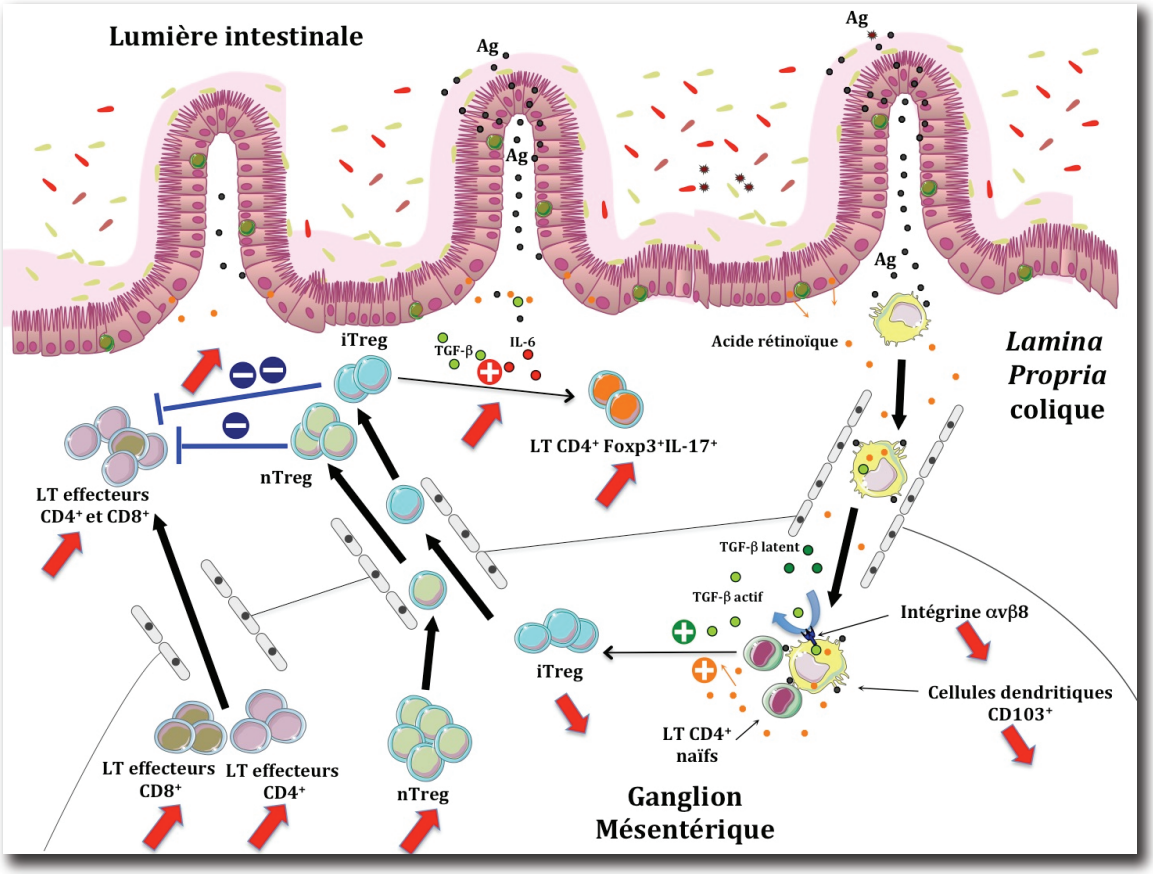


Figure 29: Synthèse des données obtenues concernant l'impact de l'inflammation intestinale sur les différentes sous-populations de LT ou cellules dendritiques (les flèches rouges correspondent à l'effet négatif ou positif de l'inflammation sur le phénomène immunologique ou la population cellulaire impliqués)

CONCLUSION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une sécrétion exagérée de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNFα, une hyperactivation des lymphocytes T effecteurs (Teff) et un contrôle insuffisant par les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg qui expriment majoritairement le facteur de transcription Foxp3, jouent un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance immunitaire et le contrôle de l'homéostasie notamment au niveau des interfaces muqueuses comme l'intestin. La rupture de cette homéostasie de l'intestin au cours des MICI est associée à un contrôle insuffisant de l'inflammation par les Treg. Deux sous-types principaux de Treg ont été décrits : les Treg dits « naturels » (nTreg) qui sont différenciés dans le thymus et les Treg dits « induits » (iTreg) qui sont néo-convertis en périphérie (en particulier dans l'intestin) à partir de LT $CD4^+Foxp3^-$ en présence notamment de TGFß.

Mon travail de thèse a visé à mieux comprendre les processus par lesquels la fonction immunomodulatrice des Treg est mise en défaut au cours de l'inflammation intestinale aussi bien chez l'homme que chez la souris. Dans une première étude, nous avons montré que le traitement par anticorps anti-TNFα s'accompagne d'une augmentation rapide et significative des Treg $Foxp3^+$ circulant dans le sang de patients atteints de MICI en poussée. L'infliximab est également associé à une potentialisation de la fonction suppressive des Treg. Ce travail a mis en évidence un nouveau mécanisme d'action des biothérapies anti-TNF pouvant contribuer à l'effet bénéfique de ces thérapeutiques au cours des MICI (Inflamm Bowel Dis 2011).

Dans un deuxième travail, nous avons montré que les Treg contribuent au contrôle de l'inflammation dans un modèle de colite T indépendant (DSS). Les Treg sont toutefois incapables de prévenir totalement la colite, alors même que nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre des Treg au sein des ganglions mésentériques et de la *lamina propria* du colon inflammatoire. Ce phénomène s'accompagnait également d'une augmentation de la fonction suppressive *ex-vivo* des Treg issus du colon inflammatoire. L'impact positif de l'inflammation intestinale sur la fonctionnalité suppressive des Treg issus des ganglions mésentériques était sélectif de la sous-population de Treg $NRP1^-$ représentant majoritairement les iTreg. Dans le même temps, nous avons mis en évidence une diminution significative aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* de la néo-conversion des LT naïfs en Treg en condition

inflammatoire, contribuant ainsi à l'incapacité des Treg à contenir l'inflammation intestinale (manuscrit en révision).

Enfin, dans un troisième travail, nous avons étudié de façon systématique la dynamique des différentes sous-populations de LT auxiliaires Th1, Th17 et Treg ainsi que celle des sous-populations de LT $CD4^+$ « double positives » qui co-expriment IL-17/IFNγ, IL-17/Foxp3 et IFNγ/Foxp3 ainsi que les taux sériques des principales cytokines (TGFβ, IL-17, TNFα, IL-10, IL-8, IFNγ) à partir d'une cohorte de patients avec une maladie de Crohn en rémission clinique prolongée suivis tous les 3 mois. Nous avons pu détecter dans le compartiment circulant des sous-populations de LT $CD4^+$ doubles positives et identifier une élévation dans le sang d'une population mixte de Treg $Foxp3^+$ produisant de l'IL-17 qui précédait la survenue d'une rechute d'une poussée de la maladie de Crohn. Ces résultats suggèrent un potentiel pathogénique de cette sous-population de LT CD4 double positive co-exprimant IL-17/Foxp3 qui pourrait constituer un marqueur de rechute et une cible thérapeutique (manuscrit en préparation).

Tous ces éléments illustrent les concepts de conversion et plasticité des Treg au cours des MICI mais aussi le rôle clé joué par les Treg comme cible pour optimiser et développer de nouvelles biothérapies dans les pathologies inflammatoires chroniques.

ANNEXES

PUBLICATIONS ANNEXES n°1

"Enrichment of circulating and mucosal cytotoxic $CD8^+$ T cells is associated with postoperative endoscopic recurrence in patients with Crohn's disease"

Gilles Boschetti, Stephane Nancey, Driffa Moussata, Eddy Cotte, Yves Francois,

Bernard Flourié et Dominique Kaiserlian

Manuscrit accepté, sous presse dans *Journal of Crohn's and Colitis*

Manuscript Doi : 10.1093/ecco-jcc/jjv211

Enrichment of circulating and mucosal cytotoxic CD8$^+$ T cells is associated with postoperative endoscopic recurrence in patients with Crohn's disease

Gilles Boschetti[1-4*], Stephane Nancey[1-4*], Driffa Moussata[4], Eddy Cotte[5], Yves Francois[5], Bernard Flourié[1-4*] and Dominique Kaiserlian[1-3*]

[*]*The first 2 and the last 2 authors equally contributed to this work*

[1]CIRI, International Center for Infectiology Research, "Mucosal immunity, Vaccination & Biotherapies" Team, Université de Lyon, Lyon, France.

[2]Inserm, U1111, Lyon, France.

[3]Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

[4-5] Hospices Civils de Lyon, Department of Gastroenterology[4] and Surgery[5], Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France

Short title : Cytotoxic CD8$^+$ T cells and Crohn's disease

Address correspondence to:

Gilles Boschetti
INSERM-U1111-CIRI
21 Avenue Tony Garnier
69365 LYON, FRANCE
gillesboschetti@yahoo.fr

Copyright © 2015 European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Accepted Manuscript

CONFLICT OF INTEREST/FUNDING

Specific author contributions: Study design (SN, BF, DK) ; acquisition of data, analysis and interpretation of data (GB, SN, DK, BF) ; drafting of the manuscript (GB, SN, BF, DK); critical review of the manuscript (EC, DM, YF).

Funding : This work was supported by institutionnal grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Hospices Civils de Lyon (HCL) and the François Aupetit Association (AFA).

Conflict of interest : None for all the authors.

Acknowledgements: We are grateful to the Cytometry plateform of the UMR5308 for help with FACS analysis.

Accepted Manuscript

Manuscript Doi : 10.1093/ecco-jcc/jjv211

ABSTRACT

BACKGROUND AND AIMS: Evidence from mouse colitis models indicates that cytotoxic $CD8^+$ T cells (CTL) play a key role in the initiation of gut lesions. We investigated whether changes in $CD8^+$ CTL in blood or *lamina propria* (*LP*) of the neoterminal ileum were associated with postoperative endoscopic recurrence of Crohn's disease (CD).

METHODS: Thirty-seven CD patients with ileocolonic resection were endoscopically followed up at six and twelve months post-surgery. $CD8^+$ T cells were analyzed by flow cytometry in blood and ileal *LP*.

RESULTS: Granzyme B- and perforin-producing $CD8^+$ T cells were significantly increased at 6 months in blood and in ileum *LP* in patients with endoscopic recurrence, as compared to those in remission. At a cutoff point of 45% of $CD8^+$ CTL, the overall accuracies of the frequency of blood granzyme B^+ or $perforin^+$ $CD8^+$ T cells to identify patients with postoperative endoscopic recurrence were 77% and 83%, respectively. Interestingly, patients with endoscopic recurrence at 12 months were those showing the highest mucosal $CD8^+$ CTL frequency at 6 months, while still in remission.

CONCLUSIONS: Enrichment of cytotoxic $CD8^+$ T cells in blood and ileal mucosa coincides with CD postoperative endoscopic recurrence. This underscores that CD8 CTL may play a patho-physiological role in the initiation of gut lesions during CD.

Accepted Manuscript

Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease that is mediated by T cells and features an imbalance between effector and regulatory subsets. Although $CD4^+$ T cells encompassing both Th1 and Th17-type cells accumulate in the intestinal mucosa of patients with active CD, several studies in experimental models of colitis have emphasized a role for $CD8^+$ T cells as initiators of the inflammatory process and gut lesions. Accordingly, it has been proposed that $CD8^+$ T cells may play an earlier role in CD development or relapse than $CD4^+$ T cells [1]. We documented in two different antigenic models that IFNγ-producing granzyme B^+ cytotoxic $CD8^+$ T cells (CTL) are delayed-type hypersensitivity effectors that initiate relapsing episodes of colitis upon recruitment into the *lamina propria* (LP) and induction of epithelial cell apoptosis [2 3]. Others studies using double transgenic mice, confirmed that $CD8^+$ T cells specific for an antigen targeted on intestinal epithelial cells induced spontaneous enteropathy [4]. Finally, a role for $CD8^+$ T cells in driving IL-23/IL-17-mediated intestinal inflammation was also highlighted in mice overexpressing TNFα [5] and in a T cell transfer model of colitis in $RAG2^{-/-}$ mice [6]. However, whether a rise in $CD8^+$ CTL expressing granzyme B or perforin may be an early indicator of the inflammatory process in CD is unknown. Post-surgical recurrence of CD is the most relevant clinical setting to address this issue as it is assumed that the immune processes involved in CD recurrence following 'curative' ileocolonic resection reproduce those involved in the early phase of disease. Furthermore, although operated patients undergo clinical remission, endoscopic survey during the year after surgery detects macroscopic lesions of the neoterminal ileum in 70% of patients who are at high risk to develop clinical flare [7 8 9]. Since a significant proportion of operated patients are in endoscopic remission 6 months post-surgery, identification of immune markers anticipating endoscopic signs of inflammation could improve patients' clinical and therapeutic management.

Accepted Manuscript

In this study we aimed to assess changes in $CD8^+$ CTL in blood or *LP* of the neoterminal ileum of operated CD patients in order to determine their patho-physiological relevance with endoscopic recurrence. As mouse colitis models indicate that $CD8^+$ CTL play a key role in the initiation of gut lesions, we hypothesized that this subset of T cells could be an early indicator of the inflammatory process in the clinical setting of postoperative CD recurrence.

Accepted Manuscript

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

Thirty-seven consecutive CD patients who underwent a non-urgent "curative" ileocolonic resection were enrolled. At the time of surgery, all macroscopically involved parts of the intestine were removed. The neoterminal ileum was anastomosed to the right or transverse colon using a side-to-side anastomosis, and the ileal resection margin was systematically checked and found microscopically free of active lesions. Patients with a short bowel syndrome or a gut stoma were excluded from the study. Patient's characteristics including location and behaviour of disease, according to the Montreal classification, are summarized in Table 1. The non-CD control group consisted of seven subjects undergoing a screening colonoscopy for colorectal cancer, and who were free of any endoscopic abnormalities. All patients and controls gave their written informed consent for participation to the study, which was previously approved by the Ethics Committee of the University of Lyon (number 2010-042-AM1).

Study design

Patients were prospectively followed after surgery by clinical, endoscopic and biologic assessment (CRP, hematocrit, hemoglobin). Disease activity was monitored at each visit using the Crohn's disease activity Index (CDAI). An ileocolonoscopy under anesthesia was performed in all patients at 6 months post-surgery and also at 12 months unless endoscopic recurrence was evidenced at 6 months. All the endoscopies were performed by 3 senior gastroenterologists (GB, DM, SN) who were experienced in grading endoscopic severity of the neoterminal ileum using the validated Rutgeerts score [8]. Absence of endoscopic recurrence was defined as a score of i0 (no lesion) and i1 (≤5 aphtous lesions); moderate recurrence was defined as a score of i2 (>5 aphtous lesions with normal mucosa between the lesions, or skip areas of larger lesions or lesions confined to the ileocolonic anastomosis);

Accepted Manuscript

severe recurrence included scores of i3 (diffuse aphtous ileitis with diffusely inflamed mucosa) and i4 (diffuse inflammation with larger ulcers, nodules, and/or narrowing) [8]. Since this study was designed to investigate whether $CD8^+$ CTL may be associated with early gut lesions and the postoperative endoscopic recurrence and not to evaluate the risk of disease recurrence, it was left to the discretion of each investigator to manage postoperative therapy.

Ten endoscopic biopsies from the neoterminal ileum close to the site of anastomosis were harvested in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin and 10% fetal calf serum (FCS) at +4°C, pooled and immediately processed for immunological analysis. Two additional biopsies were included in paraffin for routine pathological examination after staining with haematoxylin and eosin. All the investigators involved in the assessment of cytotoxic $CD8^+$ T cell infiltration were blinded for the results of the endoscopic status during the whole period of the study.

Isolation of neoterminal ileum *LP* and blood leukocytes

After an extensive washing with phosphate-buffered saline (PBS), pooled biopsies were incubated for 30 min at room temperature in PBS containing 1 mM EDTA and vortexed every 5 min. Biopsies were extensively washed to eliminate epithelial cells and consequently the intra-epithelial lymphocytes; the remaining tissue was incubated for 40 min at 37°C in RPMI 1640 medium containing 1 mg/mL of collagenase IV plus 0.1 mg/mL of DNAse I. The resulting cell suspension was incubated 15 min in RPMI 1640 plus 10 % FCS and cells collected were centrifuged, washed and resuspended in PBS. Heparinised venous blood samples were collected from patients and controls, diluted 1:3 with PBS and layered on a Ficoll-Hypaque density gradient, then centrifuged for 30 min at 900 g and peripheral blood (PB) leukocytes were collected from the interface.

Flow cytometry analysis

Accepted Manuscript

LP and PB leukocytes were suspended in PBS and initially incubated for 15 min at room temperature with human serum (pooled from normal donor) to reduce non-specific staining. Leukocytes were then incubated for 30 min with specific fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies directed against CD3 and CD8α (BD Biosciences, San Jose, CA). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized and then incubated with mouse anti-human fluorescein isothiocyanate FITC-conjugated or Alexa-Fluor 647-conjugated antibodies specific for granzyme B (clone GB11, BD Pharmingen, San Jose, CA) or perforin (clone deltaG9, Invitrogen), respectively or relevant isotype controls. Stainings were analysed by flow cytometry on a LSRII analyser (BD Biosciences) and by using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package GraphPad software Inc. (San Diego, CA). Results of numerical data are presented as mean percentage ± SD of granzyme B or perforin positive $CD8^+$ T cells among total $CD8^+$ T cells. The non-parametric Mann-Whitney test and the one-way ANOVA test with Bonferroni correction were used as appropriate. Chi square test was used to compare patients' characteristics in Table 1. p values < 0.05 were considered statistically significant. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was generated to determine the best cutoff point (defined as the maximum sum of sensitivity plus specificity) of the frequencies of circulating granzyme B- or perforin-expressing $CD8^+$ T cells for discriminating between patients with or without endoscopic recurrence. The reliability of cytotoxic $CD8^+$ T cells as a marker capable to diagnose endoscopic postoperative recurrence in CD patients was expressed in terms of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and overall accuracy. The overall accuracy was calculated by addition of the true-positive and true-negative test results divided by all tests (true-positive + true-negative + false-positive + false-negative).

Accepted Manuscript

RESULTS

Characteristics of patients

Thirty-seven patients [14 males (37.8 %), mean age 39 yrs, range (21-75 yrs)] undergoing a "curative" ileocolonic resection for CD were studied prospectively for one year. The characteristics of CD patients and the 7 control subjects [3 males (42.9 %), mean age 32 years (range 24-55 yrs)] are summarized in Table 1. The flow chart of the population studied with reference to the endoscopic status within the year following intestinal resection is represented in the Figure 1. Overall, an endoscopic recurrence was identified in 26 out of 37 (70 %) patients within one year of the postoperative follow-up. Among them, an early recurrence, defined as the occurrence of macroscopic mucosal lesions at 6 months after surgery, was evidenced in 12 patients (33 %) with a Rutgeerts score classified i2 and i3 in 7 and 5 patients, respectively. Amongst the 26 patients with endoscopic recurrence, 7 developed macroscopic lesions affecting both the ileum and colon, but none had lesions exclusively located in the colon. No clinical sign of recurrence (as defined as CDAI < 150) was evidenced within the 12 months follow-up.

Enrichment of cytotoxic $CD8^+$ T cells in ileal *LP* and in PB leukocytes is associated with early endoscopic recurrence of CD at 6 months post-surgery

At 6 months post-surgery, the proportion of granzyme B- or perforin-expressing T cells among total $CD8^+$ T cells was significantly higher ($p < 0.02$) in ileal *LP* from CD patients who were in endoscopic recurrence (15.87 ± 7.78% and 11.16 ± 6.74%, respectively, n=12), compared with those who were in endoscopic remission (8.04 ± 4.87% and 4.70 ± 4.34%, respectively, n=25) or those of non-CD control gut samples (6.38 ± 3.29% and 2.50 ± 2.38%, respectively, n=7) (Figure 2A and B). There was no significant difference in $CD8^+$ CTL frequency in ileal *LP* of patients with (n=3) or without (n=9) colonic lesions (*data not*

Accepted Manuscript

shown). Likewise, a statistically significant increase ($p < 0.05$) in granzyme B or perforin $CD8^+$ T cells was observed in blood of CD patients with endoscopic recurrence (47.05 ± 23.94% and 50.08 ± 22.94%, respectively), compared to those in remission (28.74 ± 20.65% and 24.35 ± 16.87%, respectively) and to controls (14.34 ± 3.29% and 13.00 ± 16.29%, respectively) (Figure 2C and D). In addition, there was a gradual increase of the frequency of granzyme B- or perforin-expressing T cells among total $CD8^+$ T cells in blood and ileal *LP* with regards to the postoperative endoscopic severity assessed by the Rutgeerts score (Figure 3).

To determine whether such a rise in circulating cytotoxic $CD8^+$ T cells represented a marker of endoscopic recurrence and to define its diagnostic accuracy, ROC curves were built and a cutoff was determined for each marker to obtain the optimal sensitivities (Sen), specificities (Spe), positive (PPV) and negative (NPV) predictive values (Table 2). At a cutoff of 45%, the overall accuracy of circulating granzyme B $CD8^+$ T cells and that of perforin $CD8^+$ T cells in the detection of endoscopic recurrence were 77% and 83%, respectively. The area under ROC curves were 75% and 82% for circulating granzyme B $CD8^+$ T cells and for perforin $CD8^+$ T cells, respectively (Figure 4 A and B). We also determined the optimal cutoff of 5 mg/L as an upper limit for CRP concentration using the ROC curves. At this cutoff, the area under ROC curve was 67 % for CRP (Figure 4C). Sensitivity (Sen), specificity (Spe), overall accuracy, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of CRP were summarized in Table 2.

Enrichment of granzyme B $CD8^+$ T cells in ileal *LP* of patients in endoscopic remission at 6 months precedes endoscopic recurrence at 12 months post-surgery

Finally, we investigated whether early cytotoxic $CD8^+$ T cell enrichment in either blood or mucosa at 6 months post-surgery could identify among patients in endoscopic

Accepted Manuscript

remission those at a high risk of endoscopic recurrence at 12 months. For that purpose, the frequencies of granzyme B or perforin positive $CD8^+$ T cells from ileum *LP* or blood leukocytes in patients who were in endoscopic remission at 6 months post-surgery (n=25) were compared according to their endoscopic status at 12 months post-surgery. Among the 25 patients analysed, the frequency of granzyme B-expressing $CD8^+$ T cells was significantly higher in ileal *LP* at 6 months post-surgery in patients who subsequently experienced an endoscopic recurrence at 12 months (n=14), as compared to that of patients who remained in endoscopic remission (n=11) within one year post-surgery (10.24 ± 4.67 % *vs* 5.98 ± 3.28 %, respectively; $p<0.05$) (Figure 5). In addition, higher frequencies of circulating granzyme B^+ or perforin$^+$ $CD8^+$ T cells and also of ileal *LP* perforin$^+$ $CD8^+$ T cells were observed in patients who experienced an endoscopic recurrence 6 months later, when compared with those who did not, but this did not reach statistical significance (Figure 5).

Accepted Manuscript

DISCUSSION

In the present study, we found that early post-surgical endoscopic recurrence was associated with a rise in the frequency of $CD8^+$ CTL expressing granzyme B or perforin in ileal *LP* and peripheral blood leukocytes. At 6 months post-surgery, a frequency in circulating cytotoxic $CD8^+$ T cell subsets above 45 % (with a predictive negative value of 86-87 %) appeared to accurately identify patients undergoing endoscopic recurrence. In addition, there was a gradual increase in the frequency of cytotoxic $CD8^+$ T cell in ileal *LP* and peripheral blood leucokytes according to the severity of endoscopic recurrence. Lastly, the frequency of cytotoxic $CD8^+$ T cells in ileal *LP* and peripheral blood was higher in patients who experienced an endoscopic recurrence 6 months later than in patients still in endoscopic remission but the difference reached a statistically significant level only for the frequency of granzyme B expressing $CD8^+$ T cells in ileal mucosa.

In our study, a rise in cytotoxic $CD8^+$ T cells (both in blood and ileal *LP*) coincides with the onset of gut lesions in the model of post-surgical CD relapse. Although this setting is assumed to reproduce the pre-symptomatic phase of CD, whether our data translate to non-operated patients warrants further investigation in a larger patients' cohort with graded severity and duration of disease. The diagnostic value of $CD8^+$ CTL in blood is better than that of serum CRP to detect patients in post-surgical endoscopic recurrence, but must be evaluated in comparison to other challenging inflammatory markers, such as fecal calprotectin [10, 11]. The fact that a rise in mucosal cytotoxic $CD8^+$ T cells precedes by 6 months the onset of macroscopic lesions supports that immunological profiling of different cytotoxic T cell subsets may help to characterize subgroups of patients more prone to disease relapse.

Whether changes in $CD8^+$ T cells play a role either in ongoing inflammation or disease pathogenesis, cannot be inferred from our data. Previous reports suggest that $CD8^+$ T cells may play a role in CD pathogenesis. Indeed, an accumulation of $CD8^+$ T cells in the ileal

Accepted Manuscript

crypt region of infants with inflammatory bowel disease (IBD) at first presentation has been reported [12]. *In situ* hybridization detected the presence of perforin and granzyme A cytotoxic granules co-localizing with $CD8^+$ T cells, in the vicinity of the gut epithelium [12 13]. Moreover, granzyme B-expressing $CD8^+$ T cells and apoptotic cells were observed together in the focal mucosal lesions of CD[14], suggesting that cytotoxicity represents a potential mechanism of initiation or perpetuation of the inflammatory process. Along these lines, other studies reported the presence of autoreactive class I-restricted cytotoxic T cells in blood of CD patients [15]. Interestingly, transcriptional profiling of circulating T cells from IBD patients has recently identified a prognostic gene expression signature in $CD8^+$ (but not $CD4^+$) T cells in a subgroup of patients who experienced a more aggressive disease course with higher incidence of flares and treatment failure [16]. Considering the colitogenic effector function of cytotoxic $CD8^+$ CTL documented in several mouse models of colitis [2 3 4], these data suggest that cytotoxic $CD8^+$ T cells may play a role in the initiation of intestinal lesions and underscore that these cells might constitute a potential novel therapeutic target in CD.

It should be however emphasized that beyond $CD8^+$ T cells, $CD4^+$ T cells endowed with cytolytic properties might also contribute to CD pathogenesis. Indeed, active CD patients harbour circulating and mucosal $CD4^+$ T cells performing NKG2D-mediated cytotoxicity against inflamed epithelial cells upregulating the NKG2D ligand MICA/B [17]. Moreover, co-engagement of NKG2D and the T-cell receptor significantly increased production of IL-17 and TNFα by these $CD4^+$ T cells [18]. Interestingly, T cell repertoire analysis revealed oligoclonal expansions of both $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in blood and intestinal mucosa from active and also macroscopically inactive area of patients with CD, suggesting that both these T cell subsets might contribute to recurrence of gut lesions [19].

Accepted Manuscript

In conclusion, we show that endoscopic recurrence is associated with a rise in circulating and mucosal $CD8^+$ CTL and that mucosal accumulation of $CD8^+$ CTL identifies amongst CD patients in endoscopic remission, those at high risk of subsequent recurrence.

Accepted Manuscript

References

1. Cheroutre H. In IBD eight can come before four. Gastroenterology 2006;131:667-70.

2. Nancey S, Holvoet S, Graber I, et al. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. Gastroenterology 2006;131:485-96.

3. Nancey S, Boschetti G, Hacini F, et al. Blockade of LTB(4) /BLT(1) pathway improves CD8(+) T-cell-mediated colitis. Inflamm Bowel Dis 2011;17:279-88.

4. Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S, et al. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. Gastroenterology 2006;131:510-24.

5. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, et al. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. J Exp Med 2002;196:1563-74.

6. Tajima M, Wakita D, Noguchi D, et al. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. J Exp Med 2008;205:1019-27.

7. Olaison G, Smedh K, Sjodahl R. Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms. Gut 1992;33:331-5.

8. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. Gastroenterology 1990;99:956-63.

9. Walters TD, Steinhart AH, Bernstein CN, et al. Validating Crohn's disease activity indices for use in assessing postoperative recurrence. Inflamm Bowel Dis 2011;17:1547-56.

10. Kopylov U, Rosenfeld G, Bressler B, Seidman E. Clinical utility of fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2014;20:742-56.

11. Boschetti G, Laidet MH, Moussata D, et al. Levels of fecal calprotectin are associated with the severity of postoperative endoscopic recurrence in asymptomatic patients with Crohn's disease. Am J Gastroenterol. 2015 ; 110:865-72.

Accepted Manuscript

12. Muller S, Lory J, Corazza N, et al. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. Am J Pathol 1998;152:261-8.

13. Kappeler A, Mueller C. The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. Histol Histopathol 2000;15:167-72.

14. Jenkins D, Seth R, Kummer JA, Scott BB, Hawkey CJ, Robins RA. Differential levels of granzyme B, regulatory cytokines, and apoptosis in Crohn's disease and ulcerative colitis at first presentation. J Pathol 2000;190:184-9.

15. Okazaki K, Morita M, Nishimori I, et al. Major histocompatibility antigen-restricted cytotoxicity in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993;104:384-91.

16. Lee JC, Lyons PA, McKinney EF, et al. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. J Clin Invest 2011;121:4170-9.

17. Allez M, Tieng V, Nakazawa A, et al. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. Gastroenterology 2007;132:2346-58.

18. Pariente B, Mocan I, Camus M, et al. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2011;141:217-26, 26 e1-2.

19. Camus M, Esses S, Pariente B, et al. Oligoclonal expansions of mucosal T cells in Crohn's disease predominate in NKG2D-expressing CD4 T cells. Mucosal Immunol 2014;7:325-34.

Accepted Manuscript

Legends to figures

Figure 1. Flow chart of one-year postoperative endoscopic follow-up of patients with CD undergoing ileocolonic resection.

Figure 2. Flow cytometry analysis of cytotoxic $CD8^+$ T cells in ileal biopsies and blood of CD patients.

A, C. Representative dot plots showing the frequency of granzyme B- (GzB, top panels) or perforin- (bottom panels) expressing $CD8^+$ T cells from ileal *lamina propria (LP)* (A) and PB leukocytes (C) of CD patients in endoscopic remission (n=12) (*left*) or endoscopic recurrence (n=25) (*right*) at 6 months post-surgery.

B, D. Frequencies of granzyme B- (GzB, *top panels*) or perforin- (*bottom panels*) expressing cells in gated $CD8^+$ T cells from ileal *LP* (B) and blood (D) of CD patients with endoscopic recurrence (n=12) (*black bars*) or endoscopic remission (n=25) (*white bars*) at 6 months post-surgery and in non-CD controls (n=7) (*grey bars*).

Figure 3. Frequency of granzyme B (GzB)- or perforin-expressing $CD8^+$ T cells among total $CD8^+$ T cells in blood (A, B) or ileal *LP* (C, D) among CD patients according to the endoscopic score of severity (Rutgeerts score) at 6 months after ileocolonic resection and in non-CD controls.

Figure 4. Receiver operating characteristics (ROC) curves of granzyme B- (A) and perforin- (B) expressing $CD8^+$ T cells in peripheral blood leukocytes (PBL) and CRP (C) of CD patients in endoscopic recurrence (n=12) or remission (n=25) at 6 months post-surgery. AUC : Area Under the ROC Curve.

Accepted Manuscript

Figure 5. Frequency of granzyme B (GzB)- or perforin-expressing $CD8^+$ T cells among total $CD8^+$ T cells in blood (A, C) or ileal *LP* (B, D) of CD patients in endoscopic remission at 6 months post-surgery according to their subsequent endoscopic status at 12 months post-surgery (n=25).

Accepted Manuscript

Table 1. Characteristics of patients according to their post-surgical endoscopic status.

	CD Patients in endoscopic remission at M12 (n=11)	CD Patients in endoscopic recurrence at M6 (n=12)	CD Patients in endoscopic recurrence at M12 (n=14)	p[1]	Non-CD controls (n=7)
Sex, M (%)	6 (55)	3 (25)	5 (36)	0.51	3 (43)
Age (yrs) mean, (range)	38 (21-75)	36 (24-75)	39 (28-64)	0.87	32 (24-55)
Smoking N (%)	1 (6)	5 (42)	4 (29)	0.01	2 (28)
Disease duration (yrs) mean, (range)	12 (3-28)	10 (4-21)	13 (5-31)	0.73	
Illness behaviour, N (%)					
B1 (non-stricturing, non-penetrating)	1 (9)	0 (0)	0 (0)	0.45	
B2 (stricturing)	6 (55)	9 (75)	9 (64)	0.19	
B3 (penetrating)	4 (36)	3 (25)	5 (36)	0.74	
CD location, N (%)					
L1 (ileal)	1 (9)	4 (33)	4 (29)	0.02	
L2 (colonic)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	
L3 (ileocolonic)	10 (91)	8 (67)	10 (71)	0.17	
History of previous surgery, N (%)	3 (27)	2 (17)	1 (7)	0.62	
Perianal lesions, N (%)	6 (55)	3 (25)	3 (21)	0.72	
Postoperative therapy, N (%)					
No	4 (36)	4 (33)	3 (21)	0.51	
Mesalamine	1 (9)	2 (17)	2 (14)	0.43	
Thiopurines	3 (27)	4 (33)	4 (29)	0.48	
Anti-TNFa :	4 (36)	4 (33)	6 (43)	0.32	
- monotherapy	3 (27)	2 (17)	5 (36)	0.21	
- combotherapy	1 (9)	2 (17)	1 (7)	0.58	

1 Chi square test

Accepted Manuscript

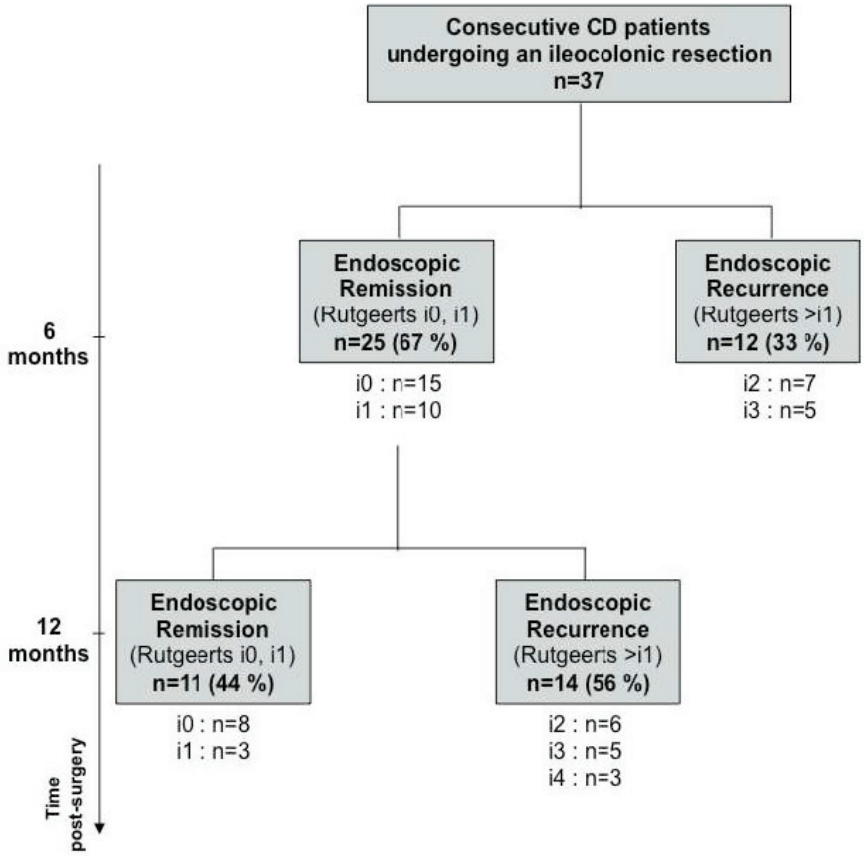
Table 2. Sensitivities, specificities, predictive values and overall accuracies of the frequencies of circulating granzyme or perforin $CD8^+$ T cells and CRP as biomarkers capable to discriminate CD patients with or without postoperative ileal endoscopic recurrence within 6 months post-surgery.

	Granzyme B among $CD8^+$ T cells (cutoff > 45 %)	**Perforin** among $CD8^+$ T cells (cutoff > 45 %)	**CRP** (cutoff > 5 mg/L)
Sensitivity	**63 %**	**63 %**	**43 %**
Specificity	**82 %**	**91 %**	**86 %**
Predictive Positive Value	**56 %**	**71 %**	**69 %**
Predictive Negative Value	**86 %**	**87 %**	**59 %**
Overall Acuracy	**77 %**	**83 %**	**62 %**

Accepted Manuscript

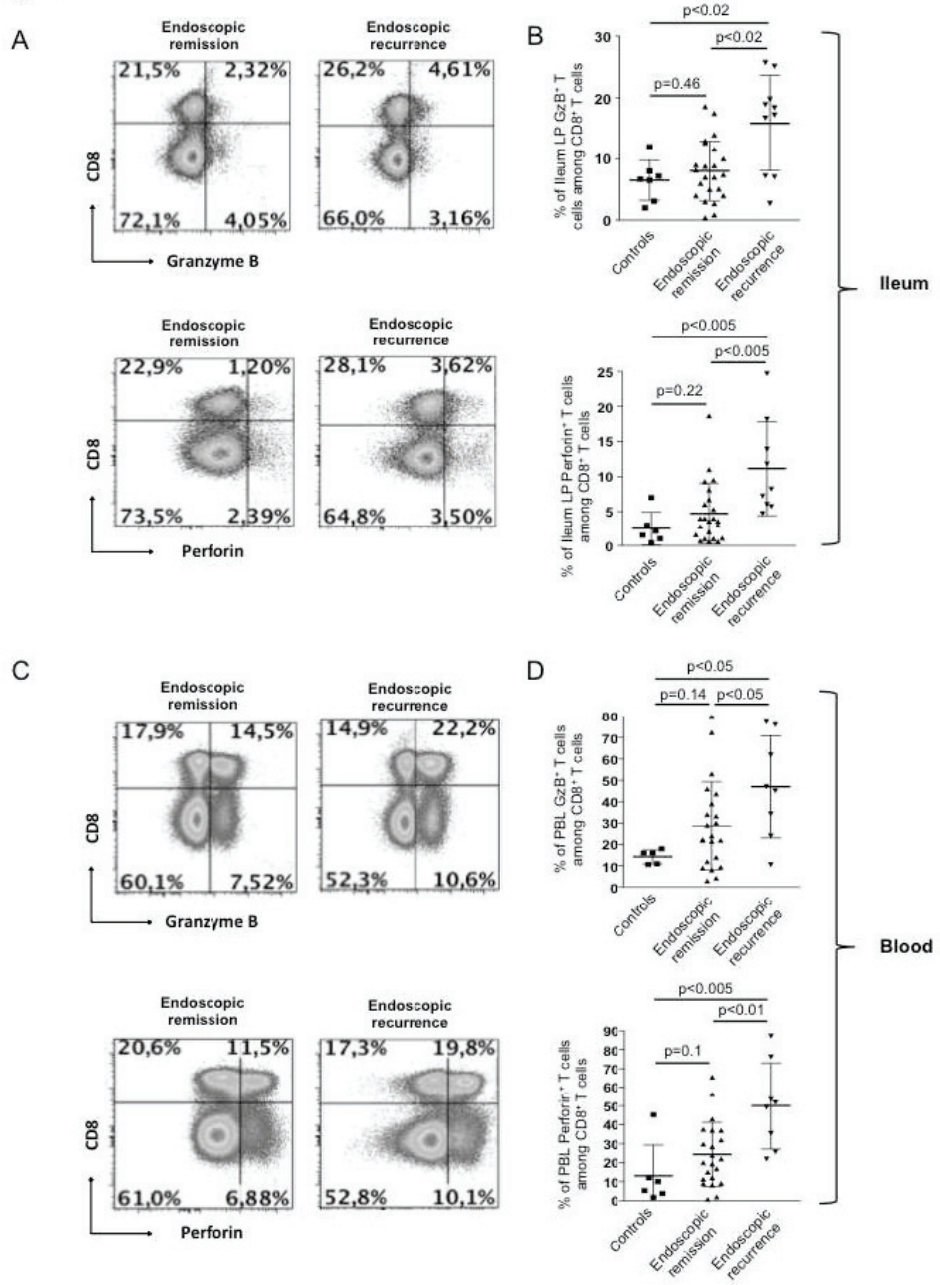
Manuscript Doi : 10.1093/ecco-jcc/jjv211

Figure 1



Downloaded from http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/ by guest on November 21, 2015

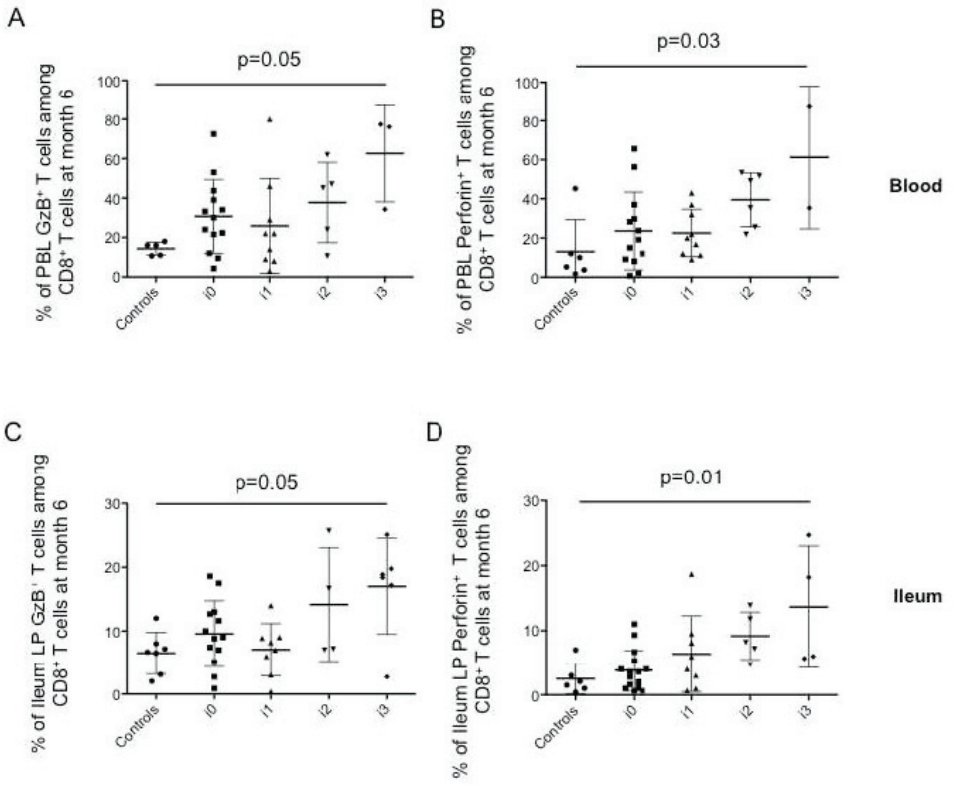
Figure 2



Downloaded from http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/ by guest on November 21, 2015

Manuscript Doi : 10.1093/ecco-jcc/jjv211

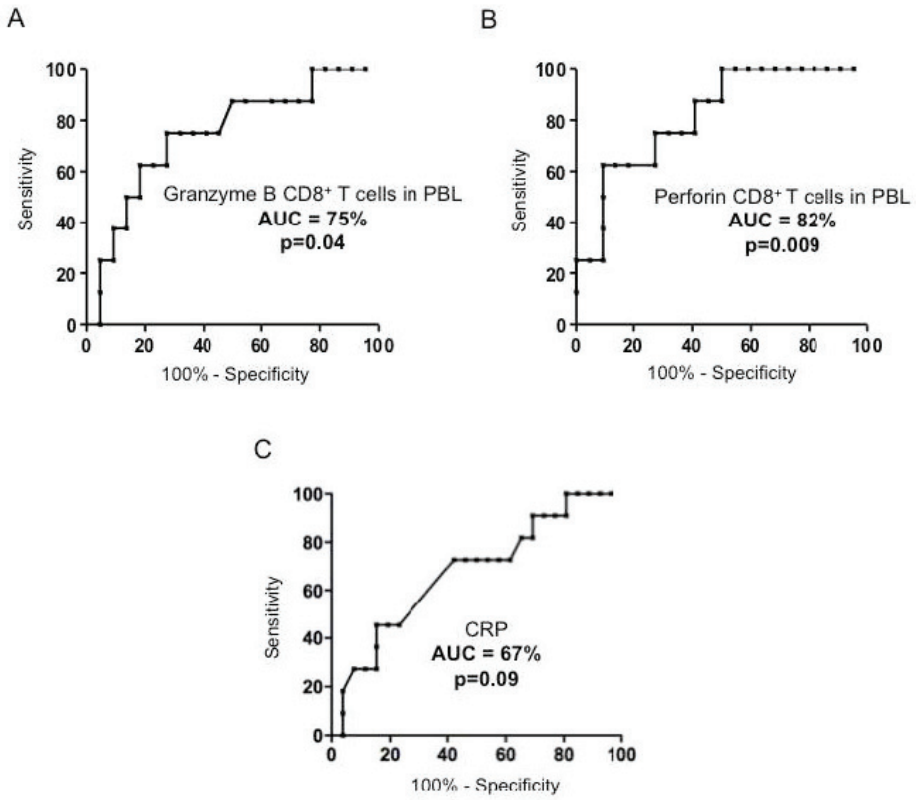
Figure 3



Downloaded from http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/ by guest on November 21, 2015

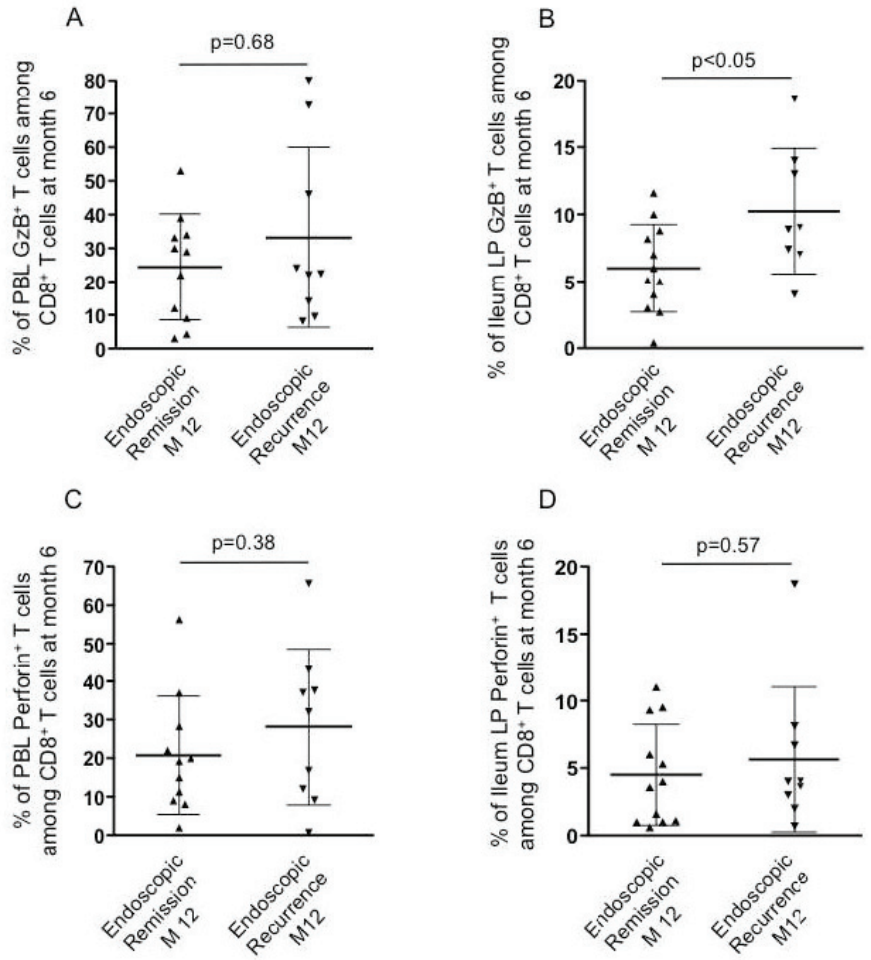
Manuscript Doi : 10.1093/ecco-jcc/jjv211

Figure 4



Downloaded from http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/ by guest on November 21, 2015

Figure 5



Downloaded from http://ecco-jcc.oxfordjournals.org/ by guest on November 21, 2015

PUBLICATIONS ANNEXES n°2

Réponses immunitaires au cours des MICI : Implication de l'axe IL-23/Th17

Gilles Boschetti, Stéphane Nancey, Reem Kanjarawi, Thibaut Almeras,

Karine Ruel, Dominique Kaiserlian et Bernard Flourié

Manuscrit publié dans Hépato-Gastro et Oncologie Digestive en 2012

Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17

Immune responses in inflammatory bowel disease: Contribution of IL-23/Th17 axis

Gilles Boschetti[1)(2)], **Stéphane Nancey**[1)(2)], **Reem Kanjarawi**[2)], **Thibaut Almeras**[2)], **Karine Ruel**[2)], **Dominique Kaiserlian**[2)], **Bernard Flourie**[1)(2)]

[1] Centre hospitalier Lyon-Sud, service d'hépato-gastroentérologie, 69495 Pierre-Bénite, France

[2] Inserm U851 Immunité, Infection, Vaccination, UMS3444, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France

e-mail : <gilles.boschetti@inserm.fr>

Résumé

La découverte d'une nouvelle population de lymphocytes T CD4+ dits « Th17 » capables de produire différentes cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-17, l'IL-21 et l'IL-22 et la mise en évidence du rôle-clé de l'IL-23 dans la survie de ces lymphocytes ont bouleversé le schéma classique de la réponse immunitaire impliquée en cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Une fréquence accrue de lymphocytes (LT) Th17 et des taux élevés d'IL-17 et d'IL-23 dans l'intestin ont en effet été identifiés dans les principaux modèles murins de colite et au cours des poussées de MICI chez l'homme. L'importance de l'axe IL-23/Th17 a été confortée par l'identification récente de l'implication d'un polymorphisme génétique du récepteur de l'IL-23 en cas de maladie de Crohn. L'orientation de la réponse immunitaire vers la génération de LT Th17 est très largement dépendante du microenvironnement tissulaire en cytokines puisque la présence concomitante de TGFβ et d'IL-6 favorise la différenciation de lymphocytes T CD4+ naïfs en cellules produisant l'IL-17 tandis que le TGFβ seul stimulera préférentiellement leur différenciation en LT régulateurs. L'efficacité chez l'animal et des données prometteuses chez l'homme de nouvelles biothérapies bloquant l'axe IL-23/Th17 ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques en cas de MICI.

Mots clés : interleukine-17, interleukine-23, Th17, maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, réponses immunes

Abstract

The recent discovery of a novel subset of T cells called T helper (Th)17 producing various proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-17, IL-21 and IL-22 and the involvement of IL-23 in the survival of Th17 cells have changed the usual paradigm of the immune responses involved in various inflammatory disorders, especially in inflammatory bowel diseases (IBD). An increased frequency of Th17 and high concentrations of IL-17 and IL-23 in the intestine have been identified in most murine colitis models and during active IBD in humans. These data were strengthened by the identification of a genetic polymorphism of the IL-23 receptor in Crohn's disease. The switch of the immune response into a Th17 profile, under control of the transcription factor RORγt, is highly dependent of cytokines in the tissue microenvironment since the presence simultaneously of TGFβ and IL-6 will preferentially favour the differentiation of naïve CD4+ T cells into Th17 cells whereas the presence of TGFβ alone will favour the generation of regulatory T cells. These recent data illustrate the functional plasticity of some T

HEPATO–GASTRO ***et Oncologie digestive***

Tirés à part : G. Boschetti

Pour citer cet article : Boschetti G, Nancey S, Kanjarawi R, Almeras T, Ruel K, Kaiserlian D, Flourie B. Réponses immunitaires aucours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépato Gastro* 2012 ; 19 : 446-454. doi : 10.1684/hpg.2012.0742

doi : 10.1684/hpg.2012.0742

cell subsets. The efficacy in animals and promising clinical data in humans of these novel biotherapies targeting the IL-23/Th17 axis have opened new avenues in the therapeutic fields of IBD.

Key words: interleukin-17, interleukin-23, Th17, Crohn's disease, ulcerative colitis, immune responses

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), résultent d'une réponse immunitaire inadaptée vis-à-vis de la flore intestinale chez un individu génétiquement prédisposé. Cette perte de tolérance vis-à-vis de la flore commensale autologue est à l'origine [1] d'une réponse inflammatoire médiée, notamment par des lymphocytes T (LT) et des cytokines pro-inflammatoires et/ou d'un défaut du contrôle de la réponse immunitaire par les lymphocytes T régulateurs (LTreg) [2]. Les LT, en particulier les LT CD4$^+$ auxiliaires (dits « T helper » (Th)), produisent différents types de cytokines et jouent un rôle clé dans l'initiation et la perpétuation de l'inflammation et des lésions intestinales. Classiquement la MC est définie par une réponse excessive des LT CD4$^+$ de type Th1 qui produisent de grandes quantités d'interféron (IFN)-γsous le contrôle de l'interleukine 12 (IL-12), tandis que la RCH est plutôt associée à un profil de cytokines de type Th2 avec un excès de production d'IL-4 et d'IL-13 [2]. Plus récemment, ce concept a été enrichi par la description d'autres populations de LT, les unes douées de fonctions régulatrices (LTreg) et les autres ayant des fonctions pro-inflammatoires (LT CD4$^+$ Th17) dont l'expansion est assurée par l'IL-23. Ce partenariat entre une cytokine et une sous-population lymphocytaire est appelé l'axe IL-23/Th17. Dans cette mini-revue, nous nous focaliserons essentiellement sur l'implication des LT CD4$^+$ Th17 et sur le rôle de l'IL-23 au cours des MICI ; en effet des avancées récentes portant sur l'axe IL-23/Th17 ont fait évoluer les concepts physiopathologiques de l'inflammation intestinale et de son contrôle et font entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Lymphocytes T auxiliaires et réseau de cytokines

Décrits par Mosmann *et al.* en 1986 [3], deux profils distincts de sécrétion de cytokines par les LT CD4$^+$ auxiliaires caractérisent classiquement les réponses immunes et inflammatoires. Un antigène est présenté par des cellules dites présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques à des LT naïfs au niveau de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; ceux-ci s'activent (c'est-à-dire deviennent fonctionnels), prolifèrent et se différencient en LT CD4$^+$ auxiliaires de type 1 (Th1) (impliqués dans l'immunité cellulaire et la clairance des pathogènes intracellulaires) ou de type 2 (Th2) (impliqués dans les réponses à médiation humorale, dans l'allergie et la défense contre certains pathogènes extracellulaires). Les LT Th1 produisent de grandes quantités d'IL-2 et d'interferon-γ (IFN-γ) en réponse à une stimulation par l'IL-12 produite par les cellules dendritiques. Les LT Th2 produisent de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et sont stimulés par l'IL-4. Les facteurs de transcription Tbet (T-box expressed in T cells) et STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) contrôlent la différenciation des LT naïfs vers un profil de cytokines Th1 tandis que STAT6 et GATA 3 (Trans-activating T-cell-specific transcription factor) sont impliqués dans leur orientation vers un profil Th2. La différenciation en Th1 est inhibée par l'IL-4 tandis que celle en Th2 est bloquée par l'IFNγ.

Malgré l'utilité de cette classification dichotomique simple pour caractériser les réponses inflammatoires, il est apparu ultérieurement que certains LT ne pouvaient être catégorisés ni en Th1 ni en Th2. Au début des années 1990, une nouvelle population de LT, appelés LT régulateurs, impliqués dans la tolérance, la suppression des réponses immunitaires et le contrôle de l'inflammation a été décrite [4]. L'expression du facteur de transcription Foxp3, de l'IL-35 et de la protéine du syndrome Wiskott-Aldrich est requise pour leur différenciation et leur fonction. Ces LT régulateurs ont des propriétés immunorégulatrices et anti-inflammatoires qui s'opèrent par la sécrétion de cytokines comme l'IL-10, le TGFβ et sont capables de contrôler la prolifération des LT activés [5]. En 2005, la description d'une nouvelle sous-population de LT auxiliaires appelés Th17, distincte des LT Th1 ou Th2 et caractérisée par sa capacité à sécréter de l'IL-17, a bouleversé le schéma de la réponse inflammatoire induite par les LT auxiliaires [6] *(figure 1)*. On sait aujourd'hui que les LT Th17 sont impliqués dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires aussi variées que l'asthme, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, l'uvéite, le lupus érythémateux disséminé, le rejet de greffe et les MICI [7].

> ***« Les LT Th17 sont impliqués dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires aussi variées que l'asthme, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, l'uvéite, le lupus érythémateux disséminé, le rejet de greffe et les MICI »***

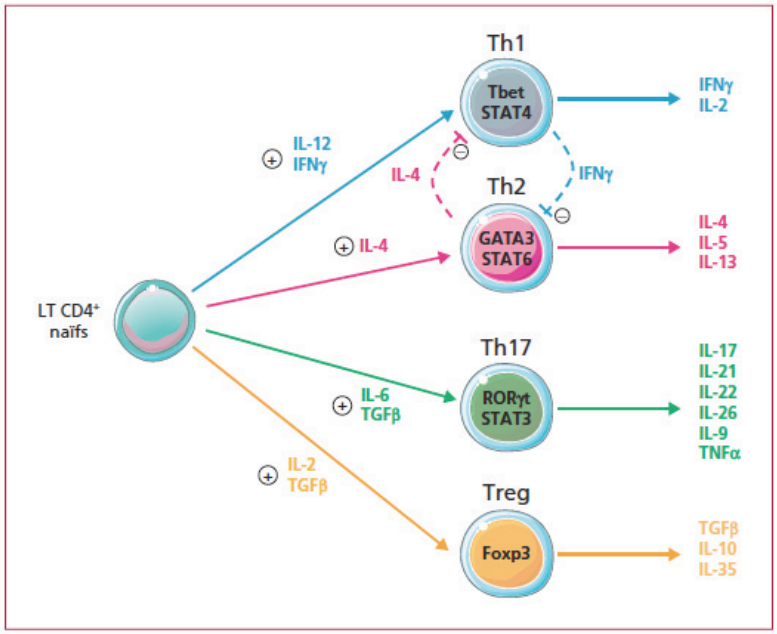


Figure 1. Capacité de différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires (« helper ») de type Th1, Th2, Th17 et en lymphocytes T régulateurs et profils respectifs de sécrétion de cytokines.

Lymphocytes Th17 : définition, différenciation et fonctions effectrices

Les LT CD4$^+$ naïfs exposés à un microenvironnement riche en IL-6 et en TGFβ peuvent se différencier en LT Th17 en réponse à une stimulation par un antigène et sécréter alors de l'IL-17, de l'IL-21, du Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) et de l'IL-22. La liaison du TGFβ avec son récepteur spécifique sur le LT naïf induit l'activation du facteur de transcription SMAD *(similar mothers against decapentaplegic)* et celle de l'IL-6 induit l'activation du facteur STAT3 conduisant alors à la stimulation du facteur de transcription RORγt *(retinoic acid related orphan receptor γt)* qui est à l'origine de la différenciation des LT naïfs en LT Th17. Le TGFβ joue un rôle clé dans la différenciation des LT en Th17 ou en cellules immuno-régulatrices. En effet, une faible concentration de TGFβ dans le microenvironnement tissulaire, surtout en présence d'IL-6, polariserait les LT CD4$^+$ naïfs vers une différenciation Th17 alors que de fortes concentrations de TGFβ favoriseraient plutôt leur différenciation en cellules immuno-régulatrices (LTreg). Chez les souris invalidées pour le TGFβ qui développent rapidement des pathologies auto-immunes variées, l'absence de LT régulateurs Foxp3$^+$ et de LT Th17 RORγt$^+$ contraste avec l'excès de cellules produisant des cytokines Th1. Ceci illustre l'importance et la complexité du TGFβ sur la différenciation des LT auxiliaires.

À la différence des lymphocytes Th1 et Th2 dont la différenciation dépend de la production de leurs propres cytokines, notamment l'IFNγ et l'IL-4 respectivement, la différenciation des LT Th17 ne requièrent pas la présence d'IL-17. Cette cytokine, aussi appelée IL-17A appartient à une famille qui compte plusieurs isoformes comme l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D (ou IL-27), l'IL-17E (ou IL-25) et l'IL-17F [8]. Son expression dépend de facteurs de transcription appelés RORγt, RORα ou STAT1. Il existe de nombreuses boucles d'auto-régulation des cytokines et des médiateurs solubles intervenant dans la différenciation Th17. Ainsi, les cytokines Th1 et/ou Th2 inhibent l'orientation vers un profil Th17 tandis que l'IL-17 bloque partiellement la différenciation en LT Th1 ou Th2 [9]. Les LT Th17 peuvent également produire de l'IFNγ qui inhibe la voie Th17, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif. De plus, l'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A, qui participe au développement des LT régulateurs dans l'intestin, exercerait un rétrocontrôle négatif sur la sous-population des lymphocytes Th17 [10]. Ainsi, la nature de l'antigène, la présence de cytokines dans le microenvironnement tissulaire, la qualité des interactions intercellulaires, en particulier *via* les molécules de co-stimulation, constituent

autant d'éléments déterminants dans l'orientation d'une réponse immune des LT naïfs vers un profil de cytokines donné Th1, Th2, Treg ou Th17.

> *« L'interleukine 23 permet l'expansion et la stabilisation des lymphocytes Th17 »*

L'interleukine-23 (IL-23) joue un rôle important dans la voie Th17 puisqu'elle permet l'expansion des LT Th17 et le maintien de ce type de réponses immunitaires. Néanmoins, les étapes précoces conduisant à la différenciation Th17 sont indépendantes de la présence ou non d'IL-23. Secondairement, l'expansion des LT Th17 et leur expression à la surface du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) est assurée par la sécrétion autocrine d'IL-21 conduisant ainsi à une amplification de la réponse *(figure 2)*
À l'état normal, les lymphocytes Th17 sont présents dans la muqueuse intestinale chez la souris comme chez l'homme. Chez la souris, la microflore intestinale contribue à la différenciation et au recrutement des LT Th17 dans la *lamina propria* de l'intestin [11]. Chez l'homme, certaines cellules dendritiques, stimulées par des ligands du récepteur intracytoplasmique de reconnaissance des bactéries NOD2 (comme le muramyl dipeptide, par exemple), contribueraient à la différenciation des LT en LT Th17 [12]. Les LT Th17 participent dans les muqueuses à la défense anti-infectieuse, notamment contre certaines bactéries (*Klebsiella pneumoniae, Salmonella, Bordetella, Citrobacter, Mycoplasma pneumoniae*), contre les levures ou les champignons filamenteux *(Candida, Aspergillus)*. Ils stimulent ainsi l'activation et le recrutement des polynucléaires neutrophiles et favorisent la sécrétion par les cellules épithéliales de peptides anti-microbiens (défensines) [13]. Une activation excessive et incontrôlée des LT Th17 conduit à des désordres auto-immuns, inflammatoires à l'origine de lésions tissulaires de différents organes, comme en atteste l'atteinte inflammatoire multiviscérale observée chez les souris transgéniques qui surexpriment l'IL-17. Les cytokines Th17 stimulent la

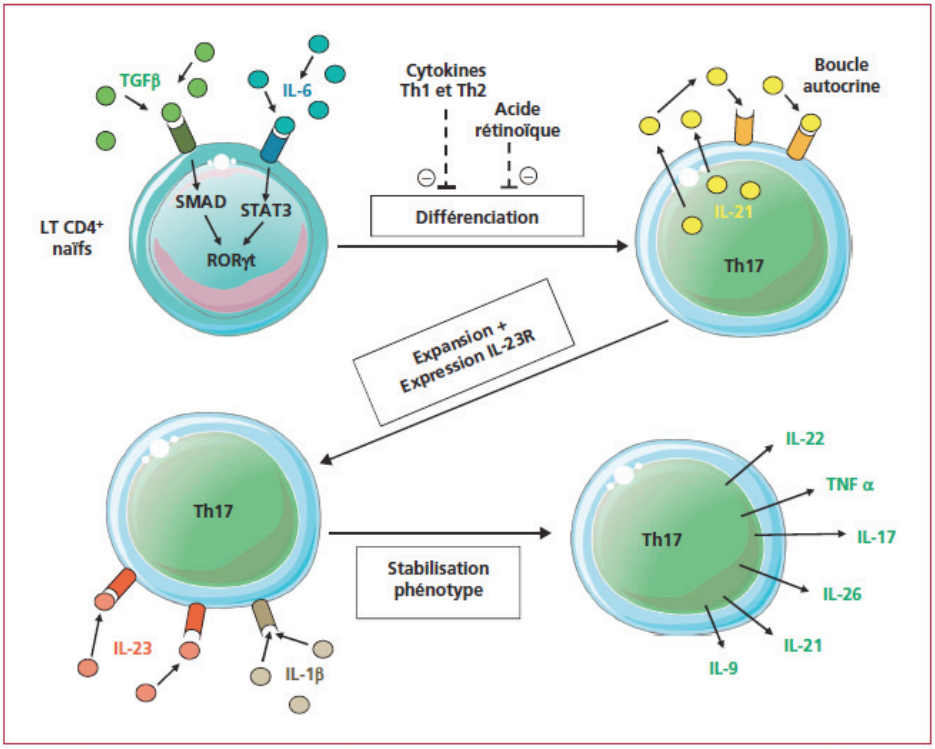


Figure 2. Voies de régulation de l'axe IL-23/Th17. La présence dans le microenvironnement d'IL-6 et de TGFβ stimule la différenciation des LT naïfs en LT Th17 qui vont s'expandre par une boucle autocrine via l'IL-21 et être stabilisés via l'IL-23.

production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNFα, GMCSF), de chimiokines (IL-8, CXCL1, CXCL8, MCP-1, MIP-3α), induisent l'activation de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et de métalloprotéinases [14] par différents types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales, etc.) et participent à la maturation des cellules dendritiques. À côté de leurs propriétés pro-inflammatoires, certains travaux ont montré que les LT Th17 réduisent l'expression de chimiokines (CL10, CXCL11) ou de récepteurs de chimiokines (CCR5) sur certaines lignées épithéliales coliques humaines [15] *(figure 3)*. Des données récentes ont identifié chez l'homme, dans le sang circulant et les organes lymphoïdes secondaires, l'existence de LT, exprimant à la fois des marqueurs de différenciation des LT régulateurs (expression du facteur Foxp3) et la cytokine IL-17 en réponse à une stimulation *in vitro* par de l'IL-1, IL-21 et IL-23 [16]. Esplugues *et al.* ont décrit en ce sens chez la souris la capacité de LT Th17 à acquérir des propriétés régulatrices spécifiquement au niveau du duodénum [17]. D'autres travaux ont montré que certains LT régulateurs peuvent se convertir en LT Th17 sous l'influence de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 [18]. Enfin, plusieurs équipes ont identifié des LT capables de produire à la fois des cytokines de type Th1 et Th17, notamment au cours de la MC [19]. Ces données démontrent que les LT auxiliaires possèdent une « plasticité fonctionnelle » et illustrent le caractère potentiellement transitoire de certaines sous-populations de LT auxiliaires et le fait que leur différenciation soit un processus dynamique [20].

> *« Les LT auxiliaires possèdent une « plasticité fonctionnelle » : ils peuvent produire différentes cytokines en fonction des moments et de l'environnement auquel ils sont soumis »*

Lignée Th17 et MICI

L'importance des LT Th17 dans les MICI est illustrée par leur rôle dans la plupart des modèles animaux d'inflammation intestinale. Ainsi des taux élevés d'IL-17 ont été mis en évidence au cours de la colite induite chez la souris par l'administration intrarectale d'un haptène, le 2,4,6 trinitrobenzène sulfonate (TNBS). Au contraire, les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-17 sont protégées et ne développent pas ce type de colite [21]. De plus, la sévérité de l'inflammation intestinale est réduite chez les souris traitées par une protéine de fusion (IgG1 anti-IL-17RA) qui bloque la voie de signalisation intracellulaire induite par l'IL-17. Enfin, le transfert adoptif de LT $CD4^+$ spécifiques d'antigènes de la flore intestinale et produisant des cytokines Th17 à partir de donneurs C3H/HeJBir à des

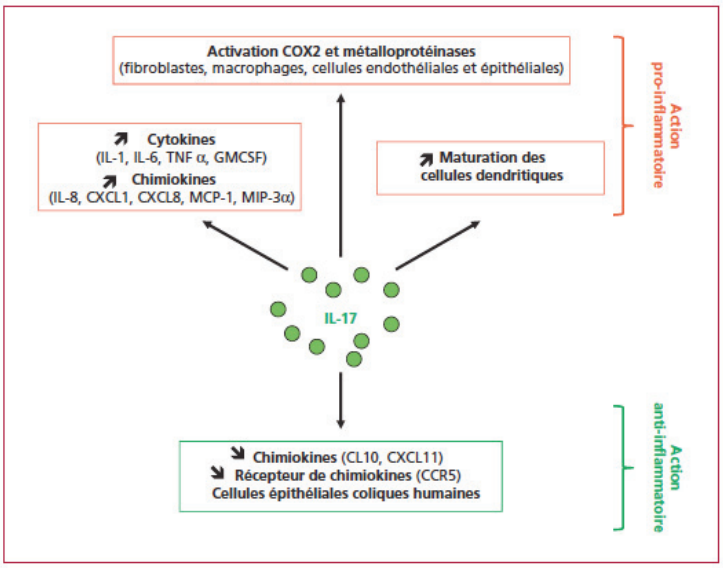


Figure 3. Dualité fonctionnelle anti et pro-inflammatoire de l'IL-17.

souris immunodéprimées SCID *(severe combined immunodepression)* conduit à une colite plus sévère que le transfert des mêmes LT $CD4^+$ mais produisant des cytokines Th1 suggérant la forte participation des LT Th17 dans ce modèle de colite [22]. Outre les LT $CD4^+$, les LT $CD8^+$ peuvent aussi produire de l'IL-17 et être responsables d'inflammation et de lésions vis-à-vis de l'intestin. Tajima *et al*. ont récemment montré que le transfert de LT $CD8^+$ naïfs produisant de l'IL-17 à des souris $RAG^{-/-}$ *(recombinase activating gene)*, déficientes en lymphocytes T et B, s'accompagnait d'une expansion des LT $CD8^+$ dans les ganglions drainant l'intestin et de la survenue d'une colite sévère [23].

Chez l'homme, la première étude impliquant les Th17 dans les MICI a rapporté des niveaux élevés de LT Th17 produisant de l'IL-17 dans le sérum et la *lamina propria* de l'intestin inflammatoire chez des patients atteints de MC et de RCH en poussée comparativement à ceux observés chez des patients atteints de colite ischémique [24]. Le nombre de cellules exprimant le facteur RORγt, essentiel à la différenciation et à la fonction Th17, est aussi accru dans l'intestin des patients présentant une MC [24, 25]. Les concentrations d'autres cytokines de la famille Th17 comme l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-26 sont également élevées dans l'intestin des patients atteints de MICI [24]. Récemment, le CD161 et le NKG2D ont été identifiés comme deux marqueurs de surface des LT Th17 produisant de l'IL-17 au cours de la MC en poussée [26, 27].

Toutefois, la contribution des LT Th17 dans la pathogénie des MICI est complexe et reste actuellement mal connue. Ainsi, tandis que la plupart des cytokines sécrétées par les LT Th17 ont une activité pro-inflammatoire, certaines pourraient limiter le processus inflammatoire. L'IL-21 amplifie la réponse Th17 par une boucle autocrine et participe ainsi à l'aggravation et à la pérennisation de l'inflammation intestinale en stimulant non seulement la voie Th1, la production de métalloprotéinases par les fibroblastes mais aussi la sécrétion par l'épithélium colique de chimiokines comme MIP3α qui favorise le recrutement des LT activés vers l'intestin [28]. L'IL-22, également augmentée dans la *lamina propria* des patients atteints de MC, stimule la sécrétion de nombreuses cytokines inflammatoires, en particulier l'IL-8 et le TNFα [29]. L'IL-26 produite par les LT Th17 semble avoir un effet délétère au cours de la MC en limitant la réparation tissulaire dans l'intestin et donc la cicatrisation [30]. Enfin, les LT Th17 produisent de l'IL-9 dont le rôle au cours des MICI n'est pas encore totalement élucidé [31]. La complexité de l'implication de la voie Th17 dans les MICI est illustrée chez la souris, par l'effet paradoxal du blocage de l'IL-17F ou de l'IL-17A qui respectivement réduit ou aggrave la sévérité de la colite induite par l'ingestion de dextran sodium sulfate (DSS) [32]. La « dualité » fonctionnelle des cytokines Th17 est aussi révélée par l'IL-22 dont l'action pro-inflammatoire a été exposée précédemment et qui stimule également l'expression de facteurs protecteurs (sécrétion de peptides antimicrobiens (défensines) par les cellules de Paneth, migration et renouvellement des cellules épithéliales) contribuant ainsi au maintien de la barrière intestinale [29] *(figure 4)*.

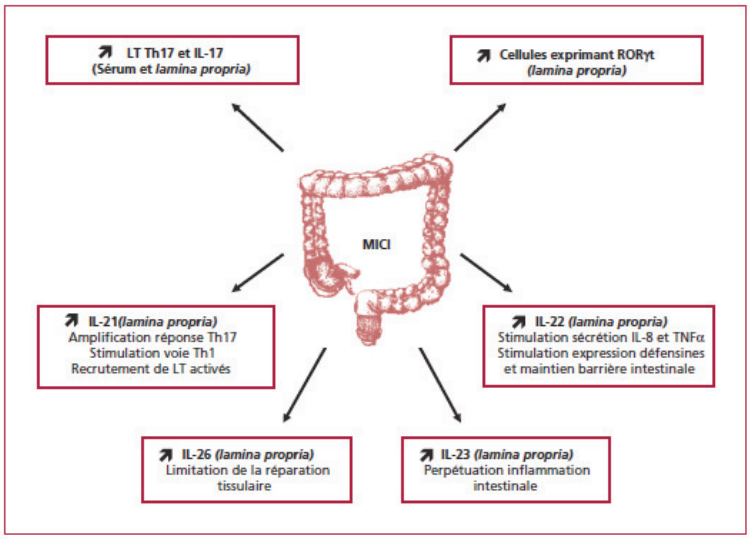


Figure 4. Implications des différentes cytokines de l'axe IL-23/Th17 dans les MICI.

IL-23 et réponse Th17

L'IL-23, découverte par Oppmann *et al.* en 2000, est une cytokine hétérodimérique composée d'une chaine commune avec l'IL-12 (sous-unité p40) et d'une sous-unité spécifique p19 [33]. L'IL-23 est préférentiellement sécrétée par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales et son expression est modulée par plusieurs facteurs de transcription (NFκB, SMAD3, ATF2). L'IL-23 est avant tout un facteur de survie et de pérennisation des LT de type Th17. Les actions de l'IL-23 pourraient s'expliquer simplement par son rôle sur les LT Th17, mais également sur les Treg voire par un rôle propre. L'implication de l'IL-23 dans l'inflammation intestinale est illustrée chez la souris transgénique qui surexprime la sous-unité p19, spécifique de l'IL-23, par le développement d'une inflammation multiviscérale prédominant au niveau du tube digestif. Dans le modèle murin de colite induite par le transfert de cellules T $CD4^+$ naïves à des souris $RAG^{-/-}$ infectées par *Helicobacter hepaticus*, la sévérité de la colite était réduite si les souris receveuses étaient aussi invalidées pour les sous-unités p19 ou p40 de l'IL-23, alors que l'invalidation de la sous-unité p35 (spécifique de l'IL-12) ne modifiait pas la gravité de la colite [34]. Chez les souris déficientes en IL-10 qui développent une ileo-colite spontanée, l'inflammation intestinale était augmentée en cas d'injection d'IL-23 recombinante ou d'invalidation de l'IL-12 (notamment de la sous-unité p35) mais abrogée en cas d'invalidation de l'IL-23 (notamment de la sous-unité p19) [35]. Très récemment, des données chez l'animal montrent que la présence d'IL-23 pourrait réduire la fréquence de LTreg exprimant Foxp3, dans l'intestin et participer ainsi au défaut de contrôle de l'inflammation [36].

La découverte de l'IL-23 a conduit de nombreuses équipes à revisiter la contribution respective de l'IL-12 et celle de l'IL-23 dans différents modèles de pathologies « Th1 » et les résultats bénéfiques des traitements par anticorps monoclonaux anti-IL-12 p40. Aussi, les LT Th17 *via* l'IL-23 pourraient jouer un rôle déterminant dans l'inflammation intestinale initialement supposée médiée par la voie classique Th1 via l'IL-12. Toutefois, certaines études à partir d'autres modèles de colite rendent plus complexe l'interprétation du rôle de l'IL-23. Ainsi, les souris invalidées pour l'IL-23 (p19) surexpriment l'IL-12 et développent une colite au TNBS plus sévère que les souris normales [37]. L'absence d'IL-23 pourrait alors conduire à une augmentation réactionnelle de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. Ces données soulignent la complexité, le pléiotropisme et l'interdépendance du réseau de cytokines. En cas de MICI, des taux élevés d'IL-23 dans l'intestin ont été décrits au cours des poussées [38]. Le nombre de cellules qui produisent l'IL-23 (macrophages et cellules dendritiques) est augmenté dans l'intestin de patients atteints de MC. Une étude génétique nord-américaine a identifié le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) comme un gène de susceptibilité au cours de la MC [39]. Cette étude a mis en évidence des polymorphismes du gène codant pour l'IL-23R. Des variations d'une seule paire de base entre individus sont associées pour certaines d'entre elles à une réduction du risque de développement d'une MC, en particulier pour le variant Arg 381 Gln (chromosome 1p31) alors que d'autres augmentent la probabilité de survenue d'une MC. Ces mutations pourraient conduire à une perte de fonction de certaines voies de signalisation activées par le récepteur à l'IL-23 et ainsi réduire le risque de développer une MC. Plusieurs travaux ont également montré l'implication de mutations des gènes codant pour l'IL-17 dans la susceptibilité à développer une MICI [40]. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent le rôle de ces polymorphismes dans le développement des MICI restent à préciser.

> *« Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent le rôle de ces polymorphismes dans le développement des MICI restent à préciser »*

Perspectives thérapeutiques

L'axe IL23/Th17 constitue la cible de nombreuses thérapeutiques en cours d'évaluation en cas de MICI. La neutralisation de la sous-unité p40 commune à l'IL-23 et l'IL-12 par des anticorps monoclonaux a montré un effet bénéfique en cas de colite chez la souris [22, 35]. Chez l'homme, une étude a montré un avantage en termes de rémission et réponse clinique chez des patients atteints de MC active traités par un anticorps monoclonal IgG1 anti-p40 (ABT-874, Abbott) [41]. En 2008, un essai thérapeutique randomisé testant le traitement par anticorps monoclonal humanisé (IgG1) anti-p40 (ustekinumab, Centocor), a montré un bénéfice chez des patients ayant une MC modérée à sévère dans le sous-groupe avec CRP élevée [42]. L'efficacité de l'ustekinumab était également plus importante dans le sous-groupe de patients ayant reçu au préalable un traitement par infliximab. Au cours de cet essai la tolérance de l'ustekinumab était satisfaisante. Les résultats de l'essai CERTIFI comparant chez 526 patients avec une MC modérée à sévère l'efficacité de l'ustekinumab (testé aux doses de 1, 3 ou 6 mg/kg) à un placebo ont été rapportés par Feagan *et al.* lors du dernier UEGW à Stockholm. Les taux de rémission à la semaine 6 étaient similaires quel que soit le groupe traité (36 %) contre 23 % dans le groupe placebo ($p > 0,05$). Dans ce travail, la moitié des patients étaient en échec des anti-TNFα.

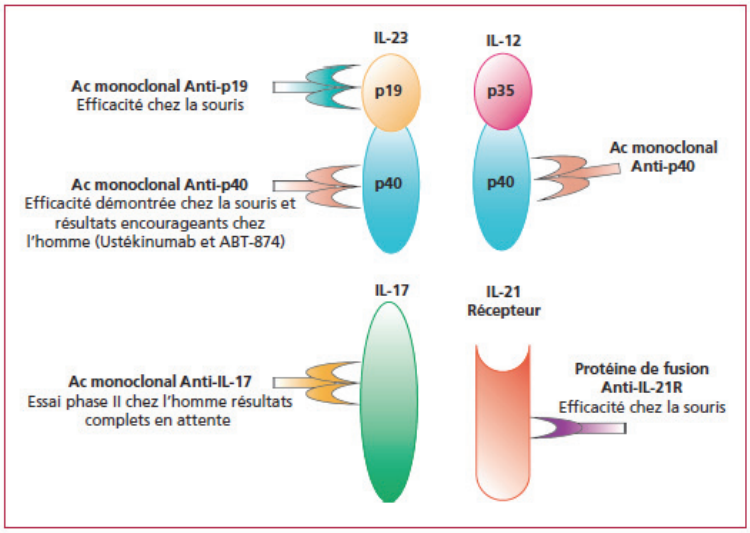


Figure 5. Cibles thérapeutiques de l'axe IL-23/Th17 en cours de développement dans les MICI.

L'utilisation d'anticorps ciblant spécifiquement l'IL-23 (sous-unité p19) semble aussi prometteuse dans certains modèles animaux de colite [22, 34] mais reste à démontrer chez l'homme. En ce qui concerne les cytokines produites par les LT Th17, le blocage du récepteur de l'IL-21 par une protéine de fusion améliore la colite induite par le DSS [43]. Enfin, Hueber *et al.* ont rapporté en 2011 les résultats d'un essai de phase II testant l'efficacité d'un traitement par un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-17A (secukinumab, Novartis) chez des patients présentant une MC modérée à sévère. Le secukinumab était inefficace voire même susceptible d'aggraver la poussée de MC dans certains cas *(figure 5)*. Ces données contrastent avec l'efficacité observée du secukinumab au cours du psoriasis, de la polyarthrite rhumatoïde ou des uvéites non-infectieuses mettant encore en évidence le rôle complexe et probablement unique de l'IL-17 et des LT Th17 au cours des MICI par rapport aux autres maladies auto-immunes.

Conclusion

Le schéma classique des voies Th1/Th2 des réponses immunes au cours des MICI qui prévalait jusque-là, avec une prédominance Th1 pour la MC et Th2 pour la RCH, a été reconsidéré depuis la découverte des LT Th17. Les cellules Th17 contribuent à l'inflammation digestive observée dans les deux formes de MICI mais en particulier au cours de la MC. La plupart des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les LT Th17 sont augmentées lors des poussées de MICI aussi bien dans le sérum que dans la *lamina propria*. Le rôle prépondérant de l'axe IL-23/Th17 dans l'immunopathologie des MICI a été confirmé par l'identification récente de polymorphismes génétiques notamment du récepteur à l'IL-23 impliqués dans la susceptibilité envers la MC et la RCH. De nombreux modèles murins ont conforté l'implication des cellules Th17 dans l'inflammation colique et permis d'isoler des populations de lymphocytes aux caractéristiques phénotypiques mixtes Th1/Th17 et Th17/Treg. La différenciation du LT $CD4^+$ (*i.e.* Th1, Th2, Th17 ou Treg) voire même ses capacités effectrices ou régulatrices évoluent probablement en fonction de l'environnement auquel il est soumis. Les résultats prometteurs des anticorps spécifiques dirigés contre la sous-unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23 (ciblant donc à la fois les voies Th1 et Th17) dans l'induction

Take home messages

- Des concentrations élevées d'IL-17 et d'IL-23 ont été mesurées dans la muqueuse intestinale en cas de MICI en poussée.
- Un polymorphisme génétique du récepteur à l'IL-23 a été identifié au cours de la maladie de Crohn.
- La neutralisation de l'IL-23 a révélé un effet thérapeutique bénéfique dans les modèles animaux de colite et chez l'homme dans la maladie de Crohn.

et le maintien d'une rémission au cours de la MC ouvrent la voie à de nouvelles stratégies de traitement.

Conflits d'intérêts : aucun

Références

Les références importantes apparaissent en gras

1. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995 ; 102 : 448-55.

2. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007 ; 448 : 427-34.

3. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 ; 136 : 2348-57.

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

5. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006 ; 212 : 256-71.

6. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 1123-32.

7. Furuzawa-Carballeda JM, Vargas-Rojas I, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 2007 ; 6 : 169-75.

8. Hundorfean GM, Neurath F, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011 ; 18 : 180-6.

9. Gocke ARP, Cravens D, Ben LH, *et al.* T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* 2007 ; 178 : 1341-8.

10. Mucida D, Park Y, Kim G, *et al.* Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007 ; 317 : 256-60.

11. Atarashi K, Nishimura I, Shima JT, *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008 ; 455 : 808-12.

12. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007 ; 27 : 660-9.

13. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996 ; 183 : 2593-603.

14. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, *et al.* Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007 ; 19 : 362-71.

15. Lee JW, Wang P, Kattah MG, *et al.* Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 2008 ; 181 : 6536-45.

16. Voo KS, Wang YH, Santori FR, *et al.* Identification of IL-17-producing FOXP3 + regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 4793-8.

17. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, *et al.* Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011 ; 475 : 514-8.

18. Xu S, Kitani A, Fuss I, *et al.* Cutting edge: regulatory T cells induce CD4 +CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007 ; 178 : 6725-9.

19. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, *et al.* Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1736-45.

20. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011 ; 140 : 1756-67.

21. Zhang Z, Zheng M, Bindas J, *et al.* Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006 ; 12 : 382-8.

22. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, *et al.* Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 2359-70.

23. Tajima M, Wakita D, Noguchi D, *et al.* IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 1019-27.

24. Fujino S, Andoh A, Bamba S, *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003 ; 52 : 65-70.

25. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, *et al.* Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008 ; 14 : 437-45.

26. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 525-34.

27. Pariente B, Mocan I, Camus M, *et al.* Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2011 ; 141 : 217-26.

28. Monteleone G, Monteleone I, Fina D, *et al.* Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005 ; 128 : 687-94.

29. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko M, *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008; 14 : 282-9.

30. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, *et al.* The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009 ; 58 : 1207-17.

31. Nowak E, Weaver CT, Turner H, *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 1653-60.

32. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, *et al.* Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immuno I*2004 ; 110 : 55-62.

33. Oppmann B, Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000 ; 13 : 715-25.

34. Hue S, Ahern P, Buonocore S, *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2473-83.

35. Yen D, Cheung J, Scheerens H, *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1310-6.

36. Izcue A, Hue S, Buonocore S, *et al.* Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008 ; 28 : 559-70.

37. Becker C, Dornhoff H, Neufert C, *et al.* Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 2006 ; 177 : 2760-4.

38. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, *et al.* Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006 ; 12 : 9-15.

39. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006 ; 314 : 1461-3.

40. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, *et al.* The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2008 ; 28 : 44-9.

41. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, *et al.* Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2069-79.

42. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, *et al.* A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monodonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 1130-41.

43. Fina D, Sarra M, Fantini MC, *et al.* Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology* 2008 ; 134 : 1038-48.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham C, Cho JH. Bugging of the intestinal mucosa. N Engl J Med. 2007;357:708-10.

Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2011;140:1729-37.

Abubakar I, Myhill DJ, Hart AR, Lake IR, Harvey I, Rhodes JM, Robinson R, Lobo AJ, Probert CS, Hunter PR. A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease--further investigation of the possible role of Mycobacterium avium paratuberculosis. Am J Epidemiol. 2007;165:776-83.

Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko HJ, Böck J, Martinez-Naves E, Glickman JN, Tschurtschenthaler M, Hartwig J, Hosomi S, Flak MB, Cusick JL, Kohno K, Iwawaki T, Billmann-Born S, Raine T, Bharti R, Lucius R, Kweon MN, Marciniak SJ, Choi A, Hagen SJ, Schreiber S, Rosenstiel P, Kaser A, Blumberg RS. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. Nature 2013; 503:272-6.

Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. Immunity 2010;33:279-88.

Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. PLoS One 2011;6:e24226.

Allez M, Tieng V, Nakazawa A, Treton X, Pacault V, Dulphy N, Caillat-Zucman S, Paul P, Gornet JM, Douay C, Ravet S, Tamouza R, Charron D, Lémann M, Mayer L, Toubert A. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. Gastroenterology 2007;132:2346-58.

Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. J Immunol 2002;169:4850-60.

Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. J Immunol 2006;177:192-200.

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. N Engl J Med 2001;344:808-14.

Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace WW, Parker CM, Powrie F. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. J Exp Med 2005;202:1051-61.

Antunes I, Kassiotis G. Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice. J Virol 2010;84:12564-75.

Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, Treuting PM, Rudensky AY. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell 2015;162:1078-89.

Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal $CD14^{+}$ macrophages. Gastroenterology 2011;141:2026-38.

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

Baeyens A, Saadoun D, Billiard F, Rouers A, Grégoire S, Zaragoza B, Grinberg-Bleyer Y, Marodon G, Piaggio E, Salomon BL. Effector T cells boost regulatory T cell expansion by IL-2, TNF, OX40, and plasmacytoid dendritic cells depending on the immune context. J Immunol. 2015;194:999-1010.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 1997;336:1066-71.

Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. Immunity 2009;31:401–411.

Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. J Clin Invest. 2007;117:1566-74.

Barreau F, Madre C, Meinzer U, Berrebi D, Dussaillant M, Merlin F, Eckmann L, Karin M, Sterkers G, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Hugot JP. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. Gut 2010;59: 207-17.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat Genet 2008;40:955-62.

Bastida G, Beltrán B. Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers. World J Gastroenterol. 2011;17:2740-7.

Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J, Hébuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, Simon T, Maynadié M, Hermine O, Faivre J, Carrat F; CESAME Study Group. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study.Lancet 2009;374:1617-25.

Beigel F, Schnitzler F, Paul Laubender R, Pfennig S, Weidinger M, Goke B, Seiderer J, Ochsenkuhn T, Brand S. Formation of antinuclear and double-strand DNA antibodies and frequency of lupus-like syndrome in anti-TNF-alpha antibody-treated patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2011;17:91-8.

Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. Curr Opin Pediatr 2001;13:533-8.

Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. J Cell Physiol 2007;211:273-8.

Bilate AB, Lafaille JJ. It takes two to tango. Immunity 2011;35:6–8.

Bisping G, Lugering N, Lutke-Brintrup S, Pauels HG, Schurmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol 2001;123:15-22.

Boschetti G, Nancey S, Kanjarawi R, Almeras T, Ruel K, Kaiserlian D, Flourie B. Réponses immunitaires aucours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. Hépato Gastro 2012;19:446-454.

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2003;3:521-33.

Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. Gut 2009;58:1152–1167.

Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. J Immunol 2003;171:6164-72.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet 2001;27:68-73.

Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. Nat Rev Immunol 2010;10:849–859.

Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? Gut 2006;55:342-7.

Burril B, Crohn LG, Gordon D. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. JAMA 1984;251:73-79.

Cai Q, Dierich A, Oulad-Abdelghani M, Chan S, Kastner P. Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. J Immunol 2009;183:2303-11.

Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1989;34:1841-54.

Canva-Delcambre V, Jacquot S, Robinet E, Lemann M, Drouet C, Labalette M, Dessaint JP, Bengoufa D, Rabian C, Modigliani R, Wijdenes J, Revillard JP, Colombel JF. Treatment of severe Crohn's disease with anti-CD4 monoclonal antibody. Aliment Pharmacol Ther 1996;10:721-7.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. J Immunol 2007;178:172-8.

Cavanaugh J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. Am J Hum Genet 2001;68:1165-71.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003;198:1875-86.

Chen X, Bäumel M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. J Immunol. 2007;179:154-61.

Cho JH. The Nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2001;7:271-5.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature 2007;450:566-9.

Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. Gastroenterology 2007;132:52-65.

Colombel JF, Sendid B, Jouhalt T, Poulain D. Secukinumab failure in Crohn’s disease: the yeast connection. Gut 2013;62(5):800–801.

Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J Exp Med 2007;204:1757-64.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. Nat Med. 2010;16:90-7.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest 1993;69:238 –249.

Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. Gastroenterology. 2001;120:1093-9.

Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP. Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis. Gut 2002;51:803-7.

Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2004;18:481-96.

Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. Inflamm Bowel Dis 2007;13:1063-8.

Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. J Immunol 2004;173:7259-68.

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. Gastroenterology 1998;115:1066-71.

Danese S. Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker. Dig Liver Dis 2008;40 Suppl 2:S225-8.

Daziel TK. Thomas Kenedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. Dis Colon Rectum 1989;32:1076-8.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med 2007;204:1257-65.

Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. Nat Immunol 2007;8:1086-94.

de Roock S, van Elk M, van Dijk ME, Timmerman HM, Rijkers GT, Prakken BJ, Hoekstra MO, de Kleer IM. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. Clin Exp Allergy 2010;40:103-10.

Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. Gastroenterology 1997;113:118-26.

Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugerie L, Hébuterne X, Bouhnik Y, Nachury M, Brun V, Bastian H, Belmonte N, Ticchioni M, Duchange A, Morel-Mandrino P, Neveu V, Clerget-Chossat N, Forte M, Colombel JF. Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. Gastroenterology 2012;143:1207-17.

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, Solcia E, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. Dis Colon Rectum 2003;46:1498-507.

Dubois B, Joubert G, de Agüero MG, Gouanvic M, Goubier A, Kaiserlian D. Sequential Role of Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory T Cells in Oral Tolerance. Gastroenterology 2009;137:1019-28.

Doering J, Begue B, Lentze MJ, Rieux-Laucat F, Goulet O, Schmitz J, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. Gut 2004;53:1632-8.

Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. Lancet 2002;360:1410-8.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 1995;102:448-55.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 2006;314:1461-3.

Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. Am J Gastroenterol 2004;99:2393-404.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J Exp Med 2004;200:277-85.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1995;109:1344-67.

Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. Immunological Reviews 2005;206:260–276.

Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. Eur J Immunol 2007;37:3155-63.

Feuerer M, Hill JA, Kretschmer K, von Boehmer H, Mathis D, Benoist C. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:5919-24.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nature Immunology 2003;4:330–336.

Forbes A, Kalantzis T. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. Int J Colorectal Dis. 2006;21:399-401.

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut 2004;53:987-92.

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nat Immunol 2006;7:1250-7.

Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. Gut 2011;60:1580-8.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut 2003;52:65-70.

Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. Autoimmun Rev 2007;6:169-175.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. J Immunol 1996;157:1261-70.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. Curr Opin Rheumatol 2003;15:430-5

Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. Lancet 1994;343:766-7.

Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD, Macpherson AJ. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. Immunity 2011;34:794-806.

Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, Vyhnalek P, Zadorova Z, Palmer T, Donoghue S. Natalizumab for active Crohn's disease. N Engl J Med 2003;348:24-32.

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology 2000;119:305-9.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. N Engl J Med 2009;361:2033-45.

Gondek DC, Devries V, Nowak EC, Lu LF, Bennett KA, Scott ZA, Noelle RJ. Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells J Immunol. 2008;181:4752-60.

González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. Gastroenterology 2009;136:978-89.

Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol 2012;188:976–980.

Gower-Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, Marti R, Nuttens MC, Votte A, Lemahieu M, Lemaire B, Colombel JF, Cortot A. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). Gut 1994;35:1433-8.

Gower-Rousseau C, Grandbastien B, Cortot A, Colombel JF. Epidemiology of inflammatory bowel disease: is there a "Belgian-French exception?" Acta Gastroenterol Belg 1996;59:2.

Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Grégoire S, Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W, Marodon G, Klatzmann D, Piaggio E, Salomon BL. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. J Clin Invest 2010;120:4558-68.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity 2004;21:589-601.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet 2003;361:512-9.

Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SH, Aranda R, Cheroutre H, Fowell DJ, Binder S, Tsao B, Locksley RM, Moore KW, Kronenberg M. Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. J Exp Med 1997;185:2101-10.

Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. Gastroenterology 2003;124:1767-73.

Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU. Inverse correlation between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease. J Clin Pathol 1996;49:65-7.

Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. Lancet 2002;359:1541-9.

Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. Gastroenterology 2006;130:323-33.

Haribhai D, Lin W, Edwards B, Ziegelbauer J, Salzman NH, Carlson MR, Li SH, Simpson PM, Chatila TA, Williams CB. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. J Immunol. 2009;182:3461-8.

Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, Ziegelbauer J, Yassai M, Li SH, Relland LM, Wise PM, Chen A, Zheng YQ, Simpson PM, Gorski J, Salzman NH, Hessner MJ, Chatila TA, Williams CB. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. Immunity 2011;35:109-22.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005;6:1123-32.

Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. Gut 1985;26:279-84.

Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, Thornton DJ, Png CW, Crockford TL, Cornall RJ, Adams R, Kato M, Nelms KA, Hong NA, Florin TH, Goodnow CC, McGuckin MA. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. PLoS Med 2008;5:e54.

Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity 2002;17:629-38.

Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Rheum Dis

Clin North Am 2012;38:125-39.

Hill JA, Hall JA, Sun CM, Cai Q, Ghyselinck N, Chambon P, Belkaid Y, Mathis D, Benoist C. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells. Immunity 2008;29:758-70.

Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, June CH, Miller JS, Wagner JE, Blazar BR. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. Am J Transplant 2011;11:1148-57.

Holmén N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjövall H, Ohman L. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. Inflamm Bowel Dis 2006;12:447-56.

Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other.Trends Immunol 2008;29:429-35.

Hosomi S, Kaser A, Blumberg RS. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol 2015;31:81-8.

Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2011;140:957-65.

Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. J Exp Med 2006;203:2473-83.

Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, Wehkamp J, Feagan BG, Yao MD, Karczewski M, Karczewski J, Pezous N, Bek S, Bruin G, Mellgard B, Berger C, Londei M, Bertolino AP, Tougas G, Travis SP; Secukinumab in Crohn's Disease Study Group.. Secukinumab, a human anti-IL17a monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn’s disease: unexpected results of a randomized, double-blind placebo con- trolled trial. Gut 2012;61:1693–1700.

Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Brauer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. J Exp Med 2004;199:303-13.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature 1996;379:821-3.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:599-603.

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. Lancet. 2003;362:2012-5.

Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. Immunity 2008;28:870-80.

Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. Immunity 2008;28:559-70.

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. Annu Rev Immunol. 2009;27:313–338.

Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. PLoS One 2008;3:e1612.

Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendicectomy). Gastroenterol Clin Biol 2006;30:859-67.

Jenkins D, Seth R, Kummer JA, Scott BB, Hawkey CJ, Robins RA. Differential levels of granzyme B, regulatory cytokines, and apoptosis in Crohn's disease and ulcerative colitis at first presentation. J Pathol 2000;190:184-9.

Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. Blood 2003;102:2180-6.

Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 2001;345:1098-104.

Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. J Exp Med 2009;206:525-534.

Khanna R, Bressler B, Levesque BG, Zou G, Stitt LW, Greenberg GR, Panaccione R, Bitton A, Paré P, Vermeire S, D'Haens G, MacIntosh D, Sandborn WJ, Donner A, Vandervoort MK, Morris JC, Feagan BG, REACT Study Investigators. Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): a cluster randomised controlled trial. Lancet 2015;doi:10.1016/S0140-6736.

Ko JM, Gottlieb AB, Kerbleski JF. Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: a review and analysis of 127 cases. J Dermatolog Treat 2009;20:100-8.

Kuster W, Pascoe L, Purrmann J, Funk S, Majewski F. The genetics of Crohn disease: complex segregation analysis of a family study with 265 patients with Crohn disease and 5,387 relatives. Am J Med Genet 1989;32:105-8.

Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. Eur J Immunol 2010;40:1877-83.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med 2007;204:57-63.

Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh CS. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. Nature 2011;478:250-4.

Lee JC, Lyons PA, McKinney EF, Sowerby JM, Carr EJ, Bredin F, Rickman HM, Ratlamwala H, Hatton A, Rayner TF, Parkes M, Smith KG. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. J Clin Invest. 2011;121:4170-9.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. Gut. 2011;60:1739-53.

Lei H, Schmidt-Bleek K, Dienelt A, Reinke P, Volk HD. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. Front Pharmacol 2015;6:184.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet 2002;70:845-57.

Li J, Norgard B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. Am J Gastroenterol 2004;99:1129-33.

Li Z, Vermeire S, Bullens D, Ferrante M, Van Steen K, Noman M, Bossuyt X, Rutgeerts P, Ceuppens JL, Van Assche G. Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Restores Peripheral Blood B-cell Subsets and CD40 Expression in Inflammatory Bowel Diseases. Inflamm Bowel Dis 2015;21:2787-96.

Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J Immunol. 2008;180:5916-26.

Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Sandborn WJ. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4:621-30.

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

Lobatón T, Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2014;39:579-94.
Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 2004;126:1504-17.

Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. J Clin Invest 2004;113:1296-306.

Lügering A, Schmidt M, Lügering N, Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn’s disease by using a caspase-dependent pathway. Gastroenterology

2001;121 :1145–1157.

Lugering A, Lebiedz P, Koch S, Kucharzik T. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? Ann N Y Acad Sci 2006;1072:62-77.
MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. Gastroenterology 2011;140:1768-75.

Magnusson MK, Brynjólfsson SF, Dige A, Uronen-Hansson H, Börjesson LG, Bengtsson JL, Gudjonsson S, Öhman L, Agnholt J, Sjövall H, Agace WW, Wick MJ. Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH+ cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation. Mucosal Immunol 2015 ;17.doi: 10.1038.

Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):3119-30.

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

Malekzadeh F, Alberti C, Nouraei M, Vahedi H, Zaccaria I, Meinzer U, Nasseri-Moghaddam S, Sotoudehmanesh R, Momenzadeh S, Khaleghnejad R, Rashtak S, Olfati G, Malekzadeh R, Hugot JP. Crohn's disease and early exposure to domestic refrigeration. PLoS One. 2009;4:e4288.

Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. J Exp Med 2003;197:111-9.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature 2006;441:231-4.

Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. Curr Opin Gastroenterol 2007;23:379-83.

Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. Gastroenterology 2004;127:80-93.

Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2005;128:1868-78.

Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, Weaver CT. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. Nat Immunol 2007;8:931-41.

Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1772-88.

McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. Hum Mol Genet 2005;14:1245-50.

McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 2015;149:1163-1176.

Meucci G, Vecchi M, Torgano G, Arrigoni M, Prada A, Rocca F, Curzio M, Pera A, de Franchis R. Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD Study Group). Gastroenterology 1992;103:514-9.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 2006;442:39-44.

Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, Rubio MT, MacIntyre E, Lepelletier Y, Hermine O. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. Eur J Immunol 2009;39:1466-71.

Mishima Y, Liu B, Hansen JJ, Sartor RB. Resident bacteria-stimulated IL-10-secreting B cells ameliorate T cell-mediated colitis by inducing Tr-1 cells that require IL-27-signaling. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2015;1:295-310.

Mizoguchi A, Takeuchi T, Himuro H, Okada T, Mizoguchi E. Genetically Engineered Mouse Models for Studying Inflammatory Bowel Disease. J Pathol 2015. doi: 10.1002.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology. 2012;142:46-54.

Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. J Clin Invest 2001;108:601-9.

Moran CJ, Walters TD, Guo CH, Kugathasan S, Klein C, Turner D, Wolters VM, Bandsma RH, Mouzaki M, Zachos M, Langer JC, Cutz E, Benseler SM, Roifman CM, Silverberg MS, Griffiths AM, Snapper SB, Muise AM. IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:115-23.

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science. 2007;317:256-60.

Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. J Exp Med 2007;204:33-9.

Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM, Linden J, Worthington MT, Ernst PB. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. J Immunol 2006;177:2765-9.

Nancey S, Holvoet S, Graber I, Joubert G, Philippe D, Martin S, Nicolas JF, Desreumaux P, Flourie B, Kaiserlian D. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. Gastroenterology 2006;131:485-96.

Nancey S, Boschetti G, Cotte E, Ruel K, Almeras T, Chauvenet M, Stroeymeyt K, Moussata D, Kaiserlian D, Flourié B. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab is associated with a profound long-lasting déplétion of Foxp3(+) regulatory T cells : A mechanistic

explanation for ipilimumab-induced sévère enterocolitis ? Inflamm Bowel Dis. 2011;8:1598-1600.

Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. Nature 2007;446:557-61.

Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. Nat Med 2002;8:567-73.

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2014;14:329-42.

Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, Adema GJ, Van der Meer JW. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. J Immunol 2005;174:6518-23.

Odes HS, Fich A, Reif S, Halak A, Lavy A, Keter D, Eliakim R, Paz J, Broide E, Niv Y, Ron Y, Villa Y, Arber N, Gilat T. Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 2001;46:1717-21.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:603-6.

Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M.. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. Gastroenterology. 2002; 123:256-70.

Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. Hum Mol Genet 1996;5:1679-83.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 1990 Mar;98(3):694-702.

Orholm M, Iselius L, Sorensen TI, Munkholm P, Langholz E, Binder V. Investigation of inheritance of chronic inflammatory bowel diseases by complex segregation analysis. Bmj 1993;306:20-4.

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol 2000;35:1075-81.

Ott SJ, Schreiber S. Reduced microbial diversity in inflammatory bowel diseases. Gut 2006;55:1207.

Païdassi H, Acharya M, Zhang A, Mukhopadhyay S, Kwon M, Chow C, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A. Preferential expression of integrin αvβ8 promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. Gastroenterology 2011;141:1813-20.

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

Pariente B, Mocan I, Camus M, Dutertre CA, Ettersperger J, Cattan P, Gornet JM, Dulphy N, Charron D, Lémann M, Toubert A, Allez M. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2011;141:217-226.

Patel A, Shah N. Mycobacterium avium subsp paratuberculosis--incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44:473-9.

Peake ST, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α agents in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2013;19:1546-55.

Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and coinhibitory antagonists. Clin Exp Immunol. 2009; 157:9–19.

Plevy SE, Targan SR. Future therapeutic approaches for inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2011;140:1838-46.
Perencevich M, Burakoff R. Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2006;12:651-64.

Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. J Biomed Biotechnol 2012;2012:718617. doi: 10.1155/2012/718617.

Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, Branche J, Sandborn WJ, Colombel JF. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn’s disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:644-53.

Pinsk V, Lemberg DA, Grewal K, Barker CC, Schreiber RA, Jacobson K. Inflammatory bowel disease in the South Asian pediatric population of British Columbia. Am J Gastroenterol. 2007;102:1077-83.

Podolsky DK, Isselbacher KJ. Composition of human colonic mucin. Selective alteration in inflammatory bowel disease. J Clin Invest 1983;72:142-53.

Podolsky DK, Fournier DA. Alterations in mucosal content of colonic glycoconjugates in inflammatory bowel disease defined by monoclonal antibodies. Gastroenterology 1988;95:379-87.

Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. Eur J Immunol 2008;38:1654-63.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. Int Immunol 1993;5:1461-71.

Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. Gut 1993;34:1547-51.

Probert CS, Chott A, Turner JR, Saubermann LJ, Stevens AC, Bodinaku K, Elson CO, Balk SP, Blumberg RS. Persistent clonal expansions of peripheral blood CD4+ lymphocytes in chronic inflammatory bowel disease. J Immunol 1996;157:3183-91.

Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. Nat Med 1999;5:1178-82.

Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease--Are we there yet? World J Gastroenterol 2006;12:7097-103.

Rahman MK, Midtling EH, Svingen PA, Xiong Y, Bell MP, Tung J, Smyrk T, Egan LJ, Faubion WA Jr. The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3+ T cell survival. J Immunol 2010;184:7247-56.

Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, Sharpe AH, Powrie F. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. J Immunol 2006;177:4376-83.

Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehlke S, Bornhäuser M, Schneider T, Zeitz M, Stein H, Thiel E, Duchmann R, Uharek L. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. Blood 2006;107:1717-23.

Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. Immunity 2009;30:656–665.

Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol. 2010;16:4264-71.

Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. Curr Opin Organ Transplant 2015;20:376-84.

Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrügger RW. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. Gastroenterology. 1997;113:377-82.

Rutgeerts P, Goboes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. Lancet 1991;338:771-4.

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

Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. Autophagy 2015;11:585-94.

Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn’s disease: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. Gastrenterology 2001;121:1088-1094.

Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, Panaccione R, Wolf D, Kent JD, Bittle B, Li J, Pollack PF. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. Gut 2007;56:1232-9.

Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P, Ghosh S, de Villiers WJ, Panaccione R, Greenberg G, Schreiber S, Lichtiger S, Feagan BG; CERTIFI Study Group. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. N Engl J Med 2012;367:1519-28.

Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, Zhang H, Strauss R, Johanns J, Adedokun OJ, Guzzo C, Colombel JF, Reinisch W, Gibson PR, Collins J, Järnerot G, Hibi T, Rutgeerts P, for the PURSUIT-SC Study Group. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative coloitis. Gastroenterology 2014;146:85-95.

Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, Zhang H, Strauss R, Johanns J, Adedokun OJ, Guzzo C, Colombel JF, Reinisch W, Gibson PR, Collins J, Järnerot G, Hibi T, Rutgeerts P, for the PURSUIT-Maintenance Study Group. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative coloitis. Gastroenterology 2014;146:96-109.

Sartor RB. Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? Gut. 2005;54:896-8.

Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. Clin Immunol 2007;125:281-90.

Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. J Signal Transduct. 2012:704953.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut 2006;55:749-53.

Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. Allergy. 2009;64:505–519.

Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. J Dig Dis. 2007;8:171-8.

Schallenberg S, Tsai PY, Riewaldt J, Kretschmer K. Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. J Exp Med 2010;207:1393-407.

Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. FASEB J 2012;26:2253-76.

Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, Aggarwal P, Jia S, Charbonnier LM, Yan K, Lorier R, Turner A, Ziegelbauer J, Georgiev P, Simpson P, Salzman NH, Hessner MJ, Broeckel U, Chatila TA, Williams CB. IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. J Immunol 2012;189:5638-48.

Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. Ann N Y Acad Sci 2006;1072:288-99.

Seagroatt V, Goldacre MJ. Crohn's disease, ulcerative colitis, and measles vaccine in an English population, 1979-1998. J Epidemiol Community Health 2003;57:883-7.

Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. Inflamm Bowel Dis 2008;14:437-445.

Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut 2003;52:237-42.

Seneschal J, Milpied B, Vergier B, Lepreux S, Schaeverbeke T, Taieb A. Cytokine imbalance with increased production of interferon-alpha in psoriasiform eruptions associated with antitumour necrosis factor-alpha treatments. Br J Dermatol 2009;161:1081-8.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. J Exp Med 2005;201:723–735.

Shanahan F. Immunology. Therapeutic manipulation of gut flora. Science 2000;289:1311-2.

Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity 2006;25:195-201.

Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Dore J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2006;12:106-11.

Sokol H, Lepage P, Seksik P, Dore J, Marteau P. Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. Gut 2007;56:152-4.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:16731-6.

Sokol H, Seksik P, Nion-Larmurier I, Vienne A, Beaugerie L, Cosnes J. Current smoking, not duration of remission, delays Crohn's disease relapse following azathioprine withdrawal. Inflamm Bowel Dis 2010;16:362-3.

Souza HS, Tortori CJ, Castelo-Branco MT, Carvalho AT, Margallo VS, Delgado CF, Dines I, Elia CC. Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. Int J Colorectal Dis 2005;20:277-86.

Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. Inflamm Bowel Dis. 2008;14:968-76.

Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor.J Exp Med 1998;187:571-8.

Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. Gastroenterology 2002;122:94-105.

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet 2004;36:476-80.

Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. Gastroenterology 1997;113:160-7.

Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, Lang S, Kirkwood JM, Whiteside TL. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. J Immunol 2008;180:2967-80.

Stronkhorst A, Radema S, Yong SL, Bijl H, ten Berge IJ, Tytgat GN, van Deventer SJ. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. Gut 1997;40:320-7.

Suenaert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. Am J Gastroenterol 2002;97:2000-4.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002;122:44-54.

Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Lupicki M, Scholze J, Lochs H, Dieleman LA. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:963-70.

Szczepanik M, Gryglewski A, Bryniarski K, Stachura J, Ptak W. Experimental inflammatory bowel disease--role of T cells. J Physiol Pharmacol 2000;51:333-46.

Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Gut 1978;19:108-13.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat Immunol 2008;9:239-44.

Tanoue T, Honda K. Induction of Treg cells in the mouse colonic mucosa: a central mechanism to maintain host-microbiota homeostasis. Semin Immunol 2012;24:50–57.

Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. Dig Dis Sci 2006;51:677-86.

Targan SR, Feagan BG, Vermiere S, et al. A randomized, double blind, placebo controlled study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of AMG 827 in subjects with moderate to severe Crohn’s disease. Gastroenterology 2012;143(3):E26.

Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini

RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor a blockade in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43:38–47.

ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. Gut 2002;50:206-11.

Thachil E, Hugot JP, Arbeille B, Paris R, Grodet A, Peuchmaur M, Codogno P, Barreau F, Ogier-Denis E, Berrebi D, Viala J. Abnormal activation of autophagy-induced crinophagy in Paneth cells from patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2012;142:1097-1099.

Thomson AW, Robbins PD. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. Ann Rheum Dis 2008;67 Suppl 3:iii90-6.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med 1998;188:287–296.

Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol 2010;184:3433-41.

Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. Nat Immunol 2008;9:194-202.

Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. Ann N Y Acad Sci 2005;1051:506-14.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther. 2008;117:244-79.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.Nat Immunol 2010;11:55-62.

Tresoldi E, Dell'Albani I, Stabilini A, Jofra T, Valle A, Gagliani N, Bondanza A, Roncarolo MG, Battaglia M. Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells. Haematologica 2011;96:1357-65.

Tréton X, Pédruzzi E, Cazals-Hatem D, Grodet A, Panis Y, Groyer A, Moreau R, Bouhnik Y, Daniel F, Ogier-Denis E. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. Gastroenterology 2011;141: 1024-35.

Tréton X, Pedruzzi E, Guichard C, Ladeiro Y, Sedghi S, Vallée M, Fernandez N, Bruyère E, Woerther PL, Ducroc R, Montcuquet N, Freund JN, Van Seuningen I, Barreau F, Marah A, Hugot JP, Cazals-Hatem D, Bouhnik Y, Daniel F, Ogier-Denis E. Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice. PLoS One 2014;9: e101669.

Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut 1988;29:990-6.

Ueno A, Jijon H, Chan R, Ford K, Hirota C, Kaplan GG, Beck PL, Iacucci M, Fort Gasia M, Barkema HW, Panaccione R, Ghosh S. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. Inflamm Bowel Dis 2013;19:2522-34.

Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. J Immunol 2006;177:5852-60.

Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. Blood 2006;108:253-61.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 2006;24:179-89.

Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, Hardtke-Wolenski M, Länger F, Stremmel W, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNFα treatment. Gut 2011;60:1345-53.

Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Belaiche J, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Vlietinck R, Merlin F, Zouali H, Thomas G, Colombel JF, Hugot JP. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. Gastroenterology 2002;123:106-11.

Identification Vermeulen N, de Béeck KO, Vermeire S, Van Steen K, Michiels G, Ballet V, Rutgeerts P, Bossuyt X. of a novel autoantigen in inflammatory bowel disease by protein microarray. Inflamm Bowel Dis 2011;17:1291-300.

Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet 2009;41:71-6.

Visperas A, Do JS, Bulek K, Li X, Min B. IL-27, targeting antigen-presenting cells, promotes Th17 differentiation and colitis in mice. Mucosal Immunol 2014;7:625-33.

von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. N Engl J Med 2003;348:68-72.

Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. BMC Microbiol. 2011;11:7.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity 2006;24:677-88.

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001;182:207-14.

Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, Xiong H, Dolpady J, Frey AB, Ruocco MG, Yang Y, Floess S, Huehn J, Oh S, Li MO, Niec RE, Rudensky AY, Dustin ML, Littman DR, Lafaille JJ. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. J Exp Med 2012;2090:1723-42.

Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S, Gruber AD, Bruder D, Hansen W, Liblau R, Buer J. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. Gastroenterology 2006;131:510-24.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Genet 2001;27:18-20.

Wilhelm Fabry (1560-1624)-The other fabricius. JAMA 1964;190:933.

Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat Protoc. 2007;2:541-6.

Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-β and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin αvβ8. Gastroenterology 2011;141:1802-12.

Worthington JJ, Kelly A, Smedley C, Bauché D, Campbell S, Marie JC, Travis MA. Integrin αvβ8-Mediated TGF-β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. Immunity 2015;42:903-15.

Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A, Malissen B. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. Blood 2001;98:2626-32.

Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. J Immunol 2007;178:6725-9.

Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, Anthony BA, Sverdrup FM, Head R, Kuster DJ, Ruminski P, Weiss D, Von Schack D, Bluestone JA. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. J Exp Med 2012;209:1713-22, S1-19.

Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2007;13:191-9.

Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. Trends Mol Med 2009;15:199–207.

Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. Inflamm Bowel Dis 2006;12:382-388.

Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3

target genes in developing and mature regulatory T cells. Nature 2007;445:936-40.

Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. J Immunol 2008;180:7112-6.

Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. Nature 2010;463:808-12.

Impact de l'inflammation intestinale sur la dynamique et la fonction des lymphocytes T régulateurs

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une sécrétion exagérée de cytokines pro-inflammatoires, une hyperactivation des lymphocytes T effecteurs (Teff) et un contrôle insuffisant par les lymphocytes T régulateurs (Treg).
Nous avons montré que le traitement par anti-TNFα s'accompagne d'une augmentation significative des Treg Foxp3$^+$ dans le sang de patients atteints de MICI en poussée. L'infliximab est associé à une potentialisation de leur fonction suppressive.
Dans un 2ème travail nous montrons que les Treg sont incapables de prévenir la colite même s'il existe une augmentation du nombre de Treg dans les ganglions mésentériques ainsi qu'une majoration du nombre et de la fonction suppressive *ex-vivo* des Treg issus du colon inflammatoire. Cet impact fonctionnel positif sur les Treg issus des ganglions mésentériques était sélectif de la sous-population de Treg NRP1$^-$ correspondant aux Treg induits. La diminution significative aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* de la conversion des LT naïfs en Treg en condition inflammatoire contribue probablement à leur incapacité à contenir la colite.
Dans un 3ème travail, nous avons étudié la dynamique des LT Th1, Th17 et Treg et des sous-populations de LT CD4$^+$ co-exprimants IL-17/IFNγ, IL-17/Foxp3 et IFNγ/Foxp3 chez des patients MICI en rémission clinique suivis tous les 3 mois. Une élévation des LT Foxp3/IL-17 du sang précédait la rechute de la maladie suggérant un rôle potentiel pathogénique de cette sous-population de LT.
Ces éléments illustrent les concepts de conversion et plasticité des Treg au cours des MICI mais aussi leur rôle comme cible pour optimiser et développer de nouvelles biothérapies.

Mots clefs : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, lymphocytes T régulateurs, colite, anti-TNFα, néo-conversion.

Impact of intestinal inflammation on the dynamics and function of regulatory T cells

Inflammatory bowel disease (IBD) are characterized by an excessive secretion of pro-inflammatory cytokines, hyperactivation of effector T cells (Teff) and insufficient control by regulatory T cells (Treg).
We showed that treatment with anti-TNFα is accompanied by a significant increase in Foxp3$^+$ Treg in the blood of patients with IBD. Infliximab is also associated with a potentiation of Treg suppressive function.
In a second study, we showed that Treg are unable to completely prevent colitis, even as we have shown a significant increase in the number of Treg in the mesenteric lymph nodes and also an increase in number and the ex-vivo suppressive function of Treg cells from the inflammatory colon. The positive impact of intestinal inflammation on the suppressive function of Treg from the mesenteric lymph nodes was selective in the sub-population of Treg NRP1$^-$ majority representing iTreg. The significant decrease both in vitro and in vivo neo-conversion of LT to naïve Treg in inflammatory conditions, contributing to the inability of Treg to contain colitis.
In a third study, we systematically studied the dynamics of LT Th1, Th17 and Treg as well as subpopulations of CD4$^+$ T cells that co-express IL-17/IFNγ, IL-17/Foxp3 and IFNγ/Foxp3 from a cohort of IBD patients in clinical remission followed every 3 months. A rise in the blood of a Treg Foxp3$^+$ mixed population producing IL-17 preceded the onset of a relapse of IBD suggesting a pathogenic potential of this subpopulation of LT.
All these elements illustrate the concepts of conversion and plasticity of Treg in IBD but also the key role of Treg as a target to optimize and develop new biological therapies.

Key words : Inflammatory bowel diseases, regulatory T cells, colitis, anti-TNFα, neo-conversion.