

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE  
ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Immunologie*

Par **Aurélie FANTOU**

## **Sources cellulaires et impact de l'interleukine 22-binding protein (IL-22BP) sur la réponse moléculaire induite par les interleukines 22 et 17 au cours de la maladie de Crohn.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 31/03/2021  
Unité de recherche : CRTI, INSERM UMR 1064

### **Composition du Jury :**

- Président : **Céline BOSSARD**  
Professeur des universités-praticien hospitalier-Université de Nantes
- Rapporteurs : **Rachel GOLUB**  
Professeur des universités-Université Paris Diderot
- Gilles BOSCHETTI**  
Professeur des universités-praticien hospitalier-Université Claude Bernard Lyon 1
- Examineur : **Mathieu UZZAN**  
Chef de Clinique-Assistant-Université Paris Diderot
- Dir. de thèse : **Régis JOSIEN**  
Professeur des universités-praticien hospitalier-Université de Nantes
- Co-Encadrant : **Jérôme MARTIN**  
Maitre de conférence des universités-praticien hospitalier-Université de Nantes



## REMERCIEMENTS

---

Pr Golub, je vous remercie pour votre relecture attentive de ce manuscrit de thèse ainsi que les commentaires pertinents que vous m'avez indiqués. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail en apportant votre expertise sur l'immunité associée aux muqueuses intestinales. Soyez assurée de mon profond respect.

Pr Boschetti, je vous remercie pour votre relecture attentive de ce manuscrit de thèse ainsi que les remarques judicieuses que vous m'avez signalées. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail, notamment en apportant votre expertise clinique et scientifique dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Soyez assuré de mon profond respect.

Pr Bossard, merci d'avoir accepté de juger ce travail à la lumière de votre expérience clinique et scientifique. Soyez assurée de mon profond respect

Dr Uzzan, merci d'avoir répondu favorablement et avec grand intérêt pour juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

Pr Josien, vous m'avez accueillie dans votre équipe de recherche il y a six ans déjà. Votre dynamisme, vos compétences et votre rigueur scientifique m'ont aidée à progresser. Merci de votre confiance témoignée tout au long de ce doctorat et je suis ravie de continuer à travailler dans votre équipe tant en recherche qu'en clinique. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Dr Jérôme Martin, merci pour tes relectures enrichies en remarques pertinentes au cours de la rédaction du manuscrit ; ton expertise scientifique et clinique ainsi que nos échanges m'ont permis d'avancer et de mûrir ma réflexion au cours de ce doctorat.

Merci au Dr Guillonnet et au Pr Neunlist pour leurs écoutes et leur remarques pertinentes en comité de suivi de thèse.

Merci au Dr Anne Jarry pour votre aide précieuse et votre expérience avisée dans les modèles de stimulation ex-vivo d'explants intestinaux.

Merci au Pr Bourreille, au Dr Malvyne Derkinderen, au Dr Podevin et à Emilie pour votre collaboration concernant les échantillons de patients, vous avez grandement contribué à la mise en place des mes travaux de thèse.

Merci à Laurence Delbos pour ton aide indispensable, ta disponibilité ainsi que tes conseils pertinents au cours des expériences de tri. Sans toi, tout ce travail n'aurait pas été possible.

Merci à Florian Berger pour ton aide incontestable pour les analyses statistiques des données de transcriptomiques ainsi que la facilité de nos échanges. Sans toi, tout ce travail n'aurait pas été possible.

Merci à Ahmed pour ton soutien ainsi que ta disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions au cours de ces quatre années de thèse.

Merci à Gaëlle pour ta disponibilité ainsi que ta précieuse aide tout au long de mes travaux de thèse.

Une pensée pour tous les membres de l'équipe 1, votre écoute et vos remarques pertinentes en réunion du mercredi m'ont fait avancer. Plus globalement merci à tous les membres du CRTI, c'était agréable de travailler à vos côtés.

Merci à toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes et plus particulièrement aux Dr Marie Audrain, Dr Marie Rimbart et Dr Caroline Hémond pour m'avoir accueillie il y a six années déjà. C'est un réel plaisir de travailler chaque jour à vos côtés. Merci pour votre écoute ainsi que l'allègement de l'emploi du temps au cours de ces derniers mois de rédaction.

Merci à Delphine pour ton soutien indéfectible et notamment ces derniers mois, notre amitié m'est précieuse.

Merci à Judith pour ton soutien indéniable malgré la distance, notre amitié m'est chère

Merci à Louise pour ta présence quotidienne et cette amitié qu'on a liée ces deux dernières années.

Merci à mes ami(e)s nantais (Arnaud, Elsa, Pauline, Anne-Gaëlle, Gaëlle, Alexis, Raphaël, Audrey, Léa et Antoine), angevines (Emeline et Clémentine) et rochelaises (Marie et Pauline) pour la joie que vous me procurez.

Merci à ma famille pour leur soutien indéfectible depuis de nombreuses années.

# Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS .....	
LISTE DES FIGURES .....	
LISTE DES TABLEAUX .....	
INTRODUCTION .....	2
<i>I. IMMUNITE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE.....</i>	<i>2</i>
a) Microbiote intestinal .....	2
b) Les barrières épithéliales .....	6
c) Le système immunitaire muqueux .....	14
<i>II. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES, PHYSIOPATHOLOGIQUES, CLINIQUES, DIAGNOSTICS ET DE SUIVIS DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (MICI).....</i>	<i>20</i>
a) Définition .....	20
b) Données épidémiologiques .....	21
c) Les facteurs de prédispositions des MICI.....	22
d) Mécanismes physiopathologiques.....	32
e) Le tableau clinique observé au cours des MICI.....	38
f) La stratégie diagnostique.....	42
g) Principales stratégies thérapeutiques .....	43
h) Evolution et suivi de l'activité des MICI .....	49
<i>III. PLACE DE L'IL-22 ET DE L'IL-17A DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE INTESTINALE ....</i>	<i>54</i>
a) L'interleukine 22 .....	54
b) L'interleukine 17A.....	74
<i>IV. L'INTERLEUKINE 22 BINDING PROTEIN (IL-22BP).....</i>	<i>82</i>
a) Gène et protéine de l'IL-22BP.....	82
b) Sources cellulaires et régulation de l'IL-22BP .....	85
c) L'IL-22BP, un puissant régulateur des actions biologiques de l'IL-22 .....	89
HYPOTHESE ET OBJECTIFS PRINCIPAUX.....	107

RESULTATS .....	109
PARTIE I : CLARIFICATION CHEZ L'HOMME AU COURS DE LA MALADIE DE CROHN DES SOURCES CELLULAIRES D'IL-22BP .....	109
PARTIE II : IMPACT DE L'IL-22BP SUR LE PROGRAMME MOLECULAIRE INDUIT PAR LES CYTOKINES IL-22 ET IL-17 AU COURS DE LA MALADIE DE CROHN.....	152
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	189
CONCLUSION.....	208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	210

## Liste des abréviations

**AA** : acide aminé

**Ac** : anticorps

**AhR** : aryl hydrocarbon receptor

**AOM** : azoxyméthane

**DCs** : cellules dendritiques

**CEI** : cellules épithéliales intestinales

**CG** : centre germinatif

**CRC** : cancer colorectal

**CSI** : cellules souches intestinales

**DSS** : dextran sulfate sodium

**FLI** : follicule lymphoïde isolé

**GVHD** : graft versus host disease

**GM** : ganglion mésentérique

**IgA** : immunoglobuline d'isotype A

**IL-17** : interleukine 17

**IL-22** : interleukine-22

**IL-23** : interleukine 23

**IL-22BP** : interleukine-22 binding protein

**ILCs** : innate lymphoid cells ; cellules lymphoïdes innées

**JAK** : janus kinase

**LP**: *lamina propria*

**LTBR** : lymphotoxin beta receptor

**LTi**: lymphoid tissue inducer

**LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2**: lymphotoxin alpha 1 beta 2

**LyT** : lymphocyte T

**Ly Treg** : lymphocyte T régulateur

**MC** : maladie de Crohn

**MICI** : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**MoDC** : monocyte-derived dendritic cells

**NOD2**: nucleotide binding oligomerization domain 2

**OLS** : organdes lymphoïdes secondaire

**PAMs** : peptides antimicrobiens

**PNN** : polynucléaires neutrophiles

**PNE** : polynucléaires éosinophiles

**PP** : plaque de Peyer

**PR** : polyarthrite rhumatoïde

**qPCR** : quantitative polymerase chain reaction

**RA** : acide rétinoïque

**RAG** : recombination activating gene

**RCH** : rectocolite hémorragique

**RE**: reticulum endoplasmique

**ROR $\gamma$ t** : retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t

**SLIT**: structure lymphoïde isolée tertiaire

**STAT**: signal transducers and activators of transcription

**SNP**: Single nucleotide polymorphism

**TILs**: tumor infiltrating lymphocytes

**TLR**: toll-like receptor

**TNF $\alpha$** : tumor necrosis factor alpha

**TNBS**: trinitrobenzene sulfonic acid

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Impact de l'âge et des facteurs environnementaux sur les fréquences des principaux phyla du microbiote intestinal. ....	3
<b>Figure 2</b> : Effets immunomodulateurs induits par les germes commensaux au niveau de la muqueuse intestinale.....	5
<b>Figure 3</b> : Principaux types cellulaires spécialisés constituant l'épithélium intestinal.....	7
<b>Figure 4</b> : Principaux mécanismes d'action des PAMs.....	10
<b>Figure 5</b> : La muqueuse épithéliale intestinale constitue un rempart de protection limitant les contacts entre le système immunitaire muqueux et les germes du microbiote intestinal....	13
<b>Figure 6</b> : Structures lymphoïdes secondaires et tertiaires décrivant le système immunitaire muqueux.....	15
<b>Figure 7</b> : Organisation de la réponse immune adaptative dans la LP intestinale. ....	17
<b>Figure 8</b> : Prévalence des MICI dans le monde en 2015. ....	22
<b>Figure 9</b> : Principaux gènes de susceptibilité associés aux MICI.....	25
<b>Figure 10</b> : Principaux facteurs de prédisposition des MICI.....	28
<b>Figure 11</b> : Principaux variants génétiques pouvant altérer le microbiote intestinal .....	31
<b>Figure 12</b> : Les mécanismes physiopathologiques associés aux MICI.....	33
<b>Figure 13</b> : Nouvelles stratégies de prise en charge thérapeutique des patients souffrant de MICI. ....	47
<b>Figure 14</b> : AhR joue un rôle central dans la régulation de l'expression d'IL-22 par les ILC3 et les Ly T. ....	58
<b>Figure 15</b> : Actions protectrices induites par l'IL-22 sur l'épithélium intestinal. ....	67
<b>Figure 16</b> : L'IL-22 peut médier des actions impliquées dans un processus de transformation tumorale.....	71
<b>Figure 17</b> : Dualité des actions induites par l'IL-22 au niveau des cellules épithéliales intestinales. ....	73
<b>Figure 18</b> : Récepteurs et voies de signalisation de l'IL-17A.....	75
<b>Figure 19</b> : Rôle protecteur induit par l'IL-17A au niveau de la barrière intestinale. ....	79
<b>Figure 20</b> : Dichotomie des effets entre les traitements par anti-IL23 et anti IL-17 au cours de modèles expérimentaux de colite chez la souris. ....	81

<b>Figure 21</b> : Caractérisation de l'IL-22BP : l'inhibiteur soluble et spécifique de l'IL-22. ....	83
<b>Figure 22</b> : Sources et régulation de l'IL-22BP à l'homéostasie et au cours des MICI.....	88
<b>Figure 23</b> : Au cours de la SEP, l'augmentation de l'expression d'IL-22BP impacte les actions protectrices induites par l'IL-22. ....	93
<b>Figure 24</b> : Etude de la modulation de l'axe IL-22/IL-22BP au cours de désordres inflammatoires chroniques. ....	95
<b>Figure 25</b> : Au cours d'inflammation hépatique, l'IL-22BP exerce un rôle hépato-protecteur en limitant les actions pro-inflammatoires induites par l'IL-22.....	97
<b>Figure 26</b> : Représentation schématique de l'axe IL-22/IL-22BP au cours du psoriasis. ....	100
<b>Figure 27</b> : Régulation et rôle de l'IL-22BP dans le contrôle des actions induites par l'IL-22 sur la muqueuse intestinale au cours de processus tumoraux.....	102
<b>Figure 28</b> : Identification d'un programme de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale dépendant de la combinaison des cytokines IL-22 et IL-17.....	161
<b>Figure 29</b> : La combinaison de l'IL-22 et IL-17 est essentielle pour maximiser le programme de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale. ....	163
<b>Figure 30</b> : Hétérogénéité d'expression du programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 au niveau des muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI. ....	165
<b>Figure 31</b> : Evaluation des corrélations entre les expressions des gènes du programme moléculaire et celles des cytokines.....	167
<b>Figure 32</b> : Expression du programme moléculaire induit par l'IL-22+IL-17 dans les muqueuses intestinales des patients de la cohorte RISK. ....	169
<b>Figure 33</b> : Exploration de la dynamique d'induction du programme moléculaire induit par IL-22 et IL-17 au sein des muqueuses inflammatoires de patients MICI.....	171
<b>Figure 34</b> : Le programme de renforcement des propriétés de barrière peut être restauré dans des muqueuses MC ex-vivo par la combinaison d'IL-22 + IL-17. ....	173
<b>Figure 35</b> : Renforcement des actions biologiques induites par l'IL-22 et l'IL-17 après stimulation ex vivo de muqueuses MC. ....	176
<b>Figure 36</b> : L'IL-22BP bloque la signature moléculaire induite par IL-22+IL-17 sur les muqueuses intestinales.....	178
<b>Figure 37</b> : Schéma bilan décrivant les sources et l'impact de l'IL-22BP sur la réponse moléculaire induite par l'IL-22 et l'IL-17 au cours de la MC. ....	209

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Principaux Odd Ratio associés aux principaux gènes de susceptibilités des MICI	26
<b>Tableau 2</b> : Principales caractéristiques propres à la MC et à la RCH. ....	41
<b>Tableau 3</b> : Essais cliniques en cours évaluant l'efficacité de l'IL-22 recombinante au cours de plusieurs pathologies. ....	68
<b>Tableau 4</b> : Principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans la cohorte rétrospective .....	185
<b>Tableau 5</b> : Principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans la cohorte prospective.....	186
<b>Tableau 6</b> : Liste des sondes Taqman utilisées lors des qPCR. ....	187

# *INTRODUCTION*

# Introduction

## I. *Immunité de la muqueuse intestinale*

### a) Microbiote intestinal

Nos muqueuses intestinales sont colonisées par de très nombreux microorganismes comprenant des bactéries, des champignons, des parasites et des virus constituant ainsi le microbiote (Kamada et al., 2013). Au sein de ce microbiote, cent trillions de bactéries sont retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal avec lesquelles il a établi une relation particulière basée sur un échange réciproque d'actions bénéfiques pour l'un ou l'autre des partenaires (Hooper and Macpherson, 2010). Les germes composant ce microbiote intestinal humain sont répartis en des centaines d'espèces différentes dont un petit noyau d'espèces conservées. Il s'agit d'une communauté « résidente » dominante, dite commensale et autochtone, puisque dotée d'une grande stabilité et d'une activité métabolique aussi importante que celle du foie.

Les nouveaux outils développés avec notamment les approches métagénomiques ont permis d'explorer la fraction non cultivable de ces microorganismes représentant au moins 70% du microbiote intestinal. Une étude réalisée en 2010 à partir de l'ADN bactérien extrait des selles de 124 sujets européens, a permis l'identification de 3,3 millions de gènes bactériens au sein du microbiote intestinal, ce qui équivaut à cent cinquante fois le génome humain (Qin et al., 2010). Chaque microbiote intestinal humain est défini par noyau métagénomique conservé puisque 50% des gènes bactériens d'un individu sont partagés par au moins 50% des individus de la cohorte. Cependant, il existe quelques individualités puisque des gènes rares sont partagés par moins de 20% des individus de la cohorte. En 2014, à partir d'une cohorte d'échantillons plus large (1267 échantillons provenant de trois continents différents) le catalogue bactérien a été approfondi et équivaut actuellement à 400 fois le génome humain soit une moyenne de 10 millions de gènes (Li et al., 2014a). En 2020, un groupe d'étude a permis de générer un catalogue de séquences unifiées représentant 204 938 références de génome correspondant à 171 millions de séquences protéiques définissant ainsi le premier génome unifié intestinal humain (Almeida et al., 2020).

Le microbiote bactérien intestinal est dominé par deux phyla principaux, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, qui constituent près de 90 % de la population totale. Le phylum des *Firmicutes*

est majoritairement composé de bactéries appartenant à la classe *Clostridia* comme par exemple les *Ruminococcus* spp. Le phylum des *Bacteroidetes* est, quant à lui, représenté par plusieurs genres de *Bacteroides*. Enfin le phylum des *Actinobacteria* comprend les Bifidobactéries (Qin et al., 2010). Dans son étude publiée en 2011, Arumugam a démontré qu'au sein d'une population composée de sujets européens, américains et asiatiques, les individus se répartissent en trois « entérotypes » dominants, chacun caractérisé par un agencement d'espèces dominé par les genres *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Prevotella* (Arumugam et al., 2011). La flore commensale est établie approximativement vers l'âge de 2-3 ans et reste stable tout au long de la vie adulte pour évoluer ensuite avec le vieillissement. Cependant la composition du microbiote intestinal peut être plus ou moins impactée par le mode de naissance, l'allaitement maternel, les traitements antibiotiques ou les régimes alimentaires (Ottman et al., 2012) (Figure 1).

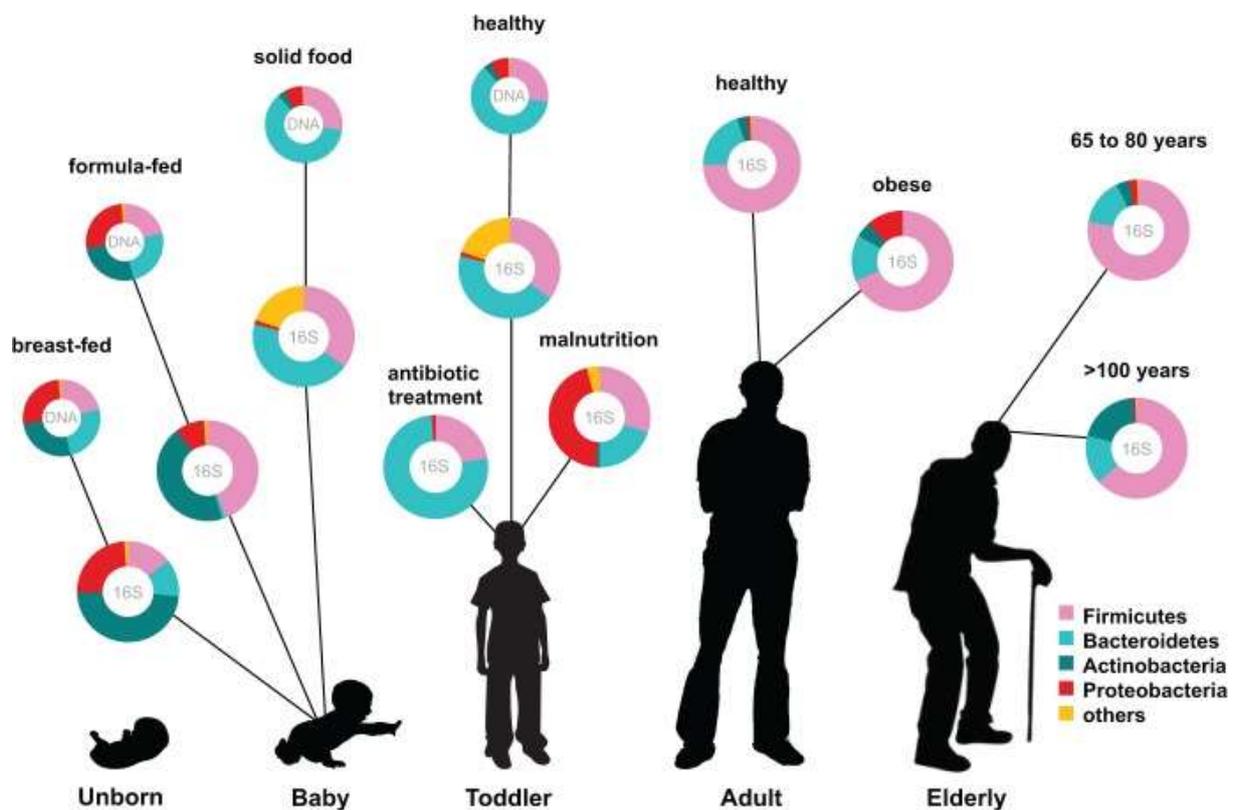
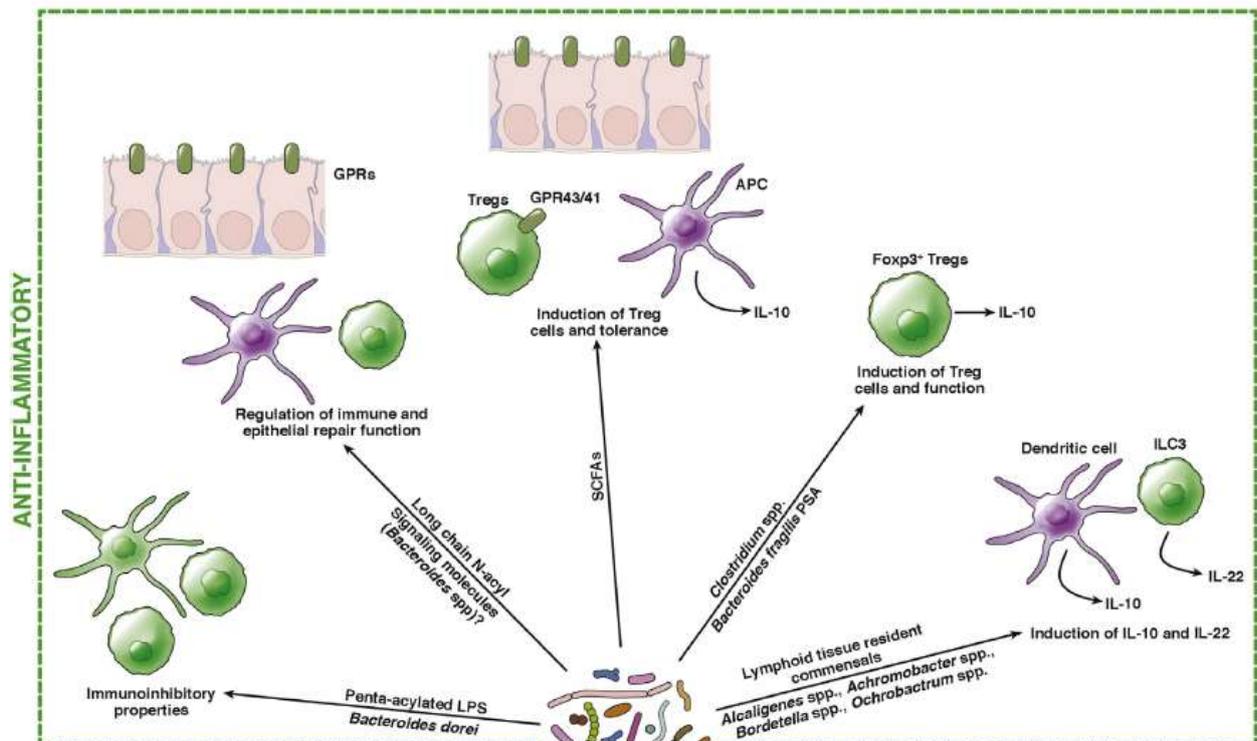


Figure 1 : Impact de l'âge et des facteurs environnementaux sur les fréquences des principaux phyla du microbiote intestinal. D'après (Ottman et al., 2012)

La muqueuse intestinale fournit un environnement riche en nutriments indispensables à la survie du microbiote qui en retour exerce des fonctions importantes à la physiologie humaine définissant ainsi un équilibre symbiotique. Parmi ces fonctions, les bactéries de la flore commensale jouent un rôle important dans la maturation (mise en place des organes lymphoïdes tertiaires : follicules lymphoïdes) et l'éducation du système immunitaire (induction de réponses régulatrices face à des stimulations par les antigènes alimentaires) (Belkaid and Hand, 2014). Macpherson a ainsi démontré que les plaques de Peyer de souris axéniques sont appauvries en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et en plasmocytes sécréteurs immunoglobulines d'isotype A (IgA) (Macpherson et al., 2001). Le microbiote exerce aussi des fonctions métaboliques essentielles notamment en synthétisant des acides biliaires secondaires, des vitamines ou des acides gras à chaîne carbonée courte dotés de propriétés immunorégulatrices (**Figure 2**). En effet, ces acides gras, notamment sécrétés par *Clostridium sp.*, induisent la différenciation des lymphocytes en LyT régulateur (Ly Treg) et inhibent les voies pro-inflammatoires (Cohen et al., 2019; Thaïss et al., 2016). Le polysaccharide A (PSA) sécrété par *B. fragilis* induit aussi une polarisation vers la voie des Ly Treg. Le lipopolysaccharide penta-acétylé produit par *Bacteroides sp.* inhibe les réponses immunes tandis que celui produit par *Escherichia coli* les exacerbe (Cohen et al., 2019). Enfin les niches bactériennes commensales (*Alcaligenes spp. /Bordetella spp*) ayant colonisé les tissus lymphoïdes sont capables d'induire la production d'IL-10, d'IL-22 et d'IgA, promulguant ainsi l'homéostasie intestinale. Enfin, le microbiote intestinal est doté d'un pouvoir de barrière limitant ainsi l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes. En effet, les microorganismes commensaux contribuent à la fortification de la barrière intestinale par divers mécanismes : stimulation de la production de peptides antimicrobiens (PAMs) ou promotion de la régénération des cellules épithéliales intestinales (CEI) (Kamada et al., 2013). Ainsi, les longues chaînes N-acyl, sécrétées par le microbiote intestinal, contribuent à réguler les réponses immunes et à induire les mécanismes de réparation tissulaire (Cohen et al., 2019). Les longues chaînes d'acide gras constituent une source d'énergie pour les CEI et jouent un rôle dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale. Certaines bactéries commensales, *via* leurs reconnaissances par des récepteurs de l'immunité innée, jouent un rôle dans la régulation des voies de l'inflammasome ou encore celles découlant du récepteur d'aryl hydrocarbène (AhR) (Thaïss et al., 2016). De plus, ces bactéries empêchent la croissance et l'adhérence de microorganismes pathogènes en limitant le niveau d'oxygène

disponible ou en diminuant l'expression de leurs facteurs de virulence. Enfin les germes commensaux sont en compétition directe avec les bactéries pathogènes vis à vis des sources d'énergie (nutriments présents au niveau de l'épithélium intestinal) (Belkaid and Hand, 2014).



**Figure 2 : Effets immunomodulateurs induits par les germes commensaux au niveau de la muqueuse intestinale.**

Le microbiote intestinal et ses produits modulent et orientent les réponses immunes vers une voie immunorégulatrice *via* l'induction de Ly Treg, de DCs tolérogènes ainsi que des processus de réparation des cellules épithéliales intestinales. D'après (Cohen et al., 2019).

Ainsi, l'ensemble des microorganismes composant le microbiote intestinal occupe une place privilégiée au sein de l'organisme humain au vu de leurs nombreuses fonctions essentielles. Des travaux récents ont permis de mettre en évidence qu'un appauvrissement de la flore commensale était impliqué dans différents mécanismes aboutissant au déclenchement de maladies inflammatoires chroniques (MICI), comme la maladie de Crohn (MC), la rectocolite hémorragique (RCH) ou encore l'obésité et le diabète (Levy et al., 2017).

Pour permettre l'équilibre de cette symbiose hôte/microbiote et ainsi empêcher une activation spontanée du système immunitaire pouvant conduire à une inflammation chronique non contrôlée, il est important de limiter les contacts entre les germes commensaux et la muqueuse intestinale (Bessman and Sonnenberg, 2016a). Cette ségrégation est assurée par les actions combinées de l'épithélium intestinal et du système immunitaire muqueux.

## b) Les barrières épithéliales

Plusieurs types cellulaires, composant l'épithélium intestinal, assurent diverses fonctions et contribuent au renouvellement de ce dernier.

### i. Les cellules épithéliales intestinales (CEI)

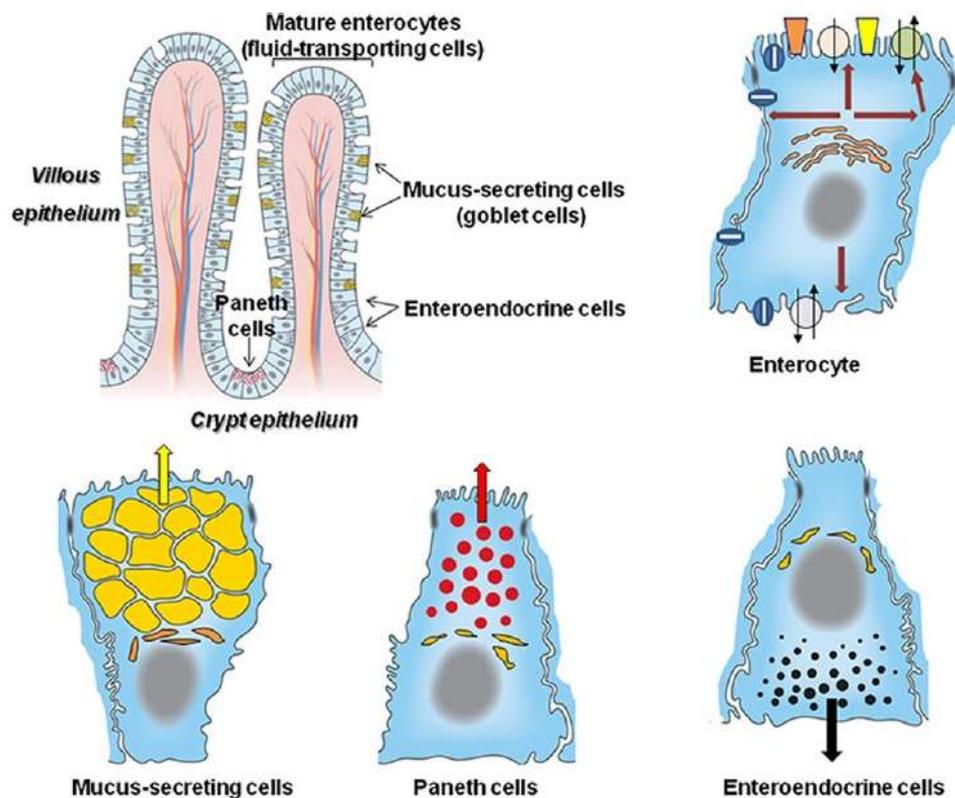
Les cellules spécialisées intestinales sont retrouvées pour la plupart au niveau des villosités de l'intestin (**Figure 3**). Ainsi nous pouvons distinguer quatre types cellulaires principaux :

- Les cellules caliciformes ou cellules de goblet assurant la production de mucus qui joue un rôle majeur dans la protection de la muqueuse intestinale.
- Les cellules entéroendocrines spécialisées dans la sécrétion d'hormones.
- Les entérocytes exerçant un rôle d'échange (absorption de petites molécules, d'ions et d'eau).
- Les cellules de Paneth, uniquement retrouvées au niveau des cryptes iléales sont impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière intestinale *via* la production de PAMs (Gassler, 2017; Ouellette and Bevins, 2001). Les cellules tuft intestinales sont quant à elles impliquées dans les défenses anti-parasitaires (Schneider et al., 2019).

Au niveau des cryptes sont localisées les cellules souches intestinales (CSI) et les cellules TA (transit-amplifying) assurant le renouvellement de l'épithélium intestinal en 4 à 5 jours (Gehart and Clevers, 2019).

De récentes analyses de single cell sur des CEI iléales murines isolées à l'homéostasie ou au cours d'une infection, ont permis d'identifier de nouveaux sous-types de cellules entéroendocrines, de Paneth et de goblet mais aussi de mieux caractériser celles existantes (facteur de transcription/récepteur/signature de gènes)(Haber et al., 2017). De façon similaire chez l'homme, ces analyses transcriptomiques ont permis de caractériser finement les signatures de gènes propres à chacun des principaux types cellulaires épithéliaux (Parikh et al., 2019; Wang et al., 2020b). L'étude de différents segments intestinaux a montré une forte prévalence des entérocytes (>70%) au niveau de la muqueuse iléale, tandis qu'il existe un enrichissement des cellules de goblet au niveau du colon (20% versus 5% au niveau de l'iléon). Ainsi, ces travaux ont permis de définir pour chaque CEI des marqueurs propres le rôle qu'elles endossent en fonction de leur localisation intestinale mais également leur implication au cours

de pathologies inflammatoires chroniques comme les MICI (Huang et al., 2019; Parikh et al., 2019; Smillie et al., 2019).



**Figure 3 : Principaux types cellulaires spécialisés constituant l'épithélium intestinal.**

La muqueuse intestinale est constituée de quatre types cellulaires principaux exerçant des fonctions physiologiques importantes. Les cellules de Paneth (retrouvées uniquement au niveau de l'iléon) produisent des PAMs alors que les cellules de goblet des mucines, les entérocytes jouent un rôle dans l'absorption des ions et des petites molécules enfin les cellules entéroendocrines sont spécialisées dans la sécrétion d'hormones. D'après (Liévin-Le Moal and Servin, 2013).

## ii. La barrière mécanique

Les jonctions serrées, établies entre les cellules épithéliales, assurent une barrière mécanique (Zeisel et al., 2019). Ces dernières sont composées au pôle apical de protéines comme les claudines ou les occludines et au pôle basal de jonctions adhérentes (cadhérines) et de desmosomes. Ces derniers jouent un rôle dans la modulation de l'ouverture des jonctions. Cette barrière est renforcée par les actions d'enzymes, du pH, des PAMs et du mucus constituant ainsi un arsenal chimique protégeant de l'invasion microbienne.

### iii. La barrière chimique

- Les peptides antimicrobiens (PAMs)

Les PAMs sont sécrétés de façon abondante au niveau des muqueuses, notamment intestinales. Leur rôle majeur est d'exercer des actions bactéricides, cependant certains PAMs possèdent des actions plus larges sur diverses cellules modulant ainsi les réponses immunes (**Figure 4**).

Les défensines, peptides cationiques de poids moléculaires compris entre 3 et 5 kilo dalton (kDa) sont des PAMs sécrétés dans la lumière intestinale en réponse à divers stimuli (Hazlett and Wu, 2011). Leur structure se compose de deux feuillets  $\beta$  reliés entre eux par des ponts disulfures. Une modification post-traductionnelle, assurée à la fois par l'appareil de Golgi et ensuite par les trypsines humaines, est nécessaire pour la maturation de la forme pré-pro-défensine en une défensine fonctionnelle. Une fois active, du fait de leur caractère amphiphile, les défensines reconnaissent la membrane chargée négativement des micro-organismes et s'y insèrent en établissant des lésions électrostatiques. Leur présence aboutit à la formation de pores, à une hyperperméabilité en raison d'une rupture des membranes et enfin à la mort du pathogène (Hancock et al., 2016a). Les défensines sont classées en deux catégories en fonction du réarrangement entre les cystéines, définissant ainsi les alpha-défensines ( $\alpha$ -défensines,) et les bêta-défensines ( $\beta$ -défensines).

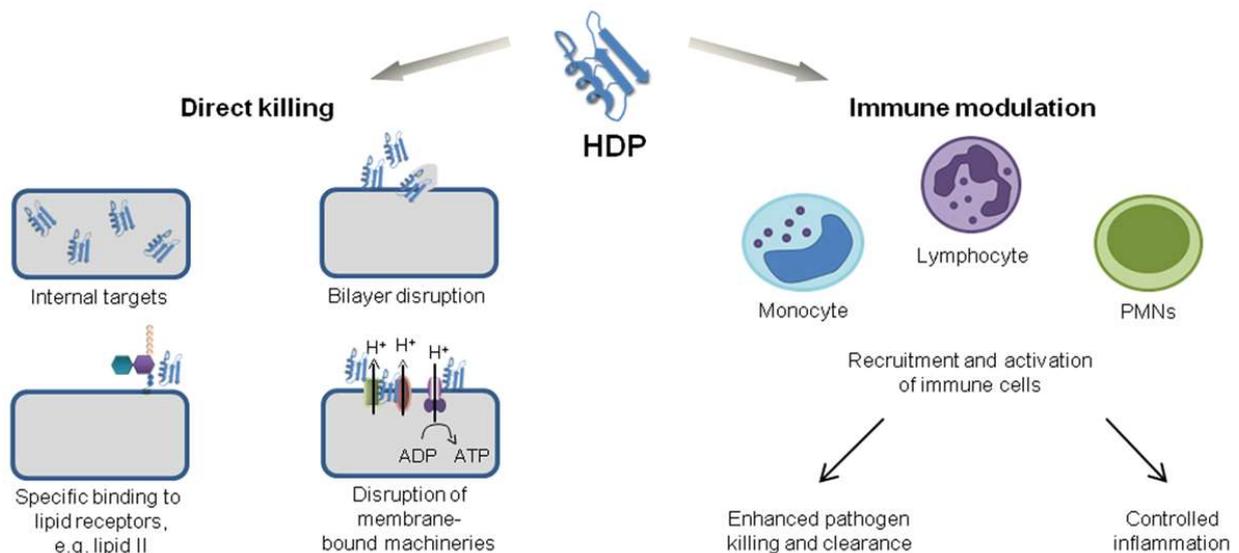
- ✓ L' $\alpha$ -défensine 5 (HD5) codée par le gène *DEFA5* et l' $\alpha$ -défensine 6 (HD6) codée par le gène *DEFA6* sont toutes deux produites puis stockées dans les granulations des cellules de Paneth. Un signal constitutif ou inductible aboutit à une dégranulation des vésicules puis à la sécrétion d' $\alpha$ -défensines dans la lumière intestinale. La sécrétion inductible peut être régulée soit par le facteur de transcription TCF4, soit par la voie de signalisation NF-kB activée en réponse à la reconnaissance par le récepteur cytosolique NOD2 de son ligand bactérien (muramyl dipeptide) (Gallo and Hooper, 2012). De par son activité bactéricide contre les bacilles à Gram négatif (BGN) *Staphylococcus aureus*, HD5 limite la colonisation bactérienne intestinale et contribue ainsi au contrôle de l'environnement du microbiote intestinal (Salzman et al., 2003). De plus, cette défensine possède aussi un pouvoir antiparasitaire contre les microsporidies de *Toxoplasma gondii* et antivirale en limitant les infections par le virus de

l'immunodéficience humaine ou les virus *Herpès simplex*. L'activité antimicrobienne d'HD6 est plus modeste.

- ✓ Trente-huit  $\beta$ -défensines sont actuellement décrites chez l'homme. Leurs productions sont assurées majoritairement par les cellules épithéliales de la peau, des tractus digestif, respiratoire et uro-génital mais aussi par les macrophages ainsi que les cellules dendritiques (DCs) (Hazlett and Wu, 2011). La  $\beta$ -défensine 1 (BD1) est produite constitutivement au niveau du colon. Les  $\beta$ -défensines 2 et 3 (BD2 et BD3) codées respectivement par les gènes *DEFB4A/DEF4B* et *DEFB103B/DEFB103A*, sont sécrétées dans la lumière colique et à plus faible niveau dans celle iléale en réponse à divers stimuli. Les voies de signalisation issues des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  ou l'IL-22) ou des récepteurs de l'immunité innée (Toll-like receptors TLRs / le récepteur cytosolique NOD2 pour nucleotide binding oligomerization domain 2) représentent les principaux signaux de stimulation de l'expression de ces PAMs (Kolls et al., 2008 ; Gallo and Hooper, 2012). Suite à leurs libérations dans la lumière intestinale *via* leurs activités antibactériennes, antivirales et antiparasitaires, les  $\beta$ -défensines jouent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale en limitant les translocations microbiennes (Hancock et al., 2016a).

En plus de ce rôle de renforcement des barrières épithéliales, les  $\alpha$ -défensines possèdent des actions pro-inflammatoires à l'origine du recrutement des macrophages, des monocytes et des mastocytes *via* la sécrétion de chimiokines (CXCL8) par les CEI. Les  $\beta$ -défensines jouent aussi le rôle de chimiattractant pour les DCs à un stade immature, les LyT ou encore les polynucléaires neutrophiles (PNN) (Hancock et al., 2016a). Cette activité chimiotactique des défensines est dépendante de leur structure puisqu'elle s'affaiblit en l'absence de pont disulfure. Cet afflux de leucocytes sur le site inflammatoire permet ainsi de combattre l'infection avec d'autant plus d'efficacité. Au niveau des CEI, les  $\alpha$ -défensines jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale et exercent des actions pro-apoptotiques ; tandis que les  $\beta$ -défensines contribuent aux processus de cicatrisation de la muqueuse (Hancock et al., 2016a). Les  $\beta$ -défensines peuvent se comporter comme des alarmines capable d'être reconnues par les récepteurs de l'immunité innée. Ainsi, la BD3 active les monocytes en se liant aux TLR1&2 ou encore amplifie la signalisation issue de l'activation du TLR9. Enfin, ces PAMs possèdent des actions immunomodulatrices : la BD3 inhibe la production de TNF $\alpha$

par les monocytes activés par le LPS et les BD2 et BD4 induisent l'angiogenèse *via* le recrutement de cellules endothéliales.



**Figure 4 : Principaux mécanismes d'actions des PAMs.**

Les peptides antimicrobiens (PAMs ou HDP (host defense peptide) exercent leurs pouvoirs bactéricides soit en agissant directement sur l'agent pathogène (formation de pores, internalisation) soit en exerçant des actions plus larges sur diverses cellules (neutrophiles, lymphocytes et monocytes) modulant ainsi les réponses immunes. D'après (Ulm et al., 2012).

La lipocaline 2 (LCN2), un peptide antimicrobien de 25 kDa, est aussi impliquée dans la protection de l'invasion de la muqueuse intestinale par des pathogènes et/ou les germes de la flore commensale. Son pouvoir antibactérien s'exerce *via* sa capacité à neutraliser les sidérophores, des chélateurs de fer produits et sécrétés par les micro-organismes pour leur assurer des réserves essentielles à leur développement. De cette façon, la LCN2 les prive de leur ressource principale en nutriment (Flo et al., 2004). Les PNN, les macrophages ou encore les CEI constituent ses sources principales de production. La LCN2 est ensuite stockée dans les granulations des PNN avant d'être libérée dans la lumière intestinale en réponse aux signaux en partie dirigés par les cytokines de l'immunité muqueuse : l'IL-22 et l'IL-17 (Kolls et al., 2008). Dans leurs travaux, Moschen et al. soulignent son rôle primordial dans la protection de la muqueuse intestinale contre les processus inflammatoires (Moschen et al., 2016). En effet les absences combinées de son activité bactériostatique et de celle immunorégulatrice de l'IL-10 laissent l'opportunité à une colonisation par des germes tels que *Alistipes spp*, provoquant

une inflammation intestinale qui, si elle n'est pas contrôlée, peut conduire à un développement tumoral.

Un autre PAM appartenant à la famille REG (Regenerative Islet Derived Proteins) joue un rôle prépondérant dans la protection de la barrière épithéliale. Il s'agit de REG3 gamma (REG3G), une lectine de type C, de poids moléculaire égal à 15kDa et codée par le gène *REG3G*. Ce peptide est synthétisé sous la forme d'un pro-peptide nécessitant l'action de trypsine pour scinder le domaine N-terminal et permettre ainsi sa maturation. Grâce à son domaine carbohydrate, REG3G reconnaît le peptidoglycane des bacilles à Gram positif (BGP), limitant ainsi l'implantation et la colonisation par certaines bactéries telles que *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (Vaishnava et al., 2011). Au cours des premiers mois de vie, l'expression de REG3G est induite au niveau de l'intestin grêle pour façonner la composition de la flore intestinale. Ce peptide est produit constitutivement par les cellules de Paneth, tandis que sa production colique est induite au cours d'infections ou lors de processus inflammatoires. En effet, les signaux issus des récepteurs de l'immunité innée (TLR4 et TLR5) contribuent, *via* des voies de signalisation dépendantes de la voie Myd88 ou de celle de l'IL-22, à sa sécrétion dans la lumière colique (Gallo and Hooper, 2012).

- Le mucus

Les cellules de goblet synthétisent des protéines glycolysées, les mucines (MUC) entrant dans la composition du mucus. Ce gel visqueux, renouvelé toutes les six à douze heures tapisse l'épithélium intestinal d'une couche épaisse contribuant ainsi au maintien d'une barrière étanche au pôle apical (Johansson and Hansson, 2016a). La composition, la densité et l'épaisseur du mucus, fluctuantes le long de l'intestin sont en corrélation directe avec l'invasion microbienne. En effet, la couche de mucus épaissie au niveau du colon protège d'avantage les CEI en comparaison à la muqueuse iléale recouverte par une couche fine de mucus. Deux catégories de mucines composent le mucus : les mucines sécrétées et celles membranaires.

- ✓ Les mucines sécrétées (MUC2, MUC5 et MUC6) forment un gel hydraté d'épaisseur comprise entre 300 et 700  $\mu\text{m}$  et composé de deux couches. La couche extérieure, assez mince, est colonisée par différents microorganismes ; tandis que la couche interne proche de l'épithélium intestinal est stérile. De cette façon, ce gel muqueux empêche l'adhérence des pathogènes et constitue une matrice captant et concentrant

les PAMs. Parmi les mucines secrétées, la mucine 2 (MUC2), codée par le gène *MUC2*, correspond à une protéine trimérique dont les sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures (Arike and Hansson, 2016). En plus de ces propriétés de barrière, MUC2 possède une activité tolérogène en induisant la production de cytokines immunorégulatrices comme IL-10 et le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) par les DCs (Shan et al., 2013).

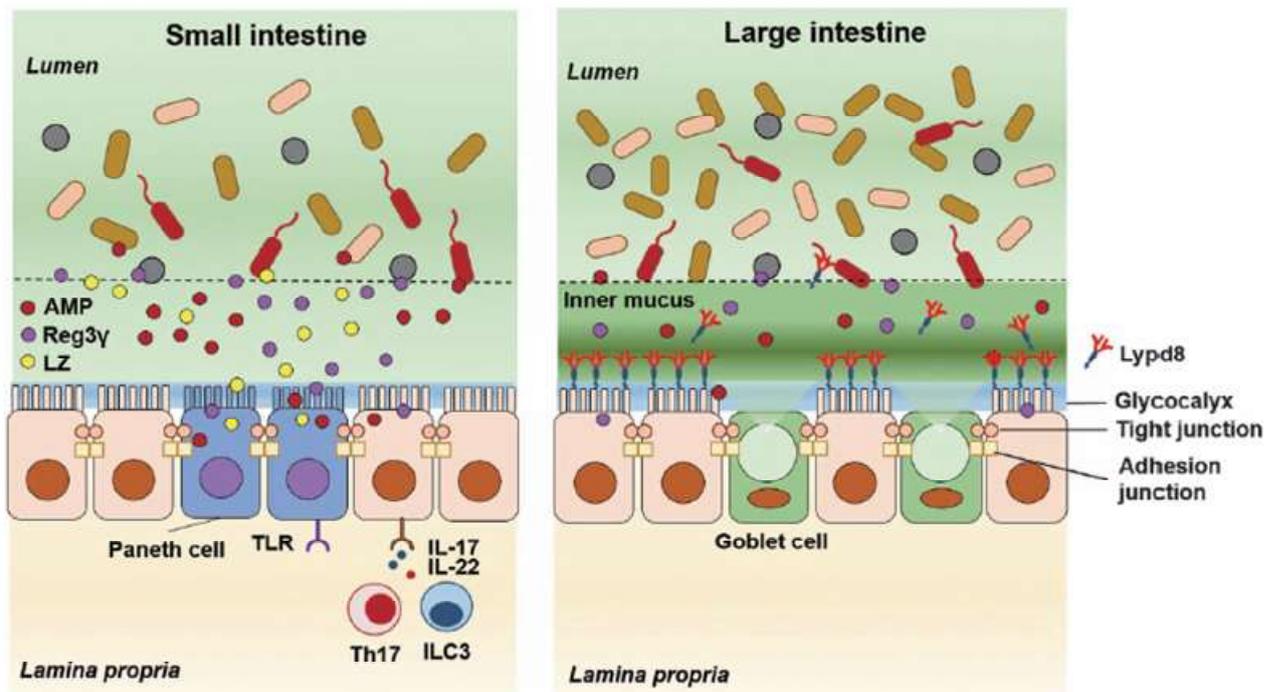
- ✓ Les mucines membranaires telles que MUC1, MUC3A/B, MUC12, MUC13 et MUC17 composent le glycocalyx : une dense macromolécule d'épaisseur comprise entre 30 et 500nm à la surface des CEI (Pelaseyed and Hansson, 2020). Le gène *MUC1* code pour la mucine 1 (MUC1), un hétérodimère formé d'une chaîne alpha permettant l'adhésion au pôle apical et d'une chaîne bêta impliquée dans la signalisation intracellulaire. Sa surexpression, sa localisation aberrante ou la modification de sa glycosylation sont associées aux adénocarcinomes.

Leurs expressions sont sous la régulation de cytokines telles que l'IL-4, IL-13, IL-9 mais aussi des signaux issus de l'activation des TLRs (Knoop and Newberry, 2018). De plus, ces cytokines, en modulant l'expression de la glycosyltransférase, contrôlent aussi le niveau de glycosylation des mucines. Ce taux de glycosylation est non négligeable puisque constituant une source d'énergie pour les bactéries commensales, il est directement corrélé aux propriétés de barrière. La libération des mucines dans la lumière intestinale est sous le contrôle du récepteur NLRP6 appartenant à la famille des récepteurs de type NOD (Birchenough et al., 2015).

La **Figure 5** illustre la barrière constituée par les actions combinées des PAMs et du mucus pour limiter l'implantation et la colonisation de la muqueuse intestinale par les pathogènes et/ou les germes de la flore commensale.

### **i. La barrière microbienne**

Cette fonction majeure dépendante des germes commensaux a été détaillée précédemment (p2).



**Figure 5 : La muqueuse épithéliale intestinale constitue un rempart de protection limitant les contacts entre le système immunitaire muqueux et les germes du microbiote intestinal.**

Les jonctions serrées établies entre deux CEI adjacentes assurent une barrière mécanique, grâce aux protéines de jonctions serrées au pôle apical et aux jonctions adhérentes au niveau de leur pôle basal. Les actions combinées des peptides antimicrobiens (PAMs), produit par les cellules de Paneth au niveau de l'iléon et les cellules épithéliales au niveau du colon ainsi que du mucus produit par les cellules de goblet jouent un rôle essentiel dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale. Au niveau du colon, la couche de mucus interne stérile est recouverte par la couche externe colonisée par les bactéries commensales tandis qu'au niveau de l'iléon, seule la couche de mucus externe est présente.

AMPs : peptides antimicrobiens, REG : Regenerative Islet Derived Proteins. D'après (Okumura and Takeda, 2017).

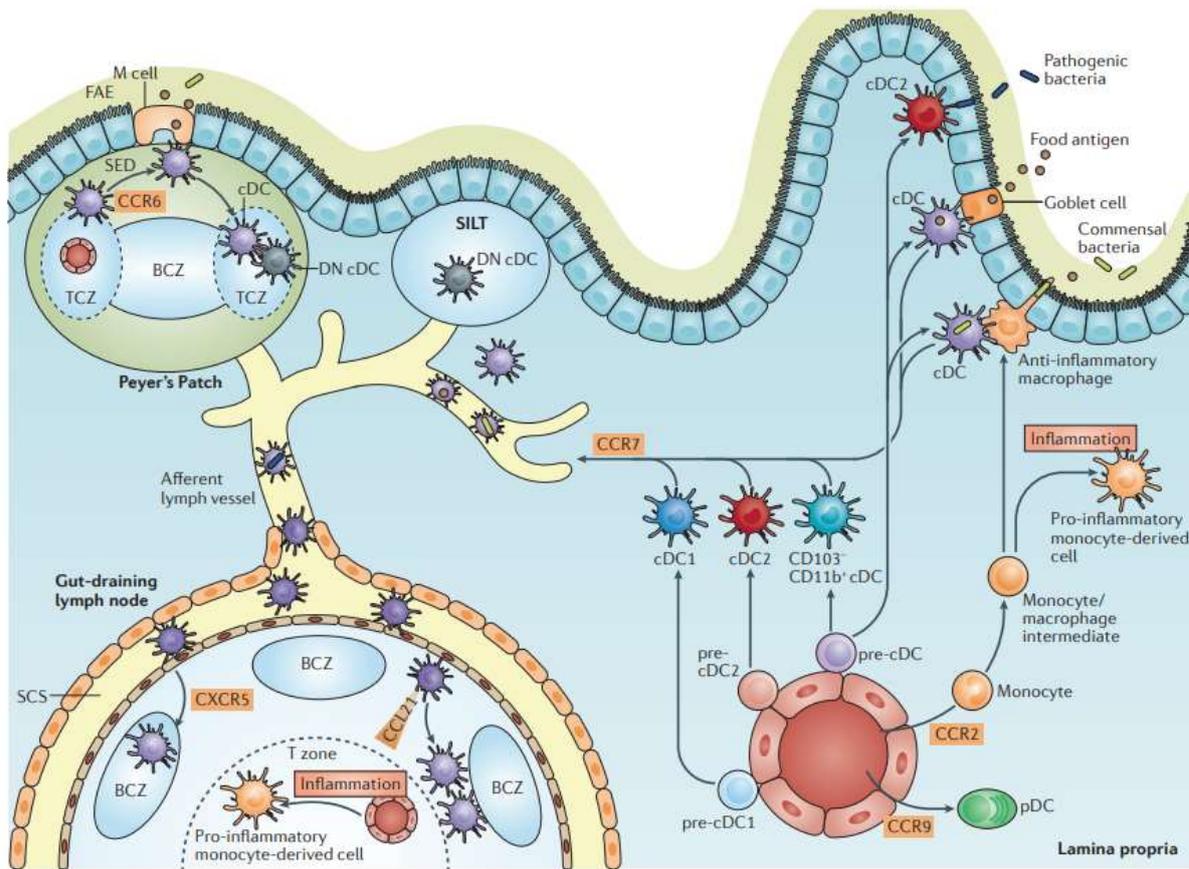
### c) Le système immunitaire muqueux

Le système immunitaire muqueux est défini par l'ensemble des structures lymphoïdes associées aux surfaces muqueuses. Ce dernier a acquis une tolérance aux germes de la flore commensale tout en les empêchant d'envahir la muqueuse. De plus, il doit maintenir une capacité à monter une réponse efficace à l'encontre de micro-organismes pathogènes. A cette fin, le système immunitaire muqueux est organisé en sites muqueux inducteurs et effecteurs.

#### i. Organisation du système immunitaire muqueux

Les sites muqueux inducteurs correspondent à des structures lymphoïdes organisées, au niveau desquelles sont initiées les réponses immunitaires adaptatives. Parmi les sites muqueux inducteurs, nous pouvons distinguer les tissus lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT) et les ganglions lymphatiques drainant la muqueuse tels que les ganglions mésentériques (GM) (**Figure 6**). Les MALTs possèdent la particularité de ne pas présenter de voies lymphatiques afférentes : les antigènes pénètrent *via* des cellules spécialisées (cellules M) composant l'épithélium associé au follicule (FAE pour Follicle Associated Epithelium) et sont transportés jusqu'au dôme sub-épithélial pour être présentés aux DCs. Les plaques de Peyer (PP) constituent d'autres structures lymphoïdes organisées, retrouvées exclusivement au niveau de l'iléon (Cornes, 1965). Les PP décrivent une organisation similaire aux autres ganglions avec de nombreux follicules B (jusqu'à 100) entourés de zones T restreintes. Des centres germinatifs (GC) sont observés au sein des follicules B indiquant une stimulation permanente. Des structures identiques aux PP sont retrouvées au niveau du caecum et du colon (Buettner and Lochner, 2016; Masahata et al., 2014). Des structures lymphoïdes isolées (SLIT) (organes lymphoïdes tertiaires) appartiennent aussi aux MALT mais contrairement aux PP, ces SLIT ne possèdent que des follicules B avec de multiples CGs (Buettner and Lochner, 2016; Mowat and Agace, 2014) et quelques rares lymphocytes T. Selon la taille, nous pouvons distinguer les cryptopatches et les follicules lymphoïdes isolés (FLIs) correspondant à différents stades de maturation (Buettner and Lochner, 2016). Chez l'homme, les SLIT au stade de cryptopatche n'ont pas été caractérisés. La muqueuse intestinale humaine dénombre jusqu'à 30 000 FLIs dont la fréquence est maximale au niveau de l'iléon (Moghaddami et al., 1998). De même, au niveau du colon, leur fréquence augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche du colon recto-sigmoïde (O'Leary and Sweeney, 1986). Les LTi (lymphoid tissue

inducer) *via* la production de lymphotoxine  $\beta$  (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) joue un rôle primordial dans le développement de ces MALTs (Buettner and Lochner, 2016). Chez la souris, contrairement aux PP, les SLIT se développent après la naissance et leur maturation au niveau de l'intestin grêle est sous l'influence de signaux de la flore intestinale (Baptista et al., 2013) tandis que celle des SLIT coliques est décrite comme indépendante du microbiote intestinal.



**Figure 6 : Structures lymphoïdes secondaires et tertiaires décrivant le système immunitaire muqueux.**

Le système immunitaire muqueux est organisé en MALT comprenant les plaques de Peyers (PP) et les structures lymphoïdes isolées (SLIT) et en ganglions lymphatiques drainant la muqueuse comme les ganglions mésentériques. Ces derniers ainsi que les PP sont des organes lymphoïdes secondaires alors que les SLIT correspondent à des structures lymphoïdes tertiaires. Les MALTs possèdent la particularité de ne pas posséder de vaisseau lymphatique afférent. Les antigènes luminaux sont reconnus par des cellules spécialisées (cellules M) localisées au niveau de l'épithélium associé au follicule (FAE) puis sont transportés jusqu'au dôme sous-épithélial (SED) où ils sont présentés aux DCs. Dans la LP intestinale, les DCs sont activées par les antigènes luminaux *via* d'autres mécanismes (émission de dendrites, présence de pores entre 2 cellules de goblet ou encore *via* les macrophages). L'activation des DCs induit l'expression de CCR7 et puis leur migration jusqu'au ganglion mésentérique le plus proche. A ce niveau, la réponse immune adaptative se met en place et permet l'activation des lymphocytes naïfs en lymphocytes T effecteurs et plasmocytes sécréteurs d'IgA. D'après (Worbs et al., 2017).

Les sites muqueux effecteurs correspondent aux zones au niveau desquelles se déroulent les mécanismes effecteurs des réponses immunitaires muqueuses, c'est à dire l'épithélium et la *lamina propria* (LP). Au sein de ces sites, sont retrouvés majoritairement des lymphocytes intra-épithéliaux, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant polarisé vers la voie Th17 ainsi que des plasmocytes sécréteurs d'IgA. Les lymphocytes de l'immunité innée (ILC ; innate lymphoid cell) et notamment les ILC3 sont largement présents au sein de la LP (Vivier et al., 2018). Des macrophages intestinaux, des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles (PNE/PNN) ainsi que des mastocytes sont également retrouvés.

## ii. La réponse du système immunitaire muqueux

### ▪ Initiation de la réponse (Figure 7,n°1)

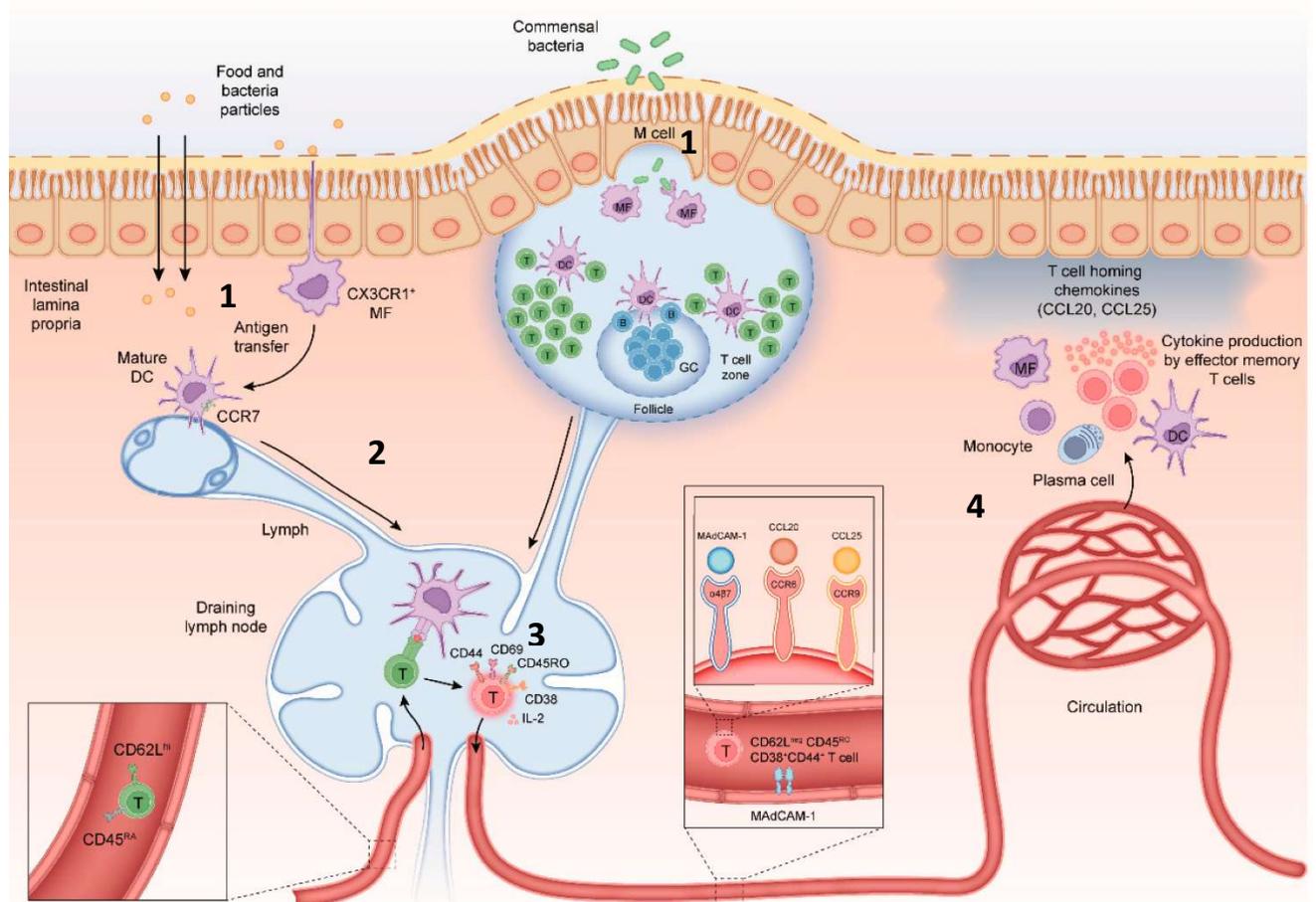
L'épithélium associé au follicule (FAE), *via* les cellules M, assure le passage d'antigènes luminaux dans les PP ou les SLIT où ils sont ensuite présentés aux DCs recrutées de façon CCR6 dépendante au sein du dôme sub-épithélial (Worbs et al., 2017).

Trois grands sous-types de DCs intestinales ont été décrits : les DC1 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>), les DC2 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) et le sous-type plus rare des DCs (CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CX3CR1<sup>int</sup>) (Watchmaker et al., 2014). Des DCs plasmacytoïdes intestinales (CD123<sup>+</sup>) sont aussi présentes et contrairement aux DC1 et DC2, elles ne migrent pas une fois activées jusqu'au ganglion drainant la muqueuse. Les DCs de la LP sont activées par des antigènes luminaux *via* d'autres mécanismes. Ainsi, ils peuvent être captés par les dendrites des DC2s (Chieppa et al., 2006; Farache et al., 2013) ou des DCs exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (Niess et al., 2005). Les antigènes luminaux peuvent aussi être transportés jusqu'aux DCs CD103<sup>+</sup> de la LP *via* des pores présents entre 2 cellules de goblet adjacentes (McDole et al., 2012). Enfin, il a été suggéré que ces antigènes pouvaient être reconnus par des macrophages CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> puis transférés aux DCs (CD 103<sup>+</sup>) (Mazzini et al., 2014) (Figure 6).

### ▪ Migration (Figure 7,n°2)

Les signaux inflammatoires cytokiniques et/ou des TLRs provoquent la maturation des DCs puis leur migration, *via* l'augmentation de l'expression de CCR7, vers le ganglion mésentérique drainant où sont initiées les réponses immunitaires adaptatives intestinales. Les DCs CD103<sup>+</sup>

de la LP possèdent la caractéristique d'exprimer une déshydrogénase (RALDH) fortement impliquée dans le métabolisme de la vitamine A en acide rétinolique (RA).



**Figure 7 : Organisation de la réponse immunitaire adaptative dans la LP intestinale.**

Le système immunitaire muqueux possède la propriété d'être tolérant aux germes de la flore commensale ou aux antigènes issus de l'alimentation tout en étant capable de montrer une réponse en cas d'agression par un agent pathogène. Ceci est permis grâce à une organisation fine du système immunitaire muqueux, capable, en fonction du stimulus initial et de l'environnement intestinal de monter une réponse tolérogène ou en cas d'agression une réponse inflammatoire. Cette réponse comprend plusieurs étapes, résumées ci-dessus : **1**) activation des DCs grâce à un stimulus au niveau des PP, des FLI ou encore de la *lamina propria* ; **2**) migration des DCs activées jusqu'au ganglion mésentérique le plus proche ; **3**) mise en place de la réponse immunitaire adaptative au niveau des zones T et des follicules B ; **4**) « *homing* intestinal » *via* l'expression de récepteurs spécifiques par les lymphocytes effecteurs. D'après (Tindemans et al., 2020).

La production de RA par les DCs CD103<sup>+</sup> influence et organise les réponses immunes au sein des ganglions mésentériques en 1) induisant l'expression de récepteurs de « homing » intestinal ( $\alpha 4\beta 7$ , CCR9 se liant respectivement à MadCAM et CCL25) à la surface des lymphocytes activés, 2) orientant la commutation isotypique vers les IgA) et 3) favorisant la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LyTCD4<sup>+</sup>) naïfs en Ly Treg (Coombes and Powrie, 2008). De plus, il a été mis en évidence chez la souris que la concentration en RA était plus importante au niveau de l'iléon, en comparaison au colon suggérant que les DCs iléales reçoivent plus de signaux émanant du RA (Jaensson-Gyllenbäck et al., 2011). Les DCs présentes au niveau des PP et du SLIT migrent du dôme sub-épithélial jusqu'à la zone parafolliculaire T.

- Initiation de la réponse adaptative au niveau des OLS : (Figure 7,n°3)

Les DCs ayant migré depuis la LP rejoignent les zones T des organes lymphoïdes secondaires (OLS) et présentent *via* leur CMH un peptide protéique aux LyT naïfs. L'environnement cytokinique produit par les DCs, en réponse à l'activation de ces récepteurs de l'immunité innée par les germes commensaux/pathogènes présents dans la lumière intestinale module la polarisation en lymphocytes effecteurs. Au niveau des centres germinaux des follicules B (ganglions mésentériques et PP), les Ly B naïfs sont activés en plasmocytes sécréteurs d'IgA avec ou sans la contribution des LyT. En effet, la production de TGF $\beta$  par les DCs productrices de RA au cours des réponses T-dépendantes oriente la commutation isotypique vers les IgA (Agace and Persson, 2012; Macpherson and Uhr, 2004). Au cours des réponses T-indépendantes, l'activation des TLRs des DCs par les bactéries commensales promulgue la sécrétion d'APRIL (famille des cytokines TNF), BAFF ou encore de TGF $\beta$  permettant ainsi la production d'IgA (Pabst, 2012). Les FLI constituent un site majeur de production d'IgA par un mécanisme indépendant des LyT (Knoop and Newberry, 2012). Ainsi, chez la souris, il a été démontré un rôle prépondérant des LTI dans l'induction de la commutation vers les IgA au niveau des FLI (Tsuji et al., 2008).

- « Homing » intestinal (Figure 7,n°4)

Après activation dans les ganglions, les lymphocytes effecteurs retournent grâce aux récepteurs de « homing » vers les sites effecteurs muqueux. Ainsi nous pouvons distinguer au sein des lymphocytes effecteurs (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010) :

- des Ly T alpha beta intra-épithéliaux (CD8<sup>+</sup> ou double négatif) : lymphocytes cytotoxiques impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des CEI exprimant un phénotype anormal à la suite d'une infection ou un stress,
- des Ly T gamma delta intra-épithéliaux (10% des Ly). Ces lymphocytes lorsqu'ils sont stimulés par du RA, sécrètent de l'IL-22,
- des Ly T CD4<sup>+</sup> effecteurs majoritairement Th17, spécialisés dans la production d'IL-22 et d'IL-17, Th1 spécialisés dans la production de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ , ou Ly Treg. Les Ly Treg en régulant la balance de différenciation Th1/Th17 jouent un rôle majeur dans le maintien de la symbiose hôte/microbiote.
- des IgA produites par les plasmocytes au niveau de la LP sont prises en charge par un récepteur poly Ig permettant ainsi leur transcytose à travers la muqueuse intestinale avant d'être sécrétées dans la lumière intestinale définissant, ainsi les IgA sécrétoires. Ces dernières, adsorbées dans la couche de mucus ont pour fonction majeure d'empêcher des contacts trop rapprochés entre les bactéries commensales et les CEI. En effet, ces immunoglobulines sont capables de neutraliser des toxines et des micro-organismes retrouvés dans la lumière intestinale (Chen et al., 2020).

## *II. Aspects épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques, diagnostics et de suivis des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)*

La maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH) sont les deux entités principales regroupées sous le terme de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Ces pathologies affectent environ 1,5 millions d'Américains et 2,2 millions d'Européens. Le retentissement de ces pathologies est important puisqu'il s'agit d'affections de longue durée, altérant la qualité de vie et nécessitant le recours à des thérapeutiques lourdes.

### a) Définition

La RCH est caractérisée par une inflammation chronique et évoluant par poussées, de la couche épithéliale superficielle de la muqueuse colique. Cette pathologie atteint constamment le rectum et s'étend de manière continue plus ou moins haut vers le cæcum, respectant l'intestin grêle. Selon l'étendue des lésions, on parle de rectite (atteinte unique du rectum), de recto-sigmoïdite (atteinte combinée du rectum et du colon sigmoïde), de rectocolite gauche (atteinte du rectum, du colon sigmoïde et descendant) et enfin de pancolite lorsque l'ensemble du colon est touché (Baumgart and Sandborn, 2007). Les formes rectite et recto-sigmoïdite sont décrites dans 30-60% des cas, la rectocolite gauche dans 16-45% des cas et la pancolite dans seulement 15-35% des cas (Ungaro et al., 2017) (**Tableau 2**).

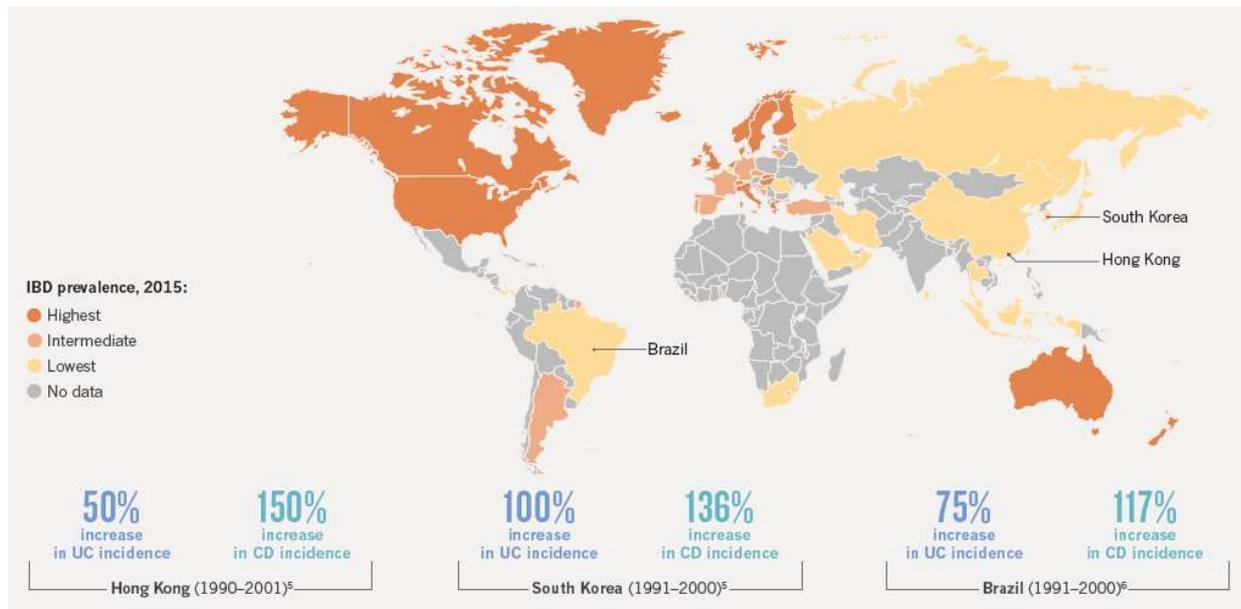
Depuis qu'elle a été décrite en 1932 par le médecin américain Burril B. Crohn à l'hôpital du Mount Sinai, la MC se caractérise par une inflammation chronique et discontinue de l'ensemble des couches de la muqueuse intestinale pouvant toucher n'importe quel segment du tube digestif. Ainsi, dans 45% des cas la MC atteint isolément l'iléon (Montreal classification L1) et dans 32% des cas seulement le colon (L2). Les formes iléo-coliques (L3) touchent 19% des malades et les formes totales (L4) sont retrouvées seulement dans 3% des cas (Baumgart and Sandborn, 2012). Il existe quelques rares cas de localisation des lésions au niveau de l'estomac et/ou du duodénum. Dans 30 à 50% des cas, des lésions anopérinéales correspondant à des lésions de la partie interne de l'anus et de la partie basse du rectum sont retrouvées (Baumgart and Sandborn, 2007). La classification de Montréal distingue trois phénotypes selon les caractéristiques initiales de la maladie : non sténosant non fistulisant

(B1) présent chez 81% des patients, sténosant (B2) (5%) et fistulisant et inflammatoire (B3) (14%) (Baumgart and Sandborn, 2012) (**Tableau 2**).

La distinction entre MC et RCH basée sur des critères cliniques, endoscopiques, histologiques et radiologiques, n'est pas toujours aisée. D'autres étiologies peuvent aussi être incriminées comme responsable d'iléite ou de colite. Ainsi, des agents infectieux parmi lesquels certaines bactéries (*Campylobacter spp*, *Yersinia spp*), certains parasites (*Entamoeba histolytica*) ou en certains virus (cytomégalovirus, *Herpès simplex*) ont été décrits. Parmi les étiologies non infectieuses, nous pouvons noter les causes inflammatoires (les diverticulites, la sarcoïdose), toxiques (AINS, certaines chimiothérapies), malignes (cancer colorectal ou certains lymphomes) et enfin vasculaires (vascularites).

#### b) Données épidémiologiques

Les MICI sont des pathologies chroniques affectant les populations des pays industrialisés, impactées par leur mode de vie, puisque la prévalence dans ces régions atteint 0.5% (Kaplan, 2015) (**Figure 8**). L'incidence mondiale de la MC est estimée entre 0,3-12,7 cas pour 100 000 Européens et entre 0 et 20,2 cas pour 100 000 Nord-Américains (Molodecky et al., 2012). Celle de la RCH, sensiblement similaire, est comprise entre 0,6 et 24,3 pour les Européens et entre 0 et 19,2 pour les Nord-Américains. De plus, l'incidence et la prévalence de ces pathologies n'ont cessé de croître ces dernières années, essentiellement au sein des populations urbaines établies dans des pays industrialisés (Ananthakrishnan, 2015; Kaplan, 2015). Cependant, l'incidence ne semble pas être influencée par le sexe mais plutôt par les appartenances ethniques. Ainsi, les populations juives d'origine ashkénaze encourent un risque trois fois plus élevé de développer une MICI (Bernstein et al., 2006). Ces dernières décennies ont aussi été marquées par une élévation de l'incidence au sein de zones géographiques peu touchées jusque-là (Ananthakrishnan, 2015). Ainsi en 10 ans, l'incidence de la MC a augmenté de 150% à Hong Kong, de 136% en Corée du Sud et de 117% au Brésil (Eisenstein, 2016). Ces populations ne partagent pas le même patrimoine génétique que les populations caucasiennes soulignant ainsi fortement l'impact de l'environnement dans l'apparition des MICI. Ces pathologies se déclarent le plus souvent chez l'adulte jeune : la moyenne d'âge lors de la première crise se situant entre 15 et 40 ans (Neurath, 2014).



**Figure 8 : Prévalence des MICI dans le monde en 2015.**  
D'après (Eisenstein, 2016)

### c) Les facteurs de prédispositions des MICI

La physiopathologie des MICI est complexe et multifactorielle. Les récents travaux ont permis d'identifier des facteurs génétiques et environnementaux représentant des acteurs cruciaux agissant en synergie dans la genèse des MICI. Cependant, il est important de noter qu'individuellement ces facteurs n'ont aucun impact sur le déclenchement des MICI mais seulement lorsqu'ils agissent en synergie entre eux. Ces gènes de susceptibilité associés à des facteurs environnementaux contribuent à altérer la composition du microbiote intestinal ainsi que l'étanchéité de la barrière intestinale contribuant ainsi au développement des MICI.

#### i. Epidémiologie génétique et génétique

L'impact de la génétique dans l'apparition des MICI a été mis en évidence depuis qu'il a été retracé chez 14% des patients atteints de MICI une histoire familiale de MC ou de RCH. En lien avec leur caractère héréditaire, le risque relatif de développer une MICI chez une personne liée au premier degré d'un patient atteint de MC est estimé autour de 5%. Pour ceux souffrant de RCH, le risque est estimé autour de 1,6% (Yang et al., 1993). Dans le cas où les deux parents sont atteints de MICI, le risque d'être atteint avant l'âge de 30 ans est considérablement augmenté puisque estimé à un tiers (Halme et al., 2006). De plus, le taux de concordance entre

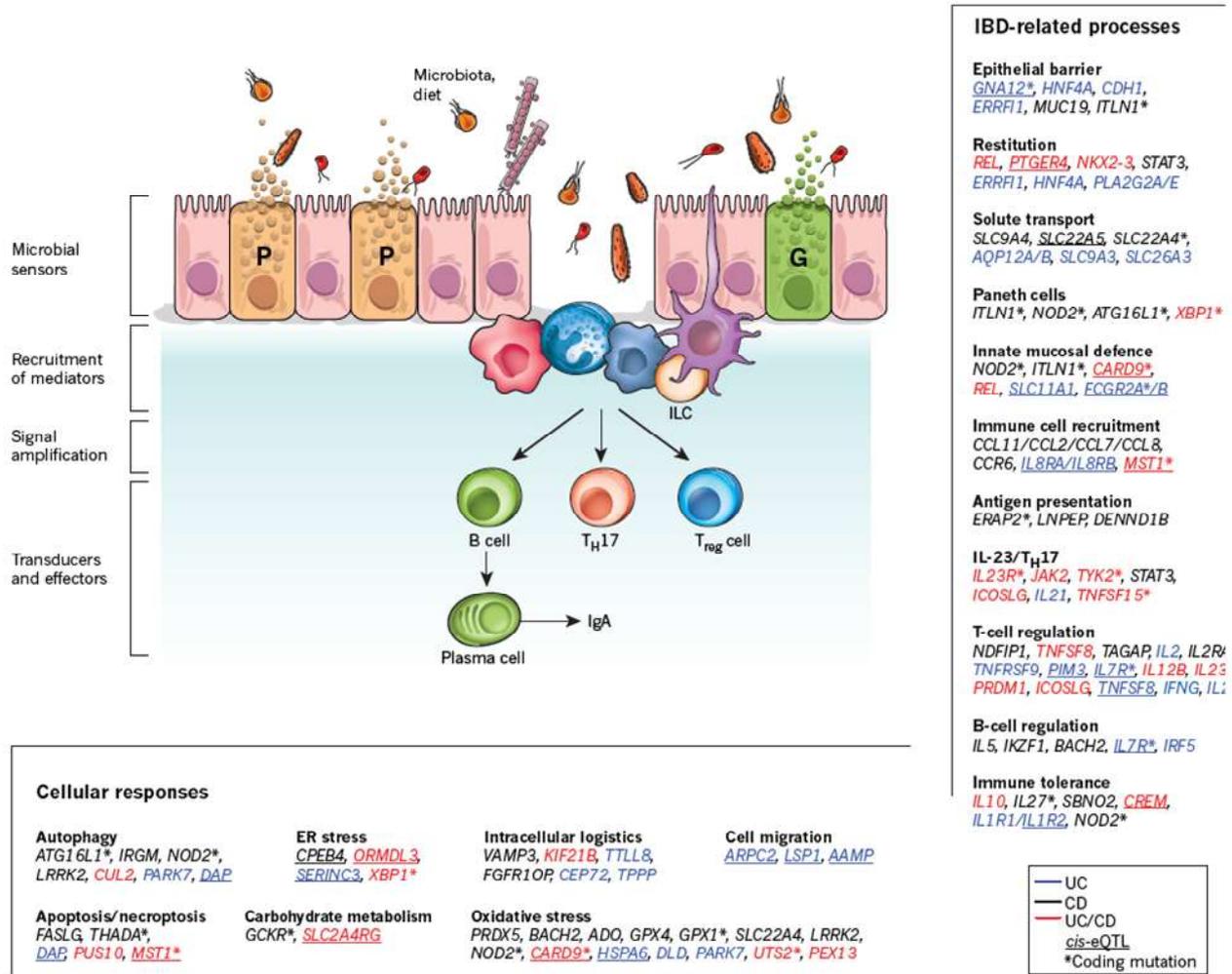
des jumeaux monozygotes est estimé entre 10-15% pour la RCH et à 30-35% pour la maladie de Crohn (Spehlmann et al., 2008).

Des études de méta-analyse à grande échelle basées sur l'analyse comparative de l'ensemble du génome de patients atteints de MC ou de RCH versus des sujets sains, ont permis l'identification de 163 locis associés aux MICI dont 110 communs aux deux, 37 spécifiques à la MC et 23 propres à la RCH (Jostins et al., 2012). Certains de ces gènes de susceptibilités, associés à la MC (*NOD2*, *PTPN22*) ont montré des niveaux significatifs de protection au cours de la RCH (Jostins et al., 2012). La présence de gènes de susceptibilité commun à la MC et la RCH permet d'expliquer des histoires familiales mixtes avec des membres atteints de MC et d'autres de RCH (Moller et al., 2015).

L'ensemble de ces gènes exerce un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale et des mutations de ces derniers ont pour conséquence l'altération de cet équilibre. Ainsi, certains de ces gènes (*CDH1*, *GNA12*, *PTPN22*, *HNF4A*) sont rattachés à un défaut de la perméabilité de la muqueuse intestinale observée au cours des MICI. Une mutation dans le gène *CDH1* provoque la formation d'une protéine E-cadhérine tronquée ou une anomalie de répartition des protéines de jonctions serrées (Muisse et al., 2009). D'autres locis contribuent à des dysfonctionnements dans les mécanismes de production et/ou de sécrétion des cellules de Paneth (Wehkamp and Stange, 2010) ayant pour conséquence une altération des défenses antimicrobiennes. En 2001, une mutation dans le gène *NOD2* (insertion d'une cytosine en position 3020 : 3020insC), à l'origine de la formation d'une protéine tronquée et d'une altération de la fonctionnalité du récepteur de l'immunité innée (reconnaissance du muramyl peptide et signalisation) est identifiée (Ogura et al., 2001). Depuis, 3 polymorphismes dans le gène *NOD2* (R702W, G908R, and 3020insC) ont été décrits et associés à une susceptibilité pour la MC (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). De plus, les souris déficientes pour le gène *Nod2* /- présentent une diminution des capacités de défense en cas d'invasion par des pathogènes (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). En 2004, l'équipe de Wehkamp relie les mutations observées dans le gène *NOD2* à la diminution d'expression des défensines 5 et 6 par les cellules de Paneth au cours de la MC (Klag et al., 2013; Wehkamp et al., 2004, 2007). La transfection de cellules Caco-2 (cellules épithéliales du colon) avec des mutants de *NOD2* confirme ces résultats puisqu'une inefficacité de la réponse immune au cours d'une infection à Salmonelle est observée (Hisamatsu et al., 2003). Enfin, il a été mis en évidence qu'une altération de la morphologie des cellules de Paneth était reliée à des SNP (single nucleotid polymorphism)

observés dans *NOD2* (VanDussen et al., 2014) et contribuait à une rechute précoce après une chirurgie. D'autres gènes sont aussi associés à un défaut de sécrétion des cellules de Paneth : *ATG16L1* (Autophagy related 16 like) (Cadwell et al., 2008; Hampe et al., 2007) impliqué dans l'autophagie et *KCNN4* codant pour un canal potassique calcium dépendant (Khor et al., 2011). Un polymorphisme dans le gène *XBPI* (X-Box Binding Protein 1), un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique, altère aussi la morphologie des cellules de Paneth et leur capacités antibactériennes (Kaser et al., 2008). Enfin des mutations dans les gènes (*TCF7L2*, *LRP6*), impliqués dans la voie de signalisation Wnt, peuvent expliquer la diminution d'expression des défensines observée au cours de la MC (Armbruster et al., 2017). Le mucus et les mucines qui le composent, établissent une barrière étanche contribuant aux défenses antimicrobiennes. Certains polymorphismes dans les gènes codant pour des mucines *MUC5AC*, *MUC2* et *MUC19* sont associés une susceptibilité aux MICI. D'autres gènes (*GPX1*, *GPX4*) sont reliés à la régulation de la production de dérivés oxygénés ou à la protection contre le stress oxydatif (Khor et al., 2011). Des mutations dans certains gènes impliqués dans la reconnaissance et/ou l'élimination des pathogènes peuvent également perturber l'homéostasie intestinale et initier une inflammation. Ainsi, deux gènes *ATG16L1* et *IRGM* (immunity related GTPase M) impliqués dans les processus d'autophagie, ont été décrits comme jouant un rôle clef dans la pathogénèse des MICI (Hampe et al., 2007; McCarroll et al., 2008). L'autophagie est un mécanisme inné important pour permettre l'homéostasie intracellulaire en assurant l'élimination de composants intracellulaires et des pathogènes. Ainsi, des mutations (variant T300A) dans le gène *ATG16L1* altèrent le processus normal d'autophagie, provoquant un défaut d'élimination des bactéries pathogènes (Khor et al., 2011). De nombreuses études ont démontré que *NOD2* interagit avec *ATG16L1* et que les variations observées sur ces gènes limitent leur interaction, impactant ainsi la clairance bactérienne et les mécanismes de présentation (Travassos et al., 2010). Un autre récepteur de l'immunité innée DECTIN-1 (*CLEC7A*) reconnaissant certains motifs à la surface des champignons et sa protéine adaptatrice associée CARD9, constituent 2 autres gènes de susceptibilité associés aux MICI (Cohen et al., 2019; Khor et al., 2011) en provoquant une altération de la voie Th17 impliquée dans la synthèse de cytokines telles que l'IL-22 et l'IL-17, nécessaires à la régulation de l'homéostasie intestinale. Des facteurs génétiques immuns ont aussi été identifiés avec la mise en évidence de SNP dans des gènes codant certaines cytokines ou chimiokines (*CCL20*, *CCL2*), des récepteurs de cytokines (les récepteurs à l'IL-12 ou IL-23

(Duerr et al., 2006)) ou encore des médiateurs de signalisation (STAT1, STAT3, STAT4 ou la kinase JAK2) (Jostins et al., 2012). De plus, des mutations avec perte de fonction ont été mise en évidence dans des gènes codant des cytokines immunorégulatrices (IL10, IL10RA, IL10RB ou TGFB1) et associées aux formes précoces de MICI (Neurath, 2019).



**Figure 9 : Principaux gènes de susceptibilité associés aux MICI.**

L'homéostasie intestinale est permise grâce aux actions combinées des CEI ainsi que des acteurs de l'immunité innée et adaptative permettant de limiter les contacts entre le système immunitaire muqueux et les germes de la flore commensale. Des mutations dans des gènes exerçant des fonctions essentielles dans les mécanismes de défenses antibactériennes, de renforcement de la barrière intestinale, d'autophagie ou encore de reconnaissance/activation de réponses immunes ont été identifiées et contribuent à l'instauration d'un terrain favorable au développement des MICI. Certains gènes sont spécifiques de la MC (en noir), d'autres de la RCH (bleu) tandis que certains sont communs aux deux maladies (rouge). P : cellule de Paneth, G : cellule de goblet. D'après (Khor et al., 2011).

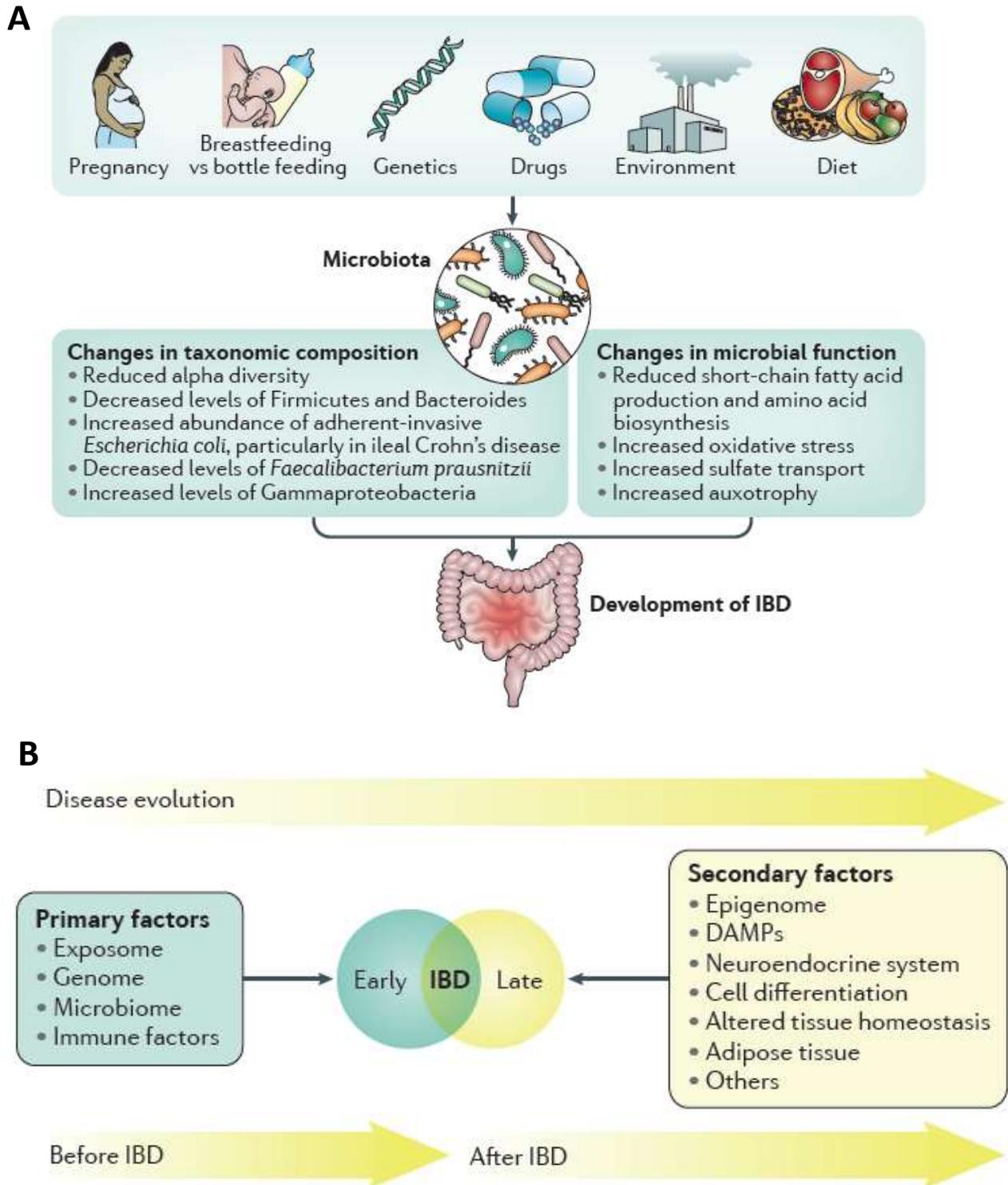
Il est important de noter que le risque associé (Odd ratio ; OR) de ces gènes de susceptibilité est relativement faible (**Tableau 1**) mais confère un terrain favorable, qui associé à des facteurs environnementaux spécifiques peut contribuer à altérer l'équilibre symbiotique établi avec le microbiote intestinal et par conséquent aboutir à des réponses immunitaires désordonnées et une inflammation chronique. Ainsi, *NOD2*, le premier gène de susceptibilité associé à la MC, présente un OR égal à 3,1 tandis que *IL23R*, associé aux MICI, confère un OR égal à 2,0 (Jostins et al., 2012). *A contrario*, certains individus sains porteurs de ces gènes de susceptibilités ne développeront jamais une MICI (Jostins et al., 2012). Ces variations génétiques expliquent seulement 13% des MC et 7.5% des RCH soulignant l'impact de l'épigénétique mais aussi des facteurs environnementaux (Liu et al., 2015). Un porteur caucasien européen de SNP dans le gène *NOD2* aura donc un impact significativement plus important en comparaison à sa présence chez une personne originaire d'Asie de l'Est (Jostins et al., 2012). Enfin des études de GWAS ont aussi démontré que ces facteurs de susceptibilité génétiques peuvent aussi jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie. En effet, des SNP dans *NOD2* sont significativement corrélés à une atteinte iléale ainsi qu'à l'âge au diagnostic la maladie (Cleynen et al., 2016).

		ODD RATIO (OR)	
		MC	RCH
<i>NOD2</i>		3.1	
<i>PTPN22</i>		1.20	
<i>HNFA4</i>			0,53
Autophagie	<i>ATG16L1</i>	1.23	
	<i>IRGM</i>		1.24
Cytokines	<i>IL23R</i>		2.01
	<i>IL12RB2</i>		1.18
	<i>IL10</i>		1.20
<i>CARD9</i>			1.18
<i>MUC19</i>			1.33
<i>STAT3</i>			1.10
<i>GPX1</i>			1.18
<i>VDR</i>			1.054

**Tableau 1 : Odd Ratio associés aux principaux gènes de susceptibilité des MICI. D'après (Jostins et al., 2012)**

## ii. Identification des principaux facteurs de risques environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux, tout au long de la vie, contribuent à façonner la flore intestinale (**Figure 10A**). Certaines expositions dans les premières années de vie peuvent être déterminantes sur l'équilibre de la flore. Ainsi, la prise d'antibiotiques avant l'âge de 5 ans expose à un risque 3 fois plus élevé de développer des MICI (Ungaro et al., 2014). Parmi les autres facteurs conduisant à un appauvrissement du microbiote, nous pouvons noter : une naissance par césarienne et l'absence d'allaitement maternel (Klement et al., 2004). D'autres facteurs environnementaux, relatifs aux modes de vie, contribuent à expliquer les différences de prévalence observées entre les pays industrialisés et ceux en voie de développement. Ainsi, un mode de vie urbain associé à une exposition à la pollution, une alimentation non équilibrée, grasse et pauvre en fibre, un mode de vie soumis à une forte pression ou sédentaire augmentent le risque de développer des MICI (RR >1.5) (Ananthakrishnan, 2015). L'urbanisation récente de certaines régions du monde explique aussi l'augmentation de l'incidence dans ces zones (Kaplan, 2015). Le régime alimentaire joue un rôle fondamental dans la composition de la flore commensale. Une alimentation journalière soumise à des influences occidentales favorisera une diversité bactérienne vers un cluster *Bacteroides spp*, tandis qu'un régime riche en fibres favorisera plutôt une colonisation par l'espèce *Prevotella spp*. Le tabac constitue un facteur de risque majeur environnemental. En effet, une méta-analyse a conclu à une augmentation du risque par 2 de développer une MC chez les fumeurs tandis que le risque de souffrir de RCH est divisé par 2 (Mahid et al., 2006). Il exerce un effet délétère sur la perméabilité intestinale de façon plus ou moins médié par une altération de la flore commensale (Kevans et al., 2015). Plusieurs études ont démontré qu'une exposition passive et ce depuis le plus jeune âge prédispose aux mêmes effets néfastes (Mahid et al., 2007) bien que de récents rapports ne le confirment pas (Chivese et al., 2018). Chez les patients fumeurs, la MC se présente sous une forme plus agressive nécessitant le recours plus rapidement à un traitement immunosuppresseur ou chirurgical. De plus, certains facteurs peuvent se combiner, en effet dans son étude Stappenbeck et al. démontre que l'association d'une imprégnation tabagique et de la mutation T300A *ATG16L1* altère le pouvoir sécrétoire des cellules de Paneth (Liu et al., 2018). Le même effet divergent est observé avec un autre facteur de risque, l'appendicectomie. En effet, à partir d'une cohorte de patients ayant été opérés de l'appendicite avant 50 ans, il a été mis en évidence un effet protecteur contre l'apparition de RCH en comparaison à la MC (Andersson et al., 2001, 2003).



**Figure 10 : Principaux facteurs de prédisposition des MICI.**

**A)** Interactions entre les principaux facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la composition du microbiote intestinal et pouvant ainsi contribuer chez certains individus au développement de MICI. **B)** Les MICI sont décrites comme un processus pathologique en constante évolution. Elles sont déclenchées par une combinaison de facteurs primaires propres à l'individu (exposome, génome, microbiome et facteurs immuns) puis après le développement de la maladie, d'autres facteurs impactent leur évolution. D'après (Ananthakrishnan, 2015).

Le **Tableau 2** (p41) résume les facteurs environnementaux divergents entre MC et RCH. D'autres facteurs pourraient jouer un rôle dans la genèse des MICI comme un environnement aseptisé, une exposition à certaines infections, la consommation d'aspirine ou d'anti-inflammatoire non stéroïdiens (Ananthakrishnan, 2015).

### iii. Le microbiote intestinal

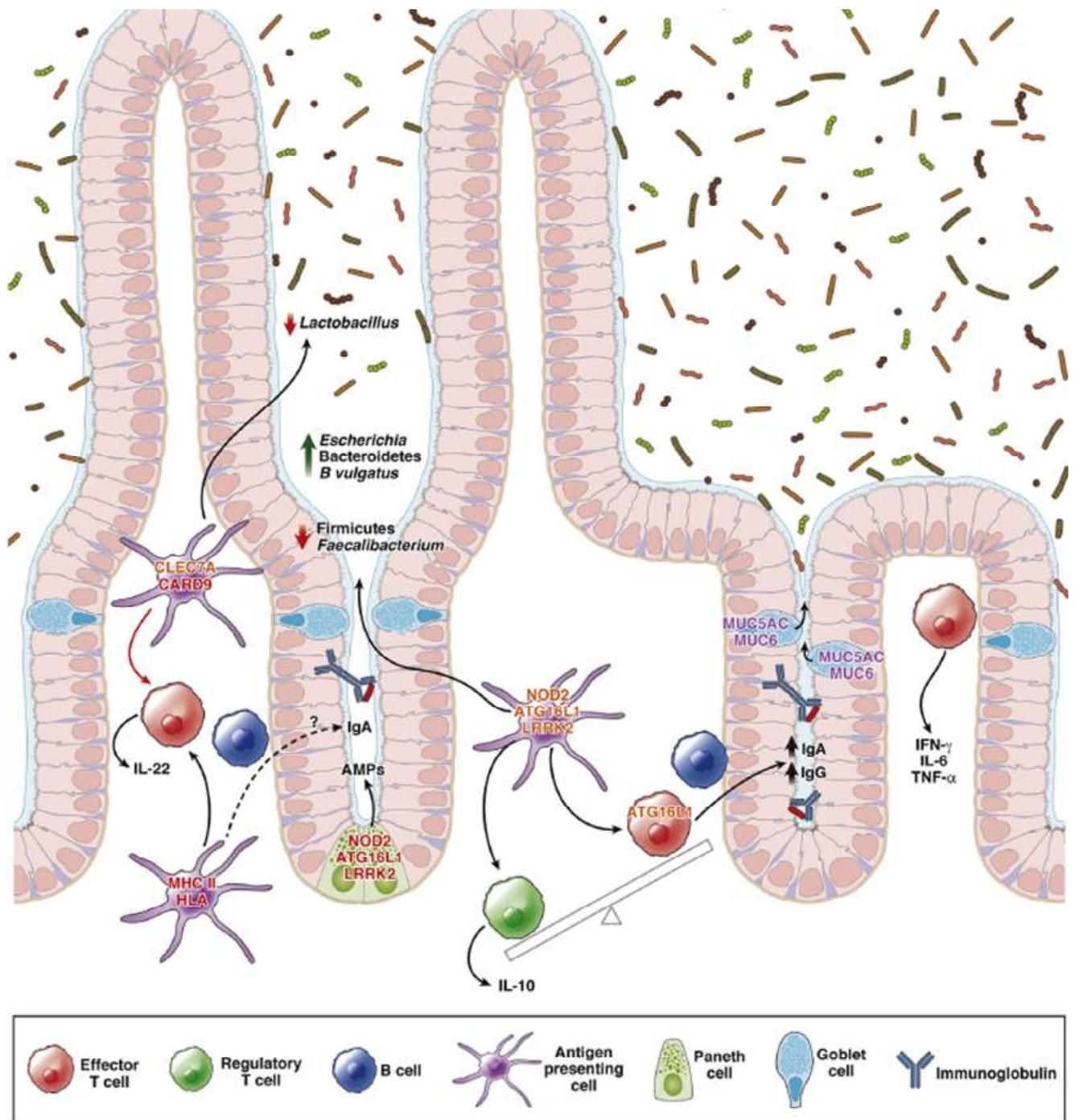
L'association des facteurs génétiques et environnementaux impacte directement la composition de la flore intestinale (**Figure 10A**). Actuellement, il n'est pas encore clairement établi si la dysbiose observée au cours des MICI peut être considérée comme une cause ou une conséquence de ces pathologies (Turpin et al., 2018).

La multiplication récente des travaux de caractérisation du microbiote intestinal par séquençage a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes aboutissant au déclenchement des MICI. L'analyse et la caractérisation de la flore commensale de patients souffrant de MICI ont permis de mettre en évidence une diminution de la diversité bactérienne au sein de leurs muqueuses (Ott et al., 2004; Sartor and Wu, 2017; Yilmaz et al., 2019). L'étude du microbiote fongique a montré une diminution de la diversité uniquement chez les patients atteints de RCH (Sokol et al., 2017). En effet, chez les patients MC avec une atteinte iléale, l'impact de l'environnement a favorisé la croissance des champignons par rapport aux bactéries. De plus au cours des MICI, il est observé une augmentation du ratio Basidiomycota/Ascomycota corrélée à l'atteinte inflammatoire. Parmi les Ascomycota, *S. cerevisiae*, dont la fréquence est diminuée au cours des MICI, exerce des actions anti-inflammatoires et empêche la colonisation des muqueuses par des bactéries pathogènes comme *E. coli* entero-pathogène (Sokol et al., 2017).

Le **Tableau 2** (p41) résume les principales altérations du microbiote bactérien, fongique et virale observées au cours des MICI. Ainsi, il a été décrit un appauvrissement de la flore par certaines souches bactériennes appartenant au groupe *Clostridium* (*Faecalibacterium prausnitzii*) possédant des propriétés immunomodulatrices (Sartor and Wu, 2017), alors que la fréquence des bactéries pro-inflammatoires est augmentée (Kostic et al., 2014). En effet, certaines souches de *Clostridium* induisent la sécrétion d'IL-10 permettant ainsi la différenciation vers la voie des Ly Treg (Atarashi et al., 2013). De plus, *F. prausnitzii* possède la capacité d'induire la sécrétion d'IL-10 par les DCs (Rossi et al., 2016), d'inhiber la voie du NF- $\kappa$ B et la production des cytokines pro-inflammatoires qui en découlent (Quévrain et al., 2016;

Sokol et al., 2008) ou encore d'induire la sécrétion de butyrate aux propriétés immunomodulatrices (Machiels et al., 2014). Au sein des *Enterobacteriaceae*, la fréquence de *Escherichia.coli* entero-invasive est significativement augmentée au niveau de la muqueuse iléale des patients MC (Baumgart et al., 2007; Darfeuille-Michaud et al., 2004). Cette bactérie adhère à la surface des CEI, se multiplie au sein des macrophages provoquant ainsi une sécrétion accrue de TNF $\alpha$  (Lapaquette et al., 2010). Des modifications du virome, spécifiques à la MC et la RCH, sont aussi observées au cours des MICI et contribuent à l'installation d'une dysbiose provoquant à terme une inflammation intestinale (Norman et al., 2015).

De nombreuses études ont démontré que certains facteurs héréditaires jouaient un rôle dans la constitution de notre microbiome (Bonder et al., 2016). Ainsi, les gènes de susceptibilité précédemment identifiés peuvent contribuer au développement de MICI en altérant la composition de la flore commensale (**Figure 11**). C'est ainsi, qu'il a été mis en évidence que des SNP dans *NOD2* étaient associés à une dysbiose iléale chez les patients pédiatriques CD (Liu et al., 2016) ainsi qu'à une augmentation des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*) et une diminution de *F.prausnitzii* (Cohen et al., 2019). De même, le statut non sécréteur du gène *FUT2*, conférant une susceptibilité à développer une MC (OR=1.1), provoque des altérations du microbiome (Turpin et al., 2018). Des modifications dans le gène *ATG16L1*, à l'origine d'une altération dans les réponses des LyT, provoquent une rupture de l'intégrité de la barrière intestinale et une perte de tolérance aux bactéries commensales de la flore (Cohen et al., 2019). Des polymorphismes dans le gène codant le récepteur à la vitamine D (*VDR*), représentant un facteur de risque de développer une MICI, contribuent à expliquer l'appauvrissement des bactéries appartenant à l'embranchement des *Parabacteroides* (Simmons et al., 2000). Enfin, une diminution de l'abondance de *F. prausnitzii* est significativement associée à un polymorphisme (rs1394174) présent sur le gène *CNTN6* (Turpin et al., 2018).



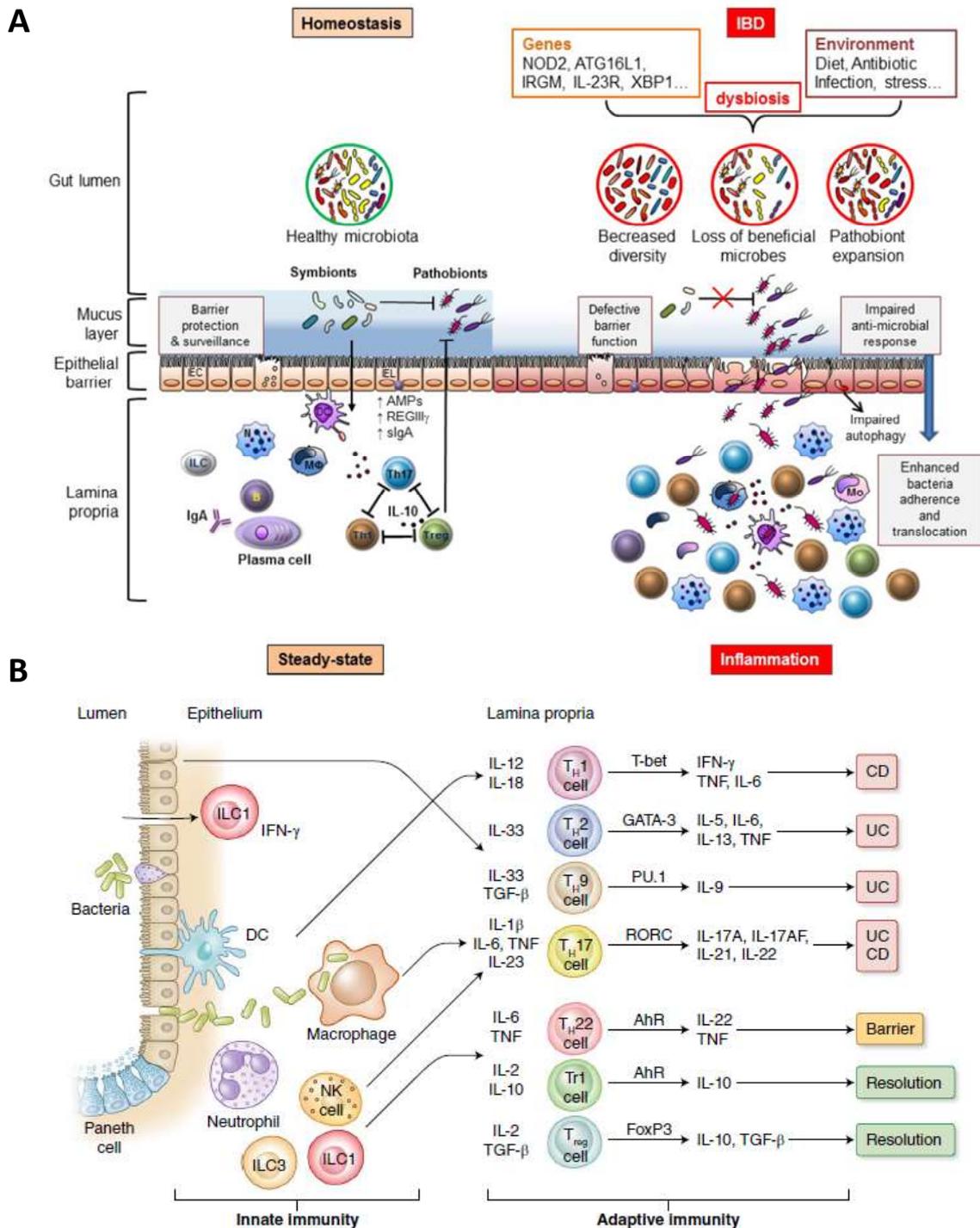
**Figure 11 : Principaux variants génétiques pouvant altérer le microbiote intestinal**

Les gènes de susceptibilité associés aux MICI ont pour conséquence principale une modification de la composition du microbiote intestinal. En effet *NOD2*, *ATG16L1* et *LRRK2* contribuent à une diminution de la sécrétion de PAMs par les cellules de Paneth. Des variants de *NOD2* sont associés à une augmentation de l'abondance des espèces bactériennes appartenant à *E. coli* / *Bacteroides* et une diminution de *Faecalibacterium*. Des variants de *CARD9* ou *CLE7A* altèrent les réponses immunes initiées par les DCs. Un défaut dans la production de mucus par les cellules de goblet (*MUC5AC* et *MUC6*) contribue à affaiblir la barrière intestinale. Les noms des gènes en rouge correspondent à des susceptibilités observées au cours de la MC et de la RCH, en orange au cours de la MC et en violet ceux propre à la RCH. Abréviations: AMP: peptides antimicrobiens. D'après (Cohen et al., 2019).

#### d) Mécanismes physiopathologiques.

Une dérégulation de l'équilibre microbiote/hôte peut conduire, chez un individu génétiquement prédisposé et sous l'influence de facteurs environnementaux à une altération de l'étanchéité de barrière intestinale provoquant le passage des germes commensaux initialement contenus dans la lumière intestinale jusque dans la LP (de Souza and Fiocchi, 2016a) (**Figure 12A**). En effet chez les patients MICI, les fonctions de barrière de la muqueuse intestinale sont affaiblies: diminution de l'expression des PAMs (Klag et al., 2013), des protéines de jonctions serrées, des capacités d'auto-renouvellement de l'épithélium diminuées (Khor et al., 2011), déplétion des cellules de goblet productrices de mucines (Johansson et al., 2014), altération des processus d'autophagie par les CEI et appauvrissement de la flore commensale. En plus des mutations décrites, une étude a suggéré qu'une diminution du nombre de copies dans le gène codant pour la  $\beta$ -défensine 2 pourrait expliquer la baisse de son expression au cours de la MC (Fellermann et al., 2006). L'amenuisement des capacités de défense de la muqueuse intestinale permet alors des translocations bactériennes, initiant par la suite une activation du système immunitaire muqueux.

Les germes commensaux ou pathogènes ayant pénétré dans la LP sont reconnus par les récepteurs de l'immunité innée présents à la surface des CEIs, des DCs ou encore des macrophages intestinaux, qui une fois activés, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Ces molécules contribuent à restaurer l'homéostasie intestinale en régulant de nombreuses fonctions : défenses de l'hôte, fonctions de barrière, régulation des processus immuns et réparation tissulaire.



**Figure 12 : Les mécanismes physiopathologiques associés aux MICI. A)** Dans la muqueuse saine, l'équilibre entre la flore commensale et l'hôte dû à une barrière intestinale étanche permet l'homéostasie intestinale. L'association de facteurs génétiques et environnementaux contribuent chez certains individus à affaiblir la flore intestinale en parallèle d'un aminuement des fonctions de barrière de la muqueuse intestinale provoquant des translocations bactériennes et une activation accrue du système immunitaire muqueux. D'après (Pickard et al., 2017). **B)** Pénétration des germes pathogènes ou commensaux provoquant une activation de la réponse innée, une sécrétion de nombreuses cytokines/chimiokines amplifiant la réponse inflammatoire, puis la mise en place de la réponse immune adaptative qui si elle n'est pas suffisamment contrôlée devient chronique et provoque à terme une destruction des tissus. D'après (Neurath, 2019).

### **i. Implications des réseaux cytokiniques dans la physiopathologie des MICI**

L'étude, de ces réseaux cytokiniques et de leurs dysrégulations au cours des MICI, a permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mais aussi d'instaurer des stratégies thérapeutiques plus adaptées (Friedrich et al., 2019) (**Figure 12B**). Parmi, ces cytokines, celles appartenant à la famille de l'IL-1, jouent un rôle fondamental au cours des MICI. Chez ces patients, il a été décrit une activation accrue de la voie découlant du complexe NLRP3 inflammasome, permettant les clivages des pro-IL-1 $\beta$  et IL-18 en des formes cytokiniques matures (Neurath, 2019). Des blocages de ce complexe inflammasome ont permis d'inhiber l'activité de la maladie au cours de modèles expérimentaux de colite. L'IL-18 joue des rôles délétères en induisant une déplétion des cellules de goblet et la synthèse de médiateurs inflammatoires (TNF $\alpha$  / IFN $\gamma$ ) par d'autres cellules mononuclées infiltrées dans la LP (Nowarski et al., 2015). Son blocage, au cours d'un modèle de colite a contribué à l'amélioration du phénotype clinique chez les souris (Kanai et al., 2001). L'IL-33, une autre cytokine de la famille de l'IL-1, exerce un rôle pléiotropique au cours des MICI. En effet, certaines études ont montré que son blocage améliorait les colites expérimentales. D'autres lui ont attribué un rôle bénéfique en favorisant la réparation tissulaire *via* la synthèse d'IL-22 par les mastocytes intestinaux ou encore la polarisation vers la voie des Ly Treg (Neurath, 2019). Enfin, une augmentation de l'IL-36 a été mise en évidence au cours des MICI. Des travaux ont montré que son absence aggravait le phénotype clinique de colite induite au DSS en inhibant une cascade de signalisation, dépendante de l'IL-36, IL-23 et IL-22 et impliquée dans les défenses antibactériennes (synthèse de PAM) et la cicatrisation (Ngo et al., 2018). Cependant, d'autres études ont démontré que son absence/blocage aux cours de modèles expérimentaux a permis de réduire l'inflammation chronique ainsi que les processus de remodelage et fibrose des tissus. D'autres cytokines pro-inflammatoires sont aussi sécrétées comme par exemple l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . L'IL-6 contribue à amplifier la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires activant les cellules stromales et inhibe l'apoptose des Ly T *via* la voie de signalisation dépendante de STAT3 (Neurath, 2019). Cependant, elle peut aussi jouer un rôle bénéfique dans les processus de cicatrisation en induisant le recrutement tissulaire de certains macrophages (Friedrich et al., 2019). Le TNF $\alpha$  joue de multiples rôles délétères : induction de la mort des cellules de Paneth par nécroptose, de l'angiogénèse et de la résistance à l'apoptose des macrophages et des LyT (Neurath, 2014). Enfin, les cytokines de la famille de

l'IL-12 (IL-12 et IL-23) jouent un rôle clef dans la polarisation des LyT CD4<sup>+</sup> naïfs vers la voie Th1 (rôle de l'IL-12) ou vers la voie Th17 (rôle de l'IL-23) à défaut d'une polarisation vers la voie des Ly Treg. L'IL-23 joue aussi un rôle majeur dans l'activation des cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) retrouvées de façon majoritaire au niveau des muqueuses inflammatoires des patients MICI (Kashani and Schwartz, 2019). Ces ILC3 sont spécialisées dans la sécrétion de cytokines (IL-22 et IL-17) (cf p54) jouant des rôles clés dans l'immunité des muqueuses, mais aussi du GM-CSF impliqué dans le recrutement de monocytes inflammatoires au niveau de l'intestin (Friedrich et al., 2019). Certaines cytokines sécrétées (TNF $\alpha$  ou l'IL-1) ou encore l'activation des récepteurs de l'immunité innée à la surface des CEIs, des cellules endothéliales et des fibroblastes induisent la sécrétion de chimiokines délivrant des signaux nécessaires au recrutement intestinal d'autres leucocytes : PNN, cellules NK, monocytes, PNE mais aussi les LyT et LyB activés (Zundler et al., 2019). Les PNN infiltrés exercent des effets néfastes sur l'épithélium intestinal. Ils induisent sa destruction *via* des mécanismes oxydatifs et instaurent un environnement inflammatoire *via* la sécrétion de médiateurs (Brazil et al., 2013). Des monocytes initialement contenus dans la circulation sanguine peuvent être recrutés au sein des muqueuses intestinales en réponse à certains signaux cytokiniques relargués par des macrophages inflammatoires et amplifier la réponse inflammatoire (Martin et al., 2019).

## **ii. Amplification de la réponse immune adaptative au cours des MICI**

Les DCs, activées au niveau de la muqueuse intestinale, vont migrer vers les OLS pour initier la réponse immune adaptative. Dans les ganglions, les LyT naïfs sont activés en effecteurs avant de re-migrer vers la muqueuse intestinale grâce à leurs marqueurs de « homing intestinal » ( $\alpha$ 4 et CCR9) induits par les DCs intestinales sécrétrices de RA (Abraham and Cho, 2009; Zundler et al., 2019). Cet afflux de LyT effecteurs provoque une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, amplifiant ainsi l'inflammation intestinale (Neurath, 2014). Les études ont mis en évidence que les profils de polarisation des LyT dans les ganglions étaient différents entre les 2 maladies : profils Th1/Th17 au cours de la MC et Th2/Th17 au cours de la RCH (de Souza and Fiocchi, 2016b). Plus récemment, des travaux ont démontré qu'au cours de la RCH, l'IL-33 produite induit la différenciation des Ly T naïfs en Th9 sécréteurs d'IL-9. Cette cytokine joue un rôle délétère sur la barrière intestinale en supprimant

la prolifération des CEI et en impactant l'expression des protéines de jonctions serrées (Nalleweg et al., 2015).

De plus, les mécanismes immunorégulateurs mis en place par l'organisme pour contenir l'excès d'inflammation semblent être moins performants au cours des MICI. En effet, un excès de Smad7, une protéine bloquant les voies de signalisation du TGF $\beta$ , est observé au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de MICI (Neurath, 2014). Des études ont démontré que des mutations dans les gènes *IL10* ou encore *IL10RA/IL10RB* étaient associées à des formes pédiatriques de MICI (Jostins et al., 2012). Un autre groupe a récemment démontré que chez les patients MICI, les LyT Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Treg sécrétaient moins d'IL-10 que chez des témoins sains (Brockmann et al., 2018). Enfin, bien que l'activité des Treg semble être préservée au cours de ces pathologies, la présence en excès de Th1 et de Th17 tend à saturer leur potentiel régulateur (Neurath, 2014). Cette inflammation devient chronique en cas d'activation non contrôlée du système immunitaire et provoque à terme une destruction des tissus.

En outre, au niveau des muqueuses intestinales, certains LyT résidents mémoires (LyT RM) persistent au niveau de la *lamina propria* grâce à différents facteurs tissulaires comme par exemple le TGF- $\beta$ , l'IL-15 ou encore l'expression de certains facteurs de transcription (diminution de KLRG1, KLF2 et TCF1 et augmentation de l'expression de Blimp-1)(Zundler et al., 2019). Ils expriment à leur surface le CD69 (récepteur antagoniste) interagissant avec S1PR1 provoquant ainsi la rétention dans l'intestin ou encore le CD103 interagissant avec la cadhérine-E exprimée à la surface de l'épithélium intestinal. Ces LyT RM jouent un rôle dans la persistance de l'inflammation chronique et le déclenchement des poussées aiguës observées au cours des MICI. En effet, ils sont capables de se-réactiver en cas de reconnaissance d'un antigène, puis de sécréter des chimiokines promulguant ainsi le recrutement de cellules myéloïdes ainsi que des Ly présents dans la circulation sanguine. Ces cellules recrutées produisent d'autres médiateurs pro-inflammatoires aux actions cytotoxiques pour l'épithélium intestinal aggravant sa porosité et amplifiant ainsi les translocations bactériennes (Zundler et al., 2019).

### iii. Identification de sous-type de réponse immune au cours des MICI

En plus de l'étude des réseaux cytokiniques, de plus en plus de travaux caractérisent les différentes populations immunes présentes au niveau des muqueuses intestinales des patients atteints de MICI. Cela permet au diagnostic de la maladie, de mieux anticiper les différents types de réponses immunes, puisque directement médiées par les populations résidentielles de la *lamina propria* des patients MICI. Ainsi, les récents travaux de Martin JC. et al. ont permis d'identifier 33 clusters de sous-type cellulaires (Martin et al., 2019). Une analyse de corrélation entre la fréquence de chaque population a mis en évidence une association préférentielle de certains sous-types cellulaires enrichis dans la muqueuse iléale inflammatoire de patients MC. Ce module cellulaire, nommé GIMATS, comprend des macrophages inflammatoires (CD206<sup>low</sup>), des DCs activées (CD86, PDL1), des lymphocytes activés, des plasmocytes sécréteurs d'IgG, des fibroblastes activés (CD90) et des cellules endothéliales activées (ACKR1<sup>+</sup>). Par la suite, les patients ont été classés en 2 groupes en fonction de leur score d'enrichissement du module : définissant ainsi les patients GIMATS<sup>high</sup> et les GIMATS<sup>low</sup>. La présence de ce module n'est pas corrélée à la sévérité ou la durée de la maladie, ni aux marqueurs systémiques d'inflammation mais associée significativement à une absence de sevrage des corticoïdes suite à un traitement par anti-TNF. Chez les patients GIMATS<sup>high</sup>, une partie des macrophages inflammatoires, correspondant à des monocytes de la circulation sanguine (CCR5), activent des fibroblastes intestinaux, qui en retour sécrètent des chimiokines (CCL2/CCL7) recrutant alors d'autres monocytes du sang (CCR5) se fixant sur les cellules endothéliales activées exprimant le récepteur ACKR1. Ainsi pour les auteurs, chez les patients GIMATS<sup>high</sup>, l'inflammation observée n'est pas uniquement médiée par les Ly T mais aussi par d'autres médiateurs (monocytes circulants infiltrant les tissus, macrophages inflammatoires, cellules stromales activées) expliquant ainsi l'échec des anti-TNF chez ces patients dont le mécanisme d'action est dû à l'induction de l'apoptose des LyT. Ils avancent l'hypothèse que le blocage de l'infiltration des tissus intestinaux par les monocytes *via* un anticorps monoclonal anti-CCR5 pourrait être plus efficace.

#### e) Le tableau clinique observé au cours des MICI

Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique responsable des symptômes digestifs et des manifestations extra-intestinales.

L'expression clinique des poussées de MC dépend de la localisation des lésions : les formes coliques sont souvent bruyantes avec des manifestations extra-digestives fréquentes, alors que l'atteinte isolée de l'intestin grêle peut être asymptomatique pendant des années et évoluer silencieusement vers certaines complications (sténoses/fistules) (Cosnes et al., 2002).

#### i. Les manifestations digestives

Au cours de la MC, les manifestations cliniques semblent corrélées à la localisation de la maladie, la sévérité de l'inflammation et le comportement phénotypique de la pathologie (Torres et al., 2017), tandis qu'au cours de la RCH, le tableau clinique est dépendant de l'intensité de l'atteinte colique (Ungaro et al., 2017). Le **Tableau 2** présente en fonction du phénotype de la MC, le tableau clinique observé ainsi que les différences entre ces 2 pathologies. Nous pouvons noter que chez les patients MC présentant une atteinte colique, des saignements rectaux et/ou des diarrhées hémorragiques peuvent être observés (Torres et al., 2017). Chez les patients atteints de RCH, il est très fréquemment observé une diarrhée hémorragique expliquée par l'atteinte colique constante au cours de cette pathologie. De plus au diagnostic, 15% des patients présentent une forme sévère (Magro et al., 2017). Les phases de poussées alternées par des phases de rémission au cours de la MC instaurent une inflammation chronique provoquant à terme des complications de type sténoses, fistules puis abcès nécessitant le recours à une chirurgie (Torres et al., 2017). Au cours de la RCH, des hémorragies sévères ou un mégacôlon toxique peuvent apparaître (Ungaro et al., 2017). De plus ces pathologies prédisposent de façon importante au développement de cancers colorectaux et de l'intestin grêle (Bernstein et al., 2001a).

#### ii. Les manifestations extra-digestives

Les manifestations extra-intestinales associées aux MICI sont observées chez 50% des patients MC, 30% des patients RCH et chez un quart des patients, ces dernières peuvent apparaître avant le déclenchement des MICI (Vavricka et al., 2015). Les atteintes ostéo-articulaires, évocatrices de formes intestinales actives, sont soit périphériques avec des arthralgies pouvant toucher toutes les articulations, soit axiales avec la spondylarthrite ankylosante et la

sacro-iléite (Torres et al., 2017). Des atteintes cutanées comme un érythème noueux se présentant sous la forme d'une éruption douloureuse, bilatérale et noduleuse ou des cas de *pyoderma gangrenosum* peuvent être observées (Vavricka et al., 2015). Des atteintes ophtalmiques (uvéite, épisclérite ou sclérite) ou encore des cholangites sclérosantes primitives (CSP) peuvent aussi se déclarer. Enfin, un patient atteint de MICI présentera un risque trois fois plus élevé de développer un événement thromboembolique (Larsen et al., 2010). Le **Tableau 2** présente les principales manifestations extra-intestinales.

		Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Définition		-Inflammation chronique et discontinue -Atteinte de l'ensemble des couches de la muqueuse intestinale -Atteinte de l'ensemble du segment du tube digestif : iléon (80%) colon(30%)	-Inflammation chronique et continue -Atteinte de la couche épithéliale superficielle -Atteinte constante du rectum pouvant +/- s'étendre jusqu'au caecum (pancolite 20%)
Epidémiologie		-incidence : 10.6 cas pour 100 000 habitants Europe du Nord -prévalence : 322 pour 100 000 habitants Europe	-incidence : 24.3 cas pour 100 000 habitants Europe du Nord -prévalence : 294 pour 100 000 habitants Europe
Facteurs de prédisposition	Génétique	-37 gènes spécifiques -impliqué dans 13% des formes -gènes associés aux fonctions sécrétoires des cellules de Paneth ( <i>IRGM, XPP1, NOD2, ATG16L1, LRRK2</i> ), à l'autophagie ( <i>ATG16L1, IRGM</i> ), aux fonctions de barrière ( <i>NOD2, MUC2</i> ) à la voie Th17 ( <i>IL23R, JAK2, STAT3</i> )	-23 gènes spécifiques -impliqué dans 7,5% des formes -gènes associés aux fonctions de barrière ( <i>HNFA4, CD1H</i> ) composant du réticulum endoplasmique ( <i>XBP1</i> ), HLA
	Environnementaux	-imprégnation tabagique (OR=1.76) -appendicite => délétère -prise d'antibiotique pendant l'enfance (OR=1.74)	-imprégnation tabagique (OR=0.58) -appendicite pendant le jeune âge => protecteur
	Microbiote	-↓ <i>Firmicutes</i> (Frank et al., 2007) <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <i>Clostridium</i> groupe IV et XIVA (Kostic et al., 2014)</li> <li>↓ <i>F. prausnitzii</i> (Quévrain et al., 2016; Sokol et al., 2006)</li> </ul> -↓ <i>Bacteroidetes</i> (Sartor and Wu, 2017) <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <i>Bacteroides fragilis</i></li> </ul> -↗ <i>Proteobacteria</i> (Yilmaz et al., 2019) <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Enterobacteriaceae</i> =&gt; <i>E.coli</i> entero invasive (Baumgart et al., 2007)</li> <li>↗ <i>Gammaproteobacteria</i></li> </ul> -↗ <i>Candida.albicans</i> et ↓ <i>S. cerevisiae</i> -↓ <i>Caudales</i> bacteriophage	-↓ <i>Firmicutes</i> (Frank et al., 2007; Kostic et al., 2014; Sheehan et al., 2015) <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <i>F. prausnitzii</i> (Machiels et al., 2014)</li> </ul> -↗ <i>Proteobacteria</i> (Yilmaz et al., 2019) <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Enterobacteriaceae</i> =&gt; <i>E.coli</i> (Pilarczyk-Zurek et al., 2013)</li> <li>↗ <i>Gammaproteobacteria</i></li> </ul> -↗ <i>Candida.albicans</i> et ↓ <i>S. cerevisiae</i> -↓ <i>Caudales</i> bacteriophage

Tableau clinique	Digestif	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<u>maladie active (B1)</u> : diarrhée, douleurs abdominales, anémie, perte de poids, fatigue, retard de croissance enfant</li> <li>-<u>maladie sténosante (B2)</u> : douleurs post-prandiales, nausées, ballonnements, syndrome occlusif.</li> <li>-<u>maladie fistulisante (B3)</u> : abcès abdominaux, fistules entériques, anales, péri-anales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<u>rectite</u> : fatigue, fièvre, perte de poids, urgence fécale, ténésme</li> <li>-<u>rectocolite gauche</u> : rectite + diarrhée hémorragique et crampes</li> <li>-<u>pancolite</u> : idem rectocolite gauche+ fatigue et fièvre</li> </ul>
	Extra-intestinale	<ul style="list-style-type: none"> <li>-érythème noueux</li> <li>-uvéïte, épisclérite, sclérite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>pyoderma gangrenosum</i></li> <li>-cholangite sclérosante primitive</li> </ul>
Diagnostic	Endoscopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ulcérations d'aspect aphtoïdes, linéaires ou en rails</li> <li>-entrecoupées de muqueuses œdémateuses nodulaires ou saines =&gt; aspect pavimenteux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-érythème, perte de la vascularisation, muqueuse aspect granulaire, friable, saignant au contact, atteinte continue</li> <li>-forme + grave : ulcérations creusantes, aspect boursouflé</li> <li>-iléite de reflux</li> </ul>
	Histologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>-infiltrats inflammatoires, transmuraux, irréguliers, discontinus</li> <li>-nodules lymphoïdes</li> <li>-granulome épithéloïde et géantocellulaire</li> <li>-préservation des cellules de goblet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-distorsion et diminution de la densité des cryptes</li> <li>-&gt; infiltrat par des lymphocytes ou plasmocytes</li> <li>-déplétion en mucines</li> <li>-métaplasie des cellules de Paneth</li> </ul>
Histoire naturelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>-poussées alternant avec des phases de rémission</li> <li>-localisation stable de la maladie (Louis et al., 2001a)</li> <li>-évolution du comportement de la maladie (5% de B3)=&gt; à 5 ans 33% de chirurgie et à 10 ans : 50% (Frolkis et al., 2013)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- poussées alternant avec des phases de rémission</li> <li>-progression atteinte colique : 10-19% des patients à 5 ans et 28% à 10ans (Frolkis et al., 2013)</li> <li>- risque chirurgical : 11.6% à 5 ans et 28% à 10 ans</li> </ul>	
Facteurs de risque	<ul style="list-style-type: none"> <li>-jeune âge au diagnostic</li> <li>-tabac</li> <li>-atteinte iléale ou du rectum</li> <li>-lésions péri-anales</li> <li>-apparition précoce de fistules ou de sténoses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-jeune âge au diagnostic</li> <li>-patient non-fumeur</li> <li>-pancolite</li> <li>-pas de rémissions endoscopiques</li> <li>-ulcérations</li> <li>-marqueurs inflammatoires/ ↓ hémoglobine</li> </ul>	

**Tableau 2 : Principales caractéristiques propres à la MC et à la RCH récapitulant les facteurs de risques (environnementaux, génétiques), l'épidémiologie, le tableau clinique, le diagnostic de la maladie ainsi que son évolution.**

#### f) La stratégie diagnostique

Le diagnostic initial repose sur l'association de signes cliniques, endoscopiques, radiologiques et histologiques à partir des biopsies. Le **Tableau 2** présente les principales caractéristiques propres à chaque maladie et permettant d'établir le diagnostic.

Les ulcérations observées au cours de la RCH sont toujours associées à une inflammation par opposition à la MC où les muqueuses environnantes des plages d'ulcérations peuvent être non lésées (Ungaro et al., 2017). En cas d'atteinte pancolique de la RCH, l'iléon est souvent inflammatoire voire ulcéré au niveau de ses derniers centimètres définissant ainsi l'iléite de reflux. De plus, une atteinte de l'iléon en l'absence de pancolite chez un patient RCH doit fortement faire suspecter une MC. La présence d'un granulome épithéloïde et giganto-cellulaire, fréquemment présent au sein de la muqueuse saine, est une caractéristique histologique de la MC. Ces granulomes, rarement mis en évidence lors de la première poussée, apparaissent dans 30 à 50% des cas au cours de l'évolution de la maladie.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) bénéficie d'une bonne sensibilité et spécificité pour l'identification d'une MC (Horsthuis et al., 2008) alors que son intérêt pour le diagnostic de RCH est limité. Ces systèmes d'imagerie sont ainsi complémentaires des examens endoscopiques pour identifier des zones inflammatoires. La vidéo capsule endoscopique (VCE) est réservée aux patients présentant une suspicion élevée de MC malgré des examens endoscopiques et radiologiques négatifs. En effet, la VCE possède une excellente valeur prédictive négative pour le diagnostic de la MC de l'intestin grêle (Torres et al., 2017).

L'identification entre MC et RCH demeure dans certain cas complexe et c'est à distance lors d'une récurrence que le diagnostic sera posé. En effet, 10 à 20% des premières poussées de MICI colique pure sont étiquetées colites indéterminées. Dans ce cas, le dosage des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ou la mise en évidence en immunofluorescence des anticorps dirigés contre les granulations des polynucléaires neutrophiles (pANCA) permettent d'orienter le diagnostic (Joossens et al., 2002). Enfin, la calprotectine fécale, corrélée avec l'infiltrat de PNN, représente un bon marqueur de l'inflammation intestinale lui conférant une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic de MICI (Torres et al., 2017).

### g) Principales stratégies thérapeutiques

La présence d'une inflammation active, due aux MICI doit être confirmée avant d'initier ou de modifier un traitement médical. Une stratégie thérapeutique ascendante peut être proposée avec une pente d'intensification plus ou moins abrupte selon les critères pronostiques présents lors de la poussée inaugurale, l'évolution clinique et endoscopique (cicatrisation muqueuse ou extension des lésions). Des facteurs prédictifs d'une évolution défavorable des MICI ont été mis en évidence. Ainsi, ils pourraient définir une population de malades candidats à un traitement plus agressif, dès la poussée inaugurale et ainsi permettre la mise en place d'une médecine personnalisée.

Si dans un premier temps, les salicylés et les corticoïdes ont représenté la stratégie thérapeutique de choix, ces quinze dernières années ont été marquées par le succès des « anti-TNF ». Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-TNF d'origine chimérique (infliximab), humanisés (adalimumab et golimumab) permet l'induction et la maintenance d'une phase de rémission au cours des MICI (Hanauer et al., 2006 ; Colombel et al., 2010 ; Evans and Lee, 2012). Ces anticorps (IgG1) dirigés contre le TNF membranaire (TNFm) ont comme principal mécanisme d'action l'induction de l'apoptose des LyT exprimant le TNFm (Levin et al., 2016). Cependant, ces traitements sont associés à de nombreux effets secondaires, dans certains cas à une absence de réponse primaire et parfois à des phénomènes d'échappement secondaires dus à l'immunisation du patient contre ces biothérapies (Shivaji et al., 2019). Deux études estiment entre 13 et 40% le pourcentage de patients chez qui aucune réponse primaire n'est observée après l'instauration d'un traitement par anti-TNF (Ben-Horin et al., 2014; Ding et al., 2016). Une étude récente confirme ces données avec une absence de réponse primaire après 14 semaines de traitement évaluée à 29% après mise sous anti-TNF (Kennedy et al., 2019). Une analyse multivariée a mis en évidence qu'une faible concentration en anti-TNF était corrélée à une absence de réponse primaire (Kennedy et al., 2019). Dans certains cas, bien que la réponse primaire ait permis d'atteindre une phase de rémission, une perte de réponse est ensuite observée chez 23 à 46% des malades et nécessite une modification de la dose d'anti-TNF. Alors que pour 5 à 13 % des malades, la perte de la réponse primaire s'accompagne par la suite d'une résistance à l'ensemble de la classe médicamenteuse des anti-TNF (Ding et al., 2016).

De nombreuses études ont permis d'estimer la concentration sérique en anti-TNF nécessaire à l'obtention d'une rémission de la maladie avec une bonne valeur prédictive. Ainsi des

concentrations en infliximab sanguines supérieures comprise entre 3-10 µg/mL (Kennedy et al., 2019; Mitrev et al., 2017; Ungar et al., 2016; Vande Casteele et al., 2015) ou d'adalimumab comprise entre 8-12 µg/mL (Kennedy et al., 2019; Ungar et al., 2016) ou supérieure à 4,9µg/mL (Kopylov and Seidman, 2016) sont corrélées à une réponse thérapeutique. Une diminution de la concentration sérique des anti-TNF est souvent corrélée avec l'apparition d'anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre ces biothérapies (Vermeire et al., 2007 ; Yanai et al., 2015). Ces Ac en se fixant au fragment Fab des anti-TNF forment des complexes immuns éliminés dans la circulation, bloquant ainsi leurs activités biologiques. La présence de ces Ac expose à un risque trois fois plus élevé de développer des phénomènes d'échappements secondaires (Kopylov and Seidman, 2016). Dans une étude rétrospective d'une cohorte de patients Israéliens, il a été démontré, qu'en cas de perte de réponse, la prévalence des Ac dirigés contre l'infliximab était de 47% et 23% pour l'adalimumab (Yanai et al., 2015). Dans son étude prospective, le groupe de Kennedy montre que la prévalence de ces Ac est égale à 63% pour l'infliximab et 29% pour l'adalimumab (Kennedy et al., 2019). La perfectibilité des méthodes ELISA ou l'utilisation de méthodes alternatives telles que le dosage radio-immunologique (RIA) ont permis la détection de ces Ac spécifiques nouvellement formés et précédant de quelques semaines la perte de réponse. Ainsi, un titre égal à 4 microgramme par équivalent millilitre (mcg/mEq) d'Ac dirigés spécifiquement contre l'adalimumab et un titre équivalent à 9mcg/mEq pour l'infliximab sont associés, avec une spécificité de 90%, à une perte de réponse et ce même en cas d'intensification de la dose d'anti-TNF (Yanai et al., 2015). Les récents algorithmes de recommandations d'usage des anti-TNF proposent que des taux faibles d'auto-Ac (<100 ng/mL, Théradiag) et transitoires entraînent une augmentation de la dose d'immunosupresseur, tandis que des taux élevés d'auto-Ac (>200ng/mL,Théradiag) et persistants motivent un changement de classe thérapeutique (Mitrev et al., 2017). De plus, il a été démontré que l'ajout d'un immunomodulateur à l'anti-TNF permet de limiter l'apparition d'auto-Ac ainsi que la perte de réponse observée chez certains patients sous anti-TNF (Ben-Horin et al., 2013; Ungar et al., 2017). En effet, cela permet de diminuer la clairance de l'anti-TNF par le système réticulo-endothélial, de diminuer la production d'auto-Ac ainsi que l'inflammation globale limitant ainsi la production de TNF $\alpha$  (Mitrev et al., 2017). De plus, pour lutter contre l'apparition de ces néo-anticorps, il a été mis en évidence qu'une association d'un anti-TNF avec un immunomodulateur ou une augmentation de la dose d'anti-TNF limitaient leur production (Kennedy et al., 2019; Mitrev et al., 2017). Une récente étude

publiée en 2020, a démontré une association significative entre HLA-DQA1\*05 et le développement d'Ac anti-TNF (Sazonovs et al., 2020). En effet, après un an de traitement, les plus forts taux d'immunisation contre les anti-TNF (92%) ont été observés chez les patients porteur de ce polymorphisme, tandis qu'après 10 ans de traitement, les plus faibles taux d'immunisation (10%) sont observés chez les sujets non-porteur du HLA-DQA1\*05. Il a aussi été démontré qu'une faible concentration d'anti-TNF après 14 semaines de traitement était corrélée à un risque d'immunisation (Kennedy et al., 2019).

C'est pourquoi de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'Ac dirigés contre les cytokines pro-inflammatoires ou de stratégies visant à favoriser des mécanismes immunorégulateurs ont émergé ces dernières années (**Figure 13**).

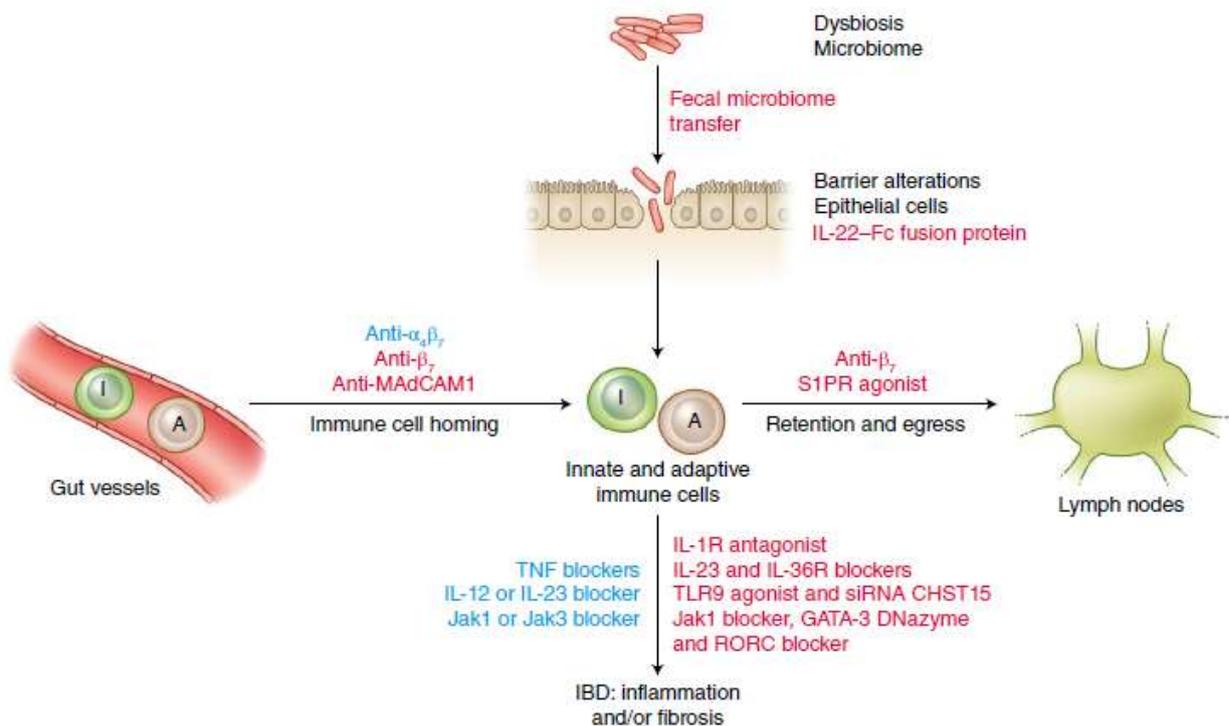
- ✓ L'étude des réseaux cytokiniques et leurs implications dans les mécanismes physiopathologiques a permis de mieux cibler les stratégies thérapeutiques.

Ainsi, l'utilisation des antagonistes anti-IL-12/23 (Ustekinumab bloquant la sous unité p40 commune à ces 2 cytokines) (Sandborn et al., 2012) ou uniquement IL-23 (Risankinumab (Feagan et al., 2017)/Brazikumab (Sands et al., 2017) bloquant la sous-unité p19 spécifique de l'IL-23) ont démontré des effets bénéfiques dans le traitement de la MC. Par ailleurs, l'Ustekinumab a été récemment approuvé dans la stratégie de prise en charge de la MC (Feagan et al., 2016). Un rapport publié en 2020, affirme qu'après 3 ans, l'Ustekinumab induit une rémission au cours de la MC, bien que 30% des patients traités aient arrêté leur traitement (Hanauer et al., 2020). L'efficacité des anti IL-23 est proposée par le blocage de 3 actions délétères de l'IL-23 : renforcement de la production de cytokines pro-inflammatoires, induction des voies de signalisation Th17 et diminution de la production et des fonctions des Ly Treg (Maxwell et al., 2015). De façon surprenante, il a été démontré que des taux initiaux d'IL-22 élevés étaient associés à une meilleure réponse des anti-IL-23 (Sands et al., 2017). Un essai clinique en cours tend également à prouver son efficacité dans la RCH (Ochsenkühn et al., 2020). L'évaluation après un an, a mis en évidence qu'une rémission clinique avait été obtenue chez 53% des patients. Ainsi, l'index d'activité de la colite est passé de 8,5 à 2 (échelle de 1-12) après 1 an de traitement et le score Mayo de 2.3 à 1.4 (échelle de 1-3). Il est important de noter que sur les 19 patients ayant reçu l'anticorps monoclonal, 5 patients ont arrêté le traitement en raison de l'apparition d'effets indésirables.

Une autre stratégie consiste en une inhibition des kinases appartenant à la famille Janus (Jak1-Jak3 et Tyk2) impliquées dans la signalisation de nombreuses cytokines sur les cellules immunitaires. Ainsi, le Tofacitinib, un inhibiteur de Jak1 et Jak3, a démontré son efficacité en diminuant l'inflammation intestinale au cours de la RCH (Sandborn et al., 2017). Il est actuellement utilisé uniquement dans le traitement de la RCH (Panés et al., 2017). En effet au cours d'un essai clinique chez des patients atteints de MC, il n'a pas été mis en évidence de réponse ni de rémission clinique après administration de Tofacitinib (Panés et al., 2017). En revanche, chez les patients RCH, l'administration de l'Ac monoclonal induisait une réponse clinique chez 16.6% des patients versus 3.6% avec le placebo et la rémission clinique était observée chez 41% des patients versus 11,1% avec le placebo (Sandborn et al., 2017).

D'autres stratégies sont actuellement en cours d'évaluation comme par exemple le blocage du récepteur de l'IL-1 ou de l'IL-36 (Neurath, 2019), le blocage de l'IL-6 (PF-04236921)(Danese et al., 2019) ou encore de l'IL-9 au cours de la RCH et le blocage de Jak1 au cours de la MC (Vermeire et al., 2017a). Une étude publiée en 2016, a démontré que le blocage pharmacologique de ROR $\gamma$ t (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor  $\gamma$ t) a amélioré le tableau clinique au cours d'un modèle expérimental de colite (Withers et al., 2016), suggérant des résultats potentiellement prometteur chez l'homme.

L'administration de cytokines aux actions immunorégulatrices s'est soldée par une absence d'efficacité chez les patients souffrant de MICI : IL-10 (Braat et al., 2003) et inhibiteur de Smad 7 (Feagan et al., 2018a). L'IL-22 (cf p54), une cytokine dont l'expression est augmentée au cours des MICI, renforce les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale et induit les processus de réparation/régénération de l'épithélium lésé. Ainsi, une stratégie thérapeutique intéressante serait de renforcer ses actions protectrices, soit par une injection d'IL-22Fc (plusieurs essais cliniques en cours [Tableau 3] ; cf p68), soit en modulant son inhibiteur soluble IL-22BP. L'IL-22 exerçant également des actions prolifératives impliquées dans les processus tumoraux (détaillé cf p54), la deuxième option semble être moins dangereuse (détaillé cf p54). Une dernière option, consiste à promouvoir les actions de l'IL-22 en induisant sa production *via* les ligands d'AhR. Dans leur étude, la stimulation de la voie de signalisation AhR-IL-22 *via* l'ingestion de plantes, semble avoir induit une réponse chez les patients souffrant de RCH en phase active (Naganuma et al., 2018).



**Figure 13 : Nouvelles stratégies de prise en charge thérapeutique des patients souffrant de MICI.**

Plusieurs options semblent être intéressantes dans le traitement des MICI résistantes aux thérapeutiques actuelles. Ainsi, la modulation des cytokines, du « homing » intestinal des lymphocytes, de la rétention des lymphocytes ou encore des molécules immunomodulatrices constituent de nouvelles opportunités. Les traitements actuellement utilisés dans la prise en charge des MICI sont en bleu et ceux en cours d'évaluation sont en rouge. D'après (Neurath 2019).

- ✓ Une des stratégies alternatives est d'empêcher le « homing intestinal » des lymphocytes, empêchant ainsi l'infiltration dans les tissus inflammatoires et limitant aussi l'accumulation de LyT résidents mémoires.

Ainsi le Védolizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , une molécule jouant un rôle clé dans la domiciliation intestinale des Ly T (Loftus et al., 2016 ; Vermeire et al., 2016) a été approuvé dans le traitement des MICI. Cet Ac prévient l'accumulation de Ly activés dans la muqueuse, empêche la formation de structure lymphoïde tout en supprimant aussi le homing de certaines cellules innées (ILCs, monocytes non classique) exprimant  $\alpha 4\beta 7$  (Neurath, 2019). D'autres Ac monoclonaux dirigés contre les intégrines sont actuellement en

cours d'évaluation : Alicaforsen, un inhibiteur de l'intégrine  $\alpha 1\beta 2$  (ligand de ICAM-1) (Greuter et al., 2016) dans la prise en charge des complications après colectomie ou encore l'Etrolizumab, un inhibiteur de  $\beta 7$ , dans le traitement de la RCH (Vermeire et al., 2014). En parallèle, un Ac monoclonal (PF-00547659) dirigé contre le ligand de  $\alpha 4\beta 7$  : MAdCAM-1 est actuellement étudié dans le traitement de la MC (Sandborn et al., 2018) et de la RCH (Vermeire et al., 2017b).

- ✓ Une autre stratégie proposée est d'induire la rétention des lymphocytes au niveau des ganglions.

Ainsi, le blocage de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ , exprimée à la surface des Ly effecteurs mémoires, permettrait de réduire leur infiltration dans la LP (Zundler et al., 2019). De même, l'Ozanimod, un agoniste de S1PR1, permet de séquestrer les Ly dans les OLS plutôt que dans la muqueuse intestinale (Sandborn et al., 2016).

- ✓ Une dernière stratégie envisagée est de compenser la dysbiose observée chez les patients souffrant de MICI en restaurant leur microbiote *via* une greffe fécale. Plusieurs études ont démontré qu'une restauration de la flore microbienne s'accompagnait d'une rémission clinique, bien qu'en général, les effets de la transplantation aient été considérés modestes. Ainsi, dans une cohorte de patients MC (n=25), après une transplantation de microbiote, 52% des patients étaient en rémission clinique à 3 mois et 23% à 18 mois. Dans une cohorte de patient RCH, il n'a pas été mis en évidence de différence sur les réponses cliniques et endoscopiques entre les patients ayant reçu une greffe fécale de patients sains et ceux qui avaient conservé leur propre microbiote (Rossen et al., 2015). Cependant les auteurs mettent en évidence que les patients ayant répondu significativement à la greffe, présentaient un microbiote proche des patients sains et enrichis en *Clostridium* clusters IV and XIVa. Enfin dans une dernière étude de patients RCH, une rémission a été observée chez 24% des patients ayant reçu une greffe contre seulement 5% pour ceux ayant reçu un placebo (Moayyedi et al., 2015).

## h) Evolution et suivi de l'activité des MICI

### i. Evolution des lésions de l'épithélium intestinal.

L'évolution des MICI se caractérise le plus souvent par l'alternance de périodes de poussées inflammatoires et de phases de rémission où l'épithélium intestinal tente de cicatriser.

La localisation initiale de la MC reste globalement stable dans le temps, avec moins de 15 % d'évolution d'une forme à l'autre au terme de 10 ans de suivi (Louis et al., 2001b). L'atteinte anopérinéale, initialement observée chez moins d'un quart des patients peut en toucher plus de 50% au terme de quelques années d'évolution (Cosnes et al., 2011). Les formes iléo-coliques tendent plutôt à se sténoser puis se perforer alors que l'atteinte colique reste plutôt longtemps inflammatoire (Thia et al., 2010). Ainsi après 10 ans d'évolution de la maladie, 50% des patients ont subi une opération chirurgicale suite à une complication de leur maladie (Torres et al., 2017).

L'amplitude des lésions, décrite au cours de la RCH, existe parfois d'emblée ou évolue progressivement au fur et à mesure des poussées avec 10-30% des patients qui présentent une extension de leur lésions (Fumery et al., 2018). Seulement 10 à 15% des patients présentent des formes sévères de la maladie (Fumery et al., 2018). Les patients, présentant un tableau clinique combinant RCH et CSP, pourraient avoir un phénotype distinct des formes RCH strictes avec une colite ulcéreuse plus étendue mais moins agressive et ne touchant pas le rectum (Loftus et al., 2005). Le risque d'avoir recours à une chirurgie est en baisse ces dernières années puisqu'évalué à 11% à 5 ans d'évolution de la maladie et à 15% au bout de 10 ans (Frolkis et al., 2013).

### ii. Les facteurs pronostiques

Il est difficile d'évaluer sur le long-terme le comportement des MICI mais certains facteurs ont été identifiés [**Tableau 2**].

Le tabac constitue le premier facteur de risque associé aux complications post-opératoires et les risques de rechute au cours de la MC (Vuitton et al., 2013). De fort taux d'ASCA ont aussi été décrits comme un facteur de risque de développement de complications de la MC (Dubinsky et al., 2008). Plusieurs études ont étudié la possibilité d'un lien entre les facteurs génétiques de susceptibilité et l'évolution de la maladie. Ainsi, l'hypothèse initialement avancée de l'association des variants de *NOD2* à un risque chirurgical plus important (Heliö et al., 2003), est depuis ces derniers années rattachée à la localisation iléale de la maladie

(Cleyne et al., 2016). En 2013, un polymorphisme dans le gène *FOXO3* est décrit comme associé à une moins bonne évolution de la MC bien qu'il ne soit pas décrit comme un gène de susceptibilité (Lee et al., 2013). Récemment, il a été confirmé que les gènes de susceptibilité étaient différents de ceux régulant le pronostic des MC (Lee et al., 2017). Ainsi, dans 2 cohortes de patients atteints de MC, parmi les 170 gènes de susceptibilité connus, aucun n'a été identifié comme significativement associé à un mauvais pronostic de la maladie. Les auteurs mettent en évidence 4 gènes significativement reliés à une moins bonne évolution de la maladie : *FOXO3*, *XACT*, *IGFBP1* et une région du CMH, suggérant que la contribution génétique au pronostic soit distincte de celle qui confère la susceptibilité à la maladie.

D'autres travaux ont démontré qu'une certaine signature de LyT CD8<sup>+</sup>, précédemment identifiée dans des cohortes de patients lupiques ou souffrant de vascularites, est aussi retrouvée dans une cohorte de patients MICI. Ainsi la présence de LyT CD8<sup>+</sup> (IBD<sup>high</sup>), présentant un enrichissement pour les gènes de l'IL-7 et les voies de signalisation du TCR, est associée à risque de résistance au traitement, de rechute ou de non contrôle de la maladie (Lee et al., 2011). Des travaux ont par la suite attribué cette signature de LyT CD8<sup>+</sup> (IBD<sup>high</sup>) à certains patients atteints de MICI dont les cellules T montrent des phénomènes d'épuisements (McKinney et al., 2015). En effet, certains LyT perdent progressivement leur capacité de réponse envers un antigène.

Au cours de la RCH, une étude a mis en évidence un polymorphisme dans le gène codant le récepteur de l'immunité innée Dectin-1 (*CLEC7A*) (SNP : rs2078178) associé à un délai plus court avant le recours à la chirurgie. Il ne s'agit pas d'un gène de susceptibilité associé à la RCH mais plutôt un gène qui semble prédisposer à une forme plus sévère (Iliev et al., 2012). Ainsi, les souris déficientes pour le récepteur Dectin-1 (*Clec7a*<sup>-/-</sup>) sont plus susceptibles au cours d'un modèle de colite induite au DSS en comparaison aux souris sauvages.

### **iii. Evaluation de l'activité des MICI**

Plusieurs scores sont utilisés en pratique pour évaluer l'activité des MICI et ainsi juger de l'efficacité d'une stratégie thérapeutique ou estimer un risque de rechute. Ainsi différents scores d'activités cliniques, endoscopiques, histologiques sont décrits.

✓ Au cours de la maladie de Crohn

Le score clinique calculé selon le CDAI (Crohn Disease Activity Index) correspond à l'indice le plus employé afin de juger de l'efficacité thérapeutique d'un essai clinique (Best et al., 1976). Un score inférieur à 150 désigne une maladie en phase de rémission. En pratique clinique, il est préférable d'évaluer la rémission de la MC à l'aide de l'index HBI (Harvey-Brashaw Index <4). En effet ce score, très bien corrélé au CDAI, est d'utilisation plus aisée car il ne nécessite pas de recueil de données cliniques sur 7 jours.

Au cours de l'examen endoscopique, l'activité résiduelle de la maladie peut être estimée *via* le score calculé selon le CDEIS (Crohn Disease Endoscopic Index) (Mary and Modigliani, 1989). Cet indice, doté d'une bonne reproductibilité est considéré actuellement comme le gold standard malgré sa complexité d'utilisation. C'est pourquoi il est préférable de quantifier cette activité résiduelle selon le SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's disease) (Daperno et al., 2004). Enfin l'indice de Rutgeerts permet d'évaluer le risque de récurrence clinique après une résection iléo-colique car doté d'une excellente corrélation entre l'intensité des lésions et le délai de récurrence des signes cliniques (Rutgeerts et al., 1990).

En raison de l'atteinte discontinue de la muqueuse intestinale, il apparaît assez complexe d'évaluer histologiquement l'inflammation de la muqueuse, c'est pourquoi aucun indice n'est encore décrit à ce jour.

✓ Au cours de la RCH

Lors des essais cliniques, le score MAYO partiel permettant une évaluation clinique est le plus fréquemment utilisé (Walsh et al., 2016). Au cours de l'examen endoscopique, le score UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index) (Travis et al., 2012) ou le sous-score endoscopique du MAYO (Walsh et al., 2016) sont utilisés. Ces index en qualifiant l'aspect de la muqueuse intestinale permettent d'estimer l'activité de la maladie.

Jusqu'en 2015, le RILEY score (Riley et al., 1991) et le GEBOES score (Geboes et al., 2000) ont été employés comme index d'activité de la RCH d'un point de vue histologique, bien que parfois non corrélés au score d'activité endoscopique (Bryant et al., 2014). Depuis deux nouveaux indices : le Nancy histological index et le RHI (pour Robarts Histological Index) ont été validés, afin de permettre une évaluation simplifiée et reproductible (Walsh et al., 2016).

### ✓ Les biomarqueurs utilisés au cours des MICI

Au cours des MICI, plusieurs biomarqueurs ont été décrits pour évaluer de façon non invasive l'activité résiduelle de la maladie. Ainsi le dosage de la calprotectine fécale, corrélée à l'activité endoscopique de la maladie, est un bon outil de dépistage de l'inflammation intestinale permettant de mesurer l'activité des MICI (van Rheenen et al., 2010). Un dosage supérieur à 100 µg/g en post opératoire est ainsi évocateur d'une rechute endoscopique de la maladie (Torres et al., 2017). Des études récentes ont démontré que le dosage de la calprotectine sérique permettait de prédire la nécessité d'une intensification du traitement et/ou une intervention chirurgicale au cours des MICI et plus particulièrement au cours de la MC (Kalla et al., 2016). Le dosage de la protéine C réactive (CRP), bien que faiblement corrélé aux scores d'activités endoscopiques permet aussi cette évaluation. La détection sanguine d'Ac anti-TNF assure la mise en évidence d'un échec thérapeutique et permet ainsi de rapidement effectuer un switch thérapeutique (Nanda et al., 2013). De cette façon, l'escalade conventionnelle de la dose inutile, coûteuse et potentiellement dangereuse est limitée.

Le défi de ces dernières années, tend de plus en plus à développer une médecine de précision adaptée à une prise en charge personnalisée de la pathologie chronique. Ainsi dans le cadre des MICI, de nombreux travaux de recherche visent à développer de nouveaux biomarqueurs permettant entre autres d'évaluer l'activité et/ou le comportement de la maladie mais aussi de prédire la réponse médicamenteuse ainsi que les effets indésirables. Ainsi, l'étude EMBARK (EMerging BiomARKers in Inflammatory Bowel Disease) a eu pour objectif, de corrélérer un panel de biomarqueurs aux scores d'activités endoscopiques et radiologiques afin d'identifier de nouveaux marqueurs d'activité. En effet, chez les patients atteints de RCH, la régression logistique ordinaire utilisant le sous-score endoscopique du MAYO a sélectionné la combinaison de la calprotectine fécale et de la métalloprotéinase sérique 9 (MMP9). Dans la cohorte de patients atteints de MC, la combinaison de la calprotectine fécale, de la MMP9 et de l'IL-22 sérique apparaît fortement associée à l'alliance des scores endoscopiques et radiologiques (Faubion et al., 2013). De même, pour estimer l'effet positif d'une mise sous anti-TNF, l'étude de Arijs et ses collaborateurs a permis d'identifier à partir de biopsies intestinales, une signature de gènes permettant de séparer les patients répondeurs des non-répondeurs (Arijs et al., 2009). Quant au groupe de Neurath et al, ils proposent qu'en couplant les Ac anti-TNF à un composé fluorescent cela permettrait d'identifier les cellules intestinales TNFα positives (mTNF<sup>+</sup>) et par conséquent de prédire la réponse thérapeutique aux anti-TNF

chez les patients atteints de MC. En effet, ils ont démontré une corrélation positive entre un pourcentage élevé de cellules mTNF<sup>+</sup> et une réponse primaire positive après 12 semaines de traitement par anti-TNF. En outre, ils ont mis en évidence au sein de ce groupe de patients présentant un fort taux de cellules mTNF<sup>+</sup>, une muqueuse intestinale cicatricielle après un an de traitement (Atreya et al., 2014). D'après les travaux de Martin JC et al, l'identification du caractère plus ou moins inflammatoire des populations immunes (module GIMAT) au moment du diagnostic, permettrait d'anticiper les réponses aux traitements par anti-TNF (Martin et al., 2019). Les récents travaux d'une étude ont permis d'identifier un biomarqueur sanguin pouvant être dosé au diagnostic des MICI et permettant ainsi de prédire l'évolution de la maladie ainsi que le recours précoce à un traitement (Biasci et al., 2019). Ce biomarqueur est représenté par une combinaison de gènes identifiés car différenciellement exprimés entre les patients présentant au diagnostic la population de LyT CD8<sup>+</sup> signature (IBD<sup>high</sup>) et ceux pour qui elle est absente (IBD<sup>low</sup>) (Lee et al., 2011). Dans leur étude prospective, ils montraient à nouveau que les patients (IBD<sup>high</sup>) présentaient une maladie plus sévère ayant nécessité un recours plus tôt au traitement ou à une chirurgie mais aussi plus de résistance aux traitements mis en place (Biasci et al., 2019). Une analyse comparative entre patients MICI et sains a identifié et validé trois miARN au sein des LyT CD4<sup>+</sup> permettant de prédire la nécessité d'une escalade thérapeutique dans la prise en charge des MICI (Kalla et al., 2020).

### III. Place de l'IL-22 et de l'IL-17A dans le maintien de l'homéostasie intestinale

#### a) L'interleukine 22

L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine découverte en 2000 par l'équipe de J-C Renauld et L. Dumoutier (Dumoutier et al., 2000a). Par sa capacité à interagir avec les récepteurs aux cytokines de classe II, elle appartient à la famille de l'interleukine 10 comprenant 8 autres membres : IL-10, la sous famille IL-20 composée de l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24 et l'IL-26 et enfin la famille des interférons de type III comprenant : l'IL-28 $\alpha$ , l'IL-28 $\beta$  et l'IL-29. L'IL-22 humaine présente 79% d'homologie avec l'IL-22 d'origine murine et 25% de similitude avec l'IL-10 (Dumoutier et al., 2000b) suggérant ainsi une forte conservation de la cytokine au cours de l'évolution.

#### i. Gène et protéine de l'IL-22

Le gène de l'IL-22 (*IL22*), situé sur le bras long du chromosome 12, code pour une protéine de 146 acides aminés (AA) (Xie et al., 2000). Deux équipes indépendantes ont étudié la structure tridimensionnelle de l'IL-22 grâce à des expériences de cristallographie sur la cytokine recombinante produite par *E.coli* (Nagem et al., 2002) ou *D.melanogaster* (Xu et al., 2005). La structure protéique de l'IL-22 décrit six hélices  $\alpha$  (A à F) organisées dans une conformation antiparallèle et reliées par des boucles. La structure primaire de la protéine comprend trois sites de N-glycosylation ainsi que quatre cystéines permettant l'établissement de 2 ponts disulfures indispensables pour stabiliser la protéine. La forme biologique circulante de l'IL-22 est principalement un monomère bien que pour des fortes concentrations des tétramères ont été observés (Dudakov et al., 2015).

#### ii. Les sources cellulaires et régulation de l'expression de l'IL-22

Les sources cellulaires d'IL-22 sont multiples bien qu'uniquement constituées par les cellules du système immunitaire. Chez l'homme, les Ly Th17 et les membres du groupe 3 de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC3) constituent les sources principales de production d'IL-22.

a. Sources innées de l'IL-22 :

Les ILCs constituent une population cellulaire d'origine hématopoïétique, présentant une morphologie lymphoïde tout en se différenciant des LyT par l'absence de récepteur spécifique aux antigènes (TCR). Les ILCs, enrichis au niveau des muqueuses intestinales, constituent des effecteurs de l'immunité innée en jouant un rôle central dans la remodelage tissulaire, les défenses antibactériennes et l'inflammation (Artis and Spits, 2015). Selon la classification la plus récente basée sur leur production de cytokines et expression de facteur de transcription, les ILCs se composent de 3 sous populations. Le groupe 3 des ILC comprend les LTi (lymphoid tissue inducer) hautement impliqués dans l'organogénèse des OLS au stade fœtal *via* la sécrétion de lymphotoxine (Mebius et al., 1997) et les ILC3 qui sont subdivisés en deux groupes en fonction de l'expression du récepteur de cytotoxicité Nkp44 (ILC3 NCR<sup>+</sup> (Natural cytotoxicity receptor) et ILC NCR<sup>-</sup>) expriment les facteurs de transcription ROR $\gamma$ t et AhR (aryl hydrocarbon receptor) et représentent une source innée majeure d'IL-22 (Vivier et al., 2018). En effet, AhR contrôle le développement des ILC3 et son absence chez des souris a provoqué une diminution de l'expression d'IL22 (Kiss et al., 2011). Les ILC3 représentent le sous-type majoritaire des ILCs dans le colon et dans l'iléon (Geremia and Arancibia-Cárcamo, 2017). Il a été rapporté une production majoritaire d'IL-22 à l'homéostasie par les ILC3 NCR<sup>+</sup> (Hoorweg et al., 2012). Chez la souris, une équipe a démontré en réalisant un modèle de souris rapportrices pour l'IL-22 (c'est-à-dire expression de la GFP à chaque fois que le gène de l'IL-22 est exprimé) que seuls les LTi expriment la cytokine à l'homéostasie (Savage et al., 2017). Les DCs ainsi que les PNN représentent aussi des sources potentielles de production d'IL-22 (Mizoguchi, 2012; Zhou et al., 2018a)

b. Sources adaptatives de l'IL-22

Les LyT CD4<sup>+</sup> polarisés vers les voies Th22 et Th17 représentent les principales sources adaptatives d'IL-22 (Rutz et al., 2014; Sonnenberg et al., 2011a). Initialement, l'IL-22 a été décrite comme une cytokine sécrétée comme l'IFN $\gamma$  par les Ly Th1 (Gurney, 2004). Les Ly Th22 sont caractérisés par une production exclusive d'IL-22. Ces cellules, de phénotype mémoire, sont retrouvées dans le sang périphérique et ont un tropisme préférentiellement cutané du fait de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR10, CCR6 et CCR4 ainsi que du ligand de sélectine CLA (Cutaneous Ligand Antigen). Elles expriment fortement le facteur de transcription AhR mais très peu ROR $\gamma$ t. Les pDCs activées sécrètent de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ ,

induisant ainsi une polarisation Th22 (Duhon et al., 2009). Les Ly Th17 exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ T sécrètent à la fois de l'IL-22 et de l'IL-17A (Rutz et al., 2014). Enfin, les Ly T CD8<sup>+</sup>, les LyT de l'immunité innée (NKT) et les LyT gamma delta (LyT  $\gamma\delta$ ) sont aussi capables de sécréter de l'IL-22 (Dudakov et al., 2015).

### c. Régulation de l'expression d'IL-22

#### ▪ Cytokiniques

Plusieurs signaux cytokiniques agissant sur les ILC3 contribuent à moduler l'expression d'IL-22 et à l'induire en cas de signaux de danger/inflammation.

-L'IL-7 et l'IL-15 sont deux cytokines importantes pour la régulation, la survie et la prolifération des ILC3 (Sonnenberg et al., 2011b).

-L'IL-23 est la cytokine clé dans l'induction de la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 (Geremia et al., 2011; Sonnenberg et al., 2012). Ainsi, l'activation de populations de phagocytes mononucléés (DCs/macrophages) provoquent la sécrétion d'IL-23 qui en retour stimulent les ILC3 et la production d'IL-22. En plus de leur activation par reconnaissance de motifs particuliers par les TLRs, plusieurs signaux cytokiniques sont décrits en amont comme inducteur de la sécrétion d'IL-23. Ainsi, l'IL-36 $\gamma$  est capable d'agir sur les DCs CD11b<sup>+</sup> pour induire l'expression d'IL-23. Dans un modèle de colite au DSS, les animaux déficients en *IL36 $\gamma$*  sont plus sensibles dû à un défaut d'induction d'IL-22 de façon IL-23 dépendante (Ngo et al., 2018). De même, les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$  sécrétées par les LT $\alpha$  signalent sur les DCs pour induire l'expression d'IL-23 (Tumanov et al., 2011).

-L'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1 $\beta$  contribuent à la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 ainsi qu'à leur stabilisation (Bergmann et al., 2017).

-L'IL-18 produite par les CEI ou encore les DCs est capable d'interagir *via* la voie NF- $\kappa$ B au niveau du promoteur *IL22* et ainsi d'induire l'expression d'IL-22 par les ILC3 (Muñoz et al., 2015; Victor et al., 2017).

-Les facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules gliales, en réponse à des stimuli de l'environnement, sont capables de signaler sur les ILC3 exprimant le récepteur RET (neuroregulatory receptor) pour induire l'expression d'IL-22 (Ibiza et al., 2016).

Certains signaux cytokiniques sont identiques pour réguler l'expression d'IL-22 par les LyT :

-Les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  et l'IL-23 contribuant à la différenciation en Th17 (Wolk et al., 2002a) représentent des signaux inducteurs de l'expression d'IL-22 (Rutz et al., 2013).

-Bien que le TGF- $\beta$  est indispensable pour la différenciation en Th17, de fortes concentrations inhibent la sécrétion d'IL-22 *via* le facteur de transcription c-Maf mais pas celle d'IL-17A (McGeachy et al., 2007).

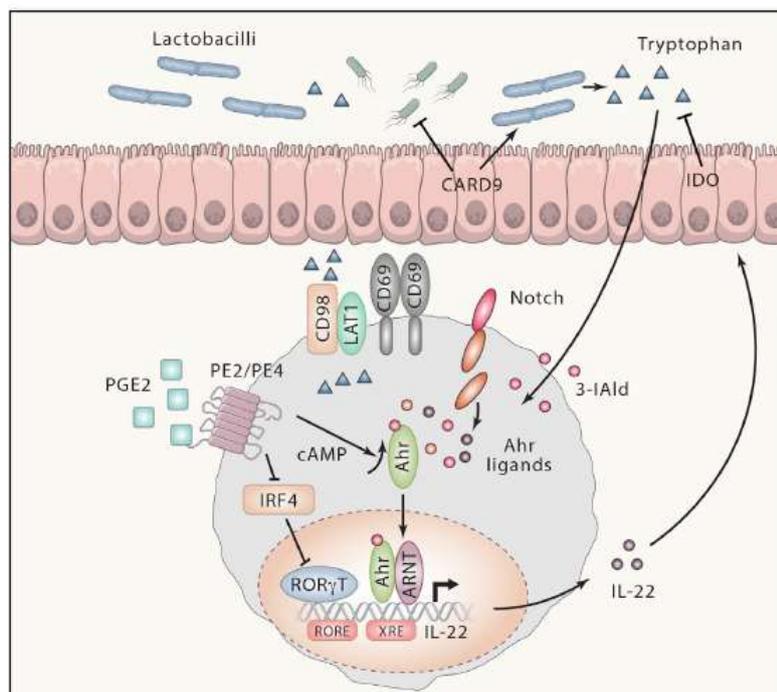
- *Facteurs de transcription*

AhR est un facteur de transcription essentiel pour la production d'IL-22 par les Th22, Th17 et les LyT  $\gamma\delta$  mais aussi les ILC3 (Ouyang and O'Garra, 2019). AhR est activé en réponse à des stimuli de l'environnement (toxines environnementales comme par exemple la tetrachlorodibenzo-p-dioxine TCDD contenue dans les fumées de cigarette) mais aussi des métabolites endogènes issus (métabolites issus de notre alimentation, métabolite du tryptophane). Comme décrit dans la **Figure 14**, il représente le point central de plusieurs voies de signalisation. Ainsi, la voie de signalisation incluant le facteur de transcription Nocht induit la production d'IL-22 par les LyT *via* la production de ligands endogènes activant AhR (Alam et al., 2010). La prostaglandine E2 promeut la production d'IL-22 par les ILC3 et les Th17, en signalant sur ses récepteurs EP2 et EP4, activant les voies cAMP et AhR et inhibant le facteur de transcription IRF-4 (Robb et al., 2018).

- *Facteurs métaboliques*

La voie de dégradation du tryptophane est soit médiée par IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) aboutissant à la production de kynurénine impliquée dans les mécanismes de tolérance soit par les bactéries intestinales (comme par exemple *Lactobacillus*) donnant des dérivés indolés : ligands endogènes d'AhR et permettent l'induction d'IL-22 par les ILC3 (Ouyang and O'Garra, 2019). Ainsi, chez les souris déficientes en IDO, les voies induisant la production d'IL-22 *via* les dérivés indolés sont renforcées permettant ainsi augmentation des fonctions de barrière et une meilleure tolérance au cours de modèles de désordre métaboliques (Laurans et al., 2018). En l'absence de CARD9, une protéine adaptatrice impliquée dans les voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée et constituant un des gènes majeurs de susceptibilité des MICI, les souris sont plus susceptibles aux modèles de colite. En effet, en l'absence de CARD9, le microbiote intestinal est altéré, empêchant le métabolisme normal du tryptophane en dérivés indolés inducteur d'IL-22, provoquant une atteinte plus forte au cours d'un modèle de colite par DSS (Lamas et al., 2016). Chez ces souris *Card9*<sup>-/-</sup>, l'inoculation avec des souches de *Lactobacillus sp.* a permis de diminuer l'inflammation intestinale *via* l'induction d'IL-22. Ces deux mécanismes de régulation de l'expression d'IL-22 sont résumés sur la **Figure 14**. En 2016,

une équipe a décrit la régulation de l'expression d'IL-22 par les LyT  $\gamma\delta$  *via* le marqueur d'activation CD69 et son association au complexe LAT1-CD98 : un transporteur d'acide aminé aromatique comme le tryptophane (Cibrian et al., 2016). De cette façon, le CD69 en régulant l'expression de ce transporteur contribue *via* l'activation d'Ahr à induire l'expression d'IL-22. Ces données mettent en évidence l'importance des signaux environnementaux dans la modulation de l'expression de l'IL-22. Récemment, il a aussi été mis en évidence que l'expression d'IL-22 par les ILC3 était soumise à un rythme circadien (Godinho-Silva et al., 2019; Teng et al., 2019). La régulation par les ligands de l'Ahr souligne qu'une modulation de la flore intestinale (alimentation, tabac, médicaments, stress ect) est directement liée à l'expression d'IL-22. Un autre modulateur des actions de l'IL-22 est sa régulation par un inhibiteur spécifique et soluble : l'IL-22 *binding protein* (IL-22BP) présentant une analogie de structure avec le récepteur IL-22RA1. En présence de cet inhibiteur, que nous aborderons dans une partie spécifique, nous verrons que les actions de l'IL-22 sont bloquées [cf. p82].



**Figure 14 : AhR joue un rôle central dans la régulation de l'expression d'IL-22 par les ILC3 et les Ly T.**

Plusieurs mécanismes contribuent à moduler les voies d'activation d'Ahr comme celle dépendante des dérivés du tryptophane *via* CD69, CARD9, IDO ou encore le microbiote intestinal. La voie Notch, en produisant des ligands endogènes d'Ahr et les prostaglandines active la voie Ahr et donc l'expression d'IL-22. D'après (Ouyang and O'Garra, 2019).

### **iii. L'IL-22 : récepteurs et voies de signalisation**

Le récepteur de l'IL-22 (IL-22R) est un hétérodimère composé de deux sous unités : IL-10R2 ubiquitaire et IL-22RA1 dont l'expression est restreinte aux cellules épithéliales de divers organes notamment la peau, le rein, les organes des systèmes digestif (intestin grêle, colon, pancréas, foie) et respiratoire (poumon, trachée) (Li et al., 2014b). Le récepteur ubiquitaire peut constituer une sous unité du récepteur pour d'autres cytokines de la famille de l'IL-10 comme IL-10, IL-26, IL-28 et IL-29 (Sabat, 2010). La sous-unité IL-22RA1 est commune avec les récepteurs de l'IL-20 et l'IL-24 pour former un autre hétérodimère avec la sous-unité IL-20R2. Les parties extracellulaires d'IL-22RA1 et IL-10R2 sont composées d'un tandem de deux domaines D1 et D2. Ils sont composés de sept brins  $\beta$  reliés entre par des boucles et stabilisés par deux ponts disulfures. Le récepteur IL-22RA1 comporte 3 sites de N-glycosylation dans sa partie extracellulaire tandis qu'IL-10R2 en comporte quatre. L'IL-22 se fixe en premier sur IL-22RA1 en raison de sa plus forte affinité, induisant un changement de conformation de l'IL-22 qui peut alors interagir avec IL-10R2. L'interaction entre IL-22 et IL-22RA1 implique les boucles AB et l'hélice F de l'IL-22 avec les boucles L2/L4 du domaine D1 de l'IL-22RA1. Trois acides aminés de l'IL-22 (Thr70, Arg73 et Lys162) sont cruciaux à cette interaction (Bleicher et al., 2008). La boucle L2 du domaine IL-10R2 étant plus petite, explique l'absence d'interaction entre IL-22 et IL-10R2 spontanément. Les études ont mis en évidence que la glycosylation d'Asn54 était important pour l'interaction IL-22/IL-10R2. Nous reverrons par la suite dans la partie IL-22BP, l'importance de cet acide aminé (aa) pour le couple IL-22/IL-22BP.

La partie intracellulaire d'IL-22R1 contient quatre sites avec le motif Tyr-X-X-Gln constituant des sites de fixation du facteur de transcription STAT (signal transducer and activator of transcription). La formation du complexe IL-22-IL-22RA1-IL-10R2 induit principalement la voie de signalisation Janus-kinase (JAK-STAT) aboutissant à la phosphorylation de STAT3, à sa dimérisation puis son passage dans le noyau où il va induire les transcriptions de gènes (Lejeune et al., 2002). D'autres voies de signalisation incluant trois principales voies des MAP kinases (p38, JNK, ERK1/2) ou encore celle PI3K (phosphoinositide-3-kinase) /AKT/mTOR ont aussi été décrites en aval de la fixation de l'IL-22 sur son récepteur. De cette façon, l'IL-22 se place ainsi comme une cytokine clé assurant le dialogue entre les cellules du système immunitaire et les épithéliums.

#### **iv. Expression de l'IL-22 au niveau des muqueuses intestinales**

##### *a. A l'homéostasie*

Les ILC3 de l'intestin sont responsables de la production constitutive d'IL-22, avec des niveaux plus élevés dans l'iléon (Krämer et al., 2017). A l'homéostasie au sein des ILC3, les NCR<sup>+</sup> présentent des niveaux d'expression supérieur d'IL-22 en comparaison aux ILC3 NCR<sup>-</sup> (Hoorweg et al., 2012).

##### *b. Au cours des MICI*

Nous avons vu au cours des MICI, que l'affaiblissement de la barrière intestinale provoque le passage de microorganismes pathogènes/commensaux initialement contenus dans la lumière intestinale jusque dans la LP. En réponse à cette translocation bactérienne, le système immunitaire s'active et émet des signaux provoquant, en outre, une induction de l'expression d'IL-22 au niveau du colon (Brand et al., 2006; Geremia et al., 2011). De plus, les niveaux d'IL-22 ont été décrits comme supérieurs chez les patients atteints de MC en comparaison aux patients souffrant de RCH (Andoh et al., 2005; Brand et al., 2006). Au cours de la MC, il a été observé une augmentation de la concentration sanguine d'IL-22 corrélée à l'activité de la maladie (Wolk et al., 2007). Plusieurs études ont caractérisé les sources d'IL-22 des les muqueuses ulcérées coliques.

-En 2010, un rapport a mis en évidence une augmentation de l'infiltration des ILC3 NKp44<sup>-</sup> (correspondant aux ILC3 NCR<sup>-</sup>) dans les muqueuses intestinales MC en regard de celles RCH ou encore des muqueuses saines (Takayama et al., 2010). Il est confirmé ensuite par une autre étude ayant montré une augmentation de la fréquence des ILC3 (NCR<sup>-</sup>) au niveau des colons inflammatoires MC en comparaison à la RCH (Geremia et al., 2011). Ainsi, au niveau des zones ulcérées, sous l'influence de l'IL-23 sécrétée par les populations de DCs/macrophages activés, ces ILC3s sécrètent de forte quantité d'IL-22.

-Les neutrophiles CD177<sup>+</sup> sécréteurs d'IL-22 infiltrent d'avantage la LP des muqueuses coliques de patients atteints de MICI en comparaison aux muqueuses saines (Zhou et al., 2018a). L'expression d'IL-22 par les PNN CD177 circulants est aussi augmentée. Un rôle protecteur leur a été attribué dans la physiopathologie des MICI puisque leur absence au cours d'un modèle de colite au DSS a provoqué une altération de la perméabilité intestinale.

-Les Ly Th17, infiltrés dans les muqueuses inflammatoires MICI et sous l'influence de différents stimuli cytokiniques présents dans la LP, expriment fortement l'IL-22.

## v. Actions de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal

### a. L'IL-22 exerce des actions protectrices contribuant au renforcement des barrières intestinales

L'IL-22 est une cytokine qui exerce des actions bénéfiques sur l'épithélium intestinal en renforçant des propriétés de barrière de la muqueuse (Sonnenberg et al., 2011a) et en induisant sa régénération. L'IL-22 protège les CEI des agressions par des bactéries pathogènes en stimulant la production de PAMs tels que la lipocaline 2, les  $\beta$ -défensines, les lectines de type C appartenant à la famille des REG ainsi que les protéines S100 (Zheng et al., 2008a; Raffatellu et al., 2009; Kolls et al., 2008; Lo et al., 2019; Coorens et al., 2019) (**Figure 17A**, numéro 6).

De plus, l'IL-22 contribue au renforcement de la barrière intestinale en stimulant l'expression de protéines des jonctions serrées tels que claudine-1 (Dudakov et al., 2015). En 2017, chez le rat au cours d'un modèle de colite induite par *C.rodentium*, l'équipe de Tsai démontre que l'IL-22 sécrétée, en réponse à l'infection, induit l'expression de la claudine 2 (Tsai et al., 2017). Cette protéine de jonction serrée contribue à la clairance du pathogène en augmentant la perméabilité intestinale. Ces résultats ont ensuite été reproduits *in vitro* avec des cellules épithéliales de colon humain (lignée cellulaire Caco-2) (Wang et al., 2017b).

L'IL-22, en induisant la production de mucines (MUC 1,-2,-10,-13) par les cellules de goblet, participe au recouvrement de la muqueuse intestinale par une couche épaisse de mucus (Sugimoto et al., 2008a) (**Figure 17A**, numéro 5)

Ces propriétés définissent l'IL-22 comme un acteur crucial de l'homéostasie intestinale et protecteur en cas d'inflammation chronique (**Figure 17A**, numéro 2). Dans différents modèles de colites expérimentales, il a été mis en évidence que l'absence d'IL-22 au cours de la colite s'associe fortement à une augmentation de la perte de poids, de la mortalité des rongeurs ainsi qu'une atteinte tissulaire plus sévère de la muqueuse digestive. Cette action bénéfique a été démontrée au cours de plusieurs modèles.

- Un modèle de colite innée réalisé par l'administration *via* l'eau de boisson des animaux pendant 5-7 jours de dextran sulfate sodium (DSS) : un agent qui provoque la rupture entre deux CEI adjacentes (Sugimoto et al., 2008a; Zenewicz et al., 2008; Zindl et al., 2013). De plus, l'administration d'IL-22 recombinante (UTTR1147A IL-22

IgG4) chez les souris au cours de ce modèle a permis d'améliorer le score histologique de la colite (Stefanich et al., 2018)

- Un modèle d'infection digestive par l'entérobactérie *Citrobacter rodentium*, l'équipe de Zheng ont pu mettre en avant le rôle fonctionnel de l'IL-22 dans les défenses anti-infectieuses. En effet, l'absence d'IL-22 ou sa neutralisation ont entraîné une diffusion systémique de la bactérie et une mort prématurée des animaux (Zheng et al., 2008a). Récemment, une équipe a démontré l'importance de la production d'IL-22 par les ILC3 dans la survie des animaux suite d'une colite induite *C. rodentium* (Wang et al., 2019).
- De même, dans un modèle d'infection chronique par *Salmonella*, les auteurs ont démontré que la neutralisation de l'IL-22 a entraîné une inflammation chronique et une persistance du pathogène provoquant à terme l'installation d'une fibrose intestinale (Lo et al., 2019)
- Un modèle de colite de type Th1 induit par l'injection de TNBS (Trinitrobenzène acide sulfonique)(Monteleone et al., 2011).
- Un modèle de colite de type Th2 : les souris n'ayant plus de TCR (TCR KO) développent spontanément une inflammation intestinale semblable à celle observée au cours de la RCH. Chez ces souris, l'administration d'IL-22 par un vecteur a diminué la sévérité de la colite (Sugimoto et al., 2008b).
- Un modèle de colite médié par le parasite *Toxoplasma gondii* provoquant une iléite chez les animaux due à une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ ) par les Ly T CD4<sup>+</sup> et à terme une nécrose tissulaire (Liesenfeld, 2002). Les auteurs ont démontré que l'absence d'IL-22 chez les souris a exacerbé la colite (Couturier-Maillard et al., 2018a). Ils suggèrent un rôle protecteur de l'IL-22 indépendant du microbiote ou du PAM REG3G mais plutôt médié par l'IL-18 ou encore par l'induction de l'expression d'*AGR2* (anterior gradient homolog 2), un gène impliqué dans la production de mucus par les cellules de goblet.
- Un modèle de colite adaptatif induit par l'injection de Ly T naïfs (CD45RB<sup>hi</sup> CD25<sup>-</sup>) d'une souris donneuse à des souris immunodéficientes (*Rag1*<sup>-/-</sup>) provoquant ainsi une inflammation intestinale chronique (Powrie et al., 1994). Le transfert de LyT issus de souris *IL22*<sup>-/-</sup> chez des souris sans système immunitaire adaptatif a aggravé significativement la colite (Zenewicz et al., 2008). Au cours du même modèle, le groupe de Eken et al. a démontré que les souris receveuses déficientes pour le

récepteur de l'IL-23 ont présenté un phénotype aggravé de la colite due à l'absence de production d'IL-22 par les ILC3 (Eken et al., 2014).

Le rôle protecteur de l'IL-22 dans le contrôle de l'intégrité des barrières est démontré dans un modèle d'infection fongique par *Candida albicans*. Au cours de ce modèle, la neutralisation de l'IL-22 a provoqué une dissémination de l'infection fongique due à un affaiblissement de la barrière épithéliale (De Luca et al., 2010).

En outre, l'IL-22 exerce des actions plus systémiques permettant de lutter contre la propagation des infections. L'IL-22 induit notamment la sécrétion par les hépatocytes du PAM hepcidine (Smith et al., 2013) permettant de capter l'hème et de limiter ainsi les nutriments pour le pathogène *C.rodentium* (Sakamoto et al., 2017). Les travaux de cette équipe ont démontré que les souris déficientes en IL-22 ont une mortalité nettement supérieure expliquée par une dissémination accrue de la bactérie. L'IL-22 induit aussi l'expression de nombreuses chimiokines permettant ainsi le recrutement de leucocytes au niveau du site d'infection.

Cependant, il est important de noter qu'au cours de certaines études d'inflammation chronique de l'intestin il a parfois été attribué à l'IL-22 un rôle délétère.

- Au cours d'un modèle d'infection par *T.gondii*, les souris déficientes en IL-22 ont présenté un score histologique significativement moins important, moins de nécrose iléale et une augmentation de la survie (Muñoz et al., 2009). Pour ce groupe, l'IL-22 produite par les LyT Th17, en réponse à l'IL-23, exercerait un rôle délétère pro-inflammatoire au niveau de l'iléon notamment en induisant des métalloprotéinases. Il est important de noter que dans ce travail, les auteurs ont infecté les rongeurs à l'aide d'une dose *T. gondii* nettement supérieure en comparaison à l'étude de Couturier citée précédemment (100 œufs versus une trentaine).
- En 2011, un groupe a démontré lors d'un modèle de transfert de LyT effecteurs/mémoires (LyT eff : CD45RB<sup>lo</sup>) exempt de LyT reg issus de souris *IL22*<sup>-/-</sup> chez des souris *Rag1*<sup>-/-</sup> a contribué à une amélioration de la colite en comparaison aux souris sauvages. En effet, le transfert de LyT eff provenant de souris *IL22*<sup>-/-</sup> est associé à une perte de poids moins importante, un colon moins rétréci et un score histologique de la colite plus faible chez les souris receveuses (Kamanaka et al., 2011). Au cours de ce modèle, contrairement au transfert de LyT naïfs (CD45RB<sup>hi</sup>) provoquant de longues plages d'ulcérations sur la muqueuse intestinale, l'injection de LyT eff : CD45RB<sup>lo</sup>

contribue à un épaississement de la muqueuse. De cette façon, l'IL-22 pourrait jouer un rôle néfaste en induisant la prolifération des CEI provoquant à terme une hyperplasie de la muqueuse.

- Au cours d'un modèle de colite innée induit par l'administration d'un Ac anti-CD40 (CD40 mAb) chez des souris immunodéficientes provoquant ainsi une inflammation intestinale médiée par l'IL-23 (Uhlir et al., 2006), le groupe de Eken et al. a souligné un rôle délétère endossé par l'IL-22 (Eken et al., 2014). Dans ce modèle, le blocage de l'IL-22 par un Ac monoclonal a permis de diminuer les manifestations cliniques de la colite, tandis que l'administration d'IL-22 par un plasmide restaure la colite. Les auteurs démontrent ensuite que l'effet délétère associé à l'IL-22 est plus ou moins médié par l'IL-23. L'IL-22, produite en réponse au signal de l'IL-23 sur les ILC3, provoque une forte sécrétion d'IFN $\gamma$  et une baisse d'IL-10. L'IL-22 joue aussi un rôle délétère dans la colite induite par un anti CD40 mAb en induisant le recrutement de PNN *via* l'induction de chimiokines (CXCL1, CXCL2 et CXCL5)
- Dans un modèle de colite spontanée induit par une délétion spécifique du récepteur de l'IL-10 au niveau des macrophages (*Cx3cr1<sup>cre</sup> : Il10ra<sup>fl/f</sup>*), la production d'IL-23 par les macrophages inflammatoires induit un phénotype délétère dépendant de l'IL-22 provoquant l'afflux de nombreux PNN (Bernshtein et al., 2019). Quant au groupe de Mathur et al, ils ont démontré au cours d'un modèle de colite au TNBS que la neutralisation de l'IL-22 s'accompagnait d'une diminution des marqueurs de fibrose ( $\alpha$ SMA, Col I et Col III)(Mathur et al., 2019).

Cette cytokine induit également le transfert de fucose sur des protéines exprimées au pôle apical des CEI *via* l'induction de l'enzyme galactoside 2 $\alpha$  L fucosyl-transferase2 (FUT2) exprimée par les cellules épithéliales (Pickard and Chervonsky, 2015) (**Figure 17A**, numéro 7). Cette glycosylation favorise la croissance de bactéries commensales au détriment de celles pathogènes comme *Salmonella typhimurium* (Goto et al., 2014) ou encore de *Enterococcus faecalis* au cours d'infection par *C.rodentium* (Pham et al., 2014) ou plus récemment *C.difficile* (Nagao-Kitamoto et al., 2020) contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale. En outre de récents travaux démontrent dans trois cohortes indépendantes de patients atteints de RCH, une corrélation négative entre l'expression d'IL-22BP (inhibiteur IL-22) et les enzymes responsables de la glycosylation (Nagao-Kitamoto et al., 2020). Ainsi pour eux, les forts niveaux d'IL-22BP observés chez des patients ayant des formes actives de la maladie

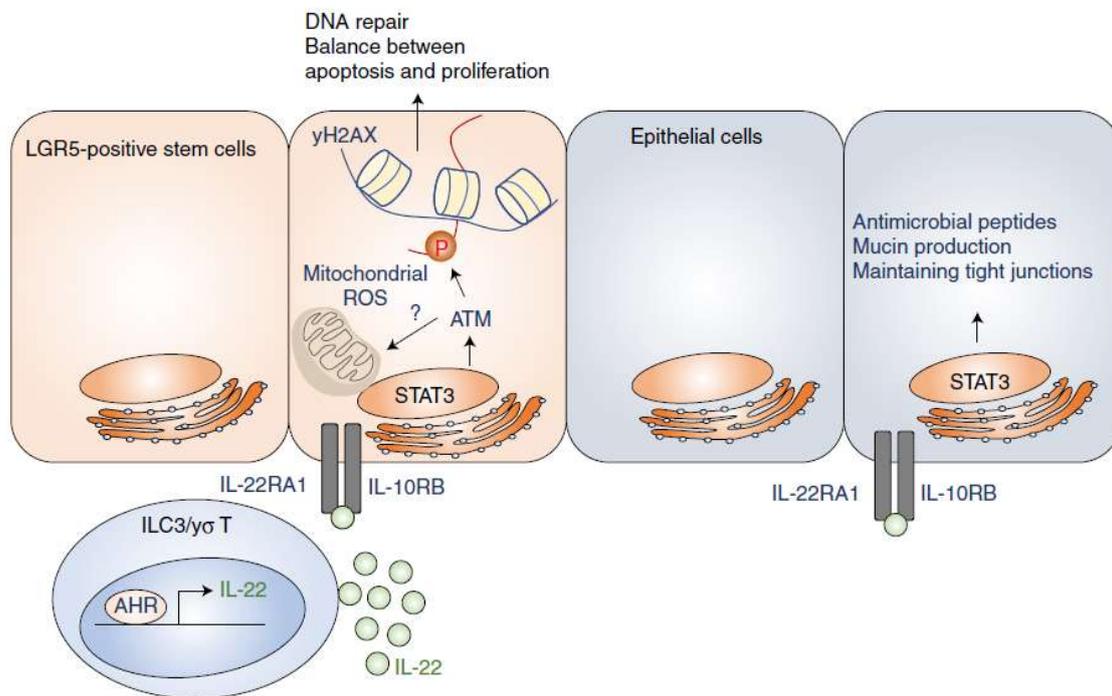
pourraient être responsables d'une baisse de la glycosylation et des dysbioses observées chez ces mêmes patients.

L'IL-22 induit la régénération des épithéliums intestinaux en agissant au niveau des cellules souches intestinales (CSI) exprimant son récepteur (IL-22R) après un dommage tissulaire (Gronke and Diefenbach, 2015; Lindemans et al., 2015) (**Figure 17A**, numéros 1&4). Cependant, deux récents papiers proposent que l'IL-22 induit la régénération *in vivo* et *in vitro* dans un modèle d'organoïde en induisant à la fois l'expansion des cellules TA (transit amplifying)(Zwarycz et al., 2019) et la différenciation des cellules de Paneth et en inhibant celles des CSI *via* l'inhibition des voies Wnt et Notch (Zha et al., 2019). Ces mécanismes de régénération induits par la prolifération des CSI présentes au niveau des cryptes intestinales sont strictement dépendante de STAT3, un facteur de transcription induit par IL-22 (Lindemans et al., 2015). En effet, en administrant du DSS, à des souris ayant subi une délétion de STAT3 spécifiquement dans les CEI, l'équipe de Pickert a mis en évidence chez ces animaux une sévère réduction de l'expression de gènes impliqués dans les processus de réparation tissulaire, de réponse au stress cellulaire et de régulation de l'apoptose (Pickert et al., 2009). Ils démontrent *via* des expériences de mini-perforations de la muqueuse digestive sous contrôle endoscopique qu'une absence de STAT3 s'associe à un retard de la cicatrisation tissulaire. Les ILC3 constituent un acteur indispensable à la régénération des épithéliums intestinaux lésés (Aparicio-Domingo et al., 2015). Dans un modèle de dommage tissulaire induit par les chimiothérapies (méthotrexate), ce groupe met en évidence que l'absence d'ILC3 s'associe à une aggravation des lésions au niveau des cryptes. Ainsi, au cours de dommages intestinaux, la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 est un médiateur indispensable à la régénération des épithéliums en induisant la prolifération des CSI et les processus de cicatrisation *via* l'expression de STAT3 par les CEI. Le rôle bénéfique de l'IL-22 a aussi été démontré sur les atteintes digestives consécutives aux greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : c'est la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Au cours d'un modèle de greffe allogénique, l'absence (*Il22<sup>-/-</sup>*) ou le blocage de cette cytokine par un Ac monoclonal chez les souris receveuses ont provoqué des dommages intestinaux tissulaires plus importants et donc plus de mortalité (Hanash et al., 2012). Chez ces souris, l'absence d'IL-22 s'associe à une augmentation de l'apoptose des CEI, une diminution du nombre de CSI et des PAMs (REG3 $\beta$  et REG3 $\gamma$ ) provoquant une altération des fonctions de barrière objectivée par une augmentation de la perméabilité intestinale (Hanash et al., 2012; Zhao et al., 2018).

Cette équipe a démontré ensuite que l'administration d'IL-22 chez les souris prévient des manifestations intestinales de GVHD en induisant l'expression de REG3 $\gamma$  jouant un rôle dans l'inhibition de l'apoptose des CSI et des cellules de Paneth. Finalement, l'administration d'IL-22 recombinante (F-652) une semaine après une greffe de CSH, a induit une diminution des signes systémiques de GVHD ainsi qu'une meilleure survie des souris (Lindemans et al., 2015). Ces études ont permis la mise en place d'un essai clinique de phase II dès lors que des manifestations intestinales de GVHD (grade II-IV) étaient objectivées chez des sujets ayant reçu une allogreffe de CSH. Actuellement, aucune donnée sur les effets potentiellement protecteurs ou délétères de cette injection d'IL-22 ne sont disponibles. Par ailleurs, plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'efficacité d'une injection d'IL-22 recombinante (IL-22 Fc) dans le traitement de l'hépatite alcoolique, des MICI, de l'ulcère du pied diabétique ou encore les pneumonies graves dues à une infection par le Sars-Cov 2 (**Tableau 3**). En effet, le pouvoir régénératif de l'IL-22 a aussi été démontré au niveau hépatique au cours d'un modèle aiguë d'hépatite induit par une hépatectomie et/ou l'administration de concanavaline A (Radaeva et al., 2004; Zhou et al., 2018b).

L'IL-22 exerce aussi des effets protecteurs en induisant des mécanismes de réparation de l'ADN consécutifs à un stress au niveau des CSI (Gronke et al., 2019) (**Figure 17A**, numéro 3). Au cours d'un modèle de cancer colorectal (CRC) via l'administration d'un agent alkylant AOM (azoxyméthane) suivie par deux cycles de DSS, les auteurs ont démontré que les souris déficientes en IL-22 présentent plus de tumeurs. Afin d'identifier le rôle exact endossé par l'IL-22 dans les processus de réparation, ils génèrent des animaux déficients pour le récepteur de l'IL-22 uniquement au niveau des CSI, puis ces animaux sont irradiés afin de provoquer des cassures spontanées dans la molécule d'ADN. Une analyse transcriptomique a mis en évidence un enrichissement des voies de réparation de l'ADN et d'apoptose uniquement dans les cellules issues des animaux *Il22<sup>+/+</sup>*. Ils démontrent ensuite un rôle de l'IL-22 dans l'induction d'une cascade de signalisation dont les acteurs sont STAT3 puis la kinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) qui phosphoryle alors H2AX pour induire des gènes impliqués dans les processus de réparation dont *p21* impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et *PUMA* impliqué dans l'induction de l'apoptose. De cette façon, l'équipe de Gronke démontre que l'IL-22 joue un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN à la suite d'un stress et qu'une absence de sa signalisation s'associe à une diminution de l'apoptose, une augmentation du nombre de mutations et une absence de réparation.

La **Figure 15** présente les actions bénéfiques induites par la signalisation de l'IL-22 sur les CEI.



**Figure 15 : Actions protectrices induites par l'IL-22 sur l'épithélium intestinal.**

L'IL-22 sécrétée par les ILC3 se fixe sur ses récepteurs exprimés à la surface des CEI pour induire l'expression de PAMs, de mucines et des protéines de jonctions serrées. L'IL-22 exerce aussi à un signal à la surface des CSI exprimant l'IL-22R et induit des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire. D'après (Hasnain and Begun, 2019).

ID	Maladie	Principe actif	Principe de l'étude	Phase	Premiers résultats
NCT02406651	Maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GVHD)	IL-22 IgG2 Fc =F652 + corticoïdes	- 1 inj/semaine/4 semaines - Manifestations intestinales de GVHD (grade II-IV)	Phase IIa	NA
NCT02655510	Hépatite alcoolique	F652 en IV à J1 et J7	-Atteinte hépatique modérée à sévère -MELD score : Model for End-Stage Liver disease (11-28)	Phase I/II	↗ marqueurs de régénération hépatique (Angioprotéine 2 / FGF / PDGF) (Arab et al., 2019) Pas d'EI graves (Tang et al., 2019)
NCT04498377	COVID-19	F652 en IV vs placebo	-Atteinte modérée à sévère à J5	Phase II	NA
NCT04386616		UTTR1147A = IL-22 IgG4 Fc en IV vs placebo	-2 injections IV -Sujets hospitalisés pour pneumonie grave	Phase II	NA
NCT02749630	Maladie de Crohn & RCH	UTTR1147A en IV vs placebo	-Etude de la sécurité de l'administration IL-22Fc -Comparaison avec des volontaires sains	Phase I	NA
NCT03650413		UTTR1147A	-Etude de la sécurité/tolérance/ pharmacodynamie de l'administration d'IL-22Fc	Phase II	NA
NCT03558152	RCH	UTTR1147A vs Vedolizumab vs placebo	-Etude de la sécurité/tolérance et pharmacodynamie de l'IL-22Fc vs placebo vs Vedolizumab -forme modérée à sévère de RCH	Phase II	NA
NCT02833389	Ulcère du pied diabétique	UTTR1147A vs placebo	-Etude de la sécurité/tolérance et pharmacodynamie de l'IL-22Fc vs placebo	Phase II	NA

**Tableau 3 : Essais cliniques en cours évaluant l'efficacité de l'injection d'IL-22 recombinante au cours de plusieurs pathologies.** FGF : Fibroblast growth factor ; PDGF : Platelet Derived Growth Factor, IV : intraveineuse ; EI : effet indésirable

*b. Une action prolongée d'IL-22 peut avoir des conséquences délétères*

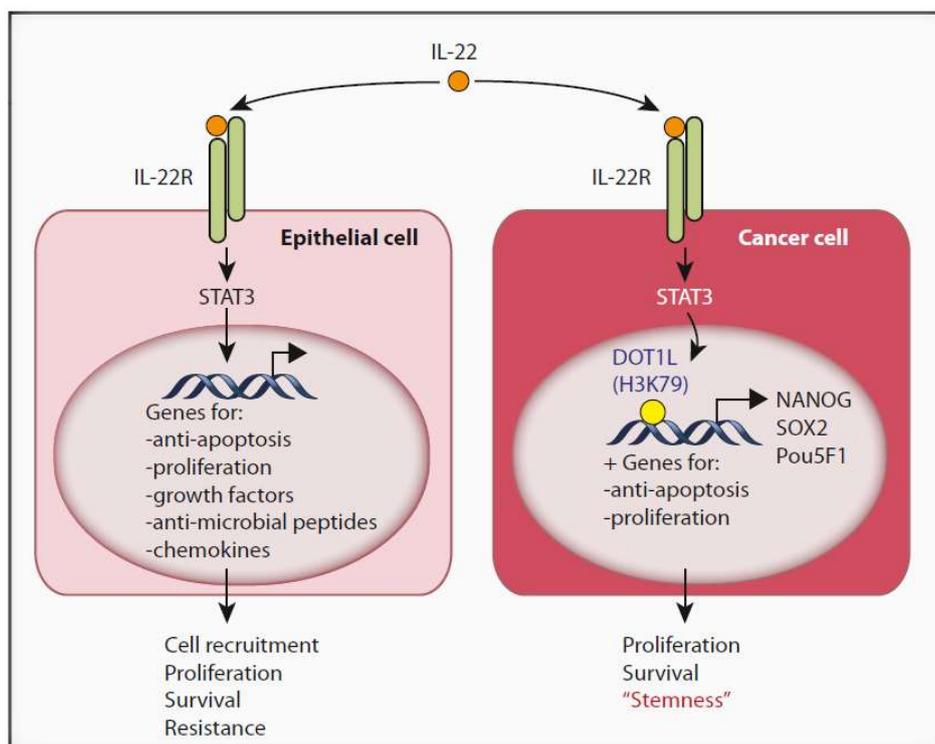
Nous venons de décrire le rôle clé joué par l'IL-22 dans le contrôle et la résolution de l'inflammation intestinale, important pour limiter l'apparition de CRC (Bernstein et al., 2001a). Plusieurs études ont, par ailleurs étudié, les liens entre l'IL-22 et les CRC. Une équipe a décrit un polymorphisme au sein du gène codant l'IL-22, associé à une incidence augmentée de 50% de développer un CRC (Thompson et al., 2010). Au niveau du colon, des travaux ont montré une augmentation de l'expression de l'IL-22 au niveau des zones cancéreuses en comparaison aux zones adjacentes saines (Kirchberger et al., 2013; Kryczek et al., 2014a). En 2013, Jiang et al. a démontré une augmentation de la sécrétion d'IL-22 par les lymphocytes ayant infiltré la tumeur (TILs) en comparaison aux lymphocytes périphériques (Jiang et al., 2013). De plus, les expressions de *ROR $\gamma$ t* et d'*IL22* sont corrélées à un moins bon pronostic/survie chez les patients atteints de CRC (Kryczek et al., 2014a; Tosolini et al., 2011). Ces données soulignent une implication de l'IL-22 dans les processus cancéreux. Plusieurs modèles animaux de CRC ont confirmé cette hypothèse.

- Au cours de modèles de CRC induits par l'AOM+DSS ou par une mutation dans le gène *Apc* (souris *Apc<sup>min/+</sup>*; mutation dans la protéine Apc Adenomatous Polyposis Coli provoquant son inactivation et un développement tissulaire excessif provoquant l'apparition de polype évoluant potentiellement en cellules tumorales) l'équipe de Huber a mis en évidence que des actions prolongées de l'IL-22 (en cas de l'absence de contrôle par l'IL-22BP) s'associent à plus fort accroissement tumoral (Huber et al., 2012a).
- L'injection de *H.hepaticus* + AOM chez des souris rendues génétiquement susceptibles, les auteurs remarquent que le blocage de l'IL-22 avec un Ac monoclonal s'associe à une diminution significative des lésions cancéreuses chez les souris (Kirchberger et al., 2013). En effet, la neutralisation de l'IL-22 a permis de réduire le score de prolifération des cellules épithéliales ainsi que l'expression de la cycline D1 (*Ccnd1*).
- Lors de la co-injection d'une lignée cellulaire cancéreuse (Hct-116) avec des TILs triés de patients CRC (+ de sécrétion d'IL-22), les souris ont développé spontanément des tumeurs plus grosses et plus de métastases par rapport aux souris ayant seulement reçu la lignée Hct-116 (Jiang et al., 2013).
- Lors de l'injection d'une suspension de cellules humaines provenant de tumeurs coliques à des souris humanisées immunodéficientes (absence du récepteur à l'IL-2),

l'injection concomitante d'un Ac bloquant l'IL-22 a permis de réduire significativement le volume/temps de développement des tumeurs (Kryczek et al., 2014a), tandis que l'ajout d'IL-22 exogène chez ces mêmes souris a accéléré considérablement le développement tumoral démontrant l'effet pro-tumoral induit par l'IL-22.

De nombreux travaux ont permis d'identifier les différents mécanismes reliant IL-22 aux processus de transformation tumorale, résumés dans la **Figure 17 B**. L'IL-22 agit sur son récepteur exprimé à la surface des CSI induisant leur prolifération *via* l'expression de molécules mitotiques (cycline D1, p21, cyclin-dependent kinase 4) et donc la croissance tumorale (Kirchberger et al., 2013; Sabat et al., 2014) (**Figure 17B**, numéro 1). L'axe IL-22/STAT3 induit une résistance à l'apoptose *via* l'expression de molécules anti-apoptotiques comme BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> (Jiang et al., 2013; Sabat et al., 2014) (**Figure 17B**, numéro 3). L'IL-22 contribue aussi à l'établissement d'une niche propice au développement de la tumeur en protégeant contre les défenses anti-tumorales et en apportant les nutriments nécessaires *via* la vascularisation de la tumeur (VEGF) (Jiang et al., 2013) (**Figure 17B**, numéro 2). L'IL-22 induit l'expression de métalloprotéinases (MMP9) jouant un rôle dans le remodelage de la *lamina propria* permettant ainsi la migration des cellules tumorales et l'invasion d'autres tissus (Ji et al., 2014) (**Figure 17B**, numéro 7). De plus, STAT3 un facteur de transcription induit par l'IL-22, est un médiateur oncogénique important en induisant des signaux de survie/prolifération (Bollrath et al., 2009; Grivennikov et al., 2009). En effet en l'absence de Stat3 chez la souris, il a été mis en évidence une augmentation de l'apoptose des CSI (Matthews et al., 2011) (**Figure 17**, numéro 6). L'IL-22 induit aussi un stress cellulaire (Powell et al., 2020) ainsi que des dérivés réactifs du nitrogène responsables de cassure de l'ADN (Ziesché et al., 2007) (**Figure 17B**, numéro 8 et 9). Des cultures *in vitro* de lignées cellulaires cancéreuses démontrent que l'IL-22 induit au sein des cellules souches l'expression des gènes *SOX2*, *NANOG* ou encore *POU5F1*, impliqués dans la mise en place d'un état immortel « stemness » (Kryczek et al., 2014a) (**Figure 17B**, numéro 5). L'IL-22 est donc impliquée dans l'initiation et l'amplification des processus cancéreux en favorisant *via* STAT3 l'induction d'une méthyltransférase DOLT1 associée à la région promotrice des gènes contribuant à la mise en place d'un état de « stemness » des cellules tumorales (Kryczek et al., 2014a) (**Figure 16**). Dans une cohorte de patients atteints de CRC, les auteurs ont démontré que les expressions *DOT1L* et *SOX2* corrélaient fortement avec un taux de survie amoindri.

En conclusion, les actions de l'IL-22 sur les CEI semblent être double (**Figure 17**), puisqu'elle exerce des actions bénéfiques importantes pour permettre la résolution d'un épisode inflammatoire (**Figure 15**) mais la persistance d'un état inflammatoire peut être à l'origine de transformation maligne amplifiée par la signalisation IL-22/STAT3 (**Figure 16**). Ainsi, le groupe de Huber et al. a démontré que l'IL-22 joue un rôle anti-tumoral au cours de la phase d'initiation du cancer grâce à son action anti-inflammatoire tandis que son blocage tardif a permis de réduire la croissance tumorale (Huber et al., 2012b). La suppression des actions prolifératives de l'IL-22 s'est avérée bénéfique au cours du modèle génétique d'induction de tumeurs (souris *Apc<sup>min/+</sup>*) non démontré au cours d'un modèle de cancer CRC dépendant de l'inflammation (AOM), renforçant donc le rôle endossé par l'IL-22 dans l'accélération du processus malin.



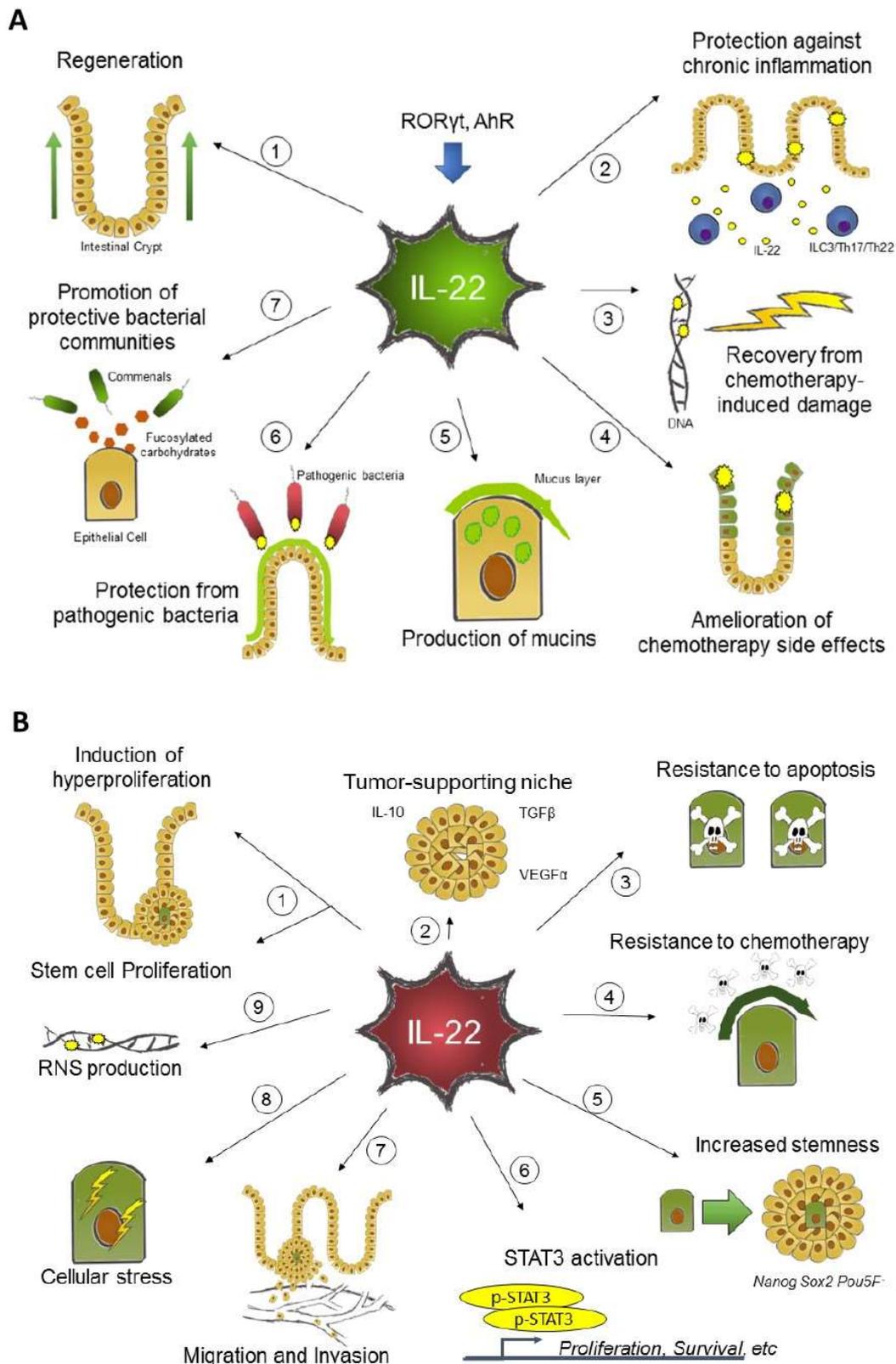
**Figure 16 : L'IL-22 peut médier des actions impliquées dans un processus de transformation tumorale.**

En signalant sur son récepteur (IL-22R) à la surface des CEI, l'IL-22 induit, *via* STAT3, les expressions de gènes associés à la prolifération, la résistance à l'apoptose et la réponse anti-infectieuse indispensables au maintien de l'homéostasie. L'IL-22 régule aussi la prolifération de CSI *via* la voie STAT3/DOT1L contribuant ainsi à l'émergence de cellules immortelles et donc à des phénomènes de transformation tumorales. D'après (Koltsova and Grivennikov, 2014).

La **Figure 17A** résume l'ensemble des actions protectrices décrites précédemment et induites par l'IL-22 sur les CEI pour promouvoir l'intégrité de la muqueuse intestinale alors que les actions exacerbées et non contrôlées de l'IL-22, exposées dans la **Figure 17B**, contribuent aux processus de tumorigénèse. Cette dualité des actions de l'IL-22, dépendante de son contexte de production, suggère la nécessité d'une régulation de l'axe IL-22/IL-22R, d'autant que ses effets peuvent être potentialisés en présence d'une autre cytokine pro-inflammatoire : l'interleukine 17A (IL-17A) (Liang et al., 2006 ; Raffatellu et al., 2009) (cf. p74).

Les actions bénéfiques induites par l'IL-22 sur la muqueuse intestinale ont contribué à la mise en phase d'un essai clinique, actuellement en phase II, visant à évaluer l'efficacité de l'administration (IV) d'IL-22 recombinante (UTTR1147A) chez des patients souffrant de formes modérées à sévères de RCH. L'efficacité de l'UTTR1147A sera comparée à celle du Vedolizumab (un Ac bloquant les intégrines  $\alpha 4\beta 7$  empêchant ainsi le « homing » des LyT) et à un placebo. Les modèles précliniques réalisés chez l'animal (Stefanich et al., 2018) et les études de phase I chez des volontaires sains ont relevé une bonne tolérance clinique de l'UTTR1147A sans effet indésirable grave (Rothenberg et al., 2019).

L'association synergique de l'IL-17A et l'IL-22 a été démontrée dans plusieurs études sur des kératinocytes et des cellules épithéliales pulmonaires mais jamais sur des CEI. En présence de ces deux médiateurs, les auteurs ont observé une induction potentialisée de l'expression de *BD2* dans des kératinocytes (Liang et al., 2006a) ou encore de *LCN2* au cours d'un modèle d'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumonia* (Aujla et al., 2008). Le mécanisme, expliquant cet effet synergique, semble être imputé à la similitude des voies de signalisation impliquées en aval des récepteurs de l'IL-22 et de l'IL-17.



**Figure 17 : Dualité des actions induites par l'IL-22 au niveau des cellules épithéliales intestinales.**

**A)** L'IL-22 contribue *via* diverses actions à renforcer les propriétés de barrière des muqueuses intestinales. **B)** Des actions exacerbées de cette cytokine peuvent contribuer à des phénomènes de transformations tumorales. D'après (Hernandez et al., 2018a).

## b) L'interleukine 17A

Le gène de l'*IL17* et la protéine correspondante IL-17 ont été découverts pour la première fois en 1993 dans les surnageants de LyT de rats (Rouvier et al., 1993).

### i. Gène et protéine de l'IL-17A

L'IL-17A appartient à la famille de l'interleukine 17, regroupant six membres (A à F) ayant une forte homologie entre eux et contenant tous des résidus cystéines carboxyle terminaux (Aggarwal and Gurney, 2002). Le gène de l'IL-17A (*IL17A*) code pour une protéine de 155 aa, sécrétée sous forme d'un homodimère de 40kDa. L'IL-17F correspond au deuxième membre majoritaire de cette famille. Cette cytokine, présentant 50% d'homologie avec l'IL-17A, est co-exprimée avec cette dernière soit sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère (IL-17A+IL-17F).

### ii. Sources cellulaires et régulation de l'IL-17A

Les LyT polarisés vers la voie Th17 ainsi que les ILC3 (LTi et ILC3 NCR<sup>+</sup> et NCR<sup>-</sup>) représentent les sources majoritaires de production d'IL-17A (Cording et al., 2016). Parmi les sources d'IL-17A, nous pouvons aussi noter les lymphocytes  $\gamma\delta$ , les LyT de l'immunité innée (NKT) et les Ly Th17 naturels (lymphocytes  $\alpha\beta^+$  ayant acquis la capacité de sécréter de l'IL-17 pendant leur développement thymique (Amatya et al., 2017)).

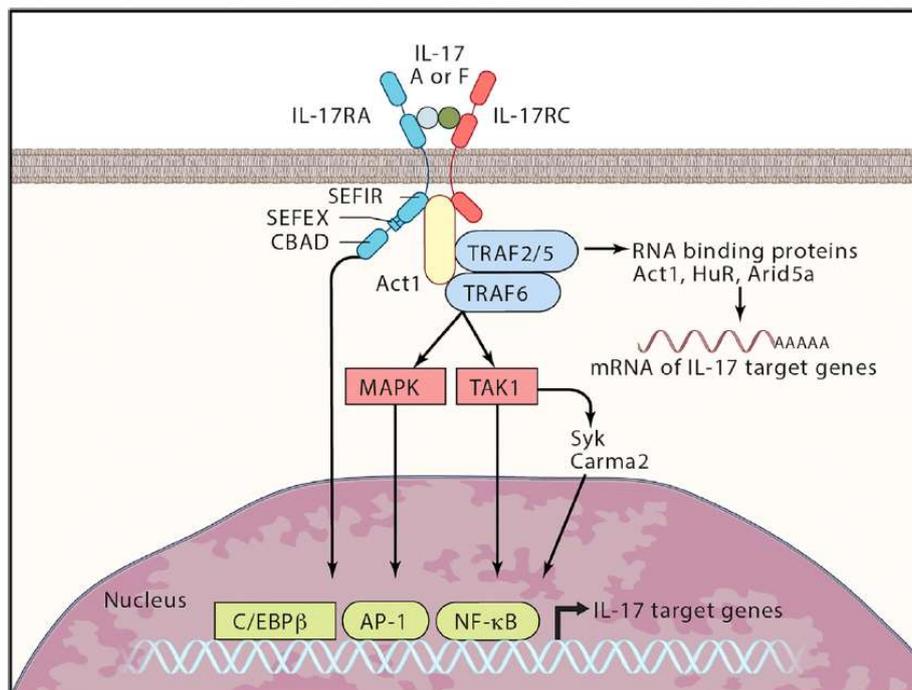
Nous avons déjà décrit précédemment (cf. p54) les signaux modulant l'expression d'IL-22, c'est pourquoi nous ne les détaillerons ici pas lorsqu'ils sont identiques. Les cytokines IL-23, IL-1, IL-6, TGF $\beta$  impliquées dans la polarisation vers la voie des Ly Th17 représentent des signaux inducteurs de la sécrétion d'IL-17A. Au contraire l'IL-27, une cytokine appartenant à la famille de l'IL-12, en inhibant la différenciation des Th17 au profit de Ly Treg, constitue un signal inhibiteur de la production d'IL-17A (Awasthi et al., 2007).

### iii. L'IL-17A : récepteur et voies de signalisation

Les actions de l'IL-17A sont induites par sa fixation sur son récepteur IL-17R composé de deux sous-unités transmembranaires l'IL-17RA exprimée de façon ubiquitaire et l'IL-17RC retrouvée essentiellement au niveau des cellules épithéliales et des fibroblastes (Toy et al., 2006a). L'IL-17A agit principalement sur des cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales intestinales, pulmonaires, salivaires, du SNC, rénales, les hépatocytes, les kératinocytes. L'IL-17 peut aussi exercer un signal sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes,

les cellules immunes ou encore les macrophages et les DCs (Amatya et al., 2017; Miossec and Kolls, 2012).

La partie extracellulaire de l'IL-17R est composée de 2 domaines fibronectines impliqués dans la reconnaissance et la fixation du ligand. Les récepteurs de la famille de l'IL-17 (IL-17R) sont caractérisés par un domaine intra-cytoplasmique conservé, nommé domaine SEFIR (**Figure 18**) (Amatya et al., 2017). Ce motif est aussi présent au niveau du récepteur de l'IL-1 ou encore des TLRs. La protéine adaptatrice cytosolique Act1, indispensable à la signalisation de l'IL-17, interagit avec la sous-unité IL-17RA *via* une connexion entre des domaines SEFIR. Puis dans un second temps, Act 1, *via* ses sites de fixation, s'associe à des protéines de la famille TRAF (comme TRAF6) permettant ainsi l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B ou encore des MAP kinases. D'autres domaines (SEFEX), correspondant à des extensions du domaines SEFIR, ont été décrits dans les parties intra-cytoplasmiques d'IL-17RA et IL-17RC et jouent un rôle dans la fonctionnalité du récepteur. Un dernier domaine (CBAD) présent sur l'IL-17RA, exerce un rôle de régulation négative sur la signalisation d'IL-17 en induisant le facteur de transcription C/EBP- $\beta$



**Figure 18 : Récepteurs et voies de signalisation de l'IL-17A.**  
D'après (McGeachy et al., 2019)

#### **iv. Expression de l'IL-17A au niveau des muqueuses intestinales**

##### *a. A l'homéostasie*

A l'homéostasie, l'IL-17A est très faiblement exprimée au niveau des muqueuses intestinales (colon/iléon).

##### *b. Au cours des MICI*

L'inflammation intestinale induite au cours des MICI, est responsable de signaux provoquant une induction de l'expression d'IL-17 au niveau du colon (Fujino et al., 2003; Hölttä et al., 2008; Nielsen et al., 2003). De plus, des études à grande échelle ont décrit des polymorphismes dans le gène *IL23R* associés de façon protectrice (Duerr et al., 2006) ou délétère (Kim et al., 2011) aux MICI. Les auteurs ont démontré ainsi que des modifications génétiques et épigénétiques concernant l'interaction entre l'IL23 et l'IL-17 pouvaient influencer les niveaux d'IL-17 et donc la physiopathologie des MICI.

#### **v. Actions de l'IL-17A sur l'épithélium intestinal**

La fonction principale de l'IL-17A est d'induire une réponse immunitaire inflammatoire afin de combattre les agents pathogènes ayant pénétré la barrière intestinale. Ainsi, cette cytokine induit la sécrétion par les CEI de chimiokines CXCL1, CXCL2 impliquées dans le chimiotactisme de PNNs, CCL20 permettant le recrutement des LyT Th17, des facteurs de croissance G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor) permettant la survie des PNNs et des macrophages (Miossec and Kolls, 2012; Onishi and Gaffen, 2010) (**Figure 19**, numéro 2). Elle stimule l'expression par les DCs et macrophages d'autres cytokines inflammatoires, comme l'IL-6, le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , pouvant agir en synergie entre elles (Grivennikov et al., 2009) ou avec l'IL-17A (Albanesi et al., 1999). En plus de la sécrétion de chimioattractants, l'IL17A induit l'expression de métalloprotéinases par les macrophages (comme MMP1,2,3,8,9,13) provoquant le remodelage de la matrice extracellulaire (Koenders et al., 2005).

L'IL-17A stimule l'expression par les CEI de PAMs (comme les bêta-défensines, LCN2 ou encore REG3G) des protéines de jonctions serrées comme par exemple les occludines/cludines (Kinugasa et al., 2000; Lee et al., 2015a) ou encore de mucines (Eyerich et al., 2017; McGeachy et al., 2019)(**Figure 19**, numéro 4).

L'IL-17 exerce un rôle dans la production d'IgA dans les PP (Veldhoen, 2017). En effet, en privilégiant l'interaction Act1-IL-17RA plutôt que celle inhibitrice entre Act1 et le récepteur

BAFF (LyB), l'IL-17A promeut la formation de nombreux centres germinatifs et la sécrétion d'Ac de forte affinité (**Figure 19**, numéro 3).

Les propriétés pro-inflammatoires et antibactériennes ont conféré à l'IL-17A un rôle bénéfique dans les réponses contre de nombreux pathogènes comme les champignons notamment *Candida albicans* (Huang et al., 2004), les virus comme *Herpès Simplex Virus* (Yue et al., 2008) ou encore les bactéries telles que *Klebsiella pneumonia* (Happel et al., 2003), *Citrobacter rodentium* ou encore *Staphylococcus aureus* (Ishigame et al., 2009). L'IL-17A protège aussi des infections par des pathogènes intracellulaires comme par exemple *Listeria monocytogenes* ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Veldhoen, 2017). Chez l'homme, des défauts de production d'IL-17 sont associés au développement d'une candidose cutanéomuqueuse chronique correspondant à une infection candidosique persistante ou récidivante. Ces manifestations cliniques sont expliquées par des mutations dans les gènes de signalisation de l'IL-17A (*IL17RA*, *ACT1*) (Puel et al., 2011), dans le gène *STAT3* résultant en un défaut de la voie Th17 (Ma et al., 2008) ou encore un défaut du gène *AIRE* provoquant une expansion de clones auto-réactifs sécrétant des auto-Ac anti-IL-17A (Puel et al., 2010).

Avec ses propriétés de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale, son action bénéfique a été mise en lumière dans de nombreux modèles expérimentaux de colite.

- Au cours d'un modèle de colite innée induit par le DSS, plusieurs études ont démontré que l'absence (Lee et al., 2015a; Song et al., 2015; Tang et al., 2018; Yang et al., 2008) ou la neutralisation de l'IL-17A (Ogawa et al., 2004a) aggravait la maladie chez les souris. En effet, la perte de la signalisation IL-17A a provoqué une perte de poids, des atteintes histologiques et un rétrécissement du colon plus important. En outre, il est observé chez les souris *Il17<sup>-/-</sup>*, une augmentation significative de la perméabilité intestinale à J3 et J7 d'une administration de DSS (Lee et al., 2015a). En effet, l'IL-17A exerce un rôle primordial sur la localisation des protéines de jonctions serrées au cours de dommages intestinaux permettant ainsi le renforcement de la perméabilité intestinale. Dans son étude, l'équipe de Song et al, a démontré qu'une absence d'IL-17 s'associait à une diminution du score de prolifération J10 d'une colite expérimentale (Song et al., 2015). Il démontre en stimulant pendant 6h des CEI de souris que l'IL-17 agit en synergie avec un facteur de croissance FGF2 pour induire des gènes impliqués dans la réparation et le remodelage tissulaire (*Mmp9*, *Csf2*, *S100A8*). Ainsi, au cours

d'une inflammation intestinale, l'IL-17 joue un rôle protecteur en induisant à la fois la réparation de l'épithélium lésé et un renforcement de la perméabilité.

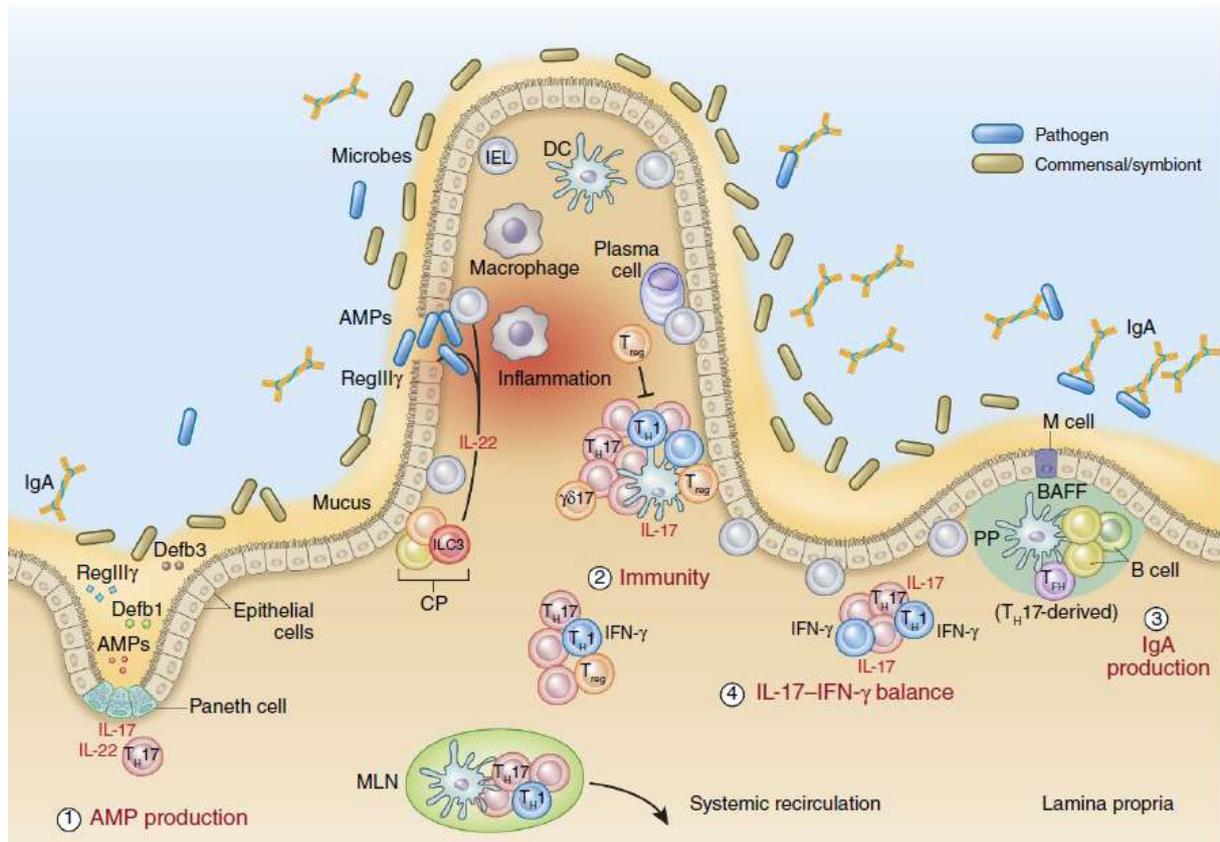
- Lors du modèle de colite induit par le pathogène *Helicobacter bilis* chez des souris *Abcba1a<sup>-/-</sup>*, il a été démontré que le blocage de l'IL-17A était associé à une aggravation de la clinique, expliquée par une augmentation de la perméabilité intestinale (Maxwell et al., 2015). En effet, l'utilisation d'un Ac bloquant le récepteur de l'IL-17 provoque une augmentation de la perméabilité, de l'expression de la claudine 4 (*Cldn4*, un marqueur de lésion de l'épithélium) et une diminution des expressions des gènes *Lrg5* : un gène exprimé par les CSI attestant du renouvellement intestinal ainsi que de *Pigr* : un gène impliqué dans le transport trans-épithélial des IgA.
- Au cours d'un modèle de colite adaptatif, une étude a mis en évidence que le transfert de Ly T naïfs triés de souris déficientes en IL-17A ou son récepteur, a provoqué une aggravation de la maladie (O'Connor et al., 2009; Song et al., 2015). En 2018, une autre équipe a réalisé les mêmes observations et a identifié un défaut d'induction des Ly Treg chez les souris ayant reçu les LyT naïfs *Il17<sup>-/-</sup>* (Tang et al., 2018).

Cependant les effets protecteurs attribués à la signalisation de l'IL-17A au cours d'inflammation intestinale ont été contredits par quelques études.

- Ainsi en 2006, une étude de Zhang a démontré que l'IL-17 joue un rôle pro-inflammatoire puisqu'au cours d'un modèle de colite au TNBS, les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-17 sont protégées en comparaison aux souris sauvages (Zhang et al., 2006). Un récent rapport a confirmé que les souris déficientes en IL17A ont des phénotypes cliniques et histologiques moins graves (Park et al., 2020).
- Au cours d'un modèle de colite au DSS, il est mis en évidence que les souris déficientes en IL-17A sont protégées grâce à une diminution de médiateurs pro-inflammatoires (Ito et al., 2008). D'autres études récentes ont démontré que l'absence de la signalisation IL-17 s'est associée à aucune différence significative sur la perte de poids ou le score inflammatoire (Maxwell et al., 2015; Park et al., 2020).
- Au cours du transfert de LyT naïfs déficients en IL-17A, les auteurs n'ont pas démontré de différence significative en comparaison avec les souris sauvages (Leppkes et al., 2009; Park et al., 2020). Ils démontrent cependant que le transfert de LyT naïfs triés de souris *RORγT* déficientes diminuent les scores endoscopiques et histologiques chez les souris receveuses, soulignant un rôle pathogénique de la voie Th17 dans ce modèle de

colite (Leppkes et al., 2009). D'autres groupes ont montré au cours du transfert de LyT *IL17*<sup>-/-</sup>, une augmentation de la fréquence des ILC3 (Park et al., 2020).

Une seule de ces études contredit formellement le rôle protecteur de l'IL-17A au cours de modèle de colite au DSS. Par ailleurs, les récentes études tendent à démontrer que l'absence de signalisation IL-17 au cours de modèle de colite au TNBS ou adaptatif s'associe à aucun effet.

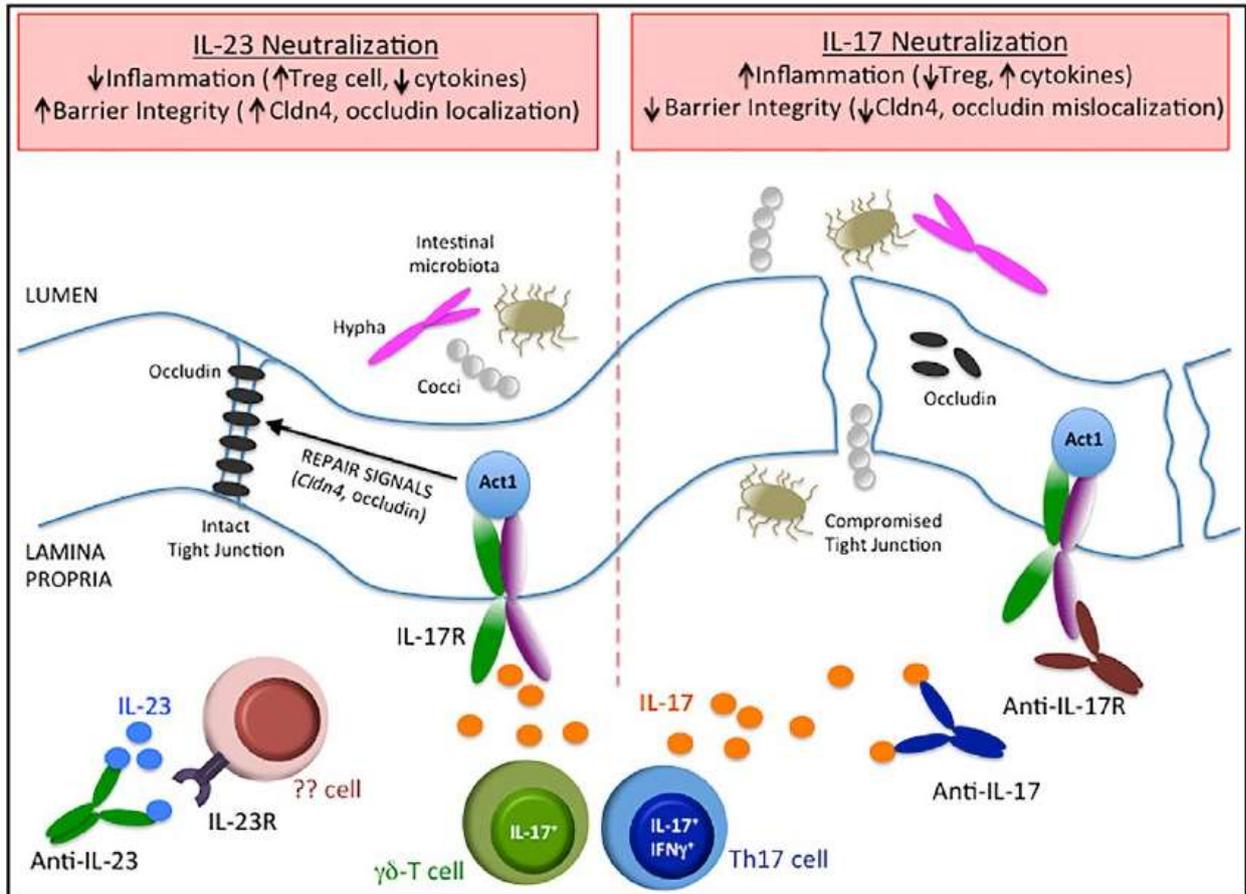


**Figure 19 : Rôle protecteur induit par l'IL-17A au niveau de la barrière intestinale.**

La rupture de l'intégrité de la barrière intestinale provoque l'invasion par des microorganismes pathogènes/commensaux initialement contenus dans la lumière intestinale. Ils sont reconnus par les DCs ou macrophages qui s'activent et sécrètent de l'IL-23, IL-1β, IL-6 induisant la production d'IL-17A par les Ly Th17 et les ILC3. L'IL-17A et l'IL-22 produites localement par les mêmes cellules induisent la sécrétion de PAMs comme la LCN2, REG3G ou encore les defensines (Defb) **(1)** mais aussi de chimiokines provoquant le recrutement de phagocytes aux actions bactéricides **(2)**. Au niveau des centres germinatifs des PP, l'IL-17A induit la génération d'IgA neutralisants les toxines et les microorganismes pathogènes **(3)**. Un équilibre se crée entre les réponses Th1 et Th17 permettant l'obtention d'une homéostasie intestinale **(4)**.

DCs= cellules dendritiques, Treg= lymphocytes T régulateurs, T<sub>FH</sub>= lymphocytes T folliculaire helper, PP= plaques de Peyer, IEL= lymphocytes intra-épithéliaux, MLN= ganglions mésentériques. D'après (Veldhoen, 2017).

Compte tenu de sa surexpression au cours des MICI (Fujino et al., 2003; Hölttä et al., 2008) et de l'efficacité des Ac monoclonaux anti-IL-17 dans d'autres pathologies inflammatoires (psoriasis, spondylarthrite ankylosante), la neutralisation de l'IL-17 a été proposée comme une stratégie bénéfique dans le traitement des poussées de MC. Cet essai clinique s'est avéré inefficace puisque des effets secondaires ainsi qu'une aggravation de l'inflammation ont été rapportés dans le groupe ayant reçu l'Ac par rapport au groupe contrôle (Hueber et al., 2012a). De même, l'utilisation du Brodalumab, un antagoniste de l'IL-17R au cours d'un essai clinique de phase II, n'a démontré aucune amélioration chez les patients atteints de MC *versus* l'utilisation d'un placebo (Targan et al., 2016). En outre au cours d'un essai clinique de phase III dans le traitement du psoriasis, l'utilisation du Secukinumab (un ac anti-IL-17A) a déclenché le développement d'une MC chez deux patients (Langley et al., 2014). Bien que surprenantes, ces observations sont en accord avec les données de littérature témoignant d'un effet protecteur de l'IL-17 en cas d'inflammation intestinale (cf p.76). De façon étonnante, les récentes alternatives thérapeutiques pour le traitement des MICI, ont démontré que le blocage de l'IL-23 et donc la neutralisation de la voie de l'IL-17, améliorait les symptômes chez les patients atteints de MC devenus résistants aux anti-TNF. L'utilisation des antagonistes anti-IL-12/23 (Ustekinumab bloquant la sous unité p40 commune à ces 2 cytokines)(Feagan et al., 2016) ou uniquement anti-IL-23 (Risankinumab (Feagan et al., 2017)/Brazikumab (Sands et al., 2017) bloquant la sous-unité p19 de l'IL-23) ont montré des effets bénéfiques dans le traitement de la MC. Différentes données de la littérature tentent d'expliquer le paradoxe entre l'efficacité des anti-IL-23 dans le traitement des MICI et l'aggravation de la symptomatologie avec les Ac bloquant l'IL-17 (**Figure 20**) (Whibley and Gaffen, 2015). Ainsi, l'efficacité des anti-IL-23 peut s'expliquer par le blocage de trois actions délétères induites par l'IL-23 à savoir (i) le renforcement de la production de cytokines pro-inflammatoires, (ii) l'induction des voies de signalisation Th17 et (iii) une diminution de la production et des fonctions des Ly Treg (Maxwell et al., 2015). Par ailleurs, il est important de noter que sous anti-IL-23, il persiste une production d'IL-17 par les lymphocytes  $\gamma\delta$  (Lee et al., 2015a) permettant d'exercer son rôle protecteur que nous avons détaillé précédemment. De plus, ce serait la production d'IL-17 par les LyT CD4<sup>+</sup> sécréteur aussi d'IFN $\gamma$  qui expliquerait l'exacerbation de la colite (Maxwell et al., 2015).



**Figure 20 : Dichotomie des effets entre les traitements par anti-IL23 et anti IL-17 au cours de modèles expérimentaux de colite chez la souris.**

L'utilisation d'Ac anti-IL-23 ne bloque pas l'expression d'IL-17 par les LyT  $\gamma\delta$  qui exerce alors des actions protectrices sur les CEI en renforçant la perméabilité intestinale. En outre, le blocage de l'IL-23 contribue à l'expansion de Ly Treg tandis que l'inhibition de la signalisation médiée par l'IL-17 s'accompagne d'effets néfastes sur la barrière intestinale (augmentation de la perméabilité et de l'inflammation). D'après (Whibley and Gaffen, 2015).

## IV. L'interleukine 22 binding protein (IL-22BP)

### a) Gène et protéine de l'IL-22BP

En 2001, au cours d'une analyse de banques publiques permettant d'identifier de nouveaux récepteurs cytokiniques appartenant à la famille de l'IL-10, l'équipe du Pr Dumoutier a découvert le gène codant pour l'IL-22BP : *IL22RA2*. Ce gène, comportant 6 exons, est présent sur le chromosome 6q24 à 40kB du gène codant pour le récepteur à l'interféron IFN $\gamma$  (*INFYR1*). Le gène *IL22RA2* code une protéine monomérique et sécrétée, comprenant 231 aa et d'un poids moléculaire de 27kD (Dumoutier et al., 2001; Xu et al., 2001). L'absence de domaine hydrophobe transmembranaire confère à l'IL-22BP uniquement une nature sécrétée. La séquence protéique de l'IL-22BP présente 34% d'homologie avec l'IL-22R (Dumoutier et al., 2001; Kotenko et al., 2001; Xu et al., 2001) (**Figure 21A**). Cependant, l'affinité de l'IL-22 pour l'IL-22BP est jusqu'à 1000 fois supérieure par rapport à son propre récepteur (IL-22R) (Jones et al., 2008a; Logsdon et al., 2002; Wolk et al., 2007). L'IL-22BP ne bloque pas les actions de l'IL-10 mais celles découlant de la signalisation d'IL-22R (Dumoutier et al., 2001). En effet, plusieurs études *in vitro* sur des lignées cellulaires ont montré qu'en présence d'IL-22BP, l'IL-22 n'était plus capable d'induire le facteur de transcription *STAT3* (voie de signalisation de l'IL-22) ou en encore le gène *SOCS3* (gène de réponse de l'IL-22) (Kotenko et al., 2001; Lim et al., 2016a).

Chez l'homme, 3 isoformes du gène de l'*IL22RA2* ont été décrits comme résultant d'épissage alternatif (**Figure 21B**). Le variant 1 (*IL22RA2v1*), correspondant à la version la plus longue du gène (séquence exonique entière : 6 exons), code pour l'isoforme 1 (IL-22BPi1), une protéine de 231 aa. Le variant 2 (*IL22RA2v2*, sans exon 3) code pour l'isoforme 2 (IL-22BPi2), une protéine de 210 aa. Enfin, le variant 3 (*IL22RA2v3*), correspondant à la version du gène la plus courte (séquence exonique dénuée d'exon 4 et 6), code pour l'isoforme 3 (IL-22BPi3) comprenant 109 aa (Witte et al., 2010). La présence d'une séquence supplémentaire de 32 aa pour l'isoforme 1 entraîne sa rétention dans le réticulum endoplasmique (RE) tandis que les isoformes 2 et 3 sont sécrétés (Gómez-Fernández et al., 2018a, 2019). L'équipe de Fernandez a étudié les voies de sécrétion des 3 isoformes (**Figure 21C**). Ainsi, après un adressage au RE, *via* leur peptide signal commun, l'isoforme 3 est directement sécrété tandis que les 2 autres isoformes interagissent avec des protéines chaperonnes (GRP94, GRP78 et cyclophiline B). La



L'IL-22BPi2 et IL-22BPi3 sont les deux isoformes capables de bloquer les actions de l'IL-22 (Gómez-Fernández et al., 2018a; Lim et al., 2016a). En effet, naturellement l'isoforme 1 est incapable d'interagir avec l'IL-22 puisque les résidus critiques d'interaction décrits entre IL-22BP et IL-22 sont situés au niveau des sites d'épissage alternatif sur le gène *IL-22RA2* (Jones et al., 2008a; de Moura et al., 2009). De plus, parmi les cytokines de la famille de l'IL-10 (IL-19, IL-20, IL-24), seule l'IL-22 est capable d'interagir avec l'IL-22BP (Dumoutier et al., 2001). L'IL-22BPi2 est décrit comme l'isoforme ayant le plus d'affinité pour l'IL-22. En effet, en comparaison avec son récepteur, le temps de demi-vie de dissociation du complexe IL-22/IL-22BPi2 est largement supérieur ( $t_{1/2} = 4,7$  jours pour IL-22BPi2 versus  $t_{1/2} = 7$  min pour IL-22R). L'affinité entre IL-22 et IL-22BPi3 est plus faible comme le démontrent les différentes valeurs de la constante de dissociation ( $K_d$ ) égale à 4 nM pour IL-22BPi3, à 1 nM pour IL-22R et 1 pM pour IL-22BPi2 (Jones et al., 2008a). Des expériences *in vitro* en présence d'IL-22, IL-17, IL-22BPi2 et IL-22BPi3 ont mis en évidence un pouvoir inhibiteur de l'IL-22BPi2 bien supérieur sur l'IL-22 en comparaison à l'IL-22BPi3 (Lim et al., 2016a).

L'étude de la structure de l'IL-22BP a permis l'identification d'aa clés (Tyr67 et Arg199) pour son interaction avec l'IL-22, ce qui a été confirmé par des études de mutagenèse ainsi que des expériences fonctionnelles (Jones et al., 2008b; de Moura et al., 2009). De plus, de nombreuses interactions électrostatiques et hydrogènes établies entre l'IL-22 et l'IL-22BP contribuent à stabiliser le complexe (de Moura et al., 2009). Parmi ces liaisons, nous pouvons noter la liaison hydrogène entre Asp-209<sup>IL-22BP</sup> et Asn-54<sup>IL-22</sup> sur l'IL-22 (Jones et al., 2008a). L'IL-22BP est exprimée au niveau des organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglions lymphatiques, appendice), digestifs (estomac, intestin grêle, colon), de la peau, des poumons, du placenta et des glandes mammaires (Dumoutier et al., 2001) (**Figure 21D**). Une étude plus récente s'est intéressée à la distribution tissulaire des différents isoformes (Lim et al., 2016a) : l'isoforme 1 est exprimé presque exclusivement dans le placenta. L'isoforme 2 est fortement exprimé dans le placenta et à des niveaux plus faibles au niveau de la rate, de l'estomac, du thymus, de l'intestin et des poumons. Enfin, l'isoforme 3, ayant une action inhibitrice bien plus faible sur les actions de l'IL-22, est exprimé à de forts niveaux au niveau des poumons, du foie foetal, de la prostate, du placenta, des glandes salivaires et thyroïde ainsi que de l'intestin.

## b) Sources cellulaires et régulation de l'IL-22BP

Les premières études sur les sources de production d'IL-22BP ont identifié les DCs comme la source principale (Nagalakshmi et al., 2004).

### i. Sources d'IL-22BP chez le rongeur

En 2012, l'équipe de Huber décrit une source cellulaire d'IL-22BP principalement d'origine hématopoïétique au niveau du colon de souris à l'homéostasie. Une caractérisation plus poussée de ces cellules lui a permis d'affirmer qu'elles ne sont pas TCR  $\alpha\beta^-$  mais plutôt CMHII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>, correspondant à des DCs (Huber et al., 2012a). Par la suite, notre équipe a pu montrer que, chez le rat et la souris, l'IL-22BP est produite de façon constitutive par des DCs conventionnelles dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et les tissus non lymphoïdes (Martin et al., 2014a). Chez le rat, les DCs CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> des OLS (équivalentes aux DC2) expriment fortement *Il22ra2* tandis que les DCs CD4<sup>int</sup> présentent des niveaux d'expression plus faibles. En générant des rats rapporteurs IL-22BP<sup>GFP</sup> (expression de la GFP lorsque que le gène *Il22ra2* est transcrit), notre équipe a confirmé ces sources. Chez la souris, cette expression est assurée par les DC2s (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) dans les ganglions mésentériques et l'intestin, tandis que les DCs CD103<sup>+</sup> CD8 $\alpha^+$  (DC1) et les macrophages triés de la *lamina propria* expriment à un niveau plus faible *Il22ra2* (Martin et al., 2014a). En 2017, une équipe japonaise a confirmé la forte l'expression d'IL-22BP par les DCs CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha^-$  (DC2) au niveau des PP de l'iléon et dans une moindre mesure au niveau des ganglions mésentériques (Jinnohara et al., 2017).

Ainsi, l'ensemble de ces données chez le rongeur semble suggérer qu'à l'homéostasie l'expression d'IL-22BP est limitée aux DCs et à des phagocytes mononucléés de la LP et des OLS. Cependant, les travaux de l'équipe de Huber ont montré, après tri de différentes cellules immunes de la LP et de ganglions de souris, une expression d'*Il22ra2* par les DCs mais aussi une faible expression par des cellules CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> CD62<sup>high</sup> correspondant aux lymphocytes T mémoires (Pelczar et al., 2016a). Ce même groupe confirme en 2017 une expression d'IL-22BP par les LyT ayant infiltré le foie au cours d'inflammation hépatique aiguë (Kleinschmidt et al., 2017). Enfin, il a été proposé et non reproduit à ce jour que les kératinocytes murins constituent une source d'IL-22BP (Fukaya et al., 2018).

## ii. Sources d'IL-22BP chez l'homme

Chez l'homme, bien que l'expression d'IL-22BP par les DCs soit conservée, notre équipe a montré que les polynucléaires éosinophiles (PNE) présents dans la *lamina propria* représentent une source majeure d'IL-22BP dans l'intestin (Martin et al., 2016a). Ces sources de production ont ensuite été confirmées par le groupe de Huber (Kempski et al., 2020; Pelczar et al., 2016a). Comme chez la souris, ce même groupe a également proposé qu'au niveau de la LP humaine les LyT CD4<sup>+</sup> expriment l'*IL22RA2*, bien que ces résultats méritent d'être confirmés (Kempski et al., 2020; Pelczar et al., 2016a) (**Figure 22A**)

L'expression d'IL-22BP par les DCs a été vérifiée chez l'homme en générant des DCs dérivées de monocytes (MoDC) après six jours de culture en présence du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating factor) et d'IL-4 alors que les monocytes frais n'expriment pas l'*IL22RA2*. Seuls les isoformes 1 et 2 de l'IL-22BP sont exprimés par les MoDC (Martin et al., 2014a). Ces données ont été confirmées ensuite par l'équipe de Lim et al. (Lim et al., 2016a). Quelques années plus tard, l'équipe de Fernandez atteste que les 3 isoformes d'IL-22BP sont exprimés par les MoDC (Gómez-Fernández et al., 2018a), bien que les niveaux soient plus faibles pour les isoformes 1 et 3.

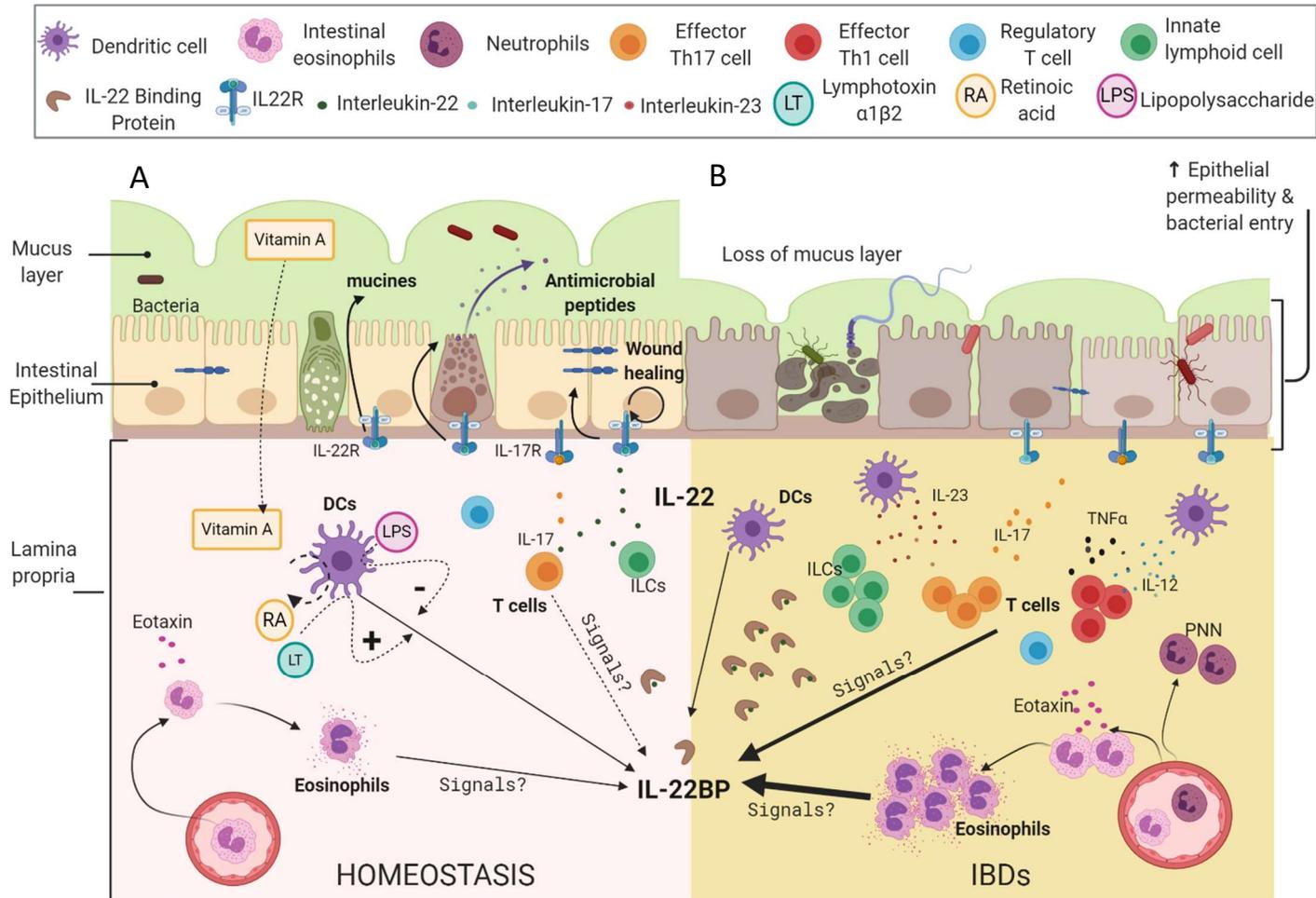
## iii. Régulation de l'expression d'IL-22BP

De nombreux travaux se sont intéressés à caractériser les signaux régulant l'expression d'IL-22BP par les DCs (à partir des MoDC), tandis que les signaux de régulation de la production par les PNE sont encore méconnus.

L'acide rétinoïque (RA) (Gómez-Fernández et al., 2018a, 2019; Lim et al., 2016a; Lindahl et al., 2019a; Martin et al., 2014a), l'interleukine 6 (Voglis et al., 2018a) et la lymphotoxine (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) (Guendel et al., 2020a; Kempski et al., 2020) constituent des signaux inducteurs de l'expression d'IL-22BP (**Figure 22A**). Le RA provient de la dégradation de la vitamine A par plusieurs enzymes notamment la rétinal deshydrogénase 2 (RALDH2) exprimée par les DCs (CD103<sup>+</sup>) intestinales productrices d'IL-22BP (Iwata and Yokota, 2011). Plus récemment, il a été mis en évidence que la LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 induit l'expression d'IL-22BP par les MoDC *via* l'activation de la voie non canonique du NF- $\kappa$ B (Kempski et al., 2020). De plus, ces travaux démontrent que la signalisation de la LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 est primordiale pour induire chez la souris l'expression d'IL-22BP au niveau du colon, des ganglions mésentériques et de la rate.

Les DCs immatures produisent de l'IL-22BP alors que leur maturation s'associe à une chute brutale de son expression (**Figure 22A**). Le lipopolysaccharide (LPS) ou divers ligands des TLRs (Gómez-Fernández et al., 2018a; Lim et al., 2016a; Lindahl et al., 2019a; Martin et al., 2014a) et la prostaglandine E2 (PGE2) (Martin et al., 2014a; Voglis et al., 2018a) en promouvant la maturation des DCs induisent une diminution de l'expression d'IL-22BP. D'autres signaux ont aussi été évoqués comme jouant un rôle inhibiteur sur l'expression d'IL-22BP par les DCs, comme par exemple : la cascade de l'inflammasome et l'IL-18 démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Huber et al., 2012a). Ces résultats n'ont pas été confirmés *in vitro* par l'équipe de Voglis (Voglis et al., 2018a). Parmi ces signaux, il a aussi été proposé que l'expression d'*IL22RA2* par les LyT CD4<sup>+</sup> de patients atteints de MICI et répondeurs aux anti-TNF était significativement diminuée en comparaison aux non-répondeurs (Pelczar et al., 2016b). Pourtant, le TNF $\alpha$  ne module pas l'expression d'IL-22BP (Pelczar et al., 2016a). Enfin, des polymorphismes identifiés dans le gène *IL22RA2* sont associés à une modulation des niveaux d'expression d'IL-22BP. Ainsi, le polymorphisme associé à la sclérose en plaque (SNP : rs17066096<sup>G</sup>) est associé à une plus forte expression d'IL-22BP par les MoDC différenciées en présence de RA (Lindahl et al., 2019a). Le SNP plus rare (rs28385692), associé également à la SEP, induit une diminution de la sécrétion d'IL-22BP (Gómez-Fernández et al., 2020). En effet, ce SNP touche la région de l'exon 2 du gène et affecte ainsi les trois isoformes de l'IL-22BP. Il encode la modification d'une leucine (résidu hydrophobe) en proline (résidu neutre) en position 16 (zone du peptide signal de l'IL-22BP). L'étude *in vitro* dans des lignées cellulaires de ce variant démontre une diminution de 50% de la sécrétion de chaque isoforme de l'IL-22BP (Gómez-Fernández et al., 2020). Enfin, le groupe de Sertorio et al. a identifié deux polymorphismes associés à une augmentation de l'expression d'*IL22RA2* et des formes fibrotiques sévères dans une cohorte de patients chinois infectés avec le parasite *S.japonicum* (Sertorio et al., 2015).

La **Figure 22A** résume les données actuellement connues sur les sources de production et de régulation de l'IL-22BP dans la LP intestinale saine humaine.



**Figure 22 : Sources et régulation de l'IL-22BP à l'homéostasie et au cours des MICI. A)** A l'homéostasie, la production d'IL-22BP par les DCs, éosinophiles et les lymphocytes T régule les actions de l'IL-22, importante pour renforcer les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale en cas d'agression bactérienne. L'affaiblissement des propriétés de barrière observée au cours des MICI en lien avec des facteurs environnementaux et génétiques induit un passage accru de microorganismes initialement contenus dans la lumière intestinale jusque dans la LP. En réponse aux translocations bactériennes, le système immunitaire muqueux s'active et sécrète de fortes quantités d'IL-22 et IL-17 par les Th17 et les ILC3. Dans les muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI, l'IL-22BP, augmentée du fait d'une infiltration importante d'éosinophiles ou d'une production accrue par les lymphocytes T, pourrait neutraliser l'IL-22 sécrétée et ses actions bénéfiques.

### c) L'IL-22BP, un puissant régulateur des actions biologiques de l'IL-22

Nous avons vu précédemment que les actions de l'IL-22 [cf p 61] pouvaient être à la fois protectrices mais aussi délétères en fonction du tissu épithélial cible sur lequel elle agit. L'expression de l'IL-22BP et son rôle dans le contrôle des actions de l'IL-22 ont été étudiés *in vivo* dans plusieurs contextes inflammatoires : 1) ceux où le rôle de l'IL-22 est protecteur comme au cours des MICI ou encore de la sclérose en plaque (SEP) et 2) ceux où cette cytokine exerce des actions délétères comme dans les processus tumoraux ou encore le psoriasis.

#### i. L'IL-22BP régule les actions protectrices de l'IL-22

##### ➤ Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

L'IL-22 est une cytokine largement décrite dans la littérature comme possédant un rôle protecteur sur la muqueuse intestinale en renforçant les propriétés de barrière mais aussi les processus de cicatrisation. Ainsi, en cas d'inflammation intestinale, les profils d'expression d'IL-22 et d'IL-22BP sont inversement régulés. Chez le rongeur, au cours d'un modèle de colite aiguë par administration de DSS, l'expression d'IL-22BP est minimale à J8 en parallèle d'une augmentation de l'expression d'IL-22 (Martin et al., 2016a; Sugimoto et al., 2008b). De même, au cours d'un modèle de colite adaptatif, l'expression d'IL-22 augmente à partir de J15 (Zenewicz et al., 2008).

Plusieurs études ont démontré le rôle inhibiteur de l'IL-22BP sur les effets protecteurs de l'IL-22 au niveau de l'épithélium intestinal au cours de modèles expérimentaux de colites. Ainsi, Sugimoto a démontré que l'injection, au niveau du colon des souris, d'un vecteur non viral contenant *Il22ra2* au cours d'un modèle de colite par DSS bloquait les actions bénéfiques induites par l'IL-22. En effet, les souris ayant reçu le vecteur viral ont une inhibition du facteur de transcription STAT3, une diminution de la production de mucus visualisée par un marquage moins prononcé au bleu alcyan des cellules de goblet et une augmentation significative du score d'activité de la colite (Sugimoto et al., 2008b). Dans notre équipe, un modèle de colite aiguë a été réalisé chez des rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (*Il22ra2*<sup>-/-</sup>) générés dans le laboratoire. L'ensemble des résultats obtenus soulignent que l'absence de l'inhibiteur s'associe à une meilleure tolérance de la colite (Martin et al., 2016a). En effet les rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (*Il22ra2*<sup>-/-</sup>) semblent être protégés au cours de la colite puisqu'aucune perte de poids n'a été enregistrée et le score histologique quantifiant l'atteinte

de la muqueuse à J10 de la colite est significativement diminué en comparaison aux rats sauvages (*Il22ra2<sup>+/+</sup>*). De plus, en l'absence de l'IL-22BP, les actions protectrices de l'IL-22 sont potentialisées : induction de l'expression des gènes codant les PAMs (lipocaline2 et bêta-défensine2), augmentation de la production de mucus. Une autre équipe a réalisé ce même modèle de colite aiguë au DSS chez des souris déficientes pour le gène de l'IL-22BP (Huber et al., 2012a). Ils n'ont observé aucune différence significative sur le phénotype clinique (perte de poids), endoscopique ou histologique entre les souris déficientes pour le gène de l'IL-22BP et les souris sauvages. Ils proposent que cette absence de différence chez les souris KO pourrait être expliquée par une diminution puis une absence d'expression de l'IL-22BP (à J10) qui ne jouerait donc aucun rôle dans le contrôle des actions de l'IL-22 à la fois chez les souris sauvages et mutées. Pourtant, leurs résultats soulignent une augmentation significative de la prolifération des CEI chez les souris déficientes en IL-22BP en comparaison aux animaux contrôle. Ils ont confirmé cette observation dans leur récent rapport montrant que l'administration d'un anticorps bloquant le récepteur de la lymphotoxine (moins d'IL-22BP) au cours d'un modèle de colite au DSS n'a eu aucun effet en comparaison aux souris n'ayant pas reçu l'anticorps bloquant (Kempski et al., 2020). Au cours d'un modèle de colite par transfert de lymphocytes T naïfs chez des souris receveuses immunodéficientes (*Rag1<sup>-/-</sup>*), le groupe de S. Huber démontre à nouveau un effet protecteur d'une absence de l'IL-22BP. En effet pour cette équipe ayant identifié les LyT CD4<sup>+</sup> comme une source de production d'IL-22BP, le transfert de LyT naïfs issus de souris déficientes en IL-22BP s'accompagne d'une protection au cours de la colite (Pelczar et al., 2016a). Ainsi ils observent une perte de poids moins importante et des scores histologiques et endoscopiques plus faibles chez les souris ayant reçu des LyT issus de souris KO pour l'IL-22BP en comparaison aux souris sauvages.

Les travaux de notre équipe ont montré que, contrairement aux modèles animaux de colite où l'IL-22BP et IL-22 sont inversement exprimés, les MICI s'associent à une surexpression de l'IL-22BP dans la LP en dépit de l'augmentation de l'IL-22 (Martin et al., 2016a) (**Figure 22B**). L'infiltration importante de la LP par les PNE pourrait expliquer l'augmentation de production d'IL-22BP et ainsi potentiellement bloquer les actions protectrices de l'IL-22. De même, le groupe de Huber a confirmé cette surexpression d'IL-22BP au cours des MICI et avance l'hypothèse d'un rôle pathogénique joué par les LyT ayant infiltré la LP des patients MICI (Pelczar et al., 2016a) (**Figure 22B**). En effet, ils semblent mettre en avant une corrélation entre de forts niveaux d'expression d'IL-22BP par les LyT CD4<sup>+</sup> et une mauvaise réponse aux

traitements par anti-TNF chez les patients MICI. Les niveaux d'expressions d'IL-22 et d'IL-22BP au cours des MICI ainsi que le rôle de l'IL-22BP sur les actions de l'IL-22 sont représentés sur la **Figure 22B**. La **Figure 24** résume l'impact d'un excès de production d'IL-22BP au cours des MICI sur les actions protectrices induites par l'IL-22 sur les CEI.

➤ Sclérose en plaque

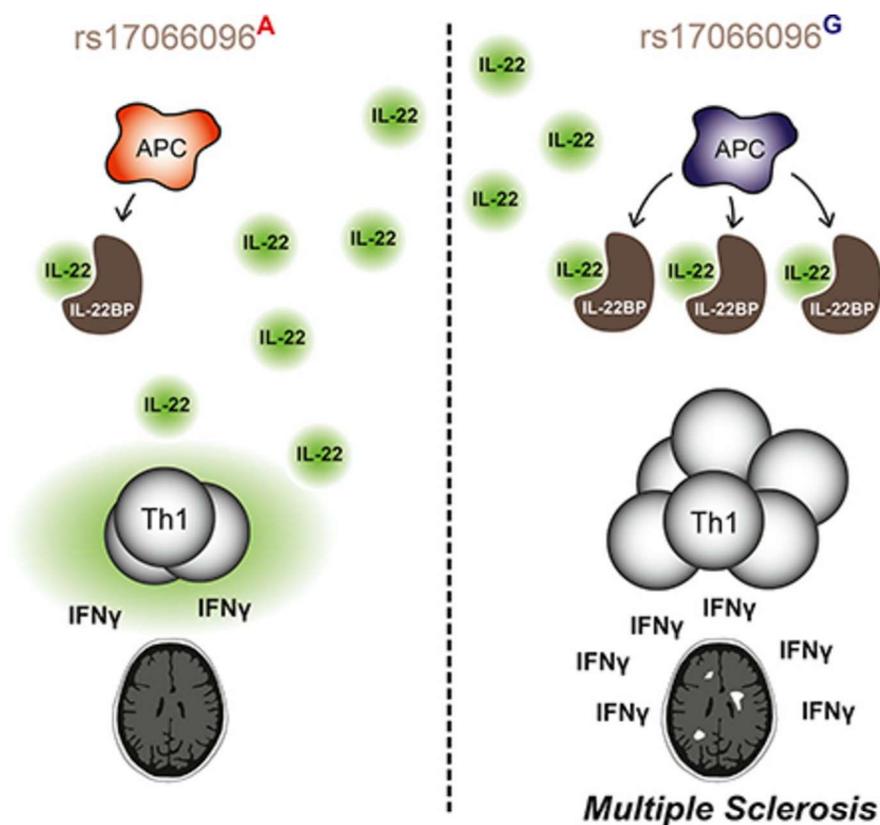
La littérature suggère que l'axe IL-22/IL-22R/IL-22BP joue un rôle important dans les mécanismes de neuro-inflammation. Initialement, le rôle joué par l'IL-22 au cours des mécanismes auto-immuns du système nerveux central (SNC) semble être pro-inflammatoire (Langrish et al., 2005), bien que la réalisation du modèle d'encéphalite auto-immune (EAE) chez une souris déficiente pour le gène *Il22* n'a pas identifié de différence clinique avec les souris sauvages (Kreymborg et al., 2007). Plus récemment, un rapport confère à l'IL-22 un rôle protecteur au niveau du SNC (Lindahl et al., 2019a). Son récepteur serait exprimé uniquement au niveau de la barrière hémato-encéphalique des patients SEP (Kebir et al., 2007).

Au cours d'un modèle d'EAE *par* administration de la protéine MOG (Myelin Oligodendrocyte Protein-modèle EAE), une équipe suédoise a identifié chez le rat une région localisée sur le chromosome 1 leur conférant un phénotype résistant à la maladie. Le même modèle d'EAE réalisé sur des rongeurs génétiquement modifiés pour bénéficier des allèles protecteurs de la maladie a provoqué un phénotype clinique atténué ainsi qu'une sécrétion diminuée de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages. De plus, chez ces rongeurs, une diminution de l'expression du gène *Il22ra2*, gène identifié dans cette région chromosomique, par les macrophages et les splénocytes des animaux immunisés est observée. Par analogie, chez l'homme, l'étude de différents polymorphismes du gène codant l'IL-22BP dans une cohorte de patients suédois (n=5019) a identifié le SNP (rs276474) comme associé à un risque de développement de la SEP (Odd Ratio = 1,26) (Beyeen et al., 2010). Par la suite, plusieurs études ont permis d'identifier l'allèle G du SNP rs17066096 sur le gène *IL22RA2* comme le gène de susceptibilité fortement associé à la SEP, avec une p value combinée égale à  $9,26 \times 10^{-36}$  (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al., 2013). En 2019, une étude met en évidence *in vitro* que des MoDC différenciées en présence de RA, à partir de monocytes de donneurs homozygotes GG pour le SNP rs17066096, ont une expression d'IL-22BP significativement plus élevée (Lindahl et al.,

2019a). Dans une cohorte espagnole, Fernandez et al identifient le SNP rs28385692 dans *IL22RA2* comme étant un facteur de risque pour la SEP, statistiquement indépendant du SNP majeur rs17066096 (Gómez-Fernández et al., 2020).

C'est pourquoi le rôle de l'IL-22BP sur le contrôle des actions de l'IL-22 au cours de la SEP a été étudié. Chez la souris, dans un modèle d'EAE, l'absence d'IL-22BP s'associe à un meilleur phénotype clinique (Laaksonen et al., 2014a). En effet, les souris déficientes en IL22BP récupèrent plus rapidement après le pic de la maladie et conservent une fonction motrice au stade chronique par rapport aux souris sauvages. De plus, les souris mutées présentent des scores inflammatoires et de démyélinisation moindres ainsi qu'une diminution de l'infiltrat par des monocytes inflammatoires au niveau du SNC.

Dans une cohorte de patients atteints de SEP, l'équipe de Perriard a mis en évidence un taux sérique d'IL-22 chez les patients à un stade actif de la maladie plus élevé par rapport à une cohorte de patients contrôle (Perriard et al., 2015). Ils démontrent un effet protecteur de l'IL-22 notamment sur les astrocytes en diminuant les phénomènes d'apoptose (**Figure 23**). Ils ne retrouvent pas de différence sur les taux sériques d'IL-22BP entre les patients malades et sains. Cependant, ils soulignent une expression d'IL-22BP supérieure dans les MoDC issues de patients atteints de SEP. En 2019, le rôle délétère de l'IL-22BP au cours de la SEP est renforcé puisque des taux d'IL-22BP sont significativement plus hauts dans le LCR des patients présentant de fortes lésions neuro-inflammatoires (Lindahl et al., 2019a) par rapport à ceux n'en présentant aucune. Ils confirment que l'absence d'IL-22BP chez le rongeur (modèle chez le rat et la souris) atténue significativement le tableau clinique d'EAE (Lindahl et al., 2019a). Cet effet protecteur de l'absence d'IL-22BP est observé à l'état hétérozygote et est strictement dépendant de l'IL-22. Ainsi, ils proposent que le phénotype homozygote pour le SNP rs17066096 provoque une plus forte expression d'IL-22BP limitant alors les effets protecteurs de l'IL-22 au niveau du SNC, notamment sur les lymphocytes T pour diminuer la réponse Th1 (**Figure 23**).



**Figure 23 : Au cours de la SEP, l'augmentation de l'expression d'IL-22BP impacte les actions protectrices induites par l'IL-22.**

Au niveau du SNC, l'IL-22BP bloque les actions protectrices induites par l'IL-22 en prévenant la mort neuronale et en inhibant les réponses Th1 (IFN $\gamma$ ). Au cours de la SEP, un SNP identifié dans le gène *IL22RA2* est associé à une augmentation de l'expression d'IL-22BP qui neutralise alors l'IL-22 disponible et conduit à des lésions neuronales. D'après (Lindahl et al., 2019a).

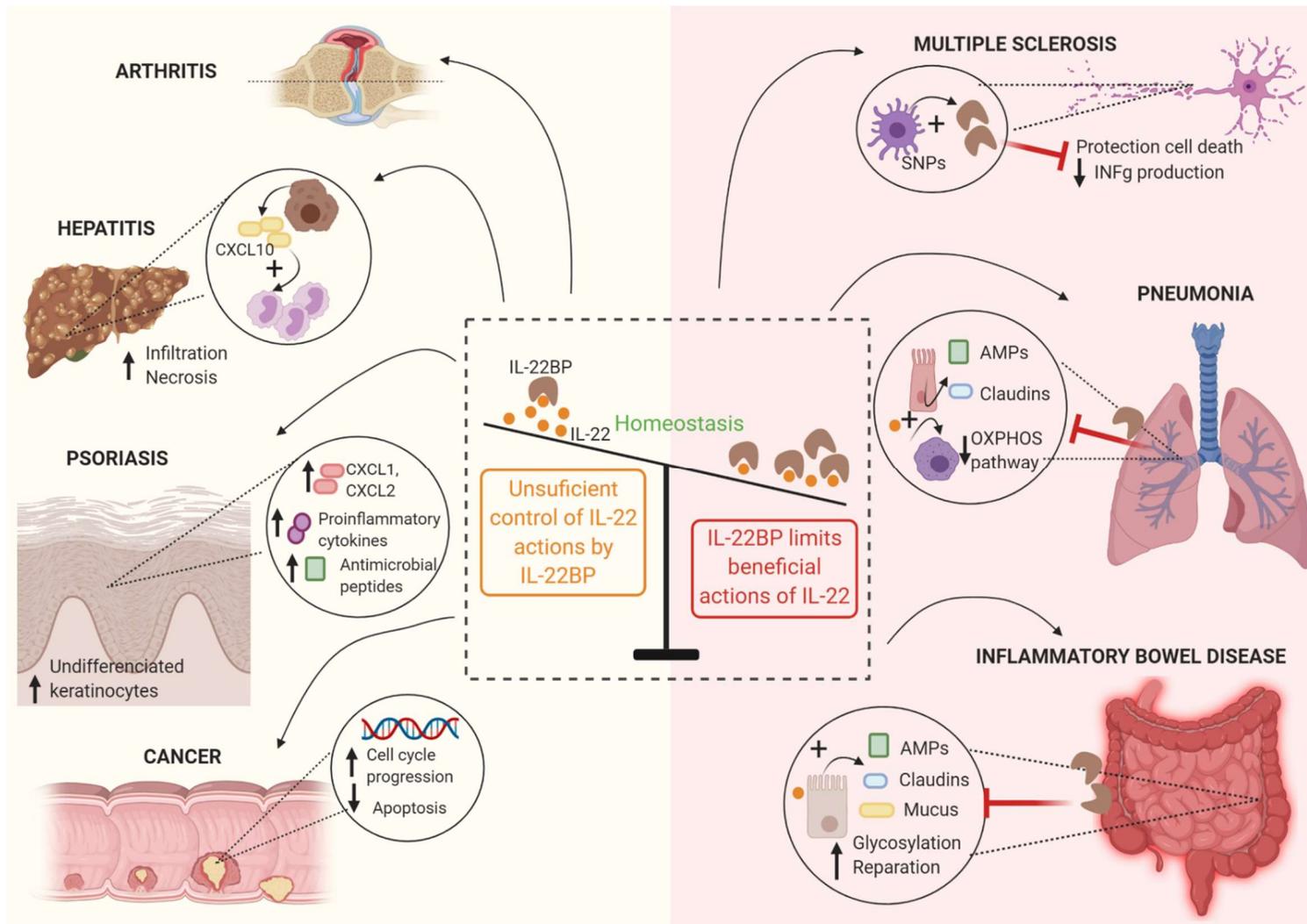
➤ Infections pulmonaires

L'IL-22 est une cytokine agissant sur les épithéliums comme ceux recouvrant les cavités pulmonaires et exerce des actions de cicatrisation et de renforcement des propriétés de barrière de ces muqueuses (Aujla et al., 2008). De plus l'IL-22 et l'IL-22BP sont produites dans le liquide broncho-alvéolaire des patients souffrant de détresse respiratoire aiguë (Whittington et al., 2004). Chez ces patients, des niveaux plus bas d'IL-22 sont observés en regard des patients sains. Chez la souris, au cours d'un modèle de pneumonie chronique, l'expression d'IL-22 est induite à J6 tandis que l'expression d'IL-22BP est la plus basse à J10 (Abood et al., 2019). Au cours d'un modèle aigu par instillation trachéale de *Pseudomonas aeruginosa*, il est observé au bout de 6 heures une augmentation transitoire de l'expression d'IL-22 associée à une augmentation de la protéine maximale après 24 heures (Broquet et al.,

2017). Ainsi, le rôle protecteur joué par l'IL-22 sur les cellules épithéliales pulmonaires et son contrôle par l'IL-22BP ont été étudiés dans plusieurs modèles d'infections respiratoires.

Au cours d'un modèle de pneumonie aiguë, le blocage de l'IL-22BP par un anticorps monoclonal a amélioré la tolérance clinique (Broquet et al., 2017). En effet, il est observé chez les souris ayant reçu l'anticorps une augmentation de la survie ainsi qu'une diminution de l'infiltrat de PNN au niveau pulmonaire. Un autre groupe a confirmé ces résultats puisque dans leur modèle de sepsis *via* la ligature du caecum, l'administration d'IL-22BP recombinante provoque une augmentation significative des PNN (Weber et al., 2007).

De même, au cours de modèles chroniques de pneumonies réalisés par une surinfection bactérienne (*S. pneumoniae* ou *S. aureus*) au cours d'une infection virale à *Influenzae*, l'absence d'IL-22BP chez les souris est associée à une meilleure tolérance clinique (Abood et al., 2019; Hebert et al., 2020; Trevejo-Nunez et al., 2019). En effet les souris présentent de meilleures courbes de survie, perdent moins de poids et récupèrent plus rapidement par rapport aux souris sauvages. L'absence d'IL-22BP chez ces souris permet l'établissement d'un environnement pro-IL-22 (attesté par une augmentation de la concentration sérique d'IL-22) : diminution de l'inflammation pulmonaire, induction des protéines des jonctions serrées comme *Tjp1*, *Tjp2*, *Cldn4* et *Ocln* (Abood et al., 2019 ; Hebert et al., 2020) mais aussi expression de PAMs comme la lipocaline (*Lcn2*) (Abood et al., 2019). En l'absence d'IL-22BP, la charge bactérienne est diminuée et les souris présentent des scores histologiques d'atteintes respiratoires plus faibles (Abood et al., 2019). Une étude transcriptomique sur les tissus pulmonaires a mis en évidence une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative chez les souris *Il22ra2<sup>-/-</sup>*. La diminution d'expression de ces gènes, strictement dépendants de l'IL-22, observée dans les macrophages de souris KO, leur permet d'acquérir un état pro-inflammatoire et d'activation nécessaire pour résister aux infections pulmonaires (Trevejo-Nunez et al., 2019). La **Figure 24** résume le blocage des actions protectrices de l'IL-22 au cours d'infections pulmonaires.



**Figure 24 : Etude de la modulation de l'axe IL-22/IL-22BP au cours de désordres inflammatoires chroniques.**

Dans certains désordres inflammatoires, un contrôle insuffisant des actions de l'IL-22 par l'IL-22BP est pathogénique comme au cours des cancers, du psoriasis, des hépatites et des arthrites, tandis que dans d'autres situations comme les MICI, la sclérose en plaque et les infections pulmonaires, l'excès d'IL-22BP peut bloquer les actions bénéfiques induites par l'IL-22 sur les épithéliums.

## ii. L'IL-22BP protège les épithéliums des actions exacerbées de l'IL-22.

De par ses actions prolifératives, des actions non contrôlées de l'IL-22 peuvent s'avérer délétères comme au cours du psoriasis ou des processus tumoraux (Sabat et al., 2014).

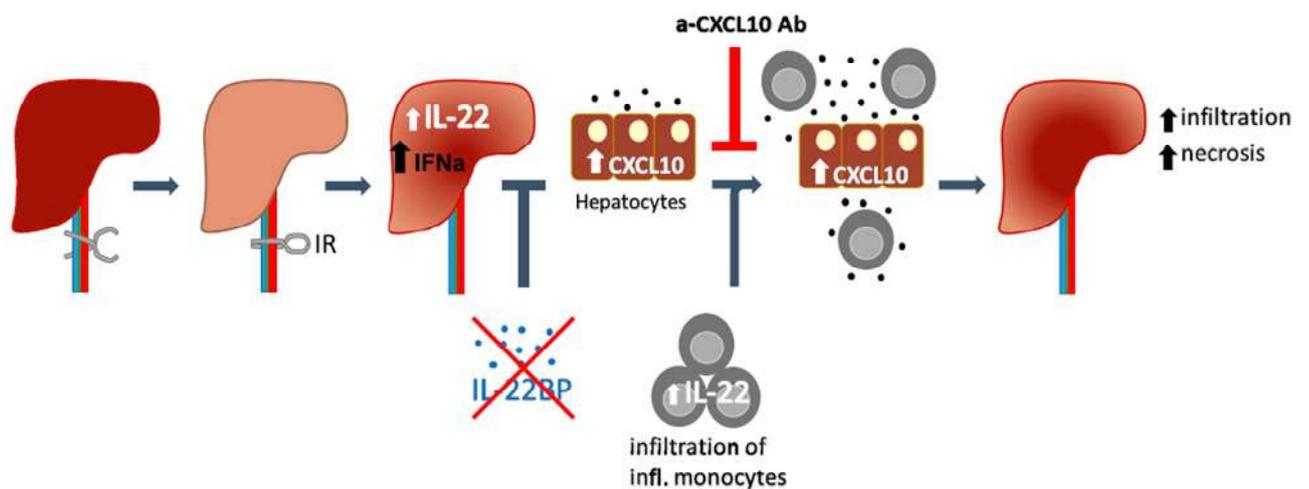
### ➤ Hépatites

Bien que les données de la littérature confèrent à l'IL-22 des actions de régénération et de cicatrisation sur les hépatocytes (Radaeva et al., 2004; Sabat et al., 2014), certaines études ont montré que de forts taux d'IL-22 étaient associés à un moins bon pronostic au cours d'hépatites chroniques (Kronenberger et al., 2012; Wu et al., 2015). Une étude génétique réalisée en 2015 a mis en évidence 2 polymorphismes dans le gène *IL22RA2* associés à une plus forte expression de l'IL-22BP ainsi qu'à une fibrose plus sévère dans une population chinoise infectée par *S.japonicum* (Sertorio et al., 2015).

L'équipe de S.Huber a étudié le rôle joué par l'IL-22BP sur les actions hépatiques de l'IL-22 dans deux modèles d'hépatites aiguës induites par l'acétaminophène ou encore l'ischémie/reperfusion (IR) chez des souris déficientes en IL-22BP et en IL-22 (Kleinschmidt et al., 2017). Lors d'une inflammation hépatique chez le rongeur, il est observé une augmentation de l'expression de l'IL-22 tandis que celle de l'IL-22BP reste stable. Au cours du modèle IR, provoquant la mort hépatocellulaire par accumulation de produits dérivés de l'oxygène et une forte activation du système immunitaire, ils mettent en évidence que les souris IL-22BP KO présentent significativement plus de dommages hépatiques. En l'absence de contrôle des actions de l'IL-22 par l'IL-22BP, il est observé à 48H plus de nécrose cellulaire et une augmentation significative des transaminases. L'administration d'acétaminophène chez les souris induit une mort par nécrose cellulaire due à l'augmentation du stress oxydatif. Au cours de ce modèle d'hépatite expérimental, les souris déficientes en IL-22BP présentent à 48H, comme précédemment, plus de nécrose ainsi que de mort cellulaire. De façon surprenante, l'absence d'IL-22 chez les souris n'a eu aucun effet sur la sévérité de la maladie en comparaison aux souris sauvages et en l'absence d'IL-22 et d'IL-22BP aucune atteinte hépatique n'est observée soulignant des actions strictement dépendantes de l'IL-22. Ainsi, les travaux de ce groupe suggèrent que l'IL-22BP régule les actions hépatiques de l'IL-22 et qu'une signalisation exacerbée de l'IL-22 est à l'origine de dommages tissulaires importants au niveau du foie en cas d'inflammation. Ils démontrent par la suite *via* une analyse transcriptomique qu'une action accrue d'IL-22 induit une forte expression par les hépatocytes du gène *Cxcl10*,

codant pour une chimiokine à l'origine d'une infiltration hépatique par des monocytes provoquant inflammation et nécrose.

En 2019, un rapport conforte le rôle hépato-protecteur de l'IL-22BP (Schwarzkopf et al., 2019) (**Figure 25**). En effet de forts taux d'IL-22 dans le sérum de patients souffrant de cirrhose sont associés à de fort risque d'évoluer vers une décompensation hépatique. Ainsi, un ratio IL-22BP/IL-22 faible est de mauvais pronostic et associé au risque de décompensation hépatique tandis que des ratios plus élevés sont observés chez des patients cirrhotiques stables ou encore des volontaires sains. Les auteurs proposent qu'un ratio IL-22BP/IL-22 faible est associé à une faible production d'IL-22BP ne permettant pas de correctement neutraliser l'induction par l'IL-22 de médiateurs hépatiques pro-inflammatoires. La **Figure 25** montre qu'au cours d'hépatites, un contrôle insuffisant des actions de l'IL-22 par l'IL-22BP peut être à l'origine de processus d'inflammation et de nécrose.



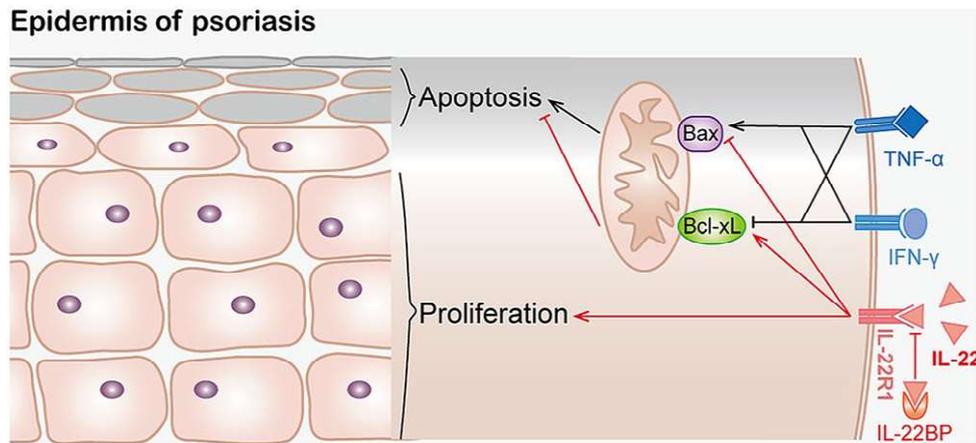
**Figure 25 : Au cours d'inflammation hépatique, l'IL-22BP exerce un rôle hépato-protecteur en limitant les actions pro-inflammatoires induites par l'IL-22. D'après (Kleinschmidt et al., 2017).**

### ➤ Psoriasis

A l'homéostasie, l'IL-22 n'est pas exprimée au niveau de la peau contrairement à l'IL-22BP. Cette cytokine peut être largement induite en cas d'inflammation chronique puisque de forts niveaux d'IL-22 sont retrouvés dans les lésions cutanées ainsi que dans la circulation sanguine des patients atteints de psoriasis (Martin et al., 2017a; Wolk et al., 2006). L'IL-22, en signalant sur les cellules épithéliales de la peau, induit la prolifération et l'inhibition de la différenciation des kératinocytes provoquant des phénomènes d'acanthose et hyperkératose, lésions cutanées observées au cours du psoriasis (Sabat et al., 2014). Plusieurs travaux, dont ceux de notre équipe, ont démontré une diminution de l'expression d'IL-22BP dans les zones non lésées psoriatiques en comparaison à de la peau saine (Lindahl et al., 2017; Martin et al., 2017a; Voglis et al., 2018a). De plus, l'analyse de biopsies appariées de patient souffrant de psoriasis met en évidence au niveau des zones lésionnelles une très forte induction d'IL-22 alors que celle de l'IL-22BP est très légèrement induite en regard des zones de peau non lésées (Martin et al., 2017b). Enfin, des dosages protéiques d'IL-22 et d'IL-22BP dans le sérum de patients atteints de psoriasis, ont démontré que le ratio IL-22/IL-22BP corrèle positivement avec le score clinique d'activité de la maladie (Martin et al., 2017b). L'ensemble des résultats sont en faveur d'une dysrégulation de l'IL-22BP chez les patients atteints de psoriasis. Au niveau des zones lésionnelles psoriatiques, le ratio IL-22/IL-22BP est en faveur d'une forte quantité d'IL-22 libre disponible pouvant agir très largement au niveau des kératinocytes. C'est pourquoi le rôle joué par l'IL-22BP dans le contrôle des actions cutanées de l'IL-22 a été étudié par plusieurs groupes dans des modèles expérimentaux de psoriasis induit par application cutanée d'Imiquimod. En activant la voie découlant du TLR7, l'Imiquimod induit une inflammation cutanée médiée par les cytokines de l'axe IL-23/IL-22/IL-17 (van der Fits et al., 2009). Dans ce modèle, plusieurs équipes ont mis en évidence une diminution de l'expression de *Il22ra2* au niveau de la peau et des organes lymphoïdes des souris traitées (Fukaya et al., 2018; Voglis et al., 2018a). Après cinq jours de traitement, notre équipe a montré un érythème ainsi qu'un épaissement significativement plus important de la peau des oreilles (cliniquement et histologiquement) chez les rats déficients pour le gène de l'IL-22BP (Martin et al., 2017b). Le blocage transitoire de l'IL-22BP a induit les mêmes lésions cutanées (érythème/épaissement de la peau des oreilles) chez des souris. D'autres groupes ont confirmé cet effet délétère de l'absence d'IL-22BP chez la souris au cours du même modèle expérimental de psoriasis (Fukaya et al., 2018; Lindahl et al., 2017). De plus, l'administration

d'IL-22BP recombinante au cours de ce modèle provoque une diminution des lésions cliniques et histologiques de psoriasis chez les souris traitées en comparaison aux souris contrôles (Fukaya et al., 2018). Ils démontrent chez les souris *Il22ra2*<sup>-/-</sup> une infiltration significativement plus importante dans les lésions cutanées par les granulocytes (Lindahl et al., 2017) et les Ly T gamma delta (Fukaya et al., 2018). La culture *in vitro* de kératinocytes en présence d'IL-22 ou d'IL-22BP recombinante démontre que l'IL-22BP inhibe la prolifération de kératinocytes induite par l'IL-22 (Fukaya et al., 2018). Ces auteurs ont par ailleurs proposé une production d'IL-22BP par les kératinocytes (Fukaya et al., 2018). Chez le rongeur, en l'absence d'IL-22BP, il est observé une augmentation significative d'actions induites par l'IL-22 comme l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement de PNN comme *Cxcl1* et *Cxcl2* (Fukaya et al., 2018 ; Lindahl et al., 2017) mais aussi de cytokines pro-inflammatoires comme *Il1b*, *Il17*, *Tnfa*, *Infg*, *Il22*, *Il24* (Fukaya et al., 2018 ; Lindahl et al., 2017 ; Martin et al., 2017) ou encore de PAMs : *Reg3g*, *Lcn2*, *Defb4a*, *S100A7* (Fukaya et al., 2018; Martin et al., 2017b). L'administration *in vivo* d'IL-22BP recombinante inhibe significativement l'expression de ces gènes, démontrant un pouvoir bloquant de l'IL-22BP sur les actions induites par l'IL-22 (Fukaya et al., 2018).

Chez les patients souffrant de psoriasis, les gènes codant pour la chimiokine *CXCL1*, les interleukines *IL20*, *IL24* et le PAM *DEFB4A* corrèlent positivement avec le ratio *IL22/IL22BP* (Martin et al., 2017b). Ainsi, l'IL-22BP apparait comme un médiateur jouant un rôle protecteur dans le contrôle des actions délétères de l'IL-22 au niveau des cellules épithéliales de la peau et une diminution de cet inhibiteur soluble joue un rôle dans la physiopathologie du psoriasis (**Figure 26**).



**Figure 26 : Représentation schématique de l'axe IL-22/IL-22BP au cours du psoriasis.** L'IL-22BP joue un rôle protecteur sur les kératinocytes en régulant les actions de prolifération et d'inhibition d'apoptose induites par l'IL-22. Ainsi, en l'absence d'IL-22BP, la signalisation découlant de l'IL-22 n'est plus contrôlée, provoquant la prolifération de kératinocytes non différenciés et l'apparition de phénomènes d'acanthose et hyperkératose. D'après (Wang et al., 2020a).

➤ *Polyarthrite rhumatoïde*

De forts niveaux d'IL22 ont été observés dans le liquide synovial de patients atteints de PR. De plus, des niveaux plasmatiques élevés d'IL-22 sont positivement corrélés avec le facteur rhumatoïde, la sévérité de la maladie ainsi que l'évolution vers une forme érosive (Sabat et al., 2014). Pourtant, il n'a pas été clairement mis en évidence de rôle pathogénique associé à l'IL-22 au cours de différents modèles murins de PR.

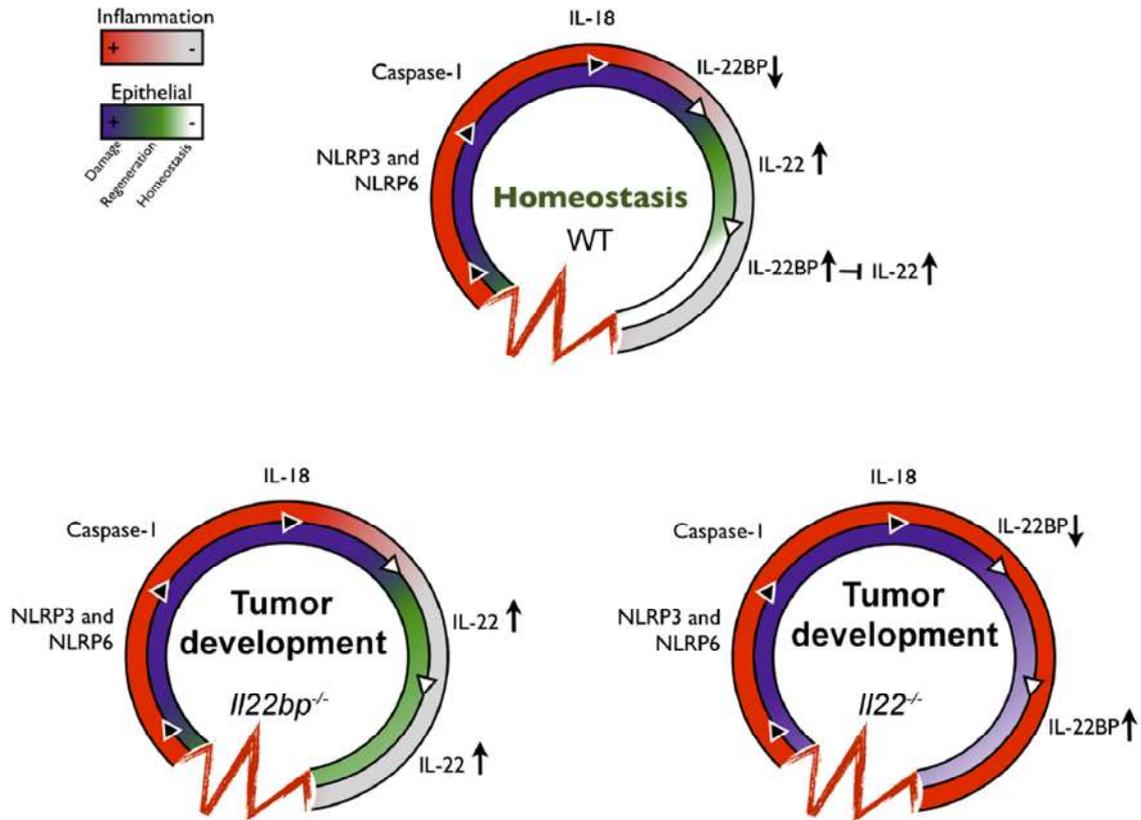
Au cours d'un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde chez des rats, une équipe a mis en évidence une forte induction de l'expression d'IL-22 corrélée positivement au score clinique chez le rongeur (Wang et al., 2017a). De plus, ils montrent qu'au cours de ce modèle une augmentation de l'expression d'IL-22R et d'IL-22BP au niveau de la rate de ces animaux et que le ratio IL-22R1/IL-22BP est en faveur d'un excès de la signalisation IL-22.

➤ *Cancers*

De part des actions prolifératives, nous avons vu précédemment que l'IL-22 pouvait jouer un rôle dans les processus de transformation tumorale. En effet, en se fixant sur son récepteur l'IL-22 induit la phosphorylation de STAT3, un facteur de transcription endossant le rôle d'un proto-oncogène en induisant l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle

cellulaire (*NANOG*, *SOX2*) mais aussi dans l'inhibition de l'apoptose (*Bcl-xL*, *Bcl-2* et *Mcl-1*) (Koltsova and Grivennikov, 2014; Kryczek et al., 2014a). Nous avons aussi vu le rôle important de l'IL-22 sur les CEI en induisant à la fois le renforcement des barrières muqueuses mais aussi la cicatrisation des épithéliums lésés. Cependant, la littérature lui confère un rôle délétère dans le développement des CRC. En effet un SNP dans le gène *IL22* est largement décrit comme étant associé à une augmentation de 50% de l'incidence des CRC chez les porteurs hétérozygotes (Thompson et al., 2010). Ainsi, nous allons détailler le rôle endossé par l'IL-22BP dans le contrôle des actions induites par l'IL-22 dans les processus tumoraux.

En 2012, les travaux de l'équipe de Flavell ont démontré que l'IL-22BP permettait de limiter une action prolongée de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal suite à un épisode inflammatoire, limitant ainsi le risque de développement tumoral (Huber et al., 2012a). Au cours d'un modèle de CRC dépendant de l'inflammation (AOM/DSS), les auteurs ont remarqué chez les souris *Il22ra2*<sup>-/-</sup> présentaient un développement tumoral plus important (tumeurs plus nombreuses et plus grosses/score de prolifération plus important) en comparaison aux souris sauvages, suggérant que les actions non contrôlées de l'IL-22 ont pu induire une transformation tumorale. Pourtant, les souris déficientes en IL-22 (*Il22*<sup>-/-</sup>) présentent elles aussi des manifestations tumorales plus importantes par rapport aux souris sauvages. Ainsi, ils démontrent *via* un blocage précoce de l'IL-22 que cette dernière joue un rôle antitumoral au cours des phases d'initiation de la transformation tumorale grâce à son action anti-inflammatoire tandis que le blocage tardif de l'IL-22 permet ensuite de réduire la croissance tumorale (Huber et al., 2012b). Dans un modèle murin spontané de CRC non médié par l'inflammation (*Apc*<sup>Min</sup>), le rôle protecteur de l'IL-22BP dans le contrôle des actions exacerbées pro-tumorales de l'IL-22 est conforté. En effet les souris *Il22ra2*<sup>-/-</sup> *Apc*<sup>Min</sup> développent, au niveau du colon, un nombre significativement plus important de tumeurs en comparaison aux souris sauvages ou encore *Il22*<sup>-/-</sup> *Apc*<sup>Min</sup>. Ainsi, l'IL-22BP joue un rôle fondamental pour neutraliser les effets pro-cancérigènes dus à une action prolongée de l'IL-22 produite en réponse à un dommage intestinal pour protéger/renforcer les muqueuses (**Figure 27**)(**Figure 24**). Dans un récent rapport, ce même groupe confirme ces résultats, puisqu'ils démontrent *via* le blocage du récepteur de la lymphotoxine (baisse de l'IL-22BP) une augmentation significative du nombre de tumeurs uniquement chez les souris ayant reçu l'anticorps bloquant (Kempski et al., 2020). Ces données n'ont à ce jour jamais été confirmées par un autre groupe.



**Figure 27 : Régulation et rôle de l'IL-22BP dans le contrôle des actions induites par l'IL-22 sur la muqueuse intestinale au cours de processus tumoraux.**

A l'homéostasie chez la souris, l'activation de la cascade de l'inflammasome en cas de dommages tissulaires ou par des ligands bactériens, provoque l'activation de l'IL-18 diminuant l'expression d'IL-22BP par les DCs, permettant ainsi l'augmentation des actions protectrices de l'IL-22 sur les CEI. Puis dans un second temps, l'expression d'IL-22BP est restaurée permettant ainsi une fine régulation de l'IL-22. Ainsi, l'absence d'IL-22BP s'associe à des actions non contrôlées d'IL-22, tandis que l'absence d'IL-22 ne permet pas à cette dernière d'exercer des effets protecteurs pour réparer la muqueuse intestinale en cas d'inflammation. Dans les deux cas, cela s'associe à une augmentation significative du développement tumoral. D'après (Huber et al., 2012).

Chez l'homme, une récente publication a évalué pour la première fois l'expression d'*IL22RA2* des patients ayant développé un CRC (Kempski et al., 2020). Ainsi, son expression est significativement diminuée au niveau des lésions tumorales en comparaison aux zones saines et est corrélée à celle de la lymphotoxine. De plus, ils proposent que des faibles niveaux d'IL-22BP pourraient constituer un facteur de risque pronostic dans les CRC. En effet, ils démontrent dans 2 cohortes indépendantes que de faibles niveaux d'IL-22BP sont associés à un mauvais pronostic tandis que de forts niveaux semblent être corrélés à une meilleure survie. Un groupe a démontré, en parallèle d'une augmentation de l'IL-22, un induction de l'expression d'IL-22BP au niveau des lésions tumorales de patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Jiang et al., 2013). Une autre équipe a décrit qu'un polymorphisme dans l'intron 4 du gène *IL22RA2* était associé à un meilleur pronostic ainsi qu'à une diminution du risque de rechute post-chimiothérapie au cours des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (Wade et al., 2011).

### iii. Conclusion

En conclusion, l'IL-22BP apparaît comme un médiateur essentiel pour finement moduler les actions de l'IL-22 qui, en fonction du contexte et du tissu, peuvent s'avérer être bénéfiques ou délétères. Au cours de désordres inflammatoires chroniques, le rôle pivot de l'IL-22BP dans le contrôle des actions de l'IL-22 a été étudié et démontré (**Figure 24**). Ainsi, une dysrégulation de l'axe IL-22/IL-22R/IL-22BP peut être impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies inflammatoires chroniques.

Au cours de la MC, l'activation non contrôlée du système immunitaire en réponse à l'invasion dans la LP par des bactéries de la flore commensale ou pathogènes, conduit à une stimulation permanente de l'épithélium intestinal provoquant à terme une inflammation chronique et des dommages tissulaires. Ainsi, l'objectif principal des stratégies thérapeutiques utilisées au cours de la MC vise à réparer et renforcer les propriétés de barrières de la muqueuse intestinale. C'est pourquoi la mise en place des anti-TNF a permis de révolutionner la prise en charge thérapeutique des patients atteints de MC. Cependant, la multiplication d'échecs thérapeutiques chez certains patients et les nombreux effets indésirables soulignent l'importance de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les données de la littérature

issus de modèles murins ont clairement démontré que les cytokines IL-22 et IL-17 exercent des actions protectrices sur les CEI.

Notre équipe s'est intéressée depuis plusieurs années au rôle joué par l'IL-22BP sur la modulation des actions protectrices induites par l'IL-22 au cours d'inflammation chronique intestinale. Nos précédents travaux ont permis d'identifier les DCs et les éosinophiles comme les sources principales de production d'IL-22BP dans l'intestin humain (Martin et al., 2016a). Au cours des MICI, nous avons démontré une augmentation de l'expression d'IL-22BP en lien avec la forte infiltration de PNE dans la LP. Enfin, nous avons démontré au cours d'un modèle expérimental de colite induit au DSS que l'absence d'IL-22BP chez les rats s'associait à une meilleure tolérance clinique de la colite (perte de poids, longueur du colon) et à un renforcement des actions induites par l'IL-22 (Martin et al., 2016b).

C'est pourquoi, l'objectif principal de ce projet de doctorat a été d'étudier l'intérêt d'un renforcement des actions induites par l'IL-22 et IL-17 pour réduire les dommages épithéliaux observés au cours des poussées de MC. Au cours de ce travail, nous avons finement caractérisé la réponse moléculaire induite par les actions combinées de l'IL-22 et l'IL-17 sur des muqueuses intestinales de patients atteints de MC et évalué l'impact de l'IL-22BP sur cette signature moléculaire.

Ces dernières années, de nombreux travaux dont les nôtres ont permis de mieux comprendre les sources cellulaires ainsi que la régulation de l'IL-22BP. Les DCs et les éosinophiles résidents intestinaux représentent une source majeure de production d'IL-22BP chez l'homme. Cependant, la suggestion récente d'une troisième source de production endossée par les LyT CD4<sup>+</sup> souligne l'importance de clarifier les sources cellulaires d'IL-22BP chez l'homme. En effet, au cours des MICI où l'expression d'IL-22BP a été démontrée comme augmentée, il apparaît fondamental d'identifier les cellules productrices de cet inhibiteur soluble. Dans une muqueuse inflammatoire de patients atteints de MICI, nous pouvons supposer que les niveaux d'IL-22BP ne seront pas les mêmes en fonction d'une production d'IL-22BP par les LyT ou les DCs. Par ailleurs, l'hypothèse que les anti-TNF pourraient agir en diminuant l'expression d'IL-22BP par les LyT CD4<sup>+</sup> est importante à vérifier et ne pourra être valable qu'en s'assurant d'une production d'IL-22BP par ces cellules. Il a en effet été mis en évidence une corrélation positive entre les niveaux d'expression des gènes *IL22RA2* et *TNF $\alpha$* , suggérant qu'une mauvaise réponse aux anti-TNF pourrait être mis en évidence par de forts dosages d'IL-22BP. Au vu de

ces informations, il est donc apparu important dans un second objectif, au cours de ce projet de thèse, de clarifier chez l'homme les sources cellulaires d'IL-22BP au cours de la MC.

*HYPOTHESE & OBJECTIFS*

*PRINCIPAUX*

# Hypothèse et objectifs principaux

L'hypothèse principale soutenue au cours de ce projet serait que les forts niveaux d'IL-22BP observés au niveau des muqueuses inflammatoires de patients atteints de MC pourraient bloquer les actions protectrices de l'IL-22 sur les épithéliums.

Ainsi, les objectifs spécifiques au cours de ce travail de thèse ont été doubles.

## **1- Clarifier les sources cellulaires humaines intestinales d'IL-22BP au cours de la MC.**

Pour mener à bien cet objectif, à partir de segments intestinaux et de ganglions mésentériques issus de résection iléo-coliques de patients atteints de MC, différentes populations immunitaires (DCs, lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [naïves et mémoires], éosinophiles et lymphocytes B) ont été isolées, puis l'expression d'IL-22BP a été évaluée en RT-qPCR. Afin d'évaluer l'expression protéique d'IL-22BP, des dosages en ELISA ont été réalisés dans des surnageants de culture de cellules fraîchement triées de patients atteints de MC. Enfin, nous avons étudié les effets d'une absence de production d'IL-22BP par les LyT au cours d'un modèle de wasting disease induit chez le rat par l'injection de LyT effecteurs CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> chez un animal receveur immunodéficient (*Il2rg*<sup>-/-</sup>). De plus, en évaluant les niveaux d'IL-22BP dans les surnageants de culture de biopsies saines et MICI, nous avons identifié chez l'homme des signaux régulant sa sécrétion intestinale. L'ensemble des résultats sont présentés dans l'**Article 1**.

## **2-Démontrer qu'un renforcement des actions combinées de l'IL-22 et IL-17, pourrait représenter une stratégie thérapeutique innovante au cours de la MC.**

Pour répondre, à cet objectif, nous avons analysé les modifications transcriptomiques induites dans des biopsies intestinales saines ayant été stimulées avec de l'IL-22 et/ou IL-17. Ainsi, nous avons caractérisé des gènes impliqués dans un programme moléculaire largement induit par l'IL-22 et l'IL-17. Nous avons par la suite évalué l'expression de ce programme dans une cohorte de patients MICI, pour laquelle nous disposons de biopsies appariées (muqueuses saines versus inflammatoires). Par la suite, le même modèle de stimulation *ex-vivo* de biopsies intestinales de patients MC a été réalisé afin d'évaluer la possibilité de moduler les expressions des gènes compris dans le programme moléculaire en ajoutant artificiellement des cytokines. Enfin, nous avons étudié l'impact de l'IL-22BP sur la signature moléculaire induite par l'IL-22 et IL-17 dans des muqueuses intestinales. L'ensemble de ces résultats ne sont pas encore publiés et sont présentés dans la seconde partie des résultats.

# *RESULTATS*

## Résultats

### Partie I : Clarification chez l'homme au cours de la maladie de Crohn des sources cellulaires d'IL-22BP

#### Résumé :

Les actions de l'IL-22, une cytokine exerçant un rôle protecteur sur les CEI en cas d'inflammation, sont inhibées par l'IL-22BP. Dans l'intestin humain, les éosinophiles et les DCs ont été identifiés comme les sources de production majeures d'IL-22BP. Cependant, il a été récemment proposé que les LyT pourraient représenter une source additionnelle de production d'IL-22BP. Ainsi, l'objectif principal de ce travail a été de clarifier ces sources cellulaires chez l'homme au cours de la MC.

En évaluant l'expression d'*IL22RA2* dans différentes fractions cellulaires isolées de LP et de ganglions mésentériques (GM), nous avons confirmé son expression par les PNE et les DCs/macrophages. En comparaison à celle des DCs, l'expression dans les fractions T est beaucoup plus faible voir absente. De plus, l'activation des LyT n'a pas induit une expression d'*IL22RA2*. Nous avons aussi voulu évaluer la production protéique d'IL-22BP dans les muqueuses intestinales de patients atteints de MC, en dosant l'IL-22BP dans des surnageants de culture de DCs, LyT et éosinophiles fraîchement triés de la LP et de GM. Nous avons identifié pour la première fois une sécrétion d'IL-22BP par les éosinophiles, en lien avec l'expression en ARNm mais pas pour les LyT. Enfin au cours d'un modèle de wasting disease induit chez des rats *Il2rg<sup>-/-</sup>*, nous n'avons pas observé de différence sur les phénotypes de colite entre l'injection de LyT CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> *Il22ra2<sup>-/-</sup>* et *Il22ra2<sup>+/+</sup>*.

Nous avons évalué les niveaux de sécrétion d'IL-22BP en mettant en culture pendant 6 heures des biopsies intestinales de tissus normaux et MICI. Nous avons démontré une hétérogénéité des niveaux intestinaux d'IL-22BP au sein des muqueuses saines et MC. Nous avons cherché à comprendre cette variabilité et ainsi identifié que la production iléale était plus importante. De plus de façon intéressante, nous avons observé, que les forts niveaux d'IL-22BP des muqueuses coliques MC correspondaient uniquement à des patients fumeurs.

En conclusion, les résultats obtenus n'ont apporté aucun argument en faveur d'une production majoritaire par les LyT mais ont plutôt renforcé l'idée que ceux sont les éosinophiles résidants de la LP qui sont la source principale d'IL-22BP.

# **Characterization of IL-22BP expression during Crohn's disease**

## **shows lack of evidence for IL-22BP production by T cells**

Aurélie Fantou<sup>1</sup>, Laurence Delbos<sup>1</sup>, Ahmed Abidi<sup>1</sup>, Gaëlle Beriou<sup>1</sup>, Anne Jarry<sup>2,3</sup>, Cécile Braudeau<sup>1,4</sup>, Nina Salabert<sup>1,4</sup>, Jason Ossart<sup>1</sup>, Carole Guillonnet<sup>1</sup>, Eros Marin<sup>1</sup>, Aurélie Moreau<sup>1</sup>, Juliette Podevin<sup>5</sup>, Arnaud Bourreille<sup>5</sup>, Jérôme C Martin<sup>1,4</sup> and Régis Josien<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, 44093 Nantes Cedex 01, France.

<sup>2</sup> CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, 44093 Nantes Cedex 01, France.

<sup>3</sup> LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", 44093 Nantes Cedex 01, France.

<sup>4</sup> CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie, CIMNA, 44093 Nantes Cedex 01, France.

<sup>5</sup> CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 44093 Nantes Cedex 01, France.

### **Corresponding author :**

Pr Régis Josien

CRTI, UMR 1064

CHU Nantes Hôtel Dieu

30, Boulevard Jean Monnet

44093 Nantes Cedex 1, France

email : [regis.josien@univ-nantes.fr](mailto:regis.josien@univ-nantes.fr)

Tel : +33240087413

## Abstract

**Background & aims:** IL-22 binding protein (IL-22BP) is a soluble and specific inhibitor of IL-22, a cytokine with known protective actions on intestinal epithelial cells during inflammation. Although eosinophils and mononuclear phagocytes (MNP) were shown to be the sources of IL-22BP in the *lamina propria* (LP), it has recently been proposed that CD4<sup>+</sup> T cells represent an additional and source of IL-22BP in the gut during Crohn's disease (CD) and in a model of colitis induced by T cell transfer in mice. The main objective of this work was to confirm these findings.

**Methods:** We investigated IL-22BP cellular sources in CD subjects gut using qPCR on FACS-sorted LP and mesenteric lymph nodes (MLN) cell subsets and ELISA on supernatants of sorted cells or from *ex-vivo* culture of intestinal biopsies. To determine the potential role of IL-22BP produced by T cells *in vivo*, we used a rat model of colitis and wasting disease induced by adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> CDR45RC<sup>high</sup> T cells in *Il2rg*<sup>-/-</sup> immunodeficient rats.

**Results:** MNP (HLA DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells) and eosinophils isolated from LP CD tissues expressed *IL22RA2*, while the expression measured in the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells fractions was undetectable or 100-1000 times lower than in MNP. Correlating with RT-qPCR data, we determined a significant level of IL-22BP protein only in supernatant of FACS-sorted eosinophils from LP CD tissues but not in T cells supernatants. In MLN, *IL22RA2* expression in T cells was 1000-fold lower than in DCs without differences between naïve and effector/memory phenotypes. *IL22RA2* expression was undetectable after *ex vivo* activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from LP or MLNs and accordingly IL-22BP was not detected in their supernatant. The transfer of CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells from either *Il22ra2*<sup>-/-</sup> or *Il22ra2*<sup>+/+</sup> rats induced colitis and wasting disease with similar kinetics and severity in *Il2rg*<sup>-/-</sup> rats. We also identified higher production of IL-22BP from ileum as compared to colon biopsies which

correlated with the level of eotaxin-2. Finally, and unexpectedly, high *ex vivo* production of IL-22BP in mucosa biopsies from CD patients was only observed in smokers.

**Conclusion:** We confirmed that eosinophils and MNPs are the sources of IL-22BP in the gut during CD but found no evidence for IL-22BP expression by T cells. This work also provides new insights on factors regulating intestinal IL-22BP levels.

## Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract, the main clinical entities of which are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)<sup>1</sup>. IBD progressively leads to bowel damage and disability that significantly alter the quality of life<sup>2</sup>. IBD prevalence has increased steadily worldwide<sup>3</sup>. IBD is thought to result from complex interactions between environmental<sup>4</sup>, genetic<sup>5</sup>, microbial<sup>6</sup> and immune factors responsible<sup>7</sup> for sustained inflammatory responses damaging the gut epithelium and leading to disease-associated intestinal remodeling<sup>8</sup>. Interleukin-(IL) 22, a member of the IL-10 family of cytokines, is strongly induced during IBD flares<sup>9</sup>, as a result of increased production by populations of lymphocytes including CD4<sup>+</sup> T cells and group 3 innate lymphoid cells (ILC3)<sup>9-11</sup>. IL-22 receptor (IL-22R) expression is mostly limited to epithelial cells<sup>12</sup> and protective actions of IL-22 on the gut epithelium have been largely suggested in different rodent models of gut inflammation<sup>13-17</sup>. IL-22 contributes to increase epithelial barrier properties by inducing the secretion of antimicrobial peptides<sup>15,18</sup> and mucins<sup>13</sup>. IL-22 also promotes intestinal epithelial cell (IEC) survival and proliferation to support epithelial regeneration and healing<sup>19,20</sup>. When unregulated, however, IL-22 actions on IEC can also promote tumor cell proliferation<sup>21-24</sup>. IL-22 binding protein (IL-22BP) is a soluble inhibitor specifically preventing IL-22R engagement by IL-22<sup>25</sup>. IL-22BP thus acts as a negative regulator to control the level of IL-22-induced epithelial response in vivo<sup>26-30</sup>. We<sup>31</sup> and others<sup>32</sup> previously showed that IL-22BP expression is increased during IBD. We also reported increased IL-22-dependent protection against DSS-induced colitis in IL-22BP-deficient rats<sup>31</sup>, though this effect was not seen in mice<sup>26</sup>, which suggested possible interspecies differences with regard to IL-22BP-dependent regulation of IL-22. Murine IL-22BP, however, was shown to protect against T cell-dependent colitis and to prevent lasting pro-proliferative actions of IL-22 that can support tumorigenesis<sup>26</sup>. *Il22ra2* expression is detected in subsets of dendritic cells (DCs)<sup>26,32-35</sup> and macrophages<sup>35-38</sup>

in the gut lamina propria (LP) and gut-associated lymphoid structures in rodents. We confirmed the high expression of *IL22RA2* in human gut MNP and identified eosinophils as another source of IL-22BP in the LP of healthy and IBD tissues<sup>31</sup>, as later confirmed by Pelczar et al<sup>32</sup>. Interestingly, the latter further revealed unsuspected expression of IL-22BP by CD4<sup>+</sup> T cells in human and mouse gut tissues<sup>32,39</sup>, and suggested T cells also contributed to increased IL-22BP levels observed in the inflamed IBD intestine. Adoptive transfer of T cells from *Il22ra2*<sup>-/-</sup> mice in *Rag1*<sup>-/-</sup> immunodeficient mice led to more severe colitis as compared to IL-22BP-sufficient T cells<sup>32</sup>, hence suggesting possible pathogenic functions of T-cell derived IL-22BP in IBD. IL-22BP expression by murine T cells, however, was not confirmed by several other groups<sup>34,36,40,41</sup> or by the analysis of the ImmGen database ([immgen.org](http://immgen.org))<sup>42</sup>, indicating that more clarification is still required with regard to IL-22BP cell sources in the gut. This is of particular importance in IBD given the major pathophysiological implications linked to the increased production of IL-22BP observed in inflamed tissues.

In this study, we sought to thoroughly revisit the cellular sources of IL-22BP in the LP of CD patients and for the first time in CD samples of mesenteric lymph nodes (MLNs). While we verified the expression of IL-22BP in eosinophils and mononuclear phagocytes (MNP), we could not obtain evidence for *IL22RA2* expression in CD T cells.

## **Materials and Methods:**

### **Human samples**

For identification IL-22BP sources, specimens were obtained from surgical pieces from CD patients undergoing resection due to relapse (**Table 1** and **Table 2**). For ex vivo culture, colonic and ileum biopsies of mucosal areas were also obtained from 43 active CD and 6 active UC patients undergoing endoscopy (**Table 3**). For RT-qPCR analysis, colonic and ileum biopsies of mucosal areas were also obtained from 24 active CD and 10 active UC patients undergoing endoscopy (**Table 4**). Control biopsies (n=16) from patients undergoing resection for CRC were also included. Normal colonic tissue samples were taken 10 cm downstream to the tumor. The tissue fragments were processed according to the French guidelines for research on human tissues. Informed patient consent was obtained according to the French bioethics law. Ethical approval was obtained from the local ethics committee (DC-2008-402).

### **Animals**

*Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats were generated on the Sprague-Dawley background using zinc-finger nucleases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at our local Rats Transgenesis and were previously described<sup>31</sup>. All animal experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines. All animal studies were conducted according to the guidelines of the French Agriculture Ministry. These studies were approved by the Veterinary Departmental Services committee (# E.44011).

### **Wasting disease**

*Il2rg*<sup>-/-</sup> SPD rats (n=6) aged of 6 weeks previously described<sup>43</sup> were injected *via* the tail vein with  $3.10^6$  sorted TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells from *Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats or controls *Il22ra2*<sup>+/+</sup> littermates. CD45RC<sup>high</sup> T cells were sorted by flow cytometry from magnetically enriched

CD4<sup>+</sup> single-cell spleen suspensions (ThermoFisher Scientific, ref 11033). A control with a PBS injection was also performed. Wasting disease development and colitis was monitored by changes in weight. Rats were sacrificed when most of the animals undergo 15-20% of initial weight loss.

### **Purification of human cells**

Immune cells were isolated from fresh human intestine and MLN. First, in human intestine samples the mucosa was isolated. To remove epithelial cells, the tissue was cut in small pieces and further incubated for 15 min at 37°C under slow rotation (100 rpm) twice time with dissociation solution (HBSS without Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> - HEPES 10mM – EDTA 5mM). The remaining tissue was washed in PBS, further minced with a scalpel and incubated for 40 min at 37°C in HBSS (with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) with Collagenase IV (0,5 mg/mL-Sigma ref C5138) and DNase I (0,1 mg/mL-Sigma) under 100 rpm rotation and vortexing every 20 min. Cells suspension was then filtered through 70µm pore size cell strainers (BD Biosciences) and processed for cell sorting. After removal adipose tissue, human MLN were cut in small pieces and incubated for 30 min at 37°C on a shaking incubator in Collagenase D solution (2mg/mL-Sigma-ref ref 1108882001) containing 0,1 mg/mL DNase I. Then, cell suspension was then filtered through 70µm pore size cell strainers (BD Biosciences) and processed for cell sorting.

### **Cells sorting from human LP and MLN**

Human intestine LP and MLN cells were stained with antibodies specific for CD45 (clone 2D1/APCCy7), CD3 (clone UCHT1/FITC), CD4 (clone SK3/PECy7), CD19 (clone HIB19/PE), CD11c (clone B-LY6/APC), HLA-DR (clone G46-6/V500) (BD Biosciences) and SIGLEC-8 (clone 7C9/PE) (BioLegend, San Diego, CA). The addition of the CD14 mAb (clone M5E2/PECy7) then allowed a precise separation between the DCs and macrophages. Cells

isolated from MLN were also stained with the following CD45RA (clone HI100/APC) and CD62L (clone Dreg56/PE) mAbs to isolate naïve and non-naïve (memory/effector) T cells. Dead cells were excluded by gating on 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-negative cells. Cell sorting was performed on a BD FACS Aria Cell sorter (BD Biosciences).

### **Real-time quantitative PCR**

After sorting, cells were suspended in TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) and frozen at 80°C. Total RNA was prepared using an RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's instructions. Gene expressions were assessed with the TaqMan Fast Advanced Master Mix reagent (Applied Biosystems, Foster City, Calif). Primers and probes were purchased from Applied Biosystems (see **Table 5** for complete list). Real-time PCR was performed using the StepOne Plus System (Applied Biosystems). Then, relative expression was normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and calculated using  $2^{-DDCt}$ . Results were expressed in arbitrary unit (a.u.).

### **Monocyte-derived dendritic cells**

Dendritic cells were generated from monocytes isolated from healthy volunteers. Monocytes were isolated either by elutriation of PBMCs (Clinical Development and Transfer Platform, Nantes, France) or by magnetic labelling (untouched cells, Human monocyte Isolation kit II). To obtain monocytes-derived dendritic cells (moDC),  $2.5 \times 10^6$  monocytes were incubated in a 6-well plate in 5 mL of complete medium (RPMI 1640 medium containing 10% Fetal Calf serum (FCS), 1% L-glutamin, 1% antibiotics, 1mM Sodium Pyruvate, 1mM HEPES, 1% non-essential amino acids) supplemented with recombinant human IL-4 (200U/mL) and

recombinant human GM-CSF (100U/mL) for 6 days at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. When indicated, cells were treated with retinoic acid (RA) (100nM, Sigma Aldrich), LPS (1 µg/mL, Sigma Aldrich) and TNF $\alpha$  (50 ng/mL, Miltenyi). After 6 days, moDC and supernatants were collected and frozen at -80°C until use.

### ***Ex- vivo* culture of gut biopsies**

Biopsies from healthy and CD patients were cultured *ex vivo* during 6 hours at 37°C – 5% Co<sub>2</sub> under slow rotations. Biopsy were placed (1 biopsy per well) in 4-well Petri dishes in 500µL serum-free medium (Media 1640, Gibco) supplemented with BSA (0.01%), 200µg/mL Penicillin/Streptomycin (Gibco ref 15140-122) and 0.25µg/mL Fungizone (Gibco ref 15290-026). After 6 hours, supernatants were collected and frozen -80°C until use.

### **ELISA assay for 22BP**

Measurement of IL-22BP in the supernatant of stimulated biopsy was performed with the Human IL-22BP ELISA DuoSet kit (R&D System, DY-1087-05) according to manufacturer's instruction. Briefly, a 96-well microplate was coated with a rabbit monoclonal anti-IL-22BP [4µg/mL] and incubated at room temperature (RT) overnight. The next day, after blocking 100-µL standard dilutions and pure samples were added to each well and incubated 2 hours at RT. Then, 100µL/well of goat anti-IL-22BP [70ng/mL] were added and 2 hours incubation at RT was performed. Finally, ELISA was revealed, and plates were read at 450 nm with TECAN Spark instrument. According to the supplier's instructions (R&D Systems), the detection limit was 94 pg/mL.

### **Multiplex assay**

Cytokines (IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A, IL-22, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-23 and TNF $\alpha$ ) and chemokines (MIP-1 $\beta$ , CXCL10, CXCL1, CXCL2, CCL2, OSM, CXCL11, CXCL5, CXCL6 and MIG) were measured in 6 hours culture supernatants of biopsies from CD mucosa (n=29 colons) with a multiplex assay from Biotechne (Rennes, France) according to the supplier's instructions. Analysis was carried out using a Luminex MAGPIX® instrument.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA). Means comparisons of unpaired samples were performed using the Mann–Whitney U-test or the Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test. The Wilcoxon signed-rank test was used for paired samples. P-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### High level of IL-22BP expression is limited to MNP and eosinophils in human

We previously showed that human MNP (DCs and macrophages) and eosinophils purified from uninflamed colons of controls expressed significant levels of *IL22RA2* mRNA, whereas almost no expression was detected in epithelial cells, lymphocytes and neutrophils<sup>31</sup>. To revisit the cellular distribution of IL-22BP mRNA expression in CD patients, we FACS-sorted populations of HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MNP, eosinophils, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and B cells from uninflamed and inflamed LP tissues (n= 5 CD patients with only 2 of them having matched areas, **Table 1**) (**Supp Figure 1**) and analyzed them by RT-qPCR for *IL22RA2* expression (**Figure 1A**). HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MNP presented the highest levels of *IL22RA2* levels followed by eosinophils, in which average expression was about 3-fold lower, though with more variability, as 2 out of the 5 samples analyzed had low-to-no IL-22BP mRNA detected. Compared to MNP and eosinophils, IL-22BP expression in CD4<sup>+</sup> T cells was 100-1000-fold lower and two samples had undetectable levels (**Figure 1A**). In addition, IL-22BP expression in CD4<sup>+</sup> T cells was similar to that detected in CD8<sup>+</sup> T cells and B cells (**Figure 1A**).

Pelczar et al. reported *Il22ra2* expression in mouse MLN CD4<sup>+</sup> T cells was especially high in memory cells<sup>32</sup>. We FACS-sorted naïve and non-naïve populations CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, MNP and B cells isolated from MLN collected on CD surgical resections (n=5). In order to dissect standard naïve vs effector/memory T cells populations in lymph node, we stained for CD45RA and CD62L. The common presence of both CR45RA and CD62L is routinely and used here to identify naïve T cells<sup>44</sup> (**Supp Figure 2**). The absence of both markers is characteristic of effector memory T cells while the singular expression of CDR45RA and CD62L is associated to T<sub>EMRA</sub> cells and central memory T cells, respectively<sup>44</sup>. Cells not positively stained for CD45RA and CD62L were sorted together and will later be called non-naïve T cells. As shown in **Figure 1A**, significant expression of *IL22RA2* was consistently

detected in MNP whereas low levels were observed in lymphocytes, which did not differ between naïve and non-naïve subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Again, similar expression existed between T and B lymphocytes (**Figure 1A**). To assess whether IL-22BP expression could be induced in T cells upon TCR-mediated activation, we FACS-sorted T cells from CD intestine and MLN and stimulated them with PMA plus Ionomycine (PMA+Iono) for 20 hours. T cell activation was verified by the induction of *IL2RA* (encoding for CD25) expression (**Figure 1B**). However, upon stimulation, neither CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells upregulated *IL22RA2* expression in intestine, nor naïve and non-naïve fractions T cells in MLN (**Figure 1C**).

It is possible that *IL22RA2* mRNA expression is transiently induced upon TCR-dependent stimulation and was not captured in our single time point analysis. We thus quantified the levels of secreted IL-22BP protein in cell supernatants by ELISA using monocyte-derived DCs (moDC), which express *IL22RA2*<sup>33,45</sup>, as a positive control. MoDC were differentiated with or without retinoic acid (RA) (moDC-RA), which we<sup>33</sup> and others<sup>45,46</sup> identified as a major inducer of IL-22BP expression in moDC and we reaffirmed in **Figure 2A**. As previously demonstrated<sup>33,45</sup>, LPS or TNF-induced maturation of moDCs significantly decreased *IL22RA2* mRNA expression, independently of RA preconditioning (**Figure 2A**). Secreted IL-22BP was only detected in supernatants of moDC-RA and higher levels were observed in unstimulated vs. LPS-stimulated cells, as confirmed by the significant correlation existing between IL-22BP levels quantified by RT-PCR and ELISA (**Figure 2B&C**).

We then specifically isolated and cultured during 20 hours HLA DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup> cells, corresponding to DCs, eosinophils and T cells from three CD (**Table 2**) LP tissues (supp Figure 3). When applying this ELISA assay to the quantification of IL-22BP in culture supernatants, only one eosinophil supernatant returned detectable levels (**Table 6**), suggesting sensitivity of the ELISA assay may not be sufficient to detect DC-derived IL-22BP, especially because of *ex vivo* associated maturation induced by tissue processing, cell sorting and cell culture, a

phenomenon well-described for tissue DC<sup>33,47</sup>. Concordant with RT-qPCR data in **Figure 1C**, IL-22BP was not detected in supernatants of both resting and stimulated LP T cells, whereas the production of IFN $\gamma$  was strongly induced upon stimulation (**Table 7**). Similarly, in MLN, IL-22BP was not detected in supernatants of both resting and stimulated T cells both naïve and non-naïve fractions (data not shown). While the sensitivity of the ELISA assay remained low, these data do not support human gut T cells as potential sources for IL-22BP.

### **IL-22BP deficient CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells induced the same colitis phenotype as IL-22BP-sufficient cells.**

Interspecies differences exist with regard to IL-22BP sources<sup>31,36,41</sup> and biological functions between human, mouse and rats. While we observed a negative regulation of IL-22 actions by endogenous IL-22BP during acute DSS colitis in the rat<sup>31</sup>, this was not the case in mice<sup>26</sup>. Pelczar et al. suggested T-cell derived IL-22BP was blocking IL-22 during transfer colitis in mice<sup>32</sup>. Because of our discordant observations about IL-22BP production by T cells, we assessed whether rat IL-22BP-deficient T cells<sup>32</sup> could induce less severe colonic inflammation in the colitis and wasting disease model induced by the transfer of CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells in *Il2rg*<sup>-/-</sup> immunodeficient rats, which we recently described (Guillonneau et al unpublished data). We compared CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells from *Il22ra2*<sup>+/+</sup> and *Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats we previously described<sup>31</sup> and observed no significant difference<sup>31</sup> in their capacity to promote colitis as assessed by weight loss. Indeed, injection of CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> effector T cells in *Il2rg*<sup>-/-</sup> rats successfully induced a wasting disease and colitis phenotype as indicated by the breakdown of the weight curve in these animals compared to the control condition (PBS) (**Figure 3**). However, injection of effector T cells from *Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats did not induce a difference in weight gain in *Il2rg*<sup>-/-</sup> recipients compared to controls *Il22ra2*<sup>+/+</sup> littermates rats.

### **IL-22BP levels correlate with eosinophil attracting eotaxins in human gut tissues.**

We previously reported variable levels of *IL22RA2* mRNA expression in IBD biopsies across patients<sup>31</sup> and we sought to identify possible factors associated with this heterogeneity in CD. We analyzed IL-22BP in the supernatant of biopsies from non-IBD intestinal tissues (healthy) and CD lesions (both uninflamed and inflamed biopsies) after 6h culture (**Figure 4A**) (Table 3&4). High amounts of IL-22BP (ranging from 94 to 812 pg/ml in normal tissues and up to 8795 pg/mL in CD lesions) were detected in some samples with wide inter-sample variability. Compared to colonic biopsies, levels of IL-22BP were significantly higher in ileum biopsies both healthy and IBD tissues, as confirmed by RT-qPCR (**Figures 4A&B**). Surprisingly, similar levels of secreted IL-22BP were detected between non-IBD and CD tissues in both ileum and colon, as well as between CD and UC biopsies. Interestingly, we observed a small but significant correlation between levels of IL-22BP and eotaxin-2, a major chemokine involved in eosinophil recruitment in the gut LP<sup>48</sup>, but not between IL-22BP and TNF $\alpha$  (**Figure 4C**). Because eotaxins levels reflect eosinophil abundance in LP mucosa<sup>49</sup>, these results suggest that higher production of IL-22BP observed in some biopsies could reflect increased infiltration of eosinophils.

We then sought to correlate IL-22BP levels with clinical data. For the colonic CD samples, we found no correlation between IL-22BP levels and clinical features such as outcome of disease, response to anti-TNF or need to surgery (data not shown). Interestingly, we found that all high IL-22BP producers, in both colon and ileum, were active smokers (**Figure 5A**). To assess whether these high levels of IL-22BP are not related to tobacco-induced inflammation, we assayed panels of pro-inflammatory chemokines and cytokines in these same supernatants. The heatmap in **Figure 5B** is a non-clustered representation of the secretion profiles between smokers and non-smokers. Thus, we have interestingly observed inflammatory profiles in both smokers and non-smokers. Moreover, in half of the smoking patients with high levels of IL-

22BP, we did not measure pro-inflammatory chemokines and cytokines in their culture supernatants (**Figure 5B**). Thus, these results have shown that IL-22BP levels are not associated with the level of inflammation. Moreover, they are mediators largely produced by T cells, reinforcing the idea that IL-22BP levels are not correlated with T cell infiltration. To conclude, we have shown that the high intestinal levels of IL-22BP can be explained by ileum localization and tobacco impregnation.

## Discussion

Data presented in this study confirm the production of IL-22BP by MNP and eosinophils in CD gut tissues, but do not support a production by T cells in LP nor in MLN as recently reported by Huber's group<sup>32,39</sup>. The reason for the discrepancies regarding expression of *IL22RA2* in human remain to be elucidated. *IL22RA2* expression was either undetected or detected at 100 times lower levels in T cells than MNP from CD mucosa, similar to what we observed previously in normal colonic mucosa<sup>31</sup>. *IL22RA2* expression levels in T cells were in fact equivalent to those in B cells which are not currently identify as a cellular source of IL-22BP. In Pelczar's study, results for *IL22RA2* expression in IBD mucosa were reported on two separate graphs, making thus the comparison between CD4<sup>+</sup> T cells and DCs impossible<sup>32</sup>. They also assessed *Il22ra2* expression in CD4<sup>+</sup> T cell subsets from mice LN and reported increased expression in memory as compared to naïve fractions. We could not confirm these data in human MLN in which *IL22RA2* expression levels in both naïve and non-naïve CD4<sup>+</sup>, as well as CD8<sup>+</sup> T cells, were either undetectable or 1000 times less than DCs. Although we could not exclude that a rare subset of LP T cells expresses *IL22RA2* during IBD, mining of our recently published single cell analysis data of CD inflammatory lesions<sup>50</sup> revealed a lack of *IL22RA2* mRNA expression by T cells.

The statement from Huber group that CD4<sup>+</sup> T cells express IL-22BP in mice is actually challenged by many reports from other groups which did not observe expression of *Il22ra2* by CD4<sup>+</sup> T cells in small intestine-LP<sup>36,41</sup> and LN<sup>34,40</sup>. Moreover, IL-22BP protein level by mouse T cells has not been reported so far. Importantly, evidences for a production of IL-22BP by mouse T cells were further provided in an experimental model of naïve T cell-induce colitis<sup>32</sup>. Indeed, transfer of naïve T cells from *Il22ra2*<sup>+/+</sup> but not *Il22ra2*<sup>-/-</sup> mice into *Rag1*<sup>-/-</sup> mice induced more severe colitis implicating T cell-derived IL-22BP as pathogenic in this model. Contrasting again with these data in mice, we found no evidence for a reduced colitogenic

action of IL-22BP-deficient T cells upon transfer in *Il2rg*<sup>-/-</sup> immunodeficient rats. This is consistent with previous data including ours in rat showing an absence of *Il22ra2* expression in CD4<sup>+</sup> T cells from spleen<sup>33</sup> or LNs<sup>51</sup>. However, it is important to note that this is not exactly the same model of adoptive transfer colitis, nor is it the same rodent species, especially as differences between rats and mice have already been observed in another DSS-induced colitis<sup>26,31</sup>.

Several assays have been used to measure IL-22BP protein production. We previously use immunofluorescence analysis to demonstrate that LP eosinophils were by far the most abundant IL-22BP expressing cells in normal and CD mucosa<sup>31</sup>. Few DCs expressing IL-22BP were identified whereas none of IL-22BP-expressing cells expressed CD3. Huber group used intracellular flow cytometry to demonstrate IL-22BP expression by DCs, eosinophils and CD4<sup>+</sup> T cells from LP<sup>32,39</sup>, the levels of which were reported to be enhanced during IBD only in CD4<sup>+</sup> T cells<sup>32</sup>. Although not mentioned by authors, DCs actually also appear to upregulate intracellular IL-22BP in their data. Strikingly, virtually all DCs appear to express IL-22BP in their report which therefore questions about the specificity of the staining observe in flow cytometry given the previously described restricted expression of *IL22RA2* by a specific subset of DCs (DC2)<sup>31,52</sup>. We therefore sought to reproduce these findings but could not evidence specific intracellular staining with the same Ab due to high background (data not shown). To circumvent this problem, we used an ELISA assay for IL-22BP but found no evidence for production by T cells from LP or MLN in line with RT-qPCR results.

IL-22BP levels in culture supernatants from normal and CD biopsies are consistent with the fact that eosinophils are the major source of IL-22BP in the gut. Indeed, we demonstrated significantly higher levels of IL-22BP in the ileum compared to the colon consistent with the known intestinal distribution of eosinophils<sup>48,53-55</sup>. At the protein level, we measured only IL-22BP levels in a supernatant of sorted eosinophils from LP CD tissues. We found no correlation

between TNF $\alpha$  and IL-22BP as shown by Pelczar et al at the mRNA level<sup>32</sup>, but observed a weak but significant correlation between IL-22BP and eotaxin-2, a major chemokine involved in eosinophil recruitment in the gut LP<sup>48</sup>. No other correlation between IL-22BP and pro-inflammatory chemokine levels was observed, suggesting that IL-22BP levels are not modulated by the state of inflammation. Blood eosinophils<sup>31</sup> do not express *IL22RA2* indicating that its expression is specifically induced by signals during their traffic to the intestine or in the intestine LP environment, the nature of which remaining to be identified.

Surprisingly, we did not detect higher levels of IL-22BP in IBD biopsies as compared to biopsies from normal tissue, but rather a large interindividual variability. Intriguingly, all CD biopsies with high levels of IL-22BP were harvested from active smokers patients both in ileal and colonic mucosa. Although the same observation was made in our small cohort of UC patients, these findings remain to be confirmed in larger number of samples. Moreover, some smokers do not have an increase in IL-22BP suggesting an immediate potential effect of tobacco on IL-22BP secretion. Although the exact mechanism remains unknown, but provides an additional argument for a damaging effect of smoking during CD.

## References

1. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 720–727 (2015).
2. Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641–1657 (2007).
3. Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 205–217 (2015).
4. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 39–49 (2018).
5. Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119–124 (2012).
6. Turpin, W., Goethel, A., Bedrani, L. & Croitoru MdcM, K. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 1133–1148 (2018).
7. Friedrich, M., Pohin, M. & Powrie, F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* **50**, 992–1006 (2019).
8. de Souza, H. S. P. & Fiocchi, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 13–27 (2016).
9. Andoh, A. *et al.* Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* **129**, 969–984 (2005).
10. Brand, S. *et al.* IL-22 is increased in active Crohn’s disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G827–838 (2006).
11. Geremia, A. *et al.* IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* **208**, 1127–1133 (2011).
12. Sabat, R., Ouyang, W. & Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 21–38 (2014).
13. Sugimoto, K. *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 534–544 (2008).
14. Zenewicz, L. A. *et al.* Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* **29**, 947–957 (2008).
15. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14**, 282–289 (2008).
16. Monteleone, G. *et al.* Phase I clinical trial of Smad7 knockdown using antisense oligonucleotide in patients with active Crohn’s disease. *Mol. Ther.* **20**, 870–876 (2012).

17. Couturier-Maillard, A. *et al.* Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii*-induced intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* **11**, 1181–1190 (2018).
18. Coorens, M. *et al.* Innate lymphoid cell type 3-derived interleukin-22 boosts lipocalin-2 production in intestinal epithelial cells via synergy between STAT3 and NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **294**, 6027–6041 (2019).
19. Lindemans, C. A. *et al.* Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* **528**, 560–564 (2015).
20. Gronke, K. & Diefenbach, A. Regenerative biology: Innate immunity repairs gut lining. *Nature* **528**, 488–489 (2015).
21. Hernandez, P., Gronke, K. & Diefenbach, A. A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur. J. Immunol.* **48**, 15–31 (2018).
22. Jiang, R. *et al.* IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* **13**, 59 (2013).
23. Kirchberger, S. *et al.* Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J. Exp. Med.* **210**, 917–931 (2013).
24. Kryczek, I. *et al.* IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* **40**, 772–784 (2014).
25. Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D. & Renauld, J. C. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol.* **166**, 7090–7095 (2001).
26. Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259–263 (2012).
27. Broquet, A. *et al.* Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Sci Rep* **7**, 11010 (2017).
28. Martin, J. C. *et al.* Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol.* **198**, 3671–3678 (2017).
29. Kleinschmidt, D. *et al.* A Protective Function of IL-22BP in Ischemia Reperfusion and Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J. Immunol.* **199**, 4078–4090 (2017).
30. Perriard, G. *et al.* Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J Neuroinflammation* **12**, 119 (2015).
31. Martin, J. C. *et al.* IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol* **9**, 539–549 (2016).
32. Pelczar, P. *et al.* A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* **354**, 358–362 (2016).

33. Martin, J. C. J. *et al.* Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol* **7**, 101–113 (2014).
34. Laaksonen, H. *et al.* The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes Immun.* **15**, 457–465 (2014).
35. Jinnohara, T. *et al.* IL-22BP dictates characteristics of Peyer’s patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J. Exp. Med.* **214**, 1607–1618 (2017).
36. Savage, A. K., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. The Development of Steady-State Activation Hubs between Adult LT $\alpha$  ILC3s and Primed Macrophages in Small Intestine. *J. Immunol.* **199**, 1912–1922 (2017).
37. Leonardi, I. *et al.* CX3CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science* **359**, 232–236 (2018).
38. Baratin, M. *et al.* T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* **47**, 349-362.e5 (2017).
39. Kempski, J. *et al.* IL22BP Mediates the Antitumor Effects of Lymphotoxin Against Colorectal Tumors in Mice and Humans. *Gastroenterology* **159**, 1417-1430.e3 (2020).
40. Fukaya, T. *et al.* Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation. *Front Immunol* **9**, 1418 (2018).
41. Guendel, F. *et al.* Group 3 Innate Lymphoid Cells Program a Distinct Subset of IL-22BP-Producing Dendritic Cells Demarcating Solitary Intestinal Lymphoid Tissues. *Immunity* **53**, 1015-1032.e8 (2020).
42. Shay, T. & Kang, J. Immunological Genome Project and systems immunology. *Trends Immunol* **34**, 602–609 (2013).
43. Ménoret, S. *et al.* Generation of Immunodeficient Rats With Rag1 and Il2rg Gene Deletions and Human Tissue Grafting Models. *Transplantation* **102**, 1271–1278 (2018).
44. Geißler, K. *et al.* Functional characterization of T-cells from palatine tonsils in patients with chronic tonsillitis. *PLoS One* **12**, e0183214 (2017).
45. Lim, C., Hong, M. & Savan, R. Human IL-22 binding protein isoforms act as a rheostat for IL-22 signaling. *Sci. Signal.* **9**, ra95–ra95 (2016).
46. Gómez-Fernández, P. *et al.* Long Interleukin-22 Binding Protein Isoform-1 Is an Intracellular Activator of the Unfolded Protein Response. *Front Immunol* **9**, 2934 (2018).
47. Schlecht, G., Mouriès, J., Poitrasson-Rivière, M., Leclerc, C. & Dadaglio, G. Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo. *International Immunology* **18**, 445–452 (2006).
48. Loktionov, A. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J Gastroenterol* **25**, 3503–3526 (2019).

49. Adar, T. *et al.* The Importance of Intestinal Eotaxin-1 in Inflammatory Bowel Disease: New Insights and Possible Therapeutic Implications. *Dig Dis Sci* **61**, 1915–1924 (2016).
50. Martin, J. C. *et al.* Single-Cell Analysis of Crohn’s Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* **178**, 1493–1508.e20 (2019).
51. Lindahl, H. *et al.* IL-22 Binding Protein Promotes the Disease Process in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **203**, 888–898 (2019).
52. Watchmaker, P. B. *et al.* Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* **15**, 98–108 (2014).
53. Lee, E. H., Yang, H. R. & Lee, H. S. Quantitative Analysis of Distribution of the Gastrointestinal Tract Eosinophils in Childhood Functional Abdominal Pain Disorders. *J Neurogastroenterol Motil* **24**, 614–627 (2018).
54. Matsushita, T. *et al.* The number and distribution of eosinophils in the adult human gastrointestinal tract: a study and comparison of racial and environmental factors. *Am J Surg Pathol* **39**, 521–527 (2015).
55. DeBrosse, C. W., Case, J. W., Putnam, P. E., Collins, M. H. & Rothenberg, M. E. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol* **9**, 210–218 (2006).

## Legends to figures:

### Figure 1: IL-22BP is expressed by human MNP and eosinophils but not T cells.

(A) *IL22RA2* expression was analysed by RT-qPCR on FACS-sorted MNP, eosinophils and T cells from LP and MLN CD tissues (n=5). For gut results, red circles correspond to inflamed mucosa and the black one to uninfamed mucosa. Concerning MLN graph, naïve lymphocytes refer to CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> cells while non-naïve to all the others. Each point represents the ratio of *IL22RA2* to HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) expression, as determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of relative quantification. (B)&(C) Fresh isolated T cells from LP and MLN CD tissues have been stimulated with media culture or PMA (50ng/m) + Ionomycine (250ng/mL). After 20 hours, *IL22RA2* and *IL2R $\alpha$*  gene expression were evaluated by RT-qPCR in resting and stimulated T cells. Each symbol represents one sample. Means comparisons of unpaired samples were performed using the Kruskal–Wallis test. P-value < 0,05 were considered statistically significant. CD: Crohn’s disease; DCs: dendritic cells, M0: macrophages; MLN: mesenteric lymph node, MNP: mononuclear phagocytes.

### Figure 2: IL-22BP level assessed using ELISA in monocytes-derived DCs.

Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs (moDCs) in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days. When indicated, ligands were added of culture. (A) On day 6, *IL22RA2* expression was analysed by quantitative RT–qPCR. Bars represent mean $\pm$ s.e.m. ratio of *IL22RA2* gene to *HPRT* expression as determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of relative quantification from n=11 independent experiments. (B) At day 6, supernatants were collected and frozen -80°C until measurement of IL-22BP level with ELISA. (C) Correlation between *IL22RA2* expression and IL-22BP protein levels. Means comparisons of paired samples were performed using the Wilcoxon test. Correlation were calculated using the Spearman rank correlation test. P-value < 0,05 were considered statistically significant. \*\*\*

p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05; moDCs: monocyte-derived dendritic cell; RA: retinoic acid; LPS: Lipopolysaccharide; TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

**Figure 3: IL-22BP deficient and sufficient CD45RC<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells promote the same colitis phenotype in *Il2rg*<sup>-/-</sup> rat.**

*Il2rg*<sup>-/-</sup> SPD rats (n=6) aged of 6 weeks were injected *via* the tail vein with 3.10<sup>6</sup> sorted TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells from *Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats or controls *Il22ra2*<sup>+/+</sup> littermates. Disease development was assessed by weight loss.

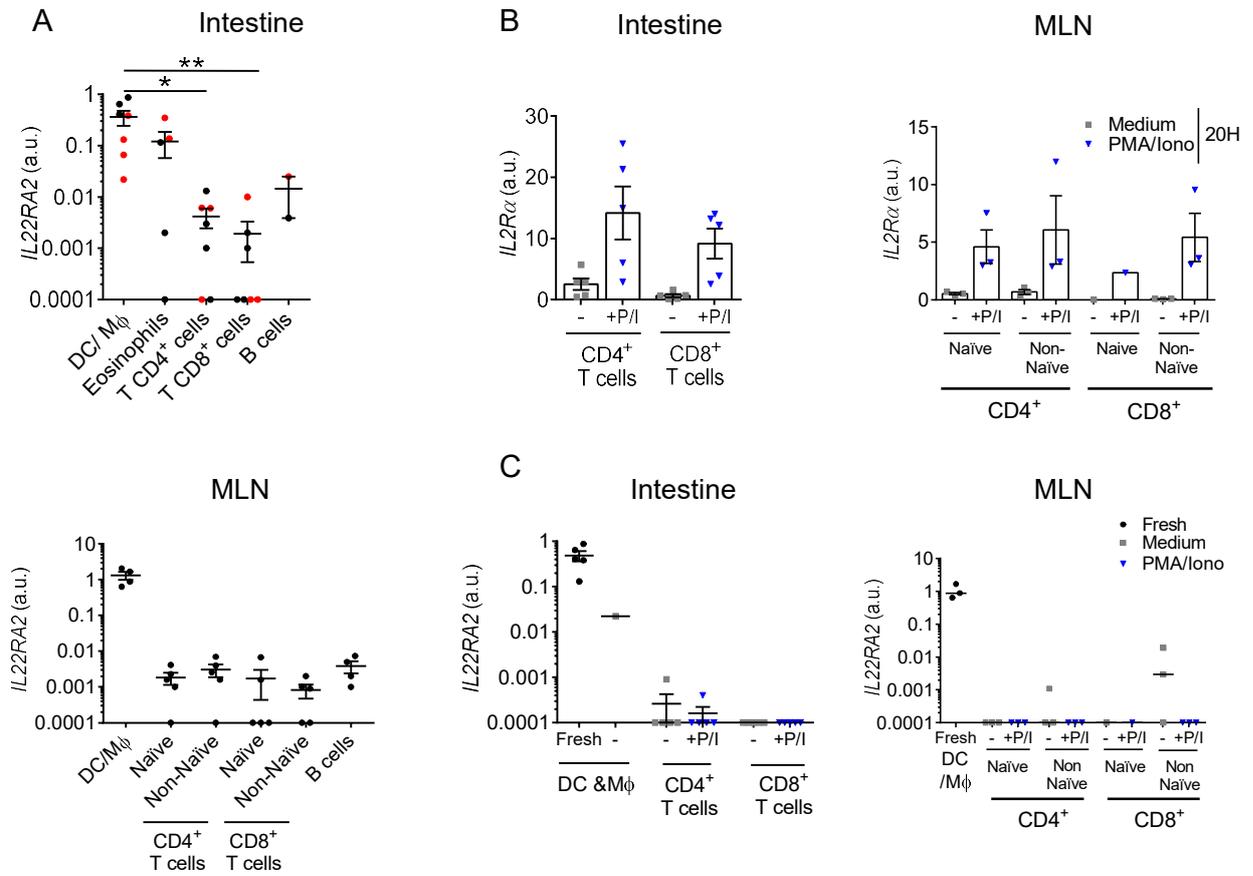
**Figure 4: In human gut tissue, IL-22BP levels are stronger in the ileum and correlate with those of eotaxin-2**

(A) ELISA assay of IL-22BP in 6 hours culture supernatants of biopsies from normal mucosa (He) (n=4 ileum and n=12 colons), CD mucosa (n=11 ileum and n=32 colons) and UC mucosa (n=6 colons) biopsies. (B) *IL22RA2* gene expression evaluated by RT-qPCR in fresh normal gut tissue (He) (n=7 ileum and n=15 colons), CD mucosa (n=14 ileum and n=10 colons) and UC mucosa (n= 10 colons). (C) Correlation between IL-22BP and eotaxin-2/TNF $\alpha$  protein levels measured in 6 hours culture supernatants of biopsies from normal and CD tissues. Each symbol represents one sample. Means comparisons of unpaired samples were performed using the Mann Whitney test. Correlation were calculated using the Spearman rank correlation test. P-value < 0,05 were considered statistically significant. \*\*\* p<0,001; \* p<0,05 n.s: non-significant. He: normal tissue; CD- Crohn's disease; UC: ulcerative colitis.

**Figure 5: Higher IL-22BP levels are observed in CD-smokers without correlating with mucosal inflammation.**

**(A)** ELISA assay of IL-22BP in 6 hours culture supernatant of biopsies from CD gut mucosa (n=11 ileum and n=32 colons) according to smoking status. Means comparisons of unpaired samples were performed using the Mann Whitney test. P-value < 0,05 were considered statistically significant. \* p<0,05; n.s: non-significant. CD- Crohn's disease. **(B)** Heatmap of chemokine and cytokine protein assays in culture supernatants of biopsies from CD colonic mucosa (n=29 colons).

# FIGURE 1

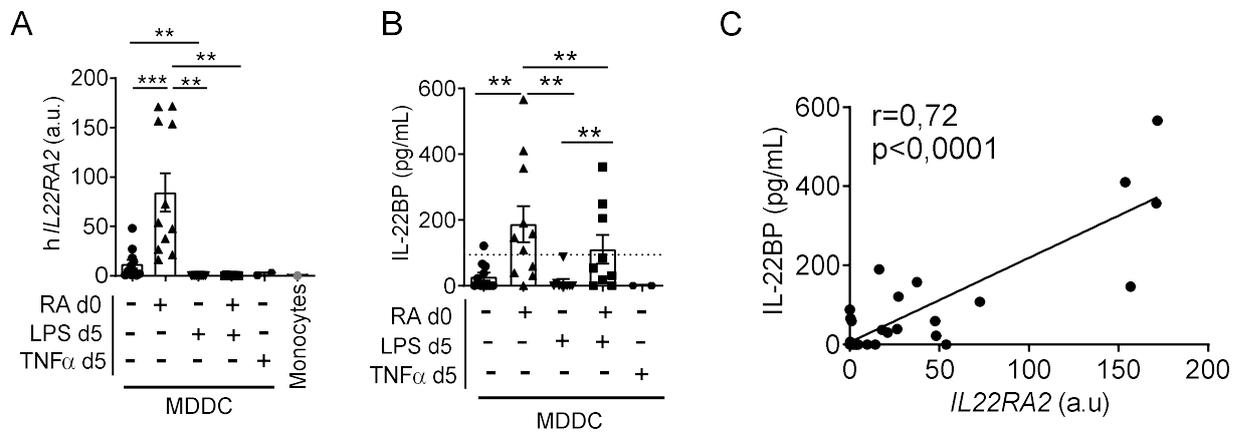


**Figure 1: IL-22BP is expressed by human MNP and eosinophils but not T cells.**

(A) *IL22RA2* expression was analysed by RT-qPCR on FACS-sorted MNP, eosinophils and T cells from LP and MLN CD tissues (n=5). For gut results, red circles correspond to inflamed mucosa and the black one to uninfamed mucosa. Concerning MLN graph, naïve lymphocytes refer to CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> cells while non-naïve to all the others. Each point represents the ratio of *IL22RA2* to HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) expression, as determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of relative quantification. (B)&(C) Fresh isolated T cells from LP and MLN CD tissues have been stimulated with media culture or PMA (50ng/m) + Ionomycine (250ng/mL). After 20 hours, *IL22RA2* and *IL2Rα* gene expression were evaluated by RT-qPCR in resting and stimulated T cells. Each symbol represents one sample. Means comparisons of unpaired samples were performed using the Kruskal–Wallis test. P-value < 0,05

were considered statistically significant. CD: Crohn's disease; DCs: dendritic cells, M0: macrophages; MLN: mesenteric lymph node, MNP: mononuclear phagocytes.

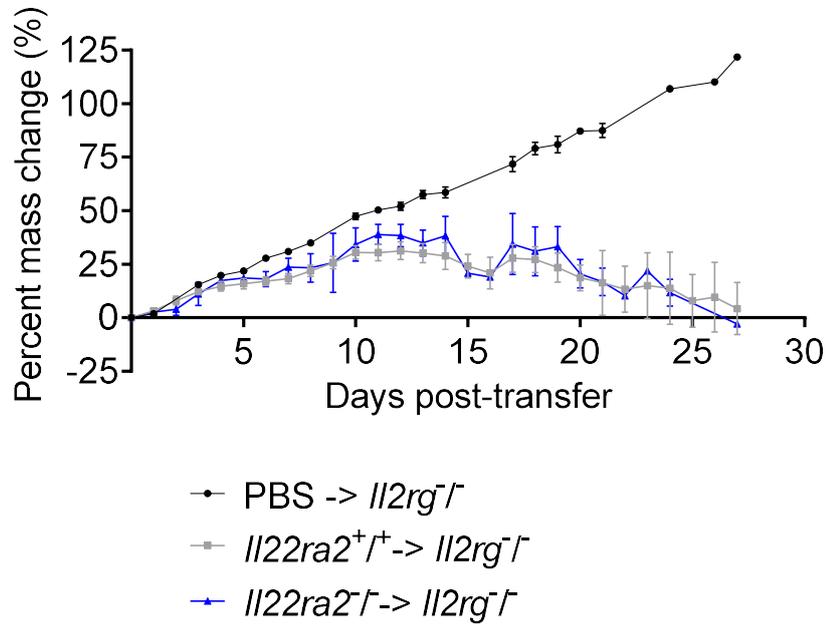
## FIGURE 2



**Figure 2: IL-22BP level assessed using ELISA in monocytes-derived DCs.**

Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs (moDCs) in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days. When indicated, ligands were added of culture. **(A)** On day 6, *IL22RA2* expression was analysed by quantitative RT-qPCR. Bars represent mean $\pm$ s.e.m. ratio of *IL22RA2* gene to *HPRT* expression as determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method of relative quantification from n=11 independent experiments. **(B)** At day 6, supernatants were collected and frozen  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement of IL-22BP level with ELISA. **(C)** Correlation between *IL22RA2* expression and IL-22BP protein levels. Means comparisons of paired samples were performed using the Wilcoxon test. Correlation were calculated using the Spearman rank correlation test. P-value  $< 0,05$  were considered statistically significant. \*\*\* p $<0,001$ ; \*\* p $<0,01$ ; \* p $<0,05$ ; moDCs: monocyte-derived dendritic cell; RA: retinoic acid; LPS: Lipopolysaccharide; TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

**FIGURE 3**



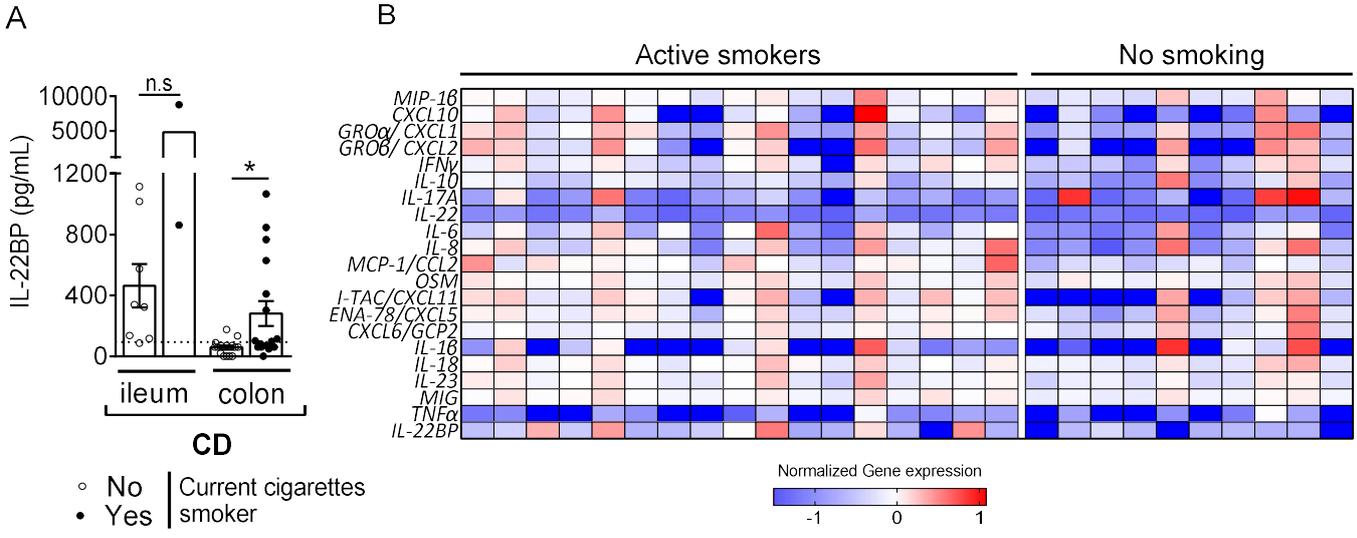
**Figure 3: IL-22BP deficient and sufficient CD45RC<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells promote the same colitis phenotype in *Il2rg*<sup>-/-</sup> rat.**

*Il2rg*<sup>-/-</sup> SPD rats (n=6) aged of 6 weeks were injected *via* the tail vein with  $3 \cdot 10^6$  sorted TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> T cells from *Il22ra2*<sup>-/-</sup> rats or controls *Il22ra2*<sup>+/+</sup> littermates. Disease development was assessed by weight loss.



P-value < 0,05 were considered statistically significant. \*\*\* p<0,001; \* p<0,05 n.s: non-significant. He: normal tissue; CD- Crohn's disease; UC: ulcerative colitis.

# FIGURE 5



**Figure 5: Higher IL-22BP levels are observed in CD-smokers without correlating with mucosal inflammation.**

(A) ELISA assay of IL-22BP in 6 hours culture supernatant of biopsies from CD gut mucosa (n=11 ileum and n=32 colons) according to smoking status. Means comparisons of unpaired samples were performed using the Mann Whitney test. P-value < 0,05 were considered statistically significant. \* p<0,05; n.s: non-significant. CD- Crohn’s disease. (B) Heatmap of chemokine and cytokine protein assays in culture supernatants of biopsies from CD colonic mucosa (n=29 colons).

## Supplementary Table

**Table 1: Clinical data**

	<b>CD (n=5)</b>
<b>Sex (F/M)</b>	(4/1)
<b>Age (years)*</b>	48 ± 21.0
<b>Disease evolution (years)*</b>	18 ± 14.5
<b>Smoking (yes/no)</b>	(n.d for 1; 1/4)
<b>Involvement</b>	
<i>ileum</i>	2
<i>colon</i>	0
<i>ileum + colon</i>	3
<b>Phenotype</b>	
<i>B1</i>	0
<i>B2</i>	3
<i>B3</i>	1
<i>B2B3</i>	1
<b>Ongoing medications</b>	
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math></i>	2
<i>Immunosuppressants</i>	1
<i>Anti-IL-23</i>	1
<i>Absence</i>	1

\*mean±sd, n.d: not done

**Table 2: Clinical data**

	<b>CD (n=3)</b>
<b>Sex (F/M)</b>	(1/2)
<b>Age (years)*</b>	28 ± 2.9
<b>Disease evolution (years)*</b>	6 ± 2.8
<b>Smoking (yes/no)</b>	(n.d for 1; 0/2)
<b>Involvement</b>	
<i>ileum</i>	2
<i>colon</i>	0
<i>ileum + colon</i>	1
<b>Phenotype</b>	
<i>B1</i>	2
<i>B2</i>	1
<i>B3</i>	
<i>B2B3</i>	
<b>Ongoing medications</b>	
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math></i>	2
<i>Immunosuppressants</i>	1
<i>Anti-IL-23</i>	
<i>Absence</i>	

\*mean±sd, n.d: not done

**Table 3: Clinical data**

LOCALIZATION	Controls		CD		UC
	ILEUM [n=4]	COLON [n=12]	ILEUM [n=11]	COLON [n=32]	COLON [n=6]
<b>Sex (F/M)</b>	-	-	(8/3)	15/17	(3/3)
<b>Age (years)*</b>	-	-	37 ± 7.6	33 ± 12.5	46.5 ± 15.6
<b>Disease evolution (years)*</b>	-	-	15 ± 9.8	8 ± 7,3	6 ± 4.6
<b>Smoking (y/n)</b>	-	-	(2/9)	(17/15)	(3/3)
<b>Involvement CD</b>					
<i>ileum</i>			6	5	
<i>colon</i>			0	5	
<i>ileum + colon</i>			5	22	
<b>Involvement UC</b>					
<i>left side</i>					1
<i>distal</i>					0
<i>pancolitis</i>					5
<b>Ongoing medications</b>					
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math></i>			3	13	3
<i>Immunosuppressants</i>			2	5	1
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math>+IS</i>			2	5	1
<i>Anti-integrin</i>			0	4	1
<i>Absence</i>			4	4	0

\*mean±sd

**Table 4: Clinical data**

LOCALIZATION	Controls		CD		UC
	ILEUM [n=4]	COLON [n=12]	ILEUM [n=14]	COLON [n=10]	COLON [n=10]
<b>Sex (F/M)</b>	-	-	(9/5)	6/4	(2/8)
<b>Age (years)*</b>	-	-	42± 11.8	36 ± 13.7	41 ± 11.6
<b>Disease evolution (years)*</b>	-	-	10± 7.5	9 ± 7,8	6.2 ± 3.5
<b>Smoking (y/n)</b>	-	-	(6/8)	(5/5)	(0/10)
<b>Involvement CD</b>					
<i>ileum</i>			6	0	
<i>colon</i>			0	3	
<i>ileum + colon</i>			8	7	
<b>Involvement UC</b>					
<i>left side</i>					1
<i>distal</i>					4
<i>pancolitis</i>					5
<b>Ongoing medications</b>					
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math></i>			7	2	4
<i>Immunosuppressants</i>			4	1	2
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math>+IS</i>			2	3	1
<i>5-ASA</i>			1	4	2
<i>Absence</i>			0	0	1

\*mean±sd

**Table 5: List of probes used in the study.**

<b>Target</b>	<b>Gene</b>	<b>Reference</b>	<b>Furnisher</b>
hIL-22BP	<i>IL22RA2</i>	Hs00364814_m1	Applied Biosystems
hCD25	<i>IL2RA</i>	Hs00907777_m1	Applied Biosystems
hHPRT	<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1	Applied Biosystems

**Table 6: IL-22BP protein assay in culture supernatant of fresh sorted cells from CD LP**

Fresh sorted DCs (HLA DR<sup>+</sup>, CD11C<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>), eosinophils and T cells from CD ileum mucosa were cultured (40 000 cells per well) in media culture. After 20 hours, IL-22BP protein level was evaluated in the culture supernatant using ELISA. Data are representative of three independent experiments on 3 different donors. IL-22BP dosages are expressed in pg/mL and values below the detection limit, according to the supplier's instructions, are reported as <94pg/mL. n.d: not done.

<b>CD-LP</b>	<b>DCs</b>	<b>Eosinophils</b>	<b>T cells</b>
<b>Inflamed Ileum#1</b>	n.d	321	<94
<b>Inflamed Ileum#2</b>	<94	<94	<94
<b>Inflamed Ileum#3</b>	<94	<94	<94

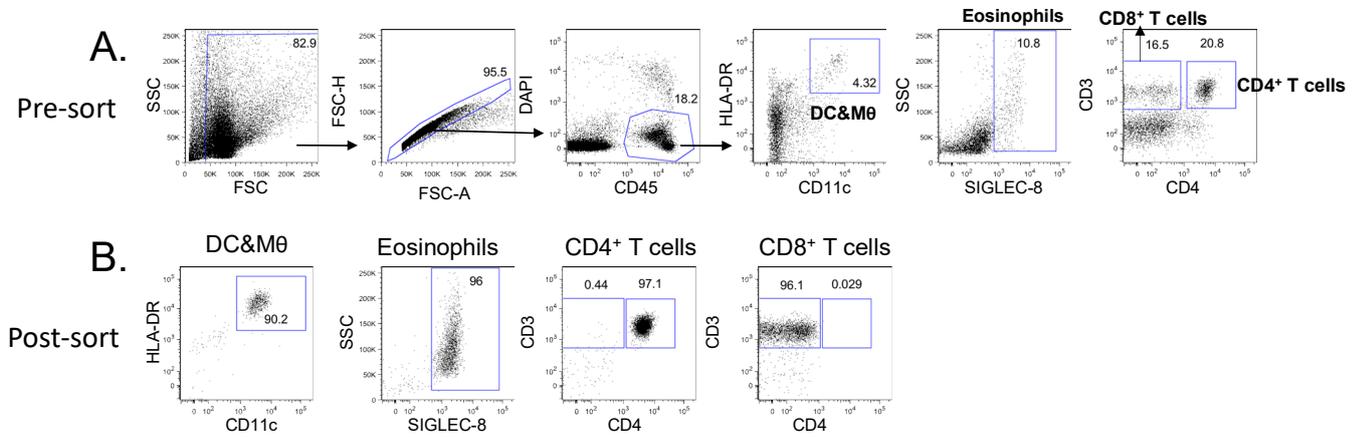
**Table 7: IL-22NP and IFN $\gamma$  protein assays in culture supernatant of fresh sorted T cells from CD LP.**

Fresh isolated CD4<sup>+</sup> T cells (100 000 cells per well) from CD mucosa have been stimulated with media culture or PMA (50ng/mL) + Ionomycine (250ng/mL). After 20 hours, IL-22BP and IFN $\gamma$  secretion were evaluated in the supernatant using Elisa. Data are representative of five independent experiments on 3 different donors. IL-22BP dosages are expressed in pg/mL and values below the detection limit, according to the supplier's instructions, are reported as < 94pg/mL. Similarly, IFN $\gamma$  dosages are expressed in pg/mL and values below the detection limit, according to the supplier's instructions, are reported as < 17pg/mL. n.d: not done.

CD LP	CD4 <sup>+</sup> T cells			
	medium		PMA+Ionomycine	
	IFN $\gamma$ (pg/mL)	IL-22BP (pg/mL)	IFN $\gamma$ (pg/mL)	IL-22BP (pg/mL)
<b>Uninflamed colon-CD#1</b>	<17	<94	8946	<94
<b>Inflamed colon-CD#1</b>	<17	<94	2060	<94
<b>Uninflamed ileum-CD#2</b>	<17	<94	36275	<94
<b>Inflamed ileum-CD#2</b>	<17	<94	6138	<94
<b>Uninflamed colon-CD#3</b>	<17	<94	23440	<94

# Supplementary Results

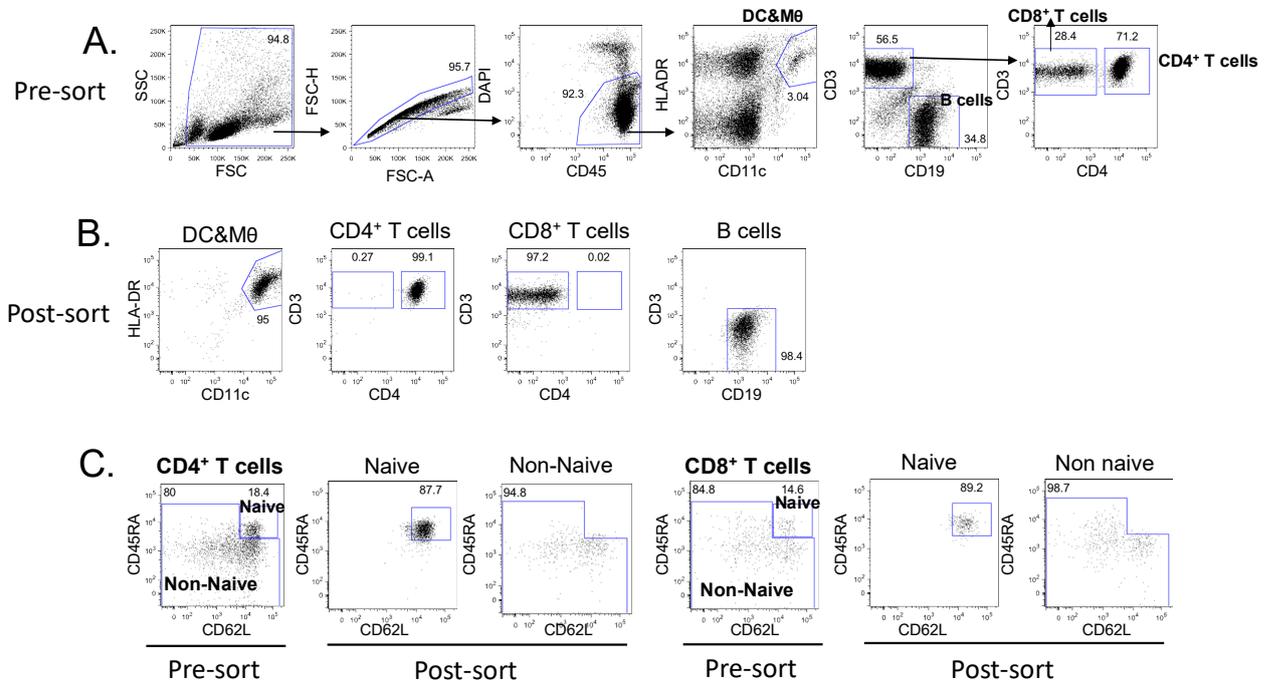
## Supp Figure 1



### Supplementary Figure 1: Purity of isolated LP cells from CD patients.

(A) In human gut, eosinophils, MNP, B and T cells were sorted using the indicated gating strategies. (B) Purity was assessed on sorted cells (eosinophils, MNP, T and B cells) by using the same gating strategies and was > 90%.

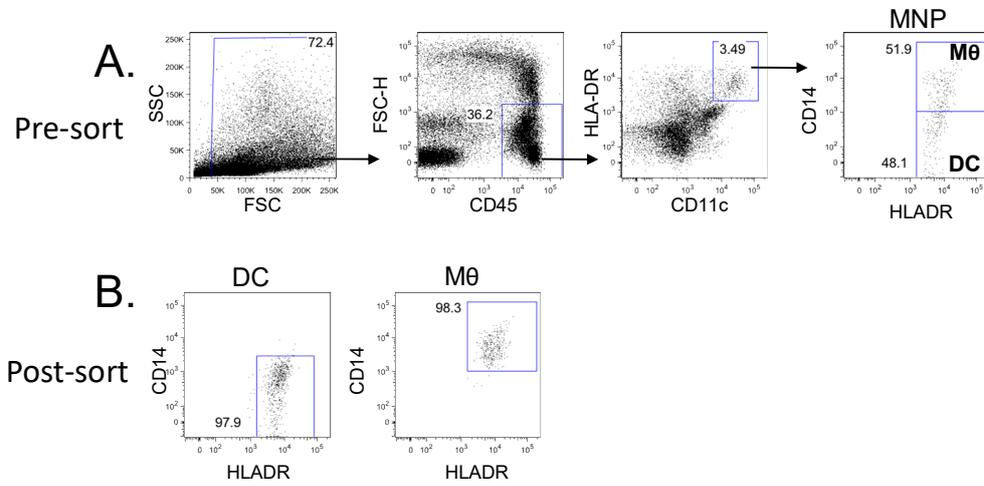
## Supp Figure 2



### Supplementary Figure 2: Purity of isolated MLN cells from CD patients.

(A) In human MLN, DC, B and T cells (naïve and non-naïve phenotype) were sorted using the indicated gating strategies. (B) Purity was assessed on sorted cells (MNP, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells (naïve and non-naïve fractions), B cells) by using the same gating strategies and was > 85%.

## Supp Figure 3



### Supplementary Figure 3: Purity of FACS-sorted DCs from LP CD tissues.

(A) In human gut, DCs and macrophages (M0) were sorted using the indicated gating strategies.

(B) Purity was assessed on sorted cells by using the same gating strategies and was > 85%.

## Partie II: Impact de l'IL-22BP sur le programme moléculaire induit par les cytokines IL-22 et IL-17 au cours de la maladie de Crohn.

### Résumé :

Les interleukines 22 et 17 agissent sur les CEI et renforcent les propriétés de barrière en induisant l'expression de PAMs, de protéines de jonctions serrées mais aussi les mécanismes de réparation et de renouvellement de l'épithélium. Au cours, des MICI, l'affaiblissement de l'épithélium intestinal provoque l'induction de réponses immunes souvent non résolues, qui deviennent chroniques et responsables du tableau clinique. Ainsi dans un but de développer de nouvelles pistes de traitement, nous avons émis l'hypothèse que renforcer les réponses induites par l'IL-22 et l'IL-17 pourraient constituer une stratégie intéressante.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé une technique de mise en culture *ex-vivo* de biopsies de muqueuse colique que nous avons stimulées avec différentes cytokines afin de mimer la situation dans l'intestin, avant de les analyser en *bulk-RNAseq*. Les données transcriptomiques obtenues nous ont permis d'identifier un programme moléculaire largement induit par l'IL-22 et l'IL-17. Au sein de ce programme, nous avons caractérisé les signaux régulant l'expression des gènes : effet cytokinique isolé, effet d'addition ou de synergie. Nous avons évalué les niveaux d'expression des gènes appartenant au programme au sein des muqueuses inflammatoires de patients MICI et ainsi identifié une expression incomplète chez certains patients. Nous avons cherché à identifier les mécanismes à l'origine de cette induction non optimale au cours des MICI. Nous avons montré que les niveaux intestinaux d'IL-22 et d'IL-17 jouaient un rôle prépondérant dans l'induction correcte du programme et que l'addition de ces cytokines dans le milieu de culture des biopsies MC permettait de le restaurer *ex-vivo*. Finalement, nous avons montré que l'IL-22BP, exprimé dans les muqueuses inflammatoires MICI, bloquait *via* l'inhibition de l'IL-22, l'induction correcte du programme moléculaire impliqué dans le renforcement des barrières intestinales, suggérant ainsi qu'il serait intéressant de le moduler au cours des poussées de MC.

## INTRODUCTION

La muqueuse épithéliale tapissant le tractus digestif joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. D'un point de vue immunologique, son rôle est double puisqu'elle doit à la fois permettre la mise en place d'un équilibre avec le microbiote intestinal et les antigènes alimentaires, tout en conservant la capacité de monter une réponse inflammatoire efficace pour résoudre les infections par des microorganismes pathogènes (Belkaid and Harrison, 2017). La régulation de ces fonctions est possible grâce à la présence d'un réseau cellulaire spécialisé dans l'intestin, intégrant notamment différentes populations de cellules épithéliales intestinales (CEI) en contact direct avec la lumière, des populations de cellules mésenchymateuses et de cellules immunitaires dont les fonctions se sont adaptées aux contraintes spécifiques auxquelles elles doivent faire face dans l'intestin (Bessman and Sonnenberg, 2016b). Les jonctions apicales serrées entre CEI adjacentes ainsi que les sécrétions de mucus et de protéines antimicrobiennes (PAMs) assurées respectivement par les cellules de goblet et les cellules de Paneth, contribuent à l'établissement de la barrière épithéliale essentielle au maintien de l'équilibre entre la flore commensale et l'hôte (Hancock et al., 2016b; Johansson and Hansson, 2016b).

Les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal sont activement régulées par le système immunitaire (SI) muqueux particulièrement lorsque celles-ci doivent être renforcées comme lors d'une infection. Cette régulation est en grande partie médiée par la sécrétion de cytokines capables d'agir sur les cellules épithéliales et dont la production est accrue lors de la réponse inflammatoire associée à l'infection. Parmi celles-ci, l'IL-22 et l'IL-17 semblent jouer des rôles majeurs dans le renforcement des propriétés de barrière et la cicatrisation de l'épithélium lésé (Sonnenberg et al., 2011b). Les productions intestinales d'IL-22 et d'IL-17 sont principalement induites en conditions inflammatoires par l'IL-23 produite par des populations de phagocytes mononucléés activés (Geremia et al., 2011). Les données sur les réponses épithéliales induites par ces cytokines, bien que nombreuses, proviennent majoritairement de modèles murins. L'IL-22 induit la production de PAMs afin de contrôler l'infection intestinale induite expérimentalement chez des souris par *C. rodentium* (Wang et al., 2019; Zheng et al., 2008b), *Salmonella* (Lo et al., 2019), *Toxoplasma gondii* (Couturier-Maillard et al., 2018b) ou encore *C. albicans* (De Luca et al., 2010). L'IL-22 favorise la cicatrisation épithéliale et limite les translocations bactériennes au cours des modèles de colites inflammatoires induites par le

DSS (Sugimoto et al., 2008b; Zenewicz et al., 2008; Zindl et al., 2013) et par transfert de lymphocytes T CD45RB<sup>hi</sup> CD25<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> à des souris dépourvues de système immunitaire adaptatif (Zenewicz et al., 2008). Cependant certaines études ont rattaché à l'IL-22 des rôles délétères non associés à la résolution de l'épisode inflammatoire comme l'induction de métalloprotéinases au cours d'une infection intestinale à *T.gondii* (Muñoz et al., 2009) avec une dose infectante largement supérieure en comparaison à l'équipe de Couturier et al., ou encore une prolifération accrue des CEI pouvant conduire à l'apparition d'une fibrose des tissus au cours d'un modèle adaptatif par transfert de Ly effecteurs CD45RB<sup>low</sup> (Kamanaka et al., 2011) suggérant ainsi qu'en cas d'inflammation les actions de l'IL-22 doivent être finement régulées. Malgré sa capacité à entretenir les réponses inflammatoires, notamment à travers le recrutement et l'activation de PNN (Miossec and Kolls, 2012), le blocage de l'IL-17 seule est néanmoins caractérisé par une majoration de la sévérité de la colite dans les modèles de colite induite au DSS (Lee et al., 2015b; Ogawa et al., 2004b; Song et al., 2015) ou par *H.bilis* chez des souris *Abcba1a*<sup>-/-</sup> (Maxwell et al., 2015). Cet effet délétère s'explique par une altération de la perméabilité de la barrière intestinale dû à une perte de la signalisation de la cytokine sur les CEI (Lee et al., 2015; Maxwell et al., 2015). De manière intéressante, les données disponibles dans la peau suggèrent que les actions biologiques de l'IL-22 et de l'IL-17 sur les kératinocytes sont particulièrement dépendantes d'actions synergiques (Liang et al., 2006b). Des actions combinées de ces 2 cytokines favorisant le stress du réticulum endoplasmique (RE) ont été récemment suggérées au cours d'un modèle d'organoïdes générées à partir de cellules souches intestinales (CSI) murines et stimulés pendant 24h avec de fortes concentrations d'IL-22 et d'IL-17 (Powell et al., 2020). Le rôle de l'IL-22 et de l'IL-17 sur la régulation des propriétés de la barrière épithéliale intestinale humaine reste cependant peu caractérisé, particulièrement dans un contexte tissulaire plus physiologique préservant la structure polarisée des CEI et les signaux qu'elles peuvent intégrer en réponse à des interactions cellulaires complexes impliquant également les cellules stromales et immunitaires.

Il est actuellement proposé que la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) repose sur l'induction de réponses inflammatoires intestinales dérégulées et initiées en réponse au passage des microorganismes commensaux dans la *lamina propria* (LP). Cette translocation bactérienne est favorisée par des facteurs environnementaux chez des individus prédisposés génétiquement et participe à une perte de l'équilibre normalement

établi entre le microbiote intestinal et l'hôte (de Souza and Fiocchi, 2016a). Il est ainsi suggéré que les patients atteints de MICI présentent une altération de fonctions de barrière assurées par l'épithélium intestinal avec notamment une diminution de l'expression des PAMs et des protéines assurant les jonctions apicales serrées (Klag et al., 2013) ainsi qu'une déplétion des cellules de goblet (Johansson et al., 2014) et une perte de capacités d'auto-renouvellement assurées par les CSI (Khor et al., 2011). Ces altérations des fonctions de barrière induites par les PAMs seraient particulièrement prononcées au cours de la MC en regard de la RCH (Fahlgren et al., 2004; Schmid et al., 2007; Wehkamp et al., 2002, 2003). Ces anomalies s'accompagnent d'une altération des processus d'autophagie dans les CEI (Khor et al., 2011) et d'un appauvrissement de la flore commensale (Turpin et al., 2018).

La prise en charge thérapeutique des MICI cherche avant tout à bloquer les réponses inflammatoires responsables des dommages tissulaires et entretenues par ces déficits de la barrière intestinale. Porté par le succès majeur des anticorps anti-TNF (Sands et al., 2004), le blocage de cytokines inflammatoires s'est maintenant étendu à l'IL-12p40 (chaîne commune entre IL-12 et IL-23) (Feagan et al., 2016) et à l'IL-23p19 (chaîne spécifique de l'IL-23) (Feagan et al., 2017; Sands et al., 2017) ainsi qu'aux voies de signalisation induites par plusieurs cytokines lors de l'activation de leurs récepteurs (inhibiteurs JAK1/3) (Sandborn et al., 2017). L'efficacité de ces thérapies ciblées reste néanmoins limitée à un sous-groupe de patients (Ollsch et al., 2021; Shmidt et al., 2018) et de nombreux essais cliniques évaluant le blocage d'autres cytokines candidates ont échoué (Braat et al., 2003; Feagan et al., 2018a; Panés et al., 2017). Le blocage de l'IL-17, a même aggravé la maladie chez certains patients atteints de MC (Hueber et al., 2012a), probablement du fait d'une majoration de la perméabilité intestinale ainsi qu'observée chez la souris mais non anticipée lors de la conception de l'essai clinique (Lee et al., 2015; Maxwell et al., 2015).

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent donc que l'efficacité des propriétés de barrière de l'épithélium intestinal des tissus inflammatoires de patients atteints de MICI soit, au moins en partie, régulée par l'action de cytokines produites par le système immunitaire dont l'IL-17 et l'IL-22. Une meilleure caractérisation des actions biologiques exercées par ces deux cytokines sur la barrière intestinale humaine et de leur régulation au cours des MICI pourrait donc offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur le renforcement de propriétés barrières qu'elles contrôlent, pouvant ainsi compléter les stratégies visant à enrayer le processus inflammatoire.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé les actions biologiques contrôlées par l'IL-22 et IL-17 sur la muqueuse intestinale humaine en analysant les modifications transcriptomiques induites par ces cytokines sur des biopsies coliques de témoins sains cultivées *ex vivo*. Nous avons ensuite évalué l'expression du programme moléculaire dépendant directement de ces cytokines dans des tissus inflammatoires de patients atteints de MICI. Nous avons observé une expression incomplète de ce programme chez un sous-groupe de patients associée à une moindre induction d'expressions de l'IL-22 et l'IL-17 dans leur muqueuse inflammatoire. Nous avons démontré que nous pouvions restaurer l'expression de ce programme moléculaire par la stimulation directe de colons inflammatoires de patients atteints de MC. Enfin, nous avons démontré que l'IL-22BP, l'inhibiteur naturel de l'IL-22 dont l'expression est augmentée au cours des MICI, inhibait fortement l'induction de la réponse moléculaire contrôlée par l'IL-17 et l'IL-22 sur la muqueuse inflammatoire colique.

## **MATERIELS ET METHODES.**

### **Cohorte de patients**

Les patients inclus dans l'étude font partie de la cohorte de patients suivie par le Service de Gastroentérologie de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD) au CHU de Nantes, (collaboration Dr A. Bourreille). Les prélèvements biopsiques sont issus de la biocollection de l'IMAD déclarée auprès du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. Le numéro d'agrément est le DC-2008-402. La biocollection a été intégrée dans le CRB de Nantes. Les patients sont invités à participer à cette biocollection et en cas d'accord signent une lettre d'information et de consentement. L'ensemble des documents est conservé au CIC.

- Cohorte rétrospective

Dans le cadre de cette collaboration, les ARNm de 17 et 22 patients atteints de MC et RCH, respectivement, ont été analysés de façon rétrospective (**Tableau 4**). Pour ces échantillons, la biocollection de l'IMAD disposait de biopsies de muqueuses coliques appariées en zone saine et zone inflammatoire. Différents critères notamment l'âge, le sexe, la durée d'évolution de la maladie, la localisation ainsi que le traitement de fond ont été utilisés afin de composer deux groupes comparables d'un point de vue statistique. En parallèle de ces prélèvements, nous avons eu aussi accès à des biopsies de 16 patients pour lesquels une endoscopie a été réalisée dans le cadre de surveillance de dysplasies ou de CRC.

- Cohorte prospective

Les mêmes critères ont été mis en œuvre pour une cohorte prospective de patients MC, pour lesquels nous avons pu disposer de biopsies coliques fraîches prélevées de préférence en zone inflammatoire. Ainsi, nous avons pu recruter 32 patients MC et en parallèle 8 contrôles sains (**Tableau 5**). Pour les tissus coliques sains, il s'agit de biopsies prélevées, au cours de chirurgie de CRC, au niveau des zones saines localisées 10 cm en aval de la tumeur.

### **Culture *ex-vivo* de biopsies humaines intestinales**

La mise en culture des biopsies coliques a été possible grâce au protocole mis au point et validé par notre collaboratrice Dr Anne Jarry (CRCINA, U892) (Jarry et al., 2015). Ainsi, brièvement, les biopsies sont mises en culture, épinglées pôle apical sur le dessus, dans des boîtes de Pétri (D. Dutscher®) recouvertes de Sylgard (VWR®) et dans lesquelles des puits ont été creusés. Le milieu de culture contenait du Ham/RPMI glutamax (1:1 vol/vol) dépourvu de sérum, BSA 0.01%, pénicilline et streptomycine (200µg/mL- Gibco ref 15140-122) et de la

fungizone (0,25ug/ml - Gibco ref 15290-026). Différentes conditions cytokiniques ont été évaluées : IL-22 [100ng/mL, Miltenyi, 130-096-295], IL-17 [100ng/mL, Miltenyi, 130-093-959], IL-22BP [331 ng/mL, R&D Systems, 8498-BP-025]. Les biopsies ont été stimulées à 37°C sous une agitation douce (40 rpm) et dans une atmosphère humide contenant 5% de dioxyde de carbone. Après 6h de culture, les biopsies ont été récupérées dans des tubes FastPrep®-24(MP-BIOMEDICALS) contenant 1mL de TRIzol ainsi que les surnageants puis conservées à -80°C en attendant leur utilisation.

### **RT-PCR quantitative en temps réel.**

Après une étape de broyage des biopsies à l'aide de l'automate Precellys® et d'une extraction de l'ARNm (technique TRIzol), la transcription inverse a été réalisée en utilisant la Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen) concentrée à 10U/10µL, avec 25µL/mL d'oligodT pdT24 (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. Un volume de 4 µL d'ADN complémentaire (ADNc), dilué au 1/5, a été amplifié dans 16µL de mix PCR contenant 1µL de sondes 20X et 10µL de tampon TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) (**Tableau 6** pour la liste complète des sondes). La PCR est ensuite réalisée dans le thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems). Pour chaque gène étudié un cycle seuil (Ct) a été déterminé, puis la méthode de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a été employée pour évaluer l'expression relative des gènes en unités arbitraires (u.a).

### **3' DGE RNA-sequencing**

Le protocole de séquençage 3' digital gene expression (DGE) RNA sequencing a été réalisé comme précédemment décrit (Cacchiarelli et al., 2015) sur les ARNm extraits de biopsies coliques stimulées *ex-vivo* de patients MC (n=20) et de contrôles sains (n=8) (**Tableau 5**). Ainsi, les bibliothèques ont été préparées à partir de 10 ng d'ARNm. Puis les queues poly-A des ARNm ont été marquées avec des adaptateurs universels orientés et des barcodes spécifiques de l'échantillon (unique molecular identifiers (UMIs)) afin de permettre un multiplexage de plusieurs échantillons. Après une étape d'amplification, les cDNA contenant leur barcode unique en référence à un échantillon, ont été fragmentés selon une approche permettant un enrichissement de la région 3' des cDNA. Une bibliothèque de cDNA de taille comprise entre 350-800 pb a ensuite été séquencée sur l'automate Illumina HiSeq 2500 (TruSeq Rapid SBS Kit). Après une exploration de la qualité des séquences générées, ces dernières ont été alignées

sur le génome de référence humain (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) *via* la version 0.7.15 de bwa. Une première étape d'analyse en composante principale (ACP) (package *stats* (v4.0.2)) ainsi que du calcul du Z-score modifié a permis d'éliminer les « outliers » : échantillons sensiblement éloignés de ceux partageant la même condition expérimentale. Après une étape de normalisation, les gènes différentiellement exprimés (gènes DE) entre chaque condition expérimentale ont ensuite été déterminés à l'aide du package *DESeq2* (v1.28.1). La méthode de normalisation est une transformation stabilisatrice de variance (Variance Stabilizing Transformation) exécutée grâce à la fonction *vst()* de *DESeq2*. Pour les échantillons provenant de séries de séquençage différents, cette métadonnée a été ajoutée en covariable dans le modèle de *DESeq2*. Ainsi, un gène est considéré comme DE si son *fold change* est strictement supérieur ou strictement inférieur à 0 et sa *p-value* ajustée ( $p_{\text{adjust}}$ ) inférieure à 0.05. Les heatmaps ont été construites *via* le package (*ComplexHeatmap*, v2.4.3) et l'utilisation d'une fonction du package *Limma* (v3.44.3) a permis de s'affranchir de l'effet batch. Enfin à l'aide du package *fgSEA* (v1.14.0), un enrichissement de réseaux de gènes appartenant aux bases de données KEGG, Reactom, Gene Ontology (GO) Biological Process, GO Molecular Function et GO Cellular Component est calculé pour chacune des listes de gènes DE.

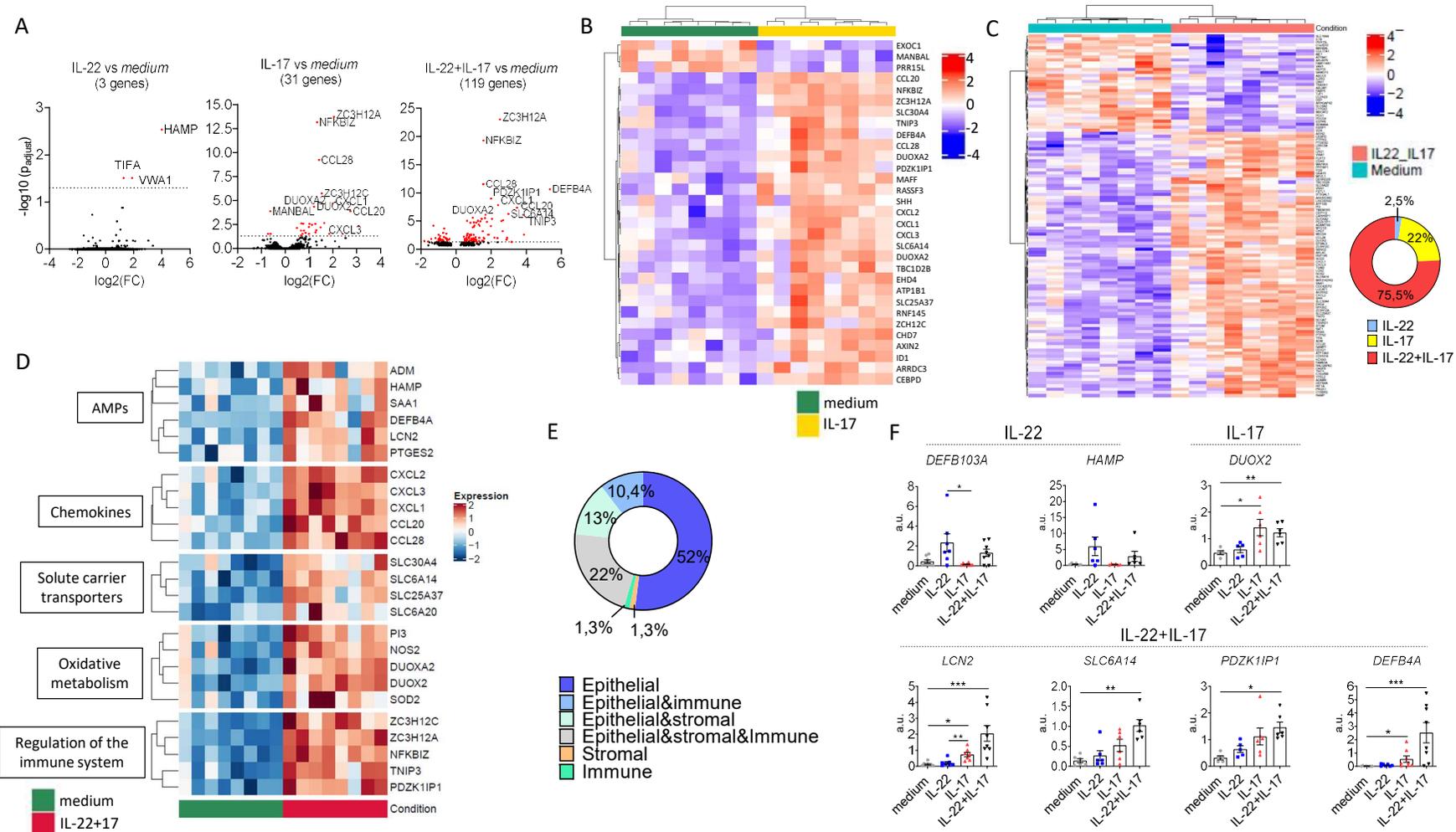
### **Statistiques**

Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism Software® (GraphPad Software, San Diego, CA). Le test non paramétrique de Mann-Whitney nous a permis de comparer deux échantillons indépendants de petite taille. Pour plus d'échantillons, le test de Kruskal-Wallis a été employé. Pour des échantillons appariés, nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

## RESULTATS

### Identification d'un programme de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale dépendant de la combinaison des cytokines IL-22 et IL-17.

Afin de mieux caractériser les réponses moléculaires induites par les cytokines IL-22 et IL-17 dans la muqueuse intestinale, nous avons réalisé une analyse transcriptomique à partir de tissus coliques sains stimulés *ex-vivo* avec différents cocktails cytokiniques (milieu seul, IL-22, IL-17, IL-22 + IL-17). A partir du jeu de données et à l'aide du package *DESeq2* (v1.28.1), nous avons identifié les gènes différentiellement exprimés (gènes DE) entre chaque condition cytokinique *versus* la condition avec du milieu seul (*medium*). Ainsi, un gène a été considéré comme DE si son *fold change* est strictement supérieur ou strictement inférieur à 0 et sa *p-value* ajustée ( $p_{\text{adjust}}$ ) inférieure à 0,05. Nous avons remarqué que, de façon surprenante, l'IL-22 seule n'induit que très peu de modifications transcriptomiques dans la muqueuse intestinale puisque notre analyse n'a identifié que trois gènes DE : *TIFA* (TRAF Interacting Protein With Forkhead Associated Domain), *VWA1* (Von Willebrand Factor A Domain Containing 1) et *HAMP* (Hepcidin antimicrobial peptide) (**Figure 28 A**). L'IL-17 a induit de façon significative l'expression de 31 gènes (**Figure 28 A et B** et **Figure 29 A**) parmi lesquels un PAM (*DEFB4A* codant pour la  $\beta$ -défensine 2), des transporteurs intestinaux d'ions (*SLC6A14*, *SLC25A37* et *SLC30A4*), des chimiokines (*CXCL1* ; *CXCL2* ; *CXCL3* ; *CCL28* et *CCL20*), des acteurs du métabolisme oxydatif intestinal (*DUOX2* et *DUOXA2*) ou encore de la régulation négative de la réponse immune (*NFKBIZ*, *ZC3H12A*, *ZC3H12C*, *TNIP3* et *PDZK1IP1*) (**Figure 29 A**). En revanche, l'analyse des biopsies saines stimulées par la combinaison d'IL-22 et l'IL-17, aux mêmes concentrations que précédemment, a révélé une augmentation importante du nombre de gènes induits en regard des stimulations par les cytokines isolées, puisque 119 gènes ont été identifiés DE (**Figure 28 A et C**). Parmi ceux-ci, 87 ont été significativement induits tandis que 32 ont été inhibés. Sur ces 119 gènes DE, 2.5% correspondaient aux gènes modulés par l'IL-22 seule et 22% par l'IL-17, 75.5% étant donc directement dépendants de la combinaison de l'IL-22 et l'IL-17 (**Figure 28 C**).

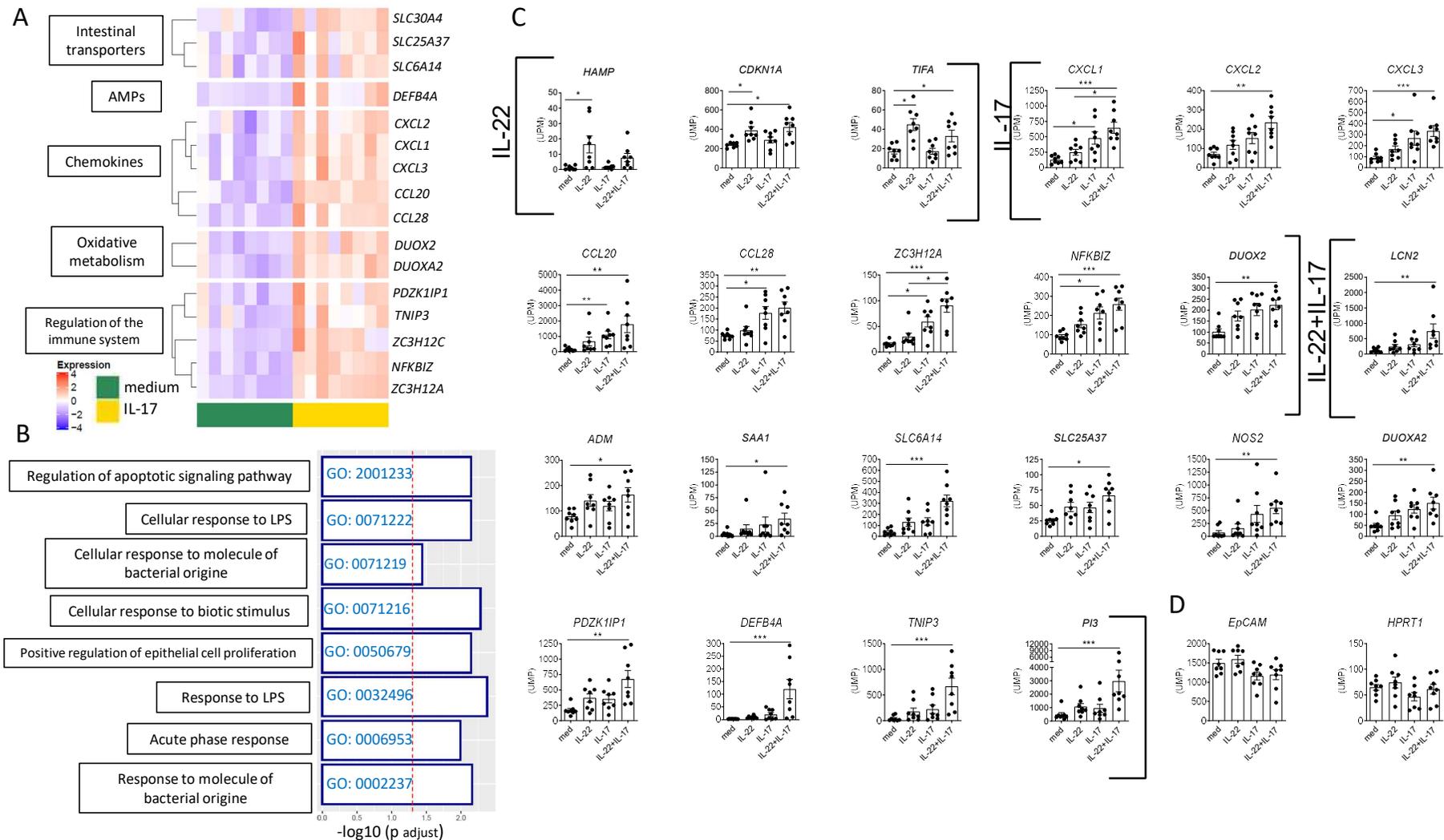


**Figure 28 : Identification d'un programme de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale dépendant de la combinaison des cytokines IL-22 et IL-17.**

**A)** Volcano plot montrant le top 10 des gènes DE après une stimulation ex-vivo de biopsies saines avec de l'IL-22, IL-17, IL-22+IL-17 versus la condition milieu seul (*medium*). **B)** Heatmap représentant les gènes DE après une stimulation avec de l'IL-17. **C)** Heatmap représentant les gènes DE après une stimulation avec de l'IL-22 et de l'IL-17. Graphique représentant pour chaque cytokine le pourcentage de gènes DE parmi ceux induits avec une stimulation avec de l'IL-22+IL-17. **D)** Heatmap montrant les principales voies d'enrichissement des gènes induits par l'IL-22 et l'IL-17. **E)** Graphique montrant pour chaque type cellulaire le pourcentage de gènes DE parmi ceux induits après par l'IL-22+IL-17. **F)** Evaluation en qPCR de l'expression des gènes *DEFB103A* (BD3), *DEFB4A* (BD2), *LCN2* (Lipocaline-2), *HAMP* (Hepcidine), *DUOX2* (Dual oxydase 2), *SLC6A14* (Solute carrier de la famille 6) et de *PDZK1IP1* (PDZK1 Interacting Protein 1) dans des muqueuses coliques saines après culture ex-vivo avec différentes conditions cytokiniques. Une p-value < 0,05 a permis de considérer le test statistique (test multiparamétrique Anova) comme significatif.

Les gènes induits par la combinaison des 2 cytokines ont cependant renforcé le nombre de gènes participant aux voies moléculaires déjà induites en présence d'IL-17 seule, notamment les voies des PAMs avec l'adrénomédulline (*ADM*), l'hepcidine (*HAMP*), le sérum amyloïde A1 (*SAA1*), la  $\beta$ -défensine 2 (*DEFB4A*), la lipocaline-2 (*LCN2*) ou encore celle rattachée au métabolisme oxydatif avec l'induction de la superoxyde dismutase 2 (*SOD2*), de l'oxyde nitrique synthétase (*NOS2*), l'élafine (*PI3*) et des dual oxydase 2 (*DUOX2* et *DUOXA2*) (**Figure 28 D**). Les gènes codant pour des transporteurs intestinaux d'ions (*SLC6A14*, *SLC25A37*, *SLC6A20* et *SLC30A4*), des chimiokines ou encore impliqués dans la régulation négative des réponses immunes inflammatoires ont aussi été significativement induits en présence d'IL-22 et d'IL-17 (**Figure 28 D**). Ainsi que confirmé par l'analyse d'enrichissement de réseaux de gènes (**Figure 29 B**), l'ensemble des voies moléculaires identifiées convergent donc vers la mise en place d'un programme de renforcement de la barrière intestinale contre les agressions par des pathogènes après stimulation de la muqueuse intestinale saine par IL-17 et IL-22. Conformément aux actions privilégiées exercées par l'IL-17 et l'IL-22 sur les épithélia (Li et al., 2014c; Toy et al., 2006b), l'analyse de données publiques de *single-cell RNA sequencing* ayant caractérisé les différents compartiments cellulaires de muqueuses intestinales saines et inflammatoires de patients atteints de MICI, a permis de confirmer que l'expression de plus de 97% des gènes DE en réponse à la stimulation par IL-22+IL-17 était détectée dans les cellules épithéliales, dont 52% de manière exclusive (Huang et al., 2019; Smillie et al., 2019) (**Figure 28 E**).

Afin de caractériser plus précisément la contribution de chacune des 2 cytokines dans l'induction des gènes après stimulation avec de l'IL-22+IL-17, nous avons analysé leurs expressions en UPM (unité d'ARN par million) individuellement pour chaque condition cytokinique (**Figure 29 C**). Ainsi, tous les gènes ne sont pas régulés par les mêmes signaux cytokiniques puisque certains sont modulés exclusivement par l'IL-22 (*HAMP*, *TIFA*), d'autres par l'IL-17 (les chimiokines, *ZC3H12A*, *NFKBIZ* ou encore *DUOX2*) et certains sont dépendant de la combinaison des 2 cytokines exerçant ensemble majoritairement des actions additives (*ADM*, *SAA1*, *SLC6A14*, *NOS2* et *PDZK1IP1*) plutôt que synergiques (*DEFB4A*, *TNIP3* et *PI3*) (**Figure 29 C**). En effet, il s'agit d'un effet additif puisque les expressions observées après stimulation combinée sont équivalentes la somme des expressions après une stimulation cytokinique isolée. Les expressions de *DEFB4A*, *TNIP3* et *PI3* sont multipliées d'un facteur 6 après stimulation combinée en regard d'une stimulation IL-22/IL-17 seule.

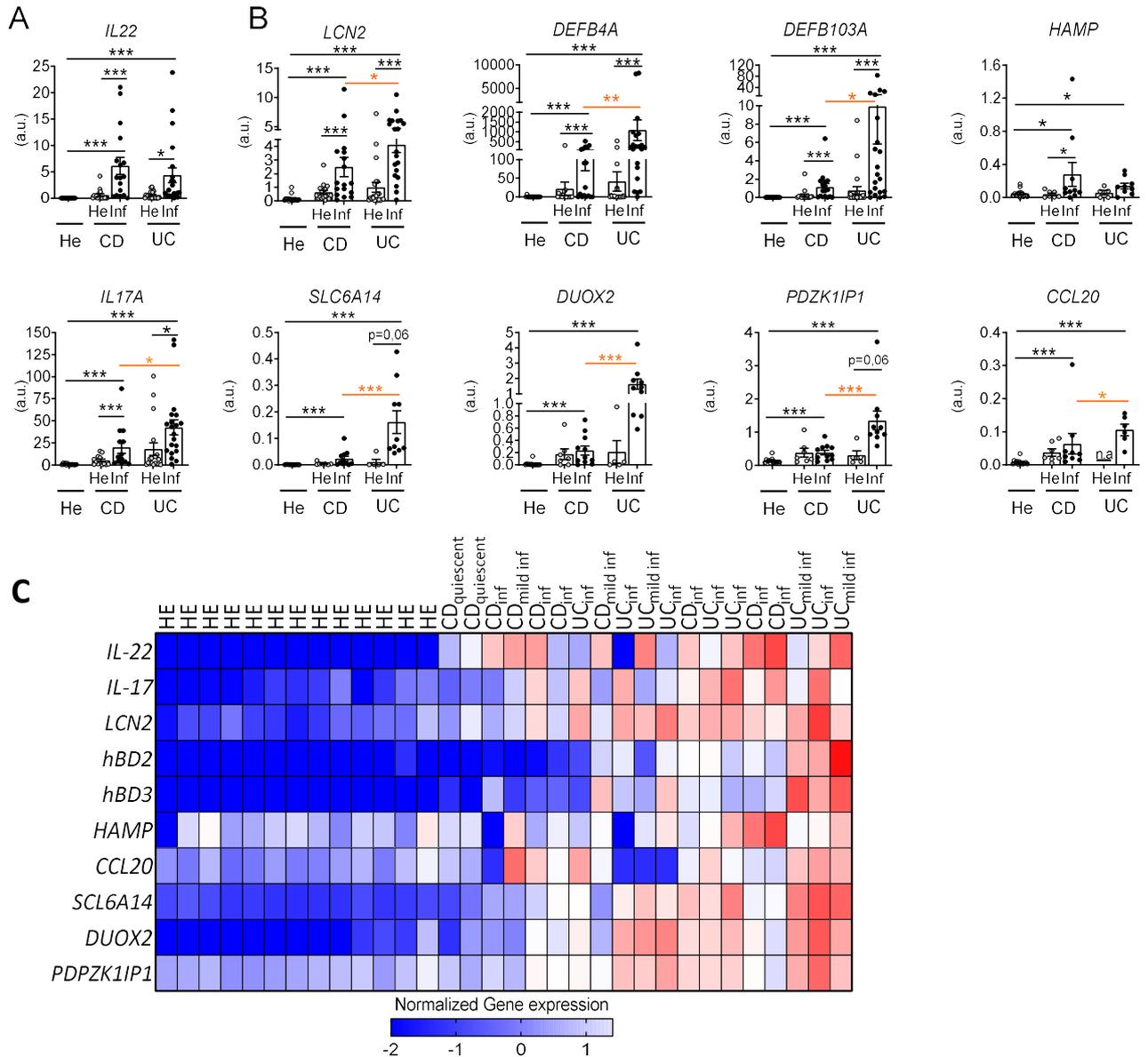


**Figure 29 : La combinaison de l'IL-22 et IL-17 est essentielle pour maximiser le programme de renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale. A)** Heatmap montrant les voies principales d'enrichissement des gènes DE induits par l'IL-17. **B)** Enrichissement de réseaux de gènes appartenant à la base de données Gene ontology (GO) Biological process pour les gènes DE induits par l'IL-22 et de l'IL-17. Les GO terms ont été considérés significatifs lorsque la  $p_{\text{adjust}} < 0.05$ . **C) & D)** Expressions (en UPM unité d'ARN par million) des gènes DE après stimulation avec de l'IL-22+IL-17 selon les différentes conditions cytokiniques.

L'identification de gènes similaires après stimulation avec de l'IL-17 et d'IL-22+IL-17 constitue un argument supplémentaire en faveur d'effet majoritairement additif des deux cytokines. Les absences de différence d'expression concernant un gène spécifiquement exprimé par les CEI (*EpCAM*) ou encore un gène largement exprimé dans tous les types cellulaires (*HPRT1*) démontrent que les différences observées entre les conditions de culture sont bien médiées par les cytokines IL-22 et IL-17 (**Figure 29 D**).

L'analyse des expressions de certains gènes dans les échantillons de biopsies saines stimulées par RT-qPCR (**Figure 28 F**), nous a permis de valider les profils de régulation définis en **Figure 29**. En effet, l'expression de *HAMP* est significativement induite après une stimulation avec de l'IL-22 seule (**Figure 28 F**). Des résultats similaires ont par ailleurs été observés pour le gène *DEFB103A*, codant pour la  $\beta$ -défensine 3, dont la séquence n'était pas annotée dans la banque de référence du génome humain (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37)) utilisée pour l'alignement de nos séquences obtenues par RNAseq. L'expression de *DUOX2* est significativement induite en présence d'IL-17, tandis les stimulations combinées de l'IL-22 et l'IL-17 ont induites les expressions de *LCN2*, *SLC6A14* et *PDZK1IP1* par un effet d'addition et celle de *DEFB4A* par un effet synergique (**Figure 28 F**). En effet, l'addition des expressions de *SLC6A14* et de *PDZK1IP1* après une stimulation cytokinique isolée (IL-22 ou IL-17) est équivalente à celle observée après stimulation combinée. L'expression de *LCN2* est légèrement induite par l'IL-22 et elle est multiplié par deux en présence des 2 cytokines par rapport à l'IL-17 seule. Les effets isolés de l'IL-22 n'ont très peu d'impact sur l'expression de *DEFB4A* qui est multipliée par 5 après une stimulation IL-22+IL-17, démontrant l'effet synergique des 2 cytokines.

Ainsi, nos résultats ont démontré qu'une stimulation combinée de tissus coliques sains avec de l'IL-22 et de l'IL-17 a permis de maximiser les expressions de gènes épithéliaux impliqués dans un programme de renforcement des barrières intestinales en regard d'une stimulation isolée avec de l'IL-22 ou de l'IL-17. De cette façon, nous avons caractérisé un programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17.



**Figure 30 : Hétérogénéité d'expression du programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 au niveau des muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI.**

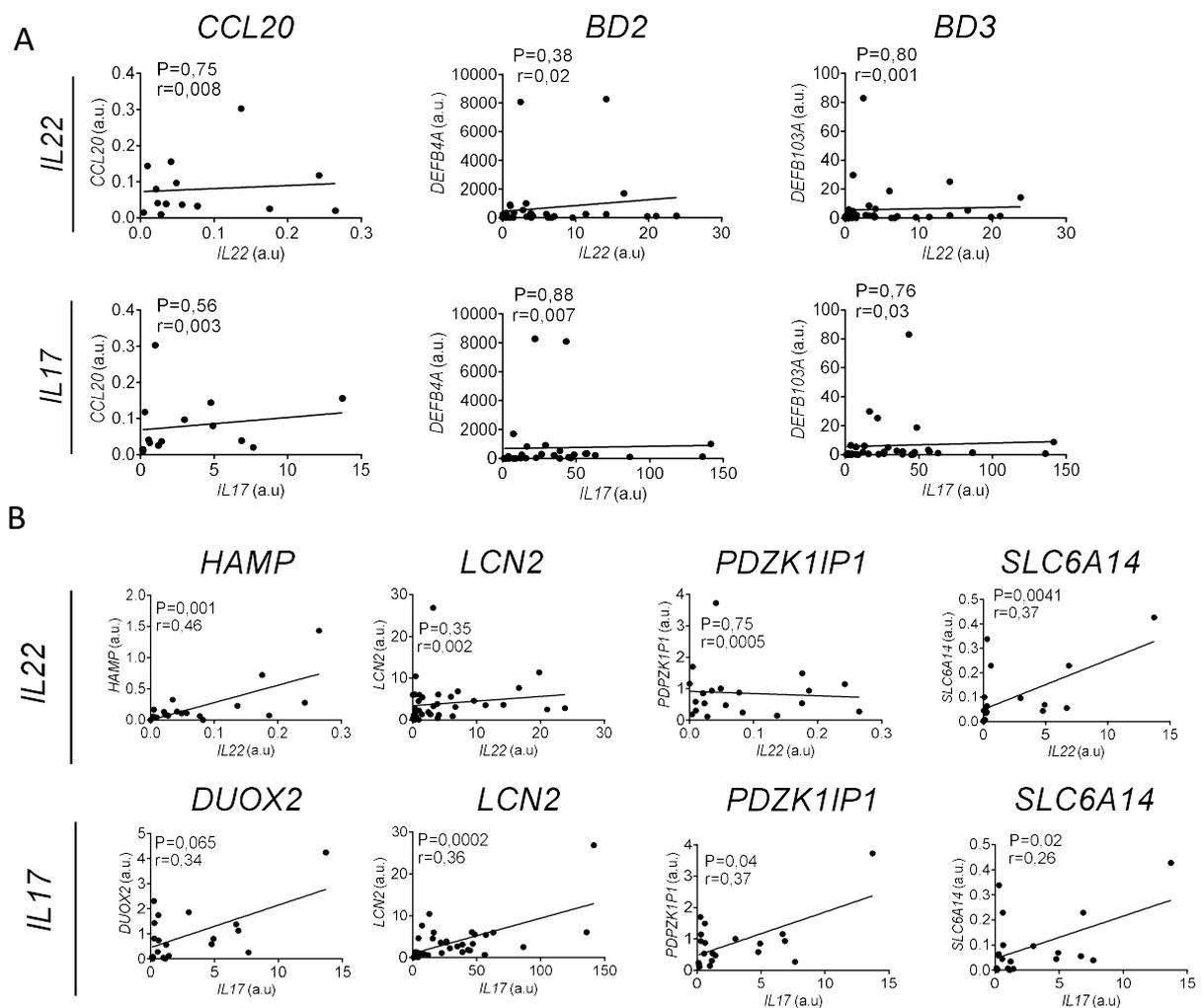
**A) et B)** Expressions en qPCR des gènes *IL22*, *IL17*, *LCN2*, *DEFB4A*, *DEFB103A*, *SLC6A14*, *DUOX2*, *PDZK1IP1*, *HAMP* et *CCL20* dans des muqueuses coliques de contrôles sains [He] (n=16), de patients atteints de MC [CD] (n=17) et RCH [UC] (n=21). Concernant les gènes *SLC6A14*, *DUOX2*, *PDZK1IP1*, *HAMP* et *CCL20*, leurs expressions ont été évaluées sur cette même cohorte mais sur un nombre plus restreint de patients [CD : n=11, UC : n=10, He : n=13]. Une p value < 0,05 a permis de considérer le test statistique comme significatif. Des tests appariés de Wilcoxon ont réalisés entre les biopsies appariées zones saines versus inflammatoires et des tests de Mann Whitney ont été réalisés entre les autres conditions. **C)** Heatmap ayant regroupé de façon non supervisée les patients, selon leur profil d'expressions des gènes du programme moléculaire observées dans les muqueuses de patients MICI et contrôles sains.

### **Hétérogénéité d'expression du programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 au niveau des muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI**

Au cours des MICI, l'affaiblissement des fonctions de barrière de la muqueuse intestinale est à l'origine du passage de germes pathogènes/commensaux initialement contenus dans la lumière intestinale jusque dans la LP. La reconnaissance de ces germes par le SI muqueux enclenche une réponse inflammatoire médiée par la sécrétion d'IL-23 par des populations de phagocytes mononuclés et aboutit à l'induction des expressions d'IL-17 (Fujino et al., 2003; Hölttä et al., 2008; Nielsen et al., 2003) et d'IL-22 (Brand et al., 2006; Geremia et al., 2011) par les ILC3 et les Ly Th17 de la LP (Kobayashi et al., 2008). Au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de MICI, dont la définition (quiescent, moyennement actif et actif) a été évaluée à partir des comptes rendus endoscopiques et anatomopathologiques, nous avons confirmé une induction significative de l'IL22 et de l'IL17 en comparaison à leurs muqueuses saines appariées ou à des tissus coliques de patients contrôles sains (**Figure 30 A**). Nous avons donc cherché à évaluer les expressions des gènes induits par les actions combinées de l'IL-22 et de l'IL-17 identifiés dans la **Figure 28**. Concordant avec une induction par l'IL-22 et l'IL-17, nous avons retrouvé une augmentation significative de l'expression de gènes *LCN2*, *DEFB4A* (BD2), *DEFB103A* (BD3), *HAMP*, *CCL20*, *SLC614*, *DUOX2* et *PDZK1IP1* dans les muqueuses inflammatoires en comparaison aux contrôles et muqueuses saines appariées (**Figure 30 B**).

L'efficacité limitée à des sous-groupes de patients de biothérapies actuellement disponibles nous a ensuite poussé à analyser si l'expression du programme moléculaire était elle-même homogène entre les patients atteints de MICI de notre cohorte. Le réarrangement non biaisé des patients par clustering hiérarchisé selon l'expression de ces gènes dans leur muqueuse inflammatoire a révélé des profils d'expression différents, certains patients présentant des profils d'expression faibles, proches de ceux observés dans les muqueuses non inflammatoires (**Figure 30 C**). Cette variabilité d'expression est particulièrement marquée pour les gènes codant pour les  $\beta$ -défensines (BD2 et BD3). De plus, dans cette cohorte de patients MICI, il apparaît que les expressions plus faibles des gènes du programme moléculaire sont majoritairement observées chez des patients MC bien qu'elles existent aussi chez des patients RCH. Ces observations sont ainsi en lien avec les niveaux d'expressions des gènes (*LCN2*, *DEFB4A*, *DEFB103A*, *SLC6A14*, *DUOX2* et *PDZK1IP1*) significativement moins exprimés dans les muqueuses inflammatoires de patients MC en regard des patients RCH (**Figure 30 A**).

Nous avons précédemment démontré qu'il s'agissait de gènes majoritairement induits par la combinaison de l'IL-22 et l'IL-17 (**Figure 28 F**). Néanmoins, aucune corrélation positive n'a été identifiée entre les expressions isolées d'IL22 ou d'IL17 et celles des gènes *DEFB4A* et *CCL20* (**Figure 31 A**) suggérant que l'hétérogénéité observée entre patients n'est pas strictement modulé par le niveau d'expression d'IL-17 ou d'IL-22 mais plutôt par des effets synergiques non évaluables. Bien que nous ayons démontré un effet strict de l'IL-22 dans l'induction de *DEFB103A*, son expression n'est pas corrélée à celle de l'IL-22, suggérant l'addition d'autres signaux (cytokiniques/environnementaux) dans la régulation de son expression (**Figure 31 A**)

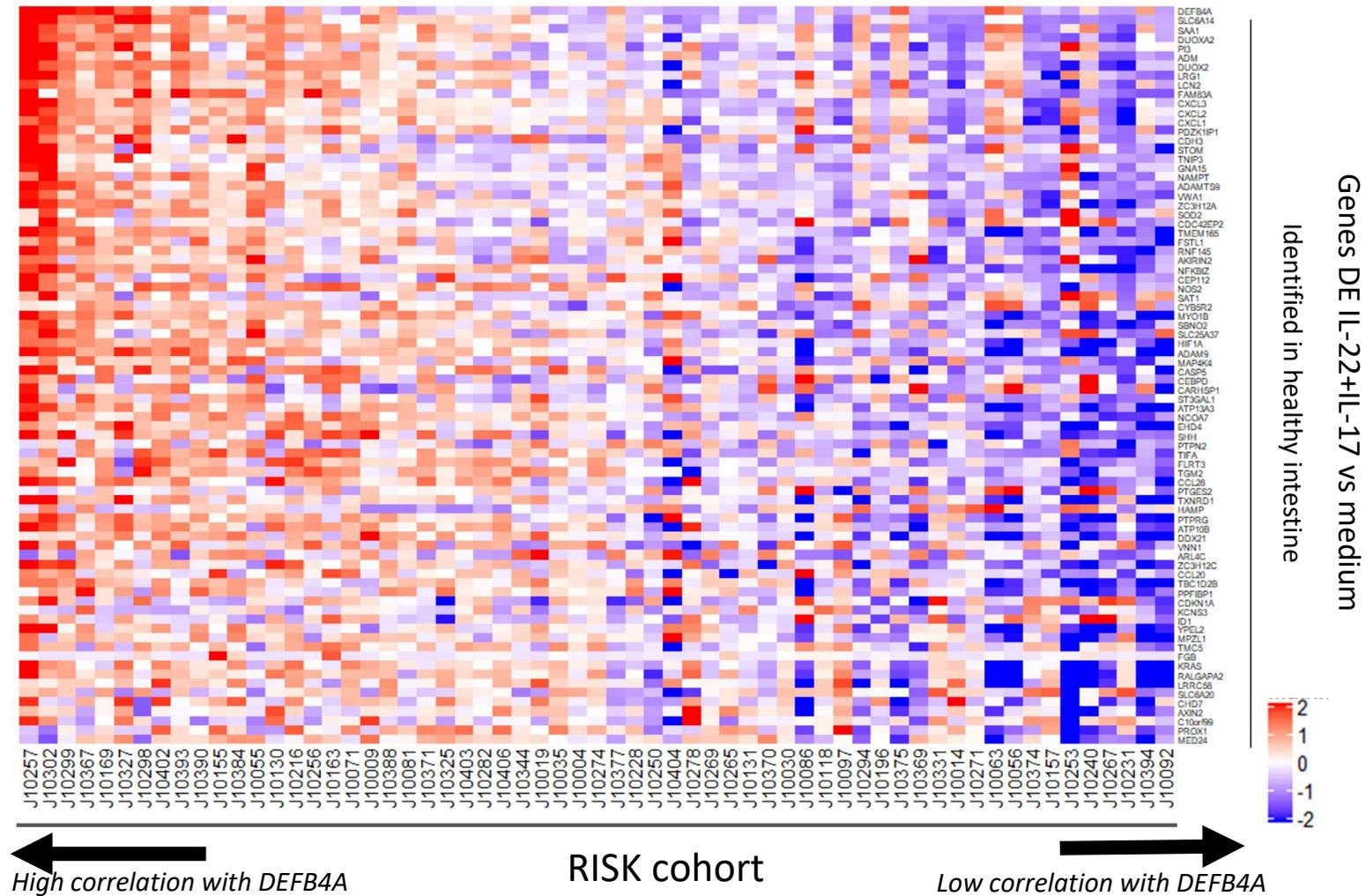


**Figure 31 : Evaluation des corrélations entre les expressions des gènes du programme moléculaire et celles des cytokines.**

A) et B) Corrélations entre les expressions des gènes identifiés comme appartenant au programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 et celles des cytokines mesurées dans les muqueuses inflammatoires des patients MICI.

De faibles corrélations positives ont été en revanche mises en évidence entre *IL22* et *HAMP*, entre *IL17* et *DUOX2* (**Figure 31 B**) renforçant les profils de régulation décrits dans la **Figure 28 F**. De même, l'expression de *LCN2* est corrélée à celle d'*IL17* mais pas d'*IL22* appuyant les résultats de qPCR ayant mis en évidence un effet majoritaire de l'IL-17 concernant l'induction de ce PAM. Enfin l'expression de *SLC6A14* semble être corrélée positivement avec *IL22* et *IL17* en lien avec l'effet d'additif ne décrit précédemment pourtant pas confirmé pour le gène *PDZK1IP1* (**Figure 31 B**). Enfin, nous avons pu valider l'hétérogénéité d'expression des gènes induits par IL-22+IL-17 entre sous-groupes de patients atteints de MICI en analysant le comportement du programme moléculaire dans des cohortes indépendantes plus larges comme RISK, comprenant des biopsies iléales de patients pédiatriques (6-17 ans) atteints de MC et naïfs de tout traitement (Haberman et al., 2014) (**Figure 32**)

Ainsi, nous venons d'identifier une hétérogénéité d'expression du programme moléculaire induit majoritairement par l'IL-22 et l'IL-17 au niveau des muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI.

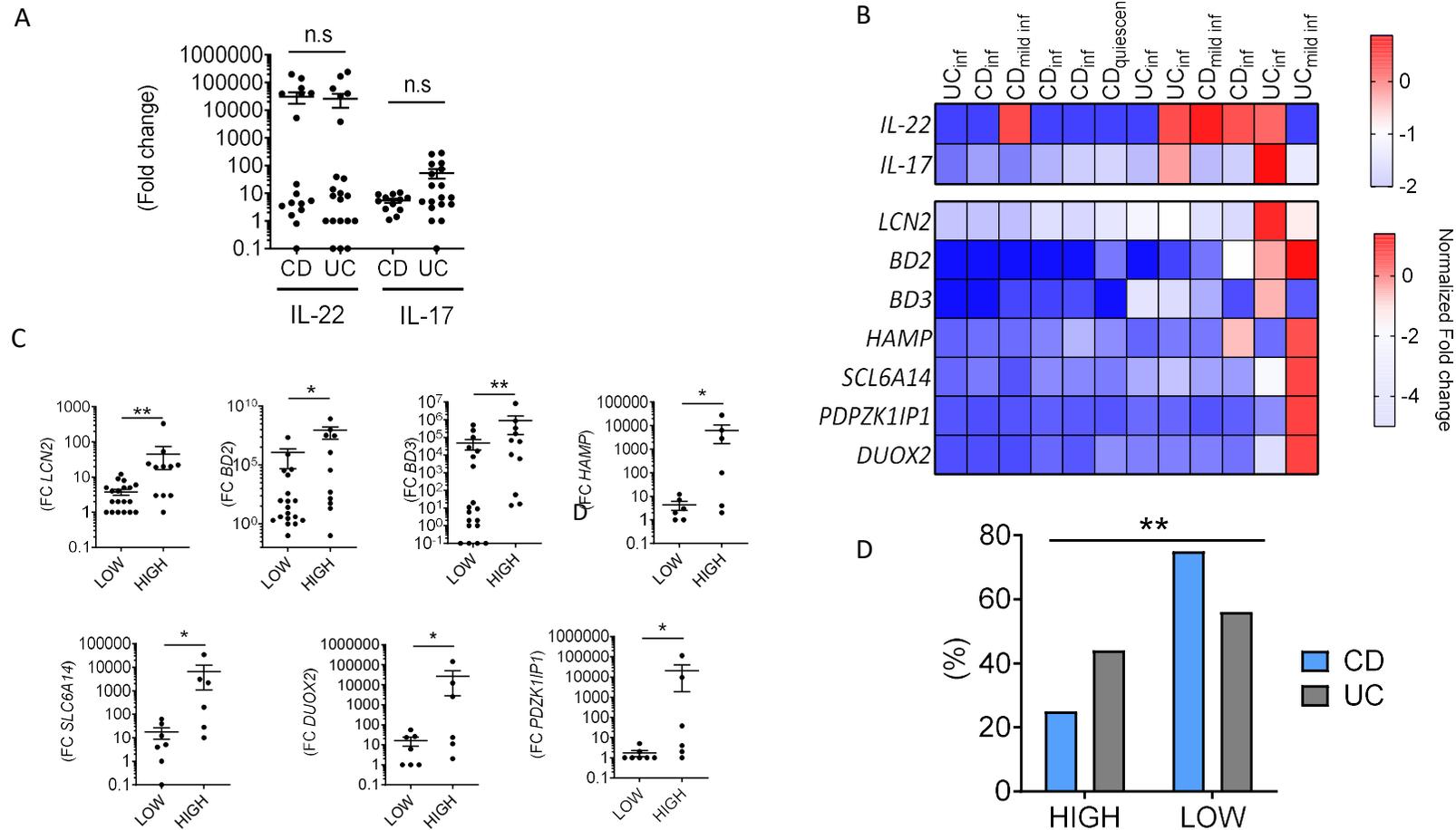


**Figure 32 : Expression du programme moléculaire induit par l'IL-22+IL-17 dans les muqueuses intestinales des patients de la cohorte RISK.** Représentation de l'expression des gènes du programme moléculaire dans des biopsies fraîches iléales de patients MC naïfs de tout traitement. Les gènes ont été classés en fonction de leur degré de corrélation d'expression avec DEFB4A largement induit par IL-22 et IL-17.

**Au sein des muqueuses inflammatoires de patients MICI, la dynamique d'induction du programme moléculaire est corrélée à celle combinée des 2 cytokines.**

Afin de mieux corréliser la dynamique d'induction des expressions des gènes du programme moléculaire à celle des 2 cytokines tout en s'affranchissant des biais liés aux variations interindividuelles de leurs expressions basales, nous avons calculé les *fold change* (FC) correspondant aux ratios des expressions entre zones inflammatoire et saine appariées. De façon intéressante, nous avons remarqué, que contrairement à l'IL-17, les FC d'IL-22 sont très hétérogènes entre nos patients atteints de MICI sans être différents en moyenne entre les 2 maladies (**Figure 33 A**). La variabilité des FC d'IL22 observée entre les muqueuses inflammatoires, sépare nos patients en 2 groupes distinct d'un facteur égal à  $10^6$ . La heatmap de la **Figure 33 B** permet de corréliser pour chaque profil d'induction du programme moléculaire celui des cytokines. Cette induction n'est pas équivalente entre tous les patients MICI et nous pouvons remarquer que les fortes inductions du programme sont associées aux fortes inductions d'IL-22 et d'IL-17.

A la lumière de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que les patients MICI n'ayant pas présenté une forte induction à la fois d'IL-22 et d'IL-17 pourraient être dans l'incapacité de correctement induire les gènes définissant programme moléculaire. Pour cela, nous avons défini, basé sur la valeur médiane des FC des 2 cytokines, un FC seuil (égal à 5) permettant de séparer les patients de la cohorte en faibles et forts inducteurs de la combinaison des deux cytokines. Ainsi les patients forts inducteurs [High] correspondent à ceux ayant présenté des FC supérieur à 5 pour chacune des 2 cytokines, tandis que les patients faibles inducteurs [Low] ceux qui ont présenté des FC inférieur à 5 pour au moins une des 2 cytokines. La **Figure 33 C** met en évidence que les patients forts inducteurs d'IL-22 et d'IL-17 ont présenté des FC significativement plus élevés pour tous les gènes (*LCN2*, *BD2*, *BD3*, *HAMP*, *SLC6A14*, *DUOX2* et *PDZK1IP1*) en comparaison aux patients qualifiés de faibles inducteurs. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une forte induction des 2 cytokines dans la muqueuse inflammatoire MICI est nécessaire pour une régulation maximale du programme moléculaire caractérisé *ex vivo*.



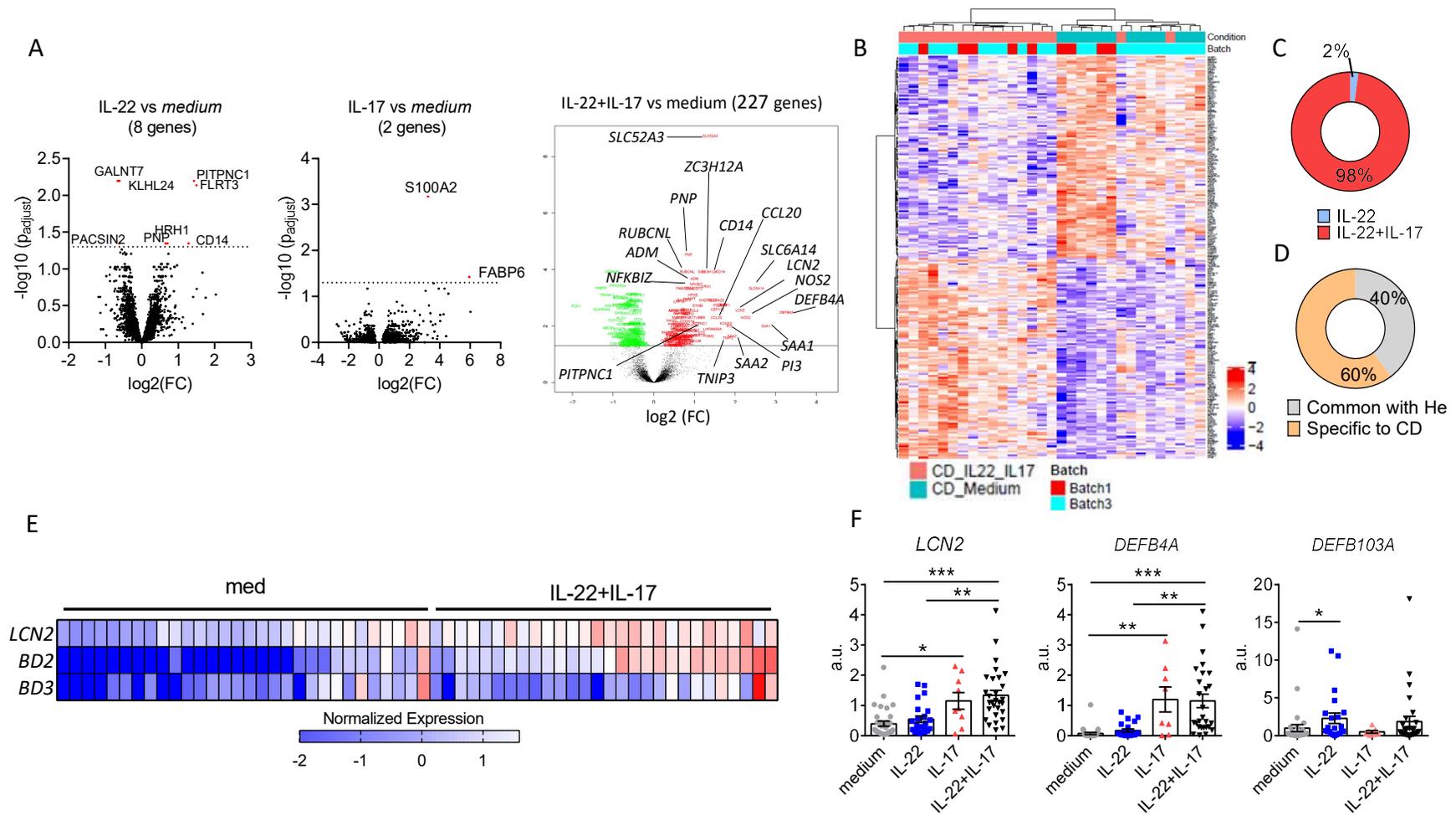
**Figure 33 : Exploration de la dynamique d'induction du programme moléculaire induit par IL-22 et IL-17 au sein des muqueuses inflammatoires de patients MUCI. A)** Fold change d'induction de l'IL-22 et de l'IL-17 dans le MC et RCH. Les FC ont été calculés en rapportant l'expression d'un gène donné en zone inflammatoire sur l'expression en zone non lésée. **B)** Heatmaps montrant les profils d'induction des gènes du programme moléculaire et ceux de l'IL-22 et IL-17 dans notre cohorte de patients MUCI. **C)** Comparaison des FC des gènes du programme moléculaire entre les patients fort inducteurs [High] (FC>5 pour IL-22 et IL-17) et faibles inducteurs [Low] (FC>5 pour une cytokine ou <5 pour les 2 cytokines). **D)** Comparaison, entre MC et RCH, du pourcentage de patients dans chacun des groupes (fort et faible inducteur). Une p-value < 0,05 a permis de considérer le test statistique (test multiparamétrique Anova) comme significatif. CD : Maladie de Crohn ; UC : Rectocolite hémorragique.

En comparant dans notre cohorte de patients MICI, les proportions de patients dans chacun des groupes, il apparaît que la fréquence des patients MC ayant eu des FC > 5 à la fois pour IL-22 et IL-17 est significativement plus faible par rapport aux patients RCH (**Figure 33 D**). Ce résultat constitue donc un argument expliquant les expressions plus fortes des gènes du programme moléculaire observées chez les patients RCH.

**Le programme de renforcement des propriétés de barrière identifié peut être restauré dans des muqueuses MC *ex-vivo* par la combinaison d'IL-22 + IL-17.**

Nous avons voulu ensuite savoir s'il était possible de renforcer *ex vivo* l'expression du programme moléculaire associé la stimulation par IL-17 et IL-22 chez les patients MC. En effet, des travaux ont suggéré que des expressions plus faibles observées pour le gène *DEFB4A* dans des muqueuses inflammatoires de patients MC pouvaient s'expliquer par une diminution du nombre de copies du gène et donc refléter un défaut intrinsèque à ce groupe de patients (Fellermann et al., 2006).

Nous avons donc stimulé *ex-vivo* des biopsies coliques MC avec différents cocktails cytokiniques comportant de l'IL-22 et/ou IL-17 dont nous avons analysé le transcriptome par RNA sequencing. Ainsi dans un tissu de patient MC, l'IL-22 a modulé significativement 8 gènes dont 5 sont induits : *FLRT3* : Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 3 ; *PITPNC1* : Phosphatidylinositol Transfer Protein Cytoplasmic 1, *PNP* : Purine nucleoside phosphorylase, *HRH1* : Histamine receptor H 1 et *CD14* (**Figure 34 A**). Ces gènes sont différents de ceux identifiés dans un tissu sain après stimulation avec de l'IL-22 (**Figure 28**) et aucun ne se rapporte au stress du RE induit dans les CEI par l'IL-22 (Powell et al., 2020). Mais il est important de garder à l'esprit qu'au niveau des muqueuses inflammatoires MC, les signaux induits par l'IL-22 sur les épithélia sont intégrés dans un microenvironnement inflammatoire complexe comprenant des populations activées/inflammatoires de macrophages, DCs, fibroblastes, cellules endothéliales, LyT et plasmablastes avec lequel un dialogue peut s'établir et potentiellement induire par les cytokines des actions biologiques différentes. *CD14* est un gène codant pour le cofacteur du récepteur innée TLR4 exprimé à la surface des DCs/macrophages et hautement impliqué dans la reconnaissance d'un motif bactérien (LPS). *PITPNC1* est un gène exprimé par les plasmablastes et les entérocytes tandis que *HRHR1* est exprimée par les cellules endothéliales et les entérocytes (Huang et al., 2019).



**Figure 34 : Le programme de renforcement des propriétés de barrière peut être restauré dans des muqueuses MC ex-vivo par la combinaison d'IL-22 + IL-17.**

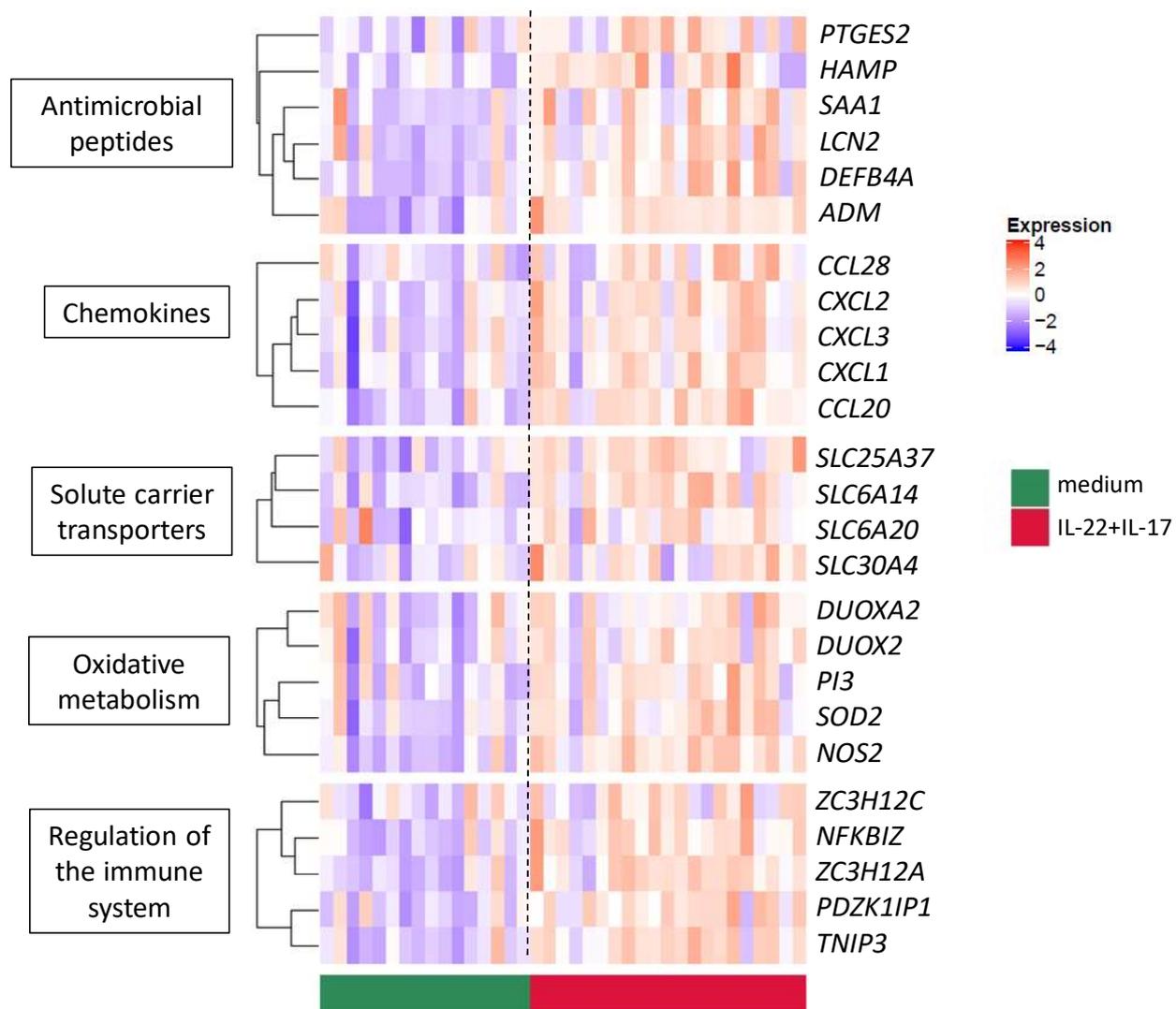
**A**) Volcano plot montrant les gènes DE (sur la  $p_{\text{adjust}}$ ) après une stimulation de biopsies intestinales de patients MC avec de l'IL-22 (n=16), IL-17 (n=9), IL-22+IL-17 (n=21) versus la condition *medium*. **B**) Heatmap représentant les gènes DE après stimulation avec de l'IL-22+IL-17. **C**) Graphique représentant pour chaque cytokine le pourcentage de gènes DE, parmi ceux induits par l'IL-22+IL-17. **D**) Graphique montrant parmi les gènes DE après une stimulation avec de l'IL-22+IL-17, le pourcentage de gènes communs avec le tissu sain et spécifique aux muqueuses MC. **E**) Heatmap représentant les expressions de 3 PAMs (LCN2, BD2 et BD3) après stimulation de biopsies MC (n=28) avec ou sans cytokines (*medium* versus IL-22+IL-17). **F**) Expressions en qPCR de *LCN2*, *DEFB4A* (BD2) et *DEFB103A* (BD3) après stimulation ex-vivo de biopsies MC avec différentes conditions cytokiniques (milieu seul [n=28], IL-22 [n=23], IL-17 [n=9], IL-22+IL-17 [n=28]). Une p-value < 0,05 a permis de considérer le test statistique (test multiparamétrique Anova) comme significatif. CD : Maladie de Crohn ; UC : rectocolite hémorragique.

Contrairement à une muqueuse colique normale, les actions induites par l'IL-17 seule sont assez limitées (n=2 gènes), probablement témoignant d'effets *in vivo* de l'IL-17 déjà induits dans la muqueuse inflammatoire (**Figure 34 A**). L'effet maximum, comme dans les tissus sains, est observé en présence d'IL-22 et d'IL-17, puisque 227 gènes sont DE dont 113 induits (**Figure 34 A-B**). Parmi ces gènes, ceux induits par l'IL-22 seule, le sont aussi dans la condition IL-22+IL-17 renforçant leur dépendance à l'IL-22. Sur les 113 gènes DE après une stimulation avec les 2 cytokines, 98% d'entre eux ont eu besoin des signaux combinés de l'IL-22 et de l'IL-17 pour être induits (**Figure 34 C**). Ce résultat suggère que dans une muqueuse inflammatoire MC, l'apport isolé de l'une ou de l'autre des cytokines n'a eu que peu d'effet. Il renforce notre précédente observation que c'est la forte contribution des 2 cytokines dans les muqueuses de patients MICI qui permet de maximiser les effets (**Figure 33 C**). Après stimulation avec de l'IL-22+IL-17, 40% des gènes DE sont communs avec ceux identifiés précédemment dans un colon sain (**Figure 34 D**). Il s'agit des gènes codant pour des transporteurs intestinaux d'ions (*SLC6A14*, *SLC6A20*), des PAMs (*ADM*, *DEFB4A*, *LCN2* et *SAA1*), des chimiokines (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* et *CCL20*), des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif (*NOS2*, *SOD2* et *PI3*) ou régulant l'activation de la réponse immune (*NFKBIZ*, *PDZK1IP1*, *TNIP3* et *ZC3H12A*). Ainsi, le programme moléculaire identifié dans un tissu sain et renforçant les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale a pu aussi être induit dans une muqueuse MC après stimulation avec de l'IL-22+IL-17 (**Figure 35**).

D'autres gènes sont spécifiques des tissus MC ayant été stimulés avec de l'IL-22+IL-17 comme les transporteurs intestinaux *SLC52A3* (Solute Carrier Family 52 Member 3) et *CALM2* (Calmodulin 2), le PAM : *SAA2* (Serum Amyloid A2), des cytokines comme l'alarmine *IL33* ou encore *LIF* Interleukin 6 Family cytokine ; mais aussi des médiateurs dans les processus d'autophagie comme *RUBCNL* (Rubicon Like Autophagy Enhancer) ainsi qu'un inhibiteur de sérines protéases contenues dans les neutrophiles *SERPINB1* (Serpine Family B Member 1) empêchant leur dégranulation (Choi et al., 2019). Ainsi, ces actions biologiques induites par ces cytokines dans des tissus inflammatoires MC peuvent être le reflet de l'activation en cascade d'autres populations immunes largement infiltrées dans ces muqueuses.

Nous avons ensuite voulu confirmer en RT-qPCR l'induction dans les tissus MC stimulés de certains gènes précédemment identifié dans un tissu sain. La heatmap présentée dans la **Figure 34 E** a regroupé de façon supervisée les échantillons de la condition médium et ceux de la condition IL-22+IL-17 respectivement ensemble. Ainsi, après une stimulation avec de l'IL-

22+IL-17, les expressions de *BD2* et *LCN2* sont renforcées pour la majorité des patients MC par rapport à la condition sans cytokine. De plus sur la **Figure 34 F**, les expressions de *LCN2* et *DEFB4A* sont significativement plus fortes en comparaison à la condition médium, démontrant que nous avons pu restaurer *ex vivo* l'expression des PAMs dans un tissu MC. Enfin, de façon similaire au tissu sain, l'induction de *LCN2* est majoritairement médiée par l'IL-17 et celle de *DEFB103A* (BD3) par l'IL-22. L'expression de *DEFB4A* est significativement induite après stimulation avec de l'IL-17 et les niveaux sont similaires à ceux observés dans la condition IL-22+IL-17, ne confirmant pas un effet synergique. Cependant, l'induction forte de *DEFB4A* avec l'IL-17 n'est observée que chez 3 patients (**Figure 34 F**). En conclusion, nous avons démontré qu'en stimulant *ex vivo* des biopsies MC avec de l'IL-22+IL-17, nous pouvions restaurer l'expression de gènes impliqués dans le renforcement de la barrière intestinale. Nous avons aussi identifié d'autres gènes, propres au tissu de patients MC et pouvant participer à d'autres processus biologiques comme l'autophagie ou anti-inflammatoires en limitant la dégranulation des PNN. Des explorations sont en cours pour finement caractériser ces réponses cytokiniques au cours de la MC.



**Figure 35 : Renforcement des actions biologiques induites par l'IL-22 et l'IL-17 après stimulation ex vivo de muqueuses MC.**

Expressions des gènes appartenant au programme moléculaire IL-22+IL-17 après stimulation pendant 6h de biopsies coliques de patients MC avec de l'IL-22+IL-17.

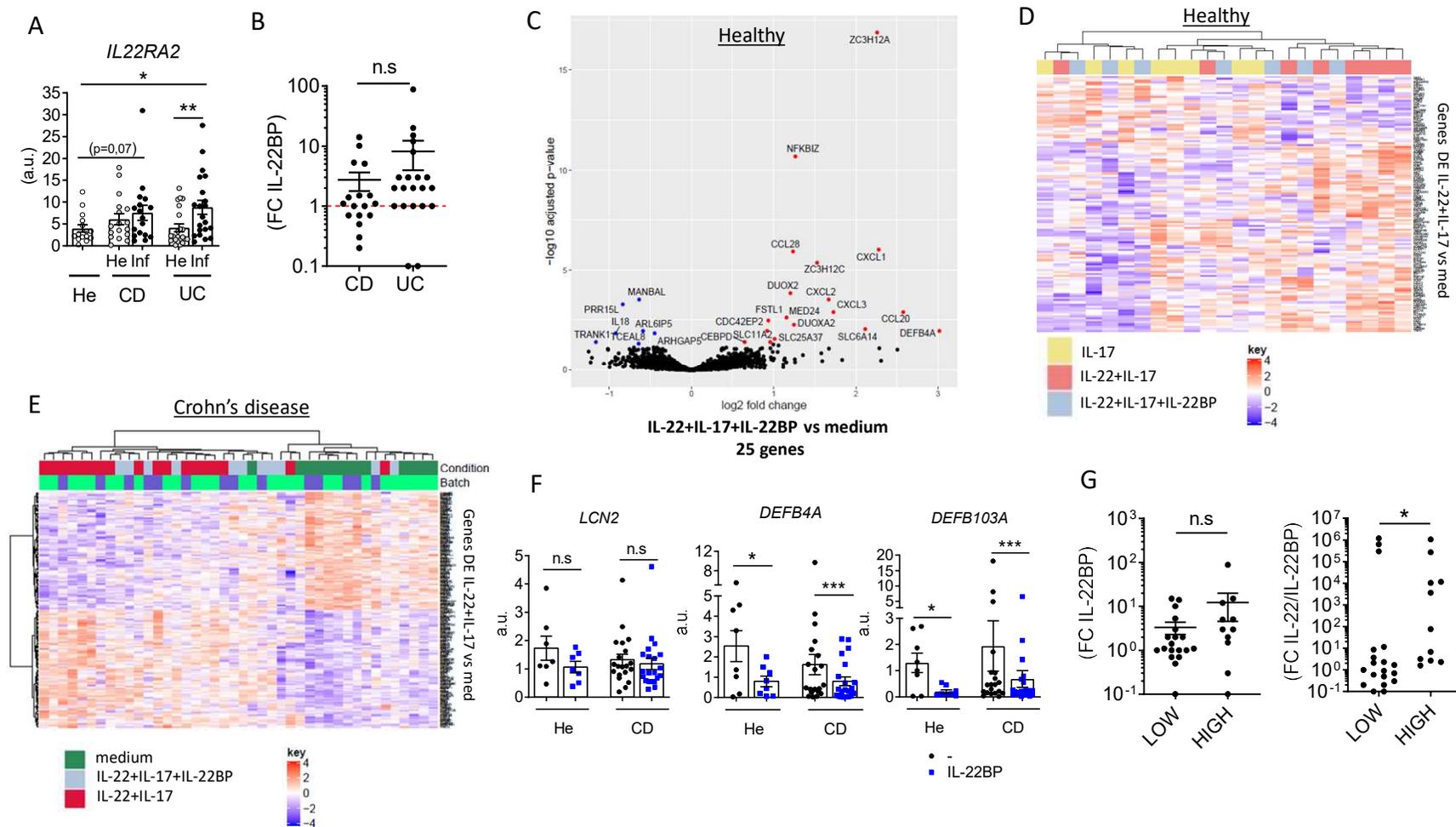
### **L'IL-22BP bloque la signature moléculaire induite par IL-22+IL-17 sur les muqueuses intestinales.**

Nos résultats ont identifié un programme moléculaire induit par la combinaison de l'IL-22 et IL-17, dont l'expression est plus faible chez certains patients MC, mais que l'on peut corriger en ajoutant artificiellement les cytokines. Comme précédemment démontré (Martin et al., 2016a; Pelczar et al., 2016b) et par opposition aux colites d'origine infectieuse, l'expression d'*IL22RA2* est augmentée au niveau des muqueuses inflammatoires des patients atteints de MICI (**Figure 36 A**). En effet, la majorité des patients MICI ont présenté une induction positive d'IL-22BP (FC>1) en zone inflammatoire en comparaison à leur niveau basal (**Figure 36 B**).

C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de l'IL-22BP, l'inhibiteur de l'IL-22, sur la réponse moléculaire induite par l'IL-22 et l'IL-17 sur la muqueuse intestinale. Après une stimulation de tissu sain avec de l'IL-22+IL-17+IL-22BP, seulement 25 gènes ont été déclarés DE (**Figure 36 C**). Sur ces 25 gènes, 18 sont induits et 14 sont communs avec les gènes DE identifiés après stimulation par IL-17 seule (**Figure 28 B**) démontrant ainsi que les actions de l'IL-22 sont entièrement bloquées en présence d'un excès d'IL-22BP. La heatmap présentée dans la **Figure 36 D** renforce ce message puisqu'un réarrangement non biaisé des échantillons par clustering hiérarchisé selon les expressions des gènes induits par IL-22+IL-17 montre que les conditions contenant de l'IL-22BP sont confondues avec celles contenant de l'IL-17 concernant

Après stimulation avec de l'IL-22+IL-17+IL-22BP de tissus MC, aucun gène n'a été identifié DE, renforçant à nouveau que l'IL-17 seule n'a pas eu d'effet *ex vivo* et que dans les muqueuses de patients MC, les actions induites par l'IL-22 sont aussi bloquées en présence d'IL-22BP. Un réarrangement non supervisé des échantillons sur l'expression des gènes induits par l'IL-22+IL-17 dans les tissus MC montre une similarité entre les conditions medium et celles contenant de l'IL-22BP (**Figure 36 E**).

Nous avons validé en qPCR le pouvoir inhibiteur de l'IL-22BP sur les actions de l'IL-22. En effet, les expressions des PAMs dépendants de l'IL-22, à savoir les  $\beta$ -défensines, sont significativement diminuées après addition d'IL-22BP à la condition IL-22+IL-17, à la fois dans les muqueuses saines et MC (**Figure 36 F**). Aucune différence significative n'est observée pour le gène codant pour la lipocaline 2 supportant ainsi les résultats déjà observés dans la **Figure 28 F**.



**Figure 36 : L'IL-22BP bloque la signature moléculaire induite par IL-22+IL-17 sur les muqueuses intestinales.** A) Expression en qPCR d'*IL22RA2* dans les tissus sains [He] et les muqueuses appariées (saine [He] versus inflammatoire [Inf]) de patients MC [CD] et RCH [UC]. B) FC d'IL-22BP dans la cohorte de patients MC et RCH. C) Volcano plot montrant les gènes DE après une stimulation de biopsies intestinales saines avec de l'IL-22+IL-17+IL-22BP (n=8) versus la condition milieu seul. Heatmap représentant de façon non supervisée en fonction des conditions cytokinique les expressions des gènes identifiés DE après une stimulation avec de l'IL-22+IL-17 dans le tissu sain D) ou MC E). F) Expression en qPCR de *LCN2*, *DEFB4A* (BD2) et *DEFB103A* (BD3) après stimulation de biopsies coliques saines (n=8) ou MC (n=21) avec ou sans addition d'IL-22BP à la condition de culture IL-22+IL-17. G) FC d'IL-22BP et ratio des FC IL-22/IL-22BP entre les patients forts et faibles inducteurs des cytokines. Une p-value < 0,05 a permis de considérer le test statistique (test de Wilcoxon pour les échantillons appariées et test de Mann-Whitney pour ceux non appariés) comme significatif He : contrôle sain, CD : Maladie de Crohn ; UC : rectocolite hémorragique.

Ainsi, nos résultats ont démontré qu'en présence d'IL-22BP, le programme de réponse médié par la combinaison de l'IL-22+IL-17 est inhibé. Ils suggèrent donc que dans les muqueuses inflammatoires de patients MICI, la présence d'IL-22BP peut à elle seule moduler les expressions de gènes induits en réponse à la sécrétion d'IL-22 et l'IL-17 même si nous n'avons pas pu le vérifier. C'est pourquoi nous avons voulu corrélérer l'induction d'IL-22 à celle d'IL-22BP. Pour des niveaux d'induction cytokinique différents (faible et fort inducteurs), les FC d'IL-22BP ne sont pas différents (**Figure 36 G**). Afin de mieux apprécier la quantité d'IL-22 disponible pour interagir avec l'IL-17 dans les tissus inflammatoires MICI, nous avons calculé les ratios IL-22/IL-22BP. Ils sont significativement plus bas (donc moins d'IL-22 libre) dans le sous-groupe de patients MICI faibles inducteurs pour lesquels une faible induction du programme de renforcement de la barrière intestinale a été identifiée (**Figure 36 G**). Ces résultats suggèrent que l'IL-22B, en modulant les niveaux intestinaux d'IL-22 disponible, pourrait contribuer à impacter l'expression du programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 dans les muqueuses inflammatoires MICI.

## CONCLUSION

En conclusion, nous avons caractérisé les actions biologiques contrôlées par l'IL-22 et IL-17 sur la muqueuse intestinale humaine en analysant les modifications transcriptomiques induites par ces cytokines sur des biopsies coliques de témoins sains cultivées *ex vivo*. Nous avons identifié des gènes impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale et dont les expressions sont maximisées en présence d'IL-22 et d'IL-17. C'est d'ailleurs, l'absence d'induction combinée de ces deux cytokines qui contribue à une moindre expression de ce programme moléculaire au sein des muqueuses inflammatoires des patients MICI. Cependant, nous avons démontré que l'on pouvait restaurer *ex vivo* l'expression des gènes du programme moléculaire dans les tissus MC en ajoutant artificiellement les cytokines. Enfin, nous avons montré qu'en présence d'IL-22BP, le programme de réponse médié par la combinaison de l'IL-22+IL-17 est inhibé. Son expression dans les muqueuses inflammatoires de patients MICI contribue à moduler les niveaux d'IL-22 disponible et ainsi en partie la bonne induction des gènes renforçant la barrière intestinale.

D'autres travaux ont aussi exploré les modifications transcriptomiques induites par ces cytokines mais en utilisant un modèle différent : les organoïdes (Sato et al., 2009). Développés à partir de CSI se différenciant en différents types cellulaires s'auto-organisant dans l'espace,

les organoïdes sont le reflet à la fois de la structure et des propriétés fonctionnelles d'un organe. Ainsi, le groupe de Powell et al, a montré que la stimulation d'organoïdes générés à partir de CSI murines pendant 24 h avec de l'IL-22, induisait significativement l'expression de 859 gènes (Powell et al., 2020). De même, les travaux de Patnaude et al. ont montré après stimulation d'organoïdes humains avec de l'IL-22 l'induction de nombreux gènes codant pour des PAMs, des mucines et des protéines de jonctions serrées (Patnaude et al., 2021). Au cours de notre étude et par opposition à ces travaux, la stimulation de biopsies entières avec des doses d'IL-22 dix fois plus concentrée n'a eu que très peu d'effets, puisque seulement 3 et 8 gènes ont été induits dans les muqueuses saines et MC respectivement. Cet effet relativement faible de l'IL-22 pourrait être dû à une altération de sa signalisation sur son récepteur exprimé au pôle basal des CEI et majoritairement dans les cryptes intestinales (Gaudino et al., 2020; Lindemans et al., 2015). En effet, les étapes préliminaires (transport/positionnement des biopsies dans les puits) au protocole de stimulation ont pu altérer la viabilité et la fonctionnalité des CEI des biopsies, pourtant non évaluées par des tests spécifiques. Une récente étude a démontré que lorsque l'IL-22 était ajoutée au pôle apical des CEI aucun effet n'était observé en comparaison à l'ajout de la cytokine au niveau du pôle basal (Patnaude et al., 2021). Ces données pourraient ainsi suggérer qu'au cours de notre protocole de stimulation, l'IL-22 additionnée dans le milieu de culture n'a pas bénéficié d'un accès correct à son récepteur ou bien n'a pas été suffisante pour induire une signalisation. Des stimulations avec une dose supérieure d'IL-22 pourront donc être envisagées, bien que celle utilisée était relativement importante (100ng/mL) et a déjà été validée dans d'autres protocoles de stimulation de biopsies fraîches (Begue et al., 2011). Par opposition à la fragilité des biopsies intestinales, les organoïdes plus stable dans le temps, permettent l'établissement de protocole avec des durées de stimulation pouvant aller de 96h (McCuaig et al., 2020) jusqu'à plusieurs jours (Patnaude et al., 2021). Par ailleurs, il a été démontré que les actions induites par l'IL-22 sont largement renforcées après 24h de stimulation an comparaison à 2h (McCuaig et al., 2020), soulignant que la stimulation des biopsies pendant 6 h pourrait constituer un facteur limitant. En outre, l'emploi des organoïdes permet d'étudier les actions biologiques induites sur des CEI nouvellement générées et n'ayant reçu au préalable que les signaux des facteurs de croissance nécessaires à leur différenciation (Sato et al., 2009). A l'inverse, les biopsies fraîchement extraites des muqueuses intestinales humaines, sont le siège de multiples signaux cytokiniques, d'autant plus nombreux dans des tissus inflammatoires MC,

pouvant induire des voies de signalisation inhibitrices. Ainsi, dans un modèle de co-culture d'organoïdes avec des LyT activés, les auteurs ont démontré que des gènes significativement induits par l'IL-22 sur les organoïdes seuls, ne le sont plus après addition de LyT activés (Patnaude et al., 2021).

Un autre modèle utilisé pour étudier les effets médiés par l'IL-22 est la stimulation de lignée cellulaire colique. Ce modèle réunissant une population homogène de cellules, est certes plus stable dans le temps, mais il ne permet pas d'étudier la variabilité inter-individuelle existante entre les échantillons humains et qui contribue à moduler les réponses biologiques. Ainsi, le groupe de Rudloff et al. a stimulé une lignée cellulaire (DLD-1) avec de l'IL-22 pendant 24 h et a identifié l'induction de 26 gènes (dont *MUC1*, *NNMT* et *CEA*), validés ensuite dans des organoïdes humains stimulés avec de l'IL-22 (Rudloff et al., 2020). Aucun de ces gènes n'est commun avec ceux que nous avons identifié après 6h de stimulation avec de l'IL-22 alors que l'induction de *MUC1* a été démontrée après stimulation d'organoïdes pendant 72h (Patnaude et al., 2021) confirmant un signal médié par l'IL-22 sur les CEI, n'ayant pas eu lieu au cours de notre modèle.

En comparaison aux organoïdes, la stimulation de biopsie a permis d'identifier des actions induites par l'IL-17 sur des cibles autres que les CEI comme les cellules stromales exprimant une sous-unité de l'IL-17R (Toy et al., 2006b). Cette information est non négligeable puisque dans des tissus inflammatoires, la part des cellules stromales est importante, notamment chez certains patients atteints de MICI décrivant un module cellulaire inflammatoire (Martin et al., 2019). La stimulation de tissu de patients MC avec de l'IL-17 n'a pourtant induit aucun gène suggérant un renforcement de ces actions *in vivo*. De plus, après une stimulation combinée, 37% des gènes identifiés sont exprimés par le tissu stromal et seulement 1.3% exclusivement. Ainsi, la majorité des gènes induits sont exprimés par les CEI et, bien que non démontré, certains ont pu être induits grâce à un dialogue entre CEI et les autres types cellulaires. En effet, en comparaison aux organoïdes, les signaux médiés par les cytokines sur les biopsies entières ont été intégrés dans un microenvironnement inflammatoire, notamment pour les tissus MC, permettant une interaction avec d'autres types cellulaires (macrophages, LyT) *via* la sécrétion de ligands. Ainsi, la co-culture de LyT activés avec des organoïdes a induit la sécrétion de cytokines (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) et chimiokines (IP-10) pro-inflammatoires, attestant donc d'un dialogue entre elles (Patnaude et al., 2021). Cette interaction entre CEI et cellules immunes contribue à pouvant moduler les réponses inflammatoires puisque les expressions

des gènes induits après stimulation d'organoïdes seuls sont renforcées comme *DEFB4A* ou alors inhibées comme *DMBT1* (Patnaude et al., 2021).

Notre étude, dans des tissus intestinaux humains, a donc apporté des clarifications quant aux rôles biologiques de ces cytokines chez l'homme. Nous avons identifié un programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 qui semble être impliqué dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale puisqu'il s'agit de gènes codant pour des PAMs (Prasad et al., 2019), des chimiokines (Hernández-Ruiz and Zlotnik, 2017), des transporteurs intestinaux d'ions (Ruffin et al., 2020) ainsi que des mécanismes de réponses oxydatives (Lambeth and Neish, 2014) et de régulation de réponse immune (Yamamoto et al., 2004). En outre, nous avons démontré l'importance de combiner les deux cytokines pour exercer sur la muqueuse intestinale des effets d'addition ou de synergie, confirmant ainsi les observations faites sur des kératinocytes (Liang et al., 2006b) et des organoïdes murins (Powell et al., 2020).

Bien que nous ayons identifié des modifications transcriptomiques en faveur d'un renforcement des propriétés de barrière intestinale, ces actions n'ont pas été validées par des tests fonctionnels comme l'observation d'une diminution de la perméabilité intestinale après stimulation cytokinique. Des rapports ont par ailleurs déjà mis en avant le rôle protecteur de l'IL-17 sur la diminution de la perméabilité intestinale entre deux CEI adjacentes (Lee et al., 2015b; Maxwell et al., 2015) alors que les effets médiés par l'IL-22 sur la perméabilité intestinale sont controversés (Patnaude et al., 2021; Wang et al., 2017b) bien que l'induction de la claudine-2 a été plusieurs fois démontrée. De plus, afin de valider les actions protectrices d'un renforcement de la signalisation IL-22+IL-17 sur les muqueuses intestinales, il apparaît important d'évaluer les expressions des gènes appartenant au programme moléculaire dans des biopsies fraîches de patients MICI, *via* des données de transcriptomiques publiques (Arijs et al., 2010; Haberman et al., 2014) puis de les corrélérer aux critères cliniques d'activité de la maladie comme la réponse sous traitement IS ou bien le risque chirurgical.

Ainsi, en stimulant des organoïdes murins, le groupe de Powell a réaffirmé ces fonctions de barrière mais aussi démontré que l'IL-22 induisait l'expression de gènes impliqués dans le stress du RE. En transposant ces données chez l'homme, ils ont caractérisé 62 gènes définissant un programme transcriptionnel associé au stress du RE dans les CEI dont l'expression, induite par l'IL-22, est enrichie au niveau des muqueuses inflammatoires de patients MICI (Powell et al., 2020). Finalement, ils démontrent que le blocage de l'IL-23, un

puissant inducteur d'IL-22/IL-17, a induit une diminution de l'expression des gènes associés au stress du RE, suggérant des actions délétères médiées par l'IL-22 et l'IL-17 par opposition à celles que nous avons identifiées.

Ces résultats suggèrent donc fortement l'importance de moduler les actions découlant de ces cytokines. De façon importante, en stimulant des tissus MC avec de l'IL-22 et de l'IL-17, nous avons démontré que nous pouvions restaurer les gènes identifiés dans une muqueuse saine démontrant des effets identiques des cytokines entre muqueuses saines et pathologiques (Patnaude et al., 2021). De futures analyses des modifications transcriptomiques induites après la stimulation de tissus inflammatoires permettront de caractériser les réponses cytokiniques induites sur des muqueuses pathologiques. Il conviendra donc d'évaluer les expressions des gènes associés à l'induction d'un stress du RE délétère sur des muqueuses. D'autant que nos résultats préliminaires ont identifié dans ces tissus stimulés des gènes impliqués dans d'autres processus biologiques. De plus, il est admis que des actions exacerbées de l'IL-22 sur des tissus inflammatoires peuvent contribuer à des processus de transformations tumorales (Kryczek et al., 2014b) et ses effets prolifératifs ont été décrits sur des organoïdes stimulés avec de l'IL-22 (Lindemans et al., 2015; Patnaude et al., 2021; Zwarycz et al., 2019). Ces résultats soulignent l'importance de finement réguler les actions induites par l'IL-22. Un axe de modulation est possible fait intervenir l'IL-22BP, puisque nous avons démontré que son ajout dans le milieu de culture a bloqué les actions induites par l'IL-22. Ces résultats sont confirmés par une autre étude ayant démontré que l'ajout d'IL-22BP au milieu de culture contenant de l'IL-22, a inhibé la prolifération des organoïdes (Patnaude et al., 2021). Dans les muqueuses inflammatoires de patients atteints de MICI, nous avons démontré que chez les patients présentant un ratio en faveur de moins d'IL-22 (dû à une moindre induction d'IL-22 en parallèle de la présence d'IL-22BP) disponible s'associait à une moindre induction des gènes identifiés comme induits par l'IL-22 et l'IL-17. Ces données suggèrent fortement que l'IL-22BP présente dans les muqueuses inflammatoires de patients MICI, pourrait à lui seul moduler l'expression du programme moléculaire, bien que cette information mérite d'être confirmée en stimulant des biopsies fraîches MC avec un inhibiteur d'IL-22BP.

En conclusion, nous avons identifié des gènes induits par la combinaison de l'IL-22 et l'IL-17 impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière de l'épithélium intestinale et dont les expressions peuvent être restaurées dans des muqueuses inflammatoires MC. Bien que ces gènes pourraient être associés à des effets protecteurs au cours des MICI en contribuant

à la résolution de l'inflammation intestinale *via* la restauration d'une barrière intestinale efficace limitant les translocations bactériennes, une évaluation de leur expression dans des biopsies fraîches de patients MICI corrélée à l'activité de la maladie permettra d'en valider l'intérêt thérapeutique.

**Tableau 4 : Principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans la cohorte rétrospective.**  
 Abréviations : H : Homme, F : Femme, anti-TNF $\alpha$  : Anticorps dirigés contre le facteur de nécrose tumorale, IS : Immunosuppresseurs, \* : moyenne  $\pm$  écart type

	<b>Contrôle (n=16)</b>	<b>MC (n=17)</b>	<b>RCH (n=22)</b>
Genre (F/H)	NA	(9/8)	(11/11)
Age (années)*	NA	32 $\pm$ 9.1	39 $\pm$ 10.6
Durée d'évolution (années)*	NA	10 $\pm$ 6.7	7 $\pm$ 4.8
Tabac (oui/non)	NA	(6/8), NA (n=3)	(0/20)
<b>Localisation de l'atteinte (MC)</b>			
<i>iléon</i>		1	
<i>colon</i>	NA	6	
<i>iléonm + colon</i>		10	
<b>Localisation de l'atteinte (RCH)</b>			
<i>rectum</i>			4
<i>colique gauche</i>	NA		8
<i>pan-colique</i>			10
<b>Traitement en cours</b>			
<i>anti-TNF<math>\alpha</math></i>		5	8
<i>IS</i>		4	3
<i>anti-TNF<math>\alpha</math>+IS</i>		3	1
<i>anti-intégrine (<math>\alpha</math>4<math>\beta</math>7)</i>		0	0
<i>absence</i>		4	10

**Tableau 5 : Principales caractéristiques cliniques des patients inclus dans la cohorte prospective.**  
 Abréviations : H : Homme, F : Femme, anti-TNF $\alpha$  : Anticorps dirigés contre le facteur de nécrose tumorale, IS : Immunosuppresseurs, \* : moyenne  $\pm$  écart type.

	<b>Contrôle (n=8)</b>	<b>MC (n=32)</b>
Genre (F/H)	(1/4), NA (n=3)	(15/17)
Age (années)*	71 $\pm$ 4,6	33 $\pm$ 12.5
Durée d'évolution (années)*	NA	8 $\pm$ 7,3
Tabac (oui/non)	NA	(15/13)
<b>Localisation de l'atteinte</b>		
<i>iléon</i>		4
<i>colon</i>	NA	5
<i>iléon + colon</i>		23
<b>Phénotype</b>		
<i>B1</i>		7
<i>B2</i>		9
<i>B3</i>	NA	4
<i>B2B3</i>		7
<i>Non déterminé</i>		5
<i>Chirurgie (oui/non)</i>		(8/24)
<b>Traitement en cours</b>		
<i>anti-TNF<math>\alpha</math></i>		12
<i>IS</i>		4
<i>anti-TNF<math>\alpha</math>+IS</i>	NA	5
<i>anti-intégrine (<math>\alpha</math>4<math>\beta</math>7)</i>		4
<i>absence</i>		4

**Tableau 6** : Liste des sondes Taqman utilisées lors des qPCR.

<b>Cible</b>	<b>Gènes</b>	<b>Référence</b>	<b>Fournisseur</b>
LCN2	<i>LCN2</i>	Hs0100857_m1	Applied Biosystems
BD2	<i>DEFB4A</i>	Hs00175474_m1	Applied Biosystems
BD3	<i>DEFB103A</i>	Hs00218678_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>IL22</i>	Hs01574154_m1	Applied Biosystems
IL-22BP	<i>IL22RA2</i>	Hs00364814_m1	Applied Biosystems
IL-17	<i>IL17</i>	Hs00174383_m1	Applied Biosystems
HPRT	<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1	Applied Biosystems
CCL20	<i>CCL20</i>	Hs00355476_m1	Applied Biosystems
HAMP	<i>HAMP</i>	Hs00221783_m1	Applied Biosystems
SLC6A14	<i>SLC6A14</i>	Hs00924564_m1	Applied Biosystems
DUOX2	<i>DUOX2</i>	Hs00204187_m1	Applied Biosystems
PDZK1IP1	<i>PDZK1IP1</i>	Hs00173779_m1	Applied Biosystems

*DISCUSSION &*  
*PERSPECTIVES*

## Discussion et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la modulation au cours de la MC de l'axe IL-22/IL-22BP/IL-22R. En effet, la réponse immune induite au cours de la MC en réponse aux translocations bactériennes massives dues à l'affaiblissement de la muqueuse intestinale aboutit, entre autres à la sécrétion d'IL-22 parmi d'autres cytokines inflammatoires. De plus, il a été démontré que contrairement aux colites d'origine infectieuse, l'inhibiteur soluble de l'IL-22, l'IL-22BP est exprimé dans les muqueuses inflammatoires de patients MICI (Martin et al., 2016b; Pelczar et al., 2016b). Des études préalables *via* des modèles expérimentaux de colite chez l'animal ont mis en lumière que l'IL-22BP bloquait les actions protectrices induites par l'IL-22 sur la muqueuse intestinale (Huber et al., 2012b; Kempski et al., 2020; Martin et al., 2016b; Pelczar et al., 2016b). De plus, la proposition que les LyT constitueraient la source principale d'IL-22BP au cours des MICI (Pelczar et al., 2016b) nous a amené à clarifier ces sources cellulaires chez des patients MC.

Les résultats obtenus n'ont apporté aucun argument en faveur d'une production majoritaire par les LyT mais ont plutôt renforcé l'idée que ce sont les éosinophiles résidants de la LP qui sont la source principale d'IL-22BP. Nous avons démontré une hétérogénéité des niveaux intestinaux d'IL-22BP au sein des muqueuses saines et MC. Nous avons cherché à comprendre cette variabilité et ainsi identifié que la production iléale était plus importante. En outre, nous avons observé de façon intéressante, que les forts niveaux d'IL-22BP des muqueuses coliques MC correspondaient uniquement à des patients fumeurs.

Nous nous sommes aussi intéressés, au rôle endossé par l'IL-22BP dans la modulation des actions induites par l'IL-22 et celles en combinaison avec l'IL-17 chez les patients atteints de MC. Ainsi, nous avons caractérisé les actions biologiques contrôlées par l'IL-22 et IL-17 sur la muqueuse intestinale humaine saine en analysant les modifications transcriptomiques induites par ces cytokines sur des biopsies cultivées *ex vivo*. Nous avons identifié des gènes impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière de la muqueuse intestinale et dont les expressions sont maximisées en présence d'IL-22 et d'IL-17. C'est d'ailleurs l'absence d'induction combinée de ces 2 cytokines qui contribue à une moindre expression de ce programme moléculaire chez certains patients MC. Cependant, nous avons pu démontrer que nous pouvions le restaurer au niveau des muqueuses MC en apportant artificiellement les cytokines. Enfin, nous avons montré qu'en présence d'IL-22BP, le programme de réponse

médié par la combinaison de l'IL-22+IL-17 est inhibé. L'ensemble de ces résultats apportent ainsi de nouvelles informations permettant de mieux comprendre l'interaction IL-22BP/IL-22 au cours de la MC.

## I. Les sources cellulaires d'IL-22BP

Depuis sa découverte, au début des années 2000, de nombreux travaux se sont intéressés à caractériser les sources cellulaires d'IL-22BP chez le rongeur (rat et souris) ainsi que chez l'homme. C'est d'ailleurs la récente publication du groupe de S. Huber proposant les LyT CD4<sup>+</sup> de la LP comme une source additionnelle intestinale d'IL-22BP (Pelczar et al., 2016b) qui nous ont amené à clarifier ces sources chez l'homme dans un contexte inflammatoire. En effet, ces résultats obtenus sont en contradiction avec ceux que nous avons précédemment publiés et qui indiquent une production restreinte à un sous type de DCs immatures et aux éosinophiles (Martin et al., 2016a). En plus de ces résultats contradictoires, les données actuelles indiquent une discordance entre espèces.

### a. Les cellules dendritiques (DCs)

Les résultats obtenus au cours de ce travail (**Article 1**) ainsi que ceux précédemment publiés (Kempski et al., 2020; Martin et al., 2016b; Pelczar et al., 2016b) ont démontré que chez l'homme, les DCs immatures constituent une source cellulaire d'IL-22BP dans la LP et les ganglions mésentériques (GM) à l'homéostasie et en cas d'inflammation.

Il a été établi une classification des 3 sous-types de DCs intestinales, présentant chacune des propriétés phénotypiques et fonctionnelles spécifiques et qui ont été conservées au cours de l'évolution (Watchmaker et al., 2014). Les DCs murines CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> enrichies dans le colon et les DCs CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>+</sup> localisées dans les OLS (Edelson et al., 2010) partagent des caractéristiques phénotypiques/transcriptomiques avec les DCs intestinales humaines CD103<sup>+</sup> SIRPα<sup>-</sup> CD141<sup>+</sup> CLEC9A<sup>+</sup> constituant ainsi le groupe des DC1. Ces DCs, exprimant les facteurs de transcription *IRF8* et *BATF3*, induisent la polarisation vers les voies Th1 et Treg/activation des LyT CD8<sup>+</sup> et sont douées de propriétés de cross-présentation (Sun et al., 2020). Les DC2, définis chez la souris CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> dans l'iléon et CD11b<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> dans les OLS sont phénotypiquement/fonctionnellement proches des DCs humaines double positive CD103<sup>+</sup> SIRPα<sup>+</sup> (CD172<sup>high</sup>), exprimant le facteur de transcription *IRF4* et impliquées dans la polarisation vers les voies Th17, Th2 et Treg (Persson et al., 2013). Un dernier sous-type de

DCs (DC3) dont la fréquence est plus rare dans la LP humaine CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> SIRPα<sup>+</sup> présentent des similarités transcriptomiques avec les DCs murines CX3CR1<sup>int</sup> et induisent la production d'IFNγ par les LyT Th1 (Watchmaker et al., 2014). Des DCs plasmacytoïdes intestinales (pDCs) (CD123<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup> BDCA4<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>) infiltrant la LP depuis la circulation sanguine ne présentent pas de propriétés migratrices jusqu'aux OLS en comparaison aux 3 sous-type de DCs (DC1, DC2, DC3) (Worbs et al., 2017). Il apparaît ainsi que chaque groupe de DC présente une ontogénie spécifique qui a été conservée au cours de leur évolution. Chez l'homme, les travaux de Watchmaker et al. ont permis d'identifier les DC2 comme le principal sous-type de DCs exprimant le gène *IL22RA2* (Watchmaker et al., 2014). De façon intéressante chez le rongeur, les DC2 constituent aussi le sous-type principal de DCs exprimant l'*Il22ra2*, démontrant ainsi une caractéristique spécifique et conservée.

Ainsi, chez le rat, nous avons montré que les DCs CD4<sup>+</sup> au niveau des GM et les CD172α<sup>high</sup> intestinales exprimaient les plus fort niveaux d'*Il22ra2* (Martin et al., 2014b). Ces sous-types de DCs CD172α<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> correspondent aux DC2 de rat (Milling et al., 2010).

Chez la souris, il a été clairement établi que les DCs conventionnelles représentaient une source majeure d'IL-22BP dans les OLS (Fukaya et al., 2018; Pelczar et al., 2016b) et la LP du colon (Huber et al., 2012b; Pelczar et al., 2016b). Les travaux de notre équipe ont démontré que les DC2 murines (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) représentaient la source majeure d'IL-22BP dans la LP tandis que les DC1 (CD103<sup>+</sup> CD8α<sup>+</sup>) en exprimaient que très faiblement (Martin et al., 2014b). De plus, ces données sont supportées par les résultats provenant de puces à ADNc murines obtenues dans le cadre du projet « Immunological Genome Project » ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)). Dans les OLS, il a aussi été montré que ce sont les DC2 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) qui expriment fortement l'*Il22ra2* en comparaison aux DC1 (CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>+</sup>) (Martin et al., 2014b). Le groupe de Jinnohara et al. a confirmé ces résultats en démontrant une expression majoritaire d'*Il22ra2* par les DC2 (CD11b<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup>) localisées au niveau du dôme sub-épithélial des PP (Jinnohara et al., 2017). Ainsi, l'expression d'IL22BP par les DC2 de souris, de rat et humaine souligne une caractéristique intrinsèque à ce sous-type de DCs, conservée au cours de leur évolution.

Récemment, un rapport a confirmé que les DC2 murines constituaient le sous-type principal de DCs producteur d'IL-22BP (Guendel et al., 2020b). En effet, les auteurs ont identifié un sous-type distinct et rare de DC localisé dans les cryptopatches et les follicules lymphoïdes isolés (FLI) (CIA-DC) exprimant fortement l'*Il22ra2*. Bien que ces cellules soient LysM<sup>+</sup>, un

marqueur spécifique des macrophages (Faust et al., 2000), ils identifient des marqueurs caractéristiques de DCs intestinales (CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>) avec l'expression du facteur de transcription *Zbtb46* (Satpathy et al., 2012) et PLET1<sup>+</sup> (Karrich et al., 2019). De plus, ces cellules sont indépendantes du facteur M-CSF (colony stimulating factor), crucial pour la différenciation et maintenance des macrophages intestinaux (McDonald et al., 2010), n'expriment pas F4/80, CD64, CX3CR1 (Longman et al., 2014) et présentent un profil transcriptomique plus proche des DC2 (LysM<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>) que des macrophages, démontrant qu'il s'agit d'un sous-type de DCs intestinales *IRF4*<sup>+</sup> (DC2). Par opposition à cette étude, le groupe de Savage a rapporté une expression d'*Il22ra2* à l'homéostasie par un sous-type de macrophages intestinaux Yet40<sup>+</sup> (CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>low</sup> CD172α<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup> MerTK<sup>+</sup>) localisés dans les mêmes structures (FLI) et une absence d'expression par les DCs (CD11c<sup>+</sup> CD64<sup>-</sup>) (Savage et al., 2017). Les FLI sont enrichis en cellules mononucléées CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> (CIA-MNP). Certains rapports ont rapproché ces cellules aux DCs (Guendel et al., 2020b; Satpathy et al., 2012) d'autres aux macrophages (Longman et al., 2014; Savage et al., 2017) soulignant la difficulté de clairement les identifier. Les études de Guendel et Savage ont toutes les deux rapporté des cellules exprimant l'*Il22ra2* au niveau des FLI, laissant ainsi supposer qu'il peut s'agir des mêmes cellules. Il est important de souligner que les techniques utilisées pour identifier les cellules *Il22ra2* diffèrent entre les 2 rapports. Le groupe de Guendel a analysé en single cell RNA-seq les profils transcriptomiques des différentes fractions cellulaires isolées des FLI tandis que les travaux de Savage et al ont reposé sur l'analyse d'*Il22ra2* en qPCR sur des cellules fraîchement triées, suggérant des résolutions d'identification différentes. En effet, le single cell RNA-seq permet une investigation de populations rares (comme celles exprimant l'*Il22ra2*) par opposition aux techniques de qPCR. Cependant, les travaux de Guendel et al. ont identifié des cellules CD64<sup>-</sup> (CD64 est un marqueur caractéristique des macrophages)(Longman et al., 2014) alors que celles exprimant l'*Il22ra2* dans l'étude de Savage sont CD64<sup>+</sup>. Au-delà de leur caractéristique phénotypique différente, il a été mis en avant dans les 2 rapports que ces cellules exprimant l'*Il22ra2* ont des rôles similaires (Guendel et al., 2020b; Savage et al., 2017). En effet, dans les FLI, elles établissent des interactions étroites avec les LTi *via* la production d'IL-23, contribuant ainsi à l'établissement d'une plateforme de régulation de la production d'IL-22 dans ces zones lymphoïdes isolées. D'autres travaux ont aussi rapporté une expression d'*Il22ra2* par des cellules exprimant des marqueurs spécifiques des macrophages murins, qui pourrait être supérieure à celle des DCs. Ainsi, au

niveau du dôme sub-épithélial des PP, un groupe a montré que les macrophages (MerTK<sup>+</sup>, Lysozyme<sup>+</sup>, Tim4<sup>-</sup>, CX3CR1<sup>+</sup>) exprimeraient des niveaux plus élevés d'*Il22ra2* par rapport aux DC2 (Da Silva et al., 2017). Jinnohara et al, a montré une expression d'*Il22ra2* par les macrophages CD103<sup>-</sup> de la LP supérieur aux DCs CD103<sup>+</sup> (Jinnohara et al., 2017). De plus, en comparant au cours d'une infection fongique, les profils transcriptomiques des macrophages CX3CR1<sup>+</sup> *versus* des DC2, l'expression d'IL-22BP est apparue plus forte dans la fraction macrophagique (Leonardi et al., 2018). Cette expression d'IL-22BP par les macrophages murins a été identifiée dans d'autres tissus, comme le tissu pulmonaire infiltré par des macrophages alvéolaires et interstitiels au cours d'une infection à *Influenza* (Hebert et al., 2020) ou encore dans les ganglions par les macrophages résidents des zones T (CX3CR1<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, MERTK<sup>+</sup>)(Baratin et al., 2017). A l'homéostasie, ces cellules résidentes exprimant des gènes anti-inflammatoires, sont impliquées dans l'élimination des cellules apoptotiques présentes dans les OLS. L'expression d'*Il22ra2* est propre à ces macrophages résidents des zones T, puisque ceux des poumons, du péritoine, de la pulpe rouge ou du cerveau n'en expriment pas(Baratin et al., 2017). Cependant, aucune identification de la production protéique d'IL-22BP par les macrophages n'a été faite en comparaison aux DCs (Martin et al., 2014b). L'ensemble de ces résultats sont donc en faveur d'une production d'IL-22BP par les cellules phagocytaires mononuclées (DCs et macrophages).

Bien que des données soient disponibles chez le rongeur, nous avons évalué pour la première fois l'expression d'IL-22BP par les DCs localisées dans les GM de patients MC (**Article 1**). Nous n'avons pas pu comparer ce niveau de production à celui de DCs présentes dans un ganglion sain, puisqu'il s'agit de prélèvement précieux et difficile à obtenir dans ce contexte. Cependant, les données attestant d'une production d'IL-22BP par le rongeur à l'homéostasie pourraient suggérer que les DCs humaines d'un ganglion sain en expriment aussi. De plus, le rôle exact endossé par l'IL-22BP dans les OLS est encore méconnu. Des données chez le rat ont démontré qu'au cours d'une immunisation, l'absence d'IL-22BP s'associait à des centres germinatifs (CG) plus petits, suggérant ainsi que l'IL-22BP pourrait jouer un rôle dans l'induction de réponses immunes (Lindahl et al., 2019a). De plus, le développement correct des OLS et la formation des CG sont assurés par la lymphotoxine (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) produite par les LTi. (Roosendaal and Mebius, 2011). En effet, elle assure le maintien des DCs folliculaires (FDC) exprimant son récepteur LT $\beta$ R. Il a été récemment démontré que la LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 induisait l'expression d'IL-22BP par les MoDC (Kempski et al., 2020). En parallèle, il a été rapporté que

les FDC isolées d'amygdales pédiatriques exprimaient l'IL-22R et qu'une stimulation avec de l'IL-22 induisait l'expression de CXCL13, une chimiokine jouant un rôle important dans la formation des GC (Corneth et al., 2016). Il n'a pas été clairement identifié une production d'IL-22BP par les FDC. Ainsi, à la lumière de ces données, il apparaît intéressant au cours de futurs travaux d'explorer les mécanismes reliant l'axe  $LT\alpha1\beta2$ /IL-22BP/IL-22R sur les FDC.

Les données chez la souris suggèrent fortement que l'expression d'IL-22BP est indépendante de la flore puisque équivalente entre les souris dépourvues ou non d'une flore commensale (Jinnohara et al., 2017). Cependant, les signaux environnementaux de la LP régulent en permanence la production d'IL-22BP par les DCs. Ainsi, leur maturation (ligands des TLRs) diminuent drastiquement l'expression d'*IL22RA2* (**Article 1**) (Gómez-Fernández et al., 2018b; Lim et al., 2016a; Lindahl et al., 2019b; Martin et al., 2014b). C'est d'ailleurs l'induction d'une maturation au cours du protocole d'extraction des DCs de la muqueuse MC qui explique l'absence de détection d'IL-22BP dans les surnageants de culture. Le RA constitue un puissant inducteur de la production d'IL-22BP (**Article 1**) (Gómez-Fernández et al., 2018b, 2019; Lim et al., 2016a; Lindahl et al., 2019b; Martin et al., 2014b), tout comme l'IL-6 (Voglis et al., 2018b) et la  $LT\alpha1\beta2$  (Kempski et al., 2020), bien que les niveaux d'induction n'aient pas été comparés. De plus, les mécanismes régulant la sécrétion d'IL-22BP par les DCs ne sont actuellement pas encore connus. Il a été démontré que la  $LT\alpha1\beta2$  exprimée par les LTi ( $ROR\gamma^+$   $CCR6^+$ )(ILC3)(Kruglov et al., 2013) résidents des cryptopatches et FLI murines induirait l'expression d'*Il22ra2* par un sous-type de DCs exprimant  $LT\beta R$  (Guendel et al., 2020b). De plus dans ces mêmes formations lymphoïdes murines (FLI et cryptopatches), il a aussi été mis en évidence un rétrocontrôle positif de la production d'IL-22 par les ILC3  $ROR\gamma^+$  via un mécanisme  $LT\alpha1\beta2$ -dépendant (Tumanov et al., 2011). En effet, la  $LT\alpha1\beta2$  exprimée par les ILC3 interagit avec le  $LT\beta R$  à la surface des DCs et stimule en retour la production d'IL-23, un puissant inducteur d'IL-22 par les ILC3 (Sonnenberg et al., 2011b). Ainsi, la  $LT\alpha1\beta2$  apparaît, chez la souris, comme un médiateur régulant à la fois la production d'IL-22 et d'IL-22BP afin d'assurer une homéostasie intestinale. De récentes données chez l'homme ont d'ailleurs identifié un déséquilibre de l'expression de la  $LT\alpha1\beta2$  au cours du CRC avec une diminution de son expression allant de pair avec une diminution de l'IL-22BP (Kempski et al., 2020). Enfin, parmi les signaux régulateurs de la production d'IL-22BP, une influence du génotype a aussi été démontrée. Ainsi, concernant le polymorphisme (rs17066096) sur le gène *IL22RA2*, la présence de l'allèle G à l'état homozygote est associée à une expression significativement plus

élevée d'*IL22RA2* par les MoDC différenciées en présence de RA à partir de monocytes de volontaires sains (Lindahl et al., 2019a). Une autre étude a identifié 2 polymorphismes associés à une plus forte expression d'*IL22RA2* et à des formes sévères de fibroses dans une cohorte chinoise de patients infectés avec le parasite *S.japonicum* (Sertorio et al., 2015).

#### b. Les lymphocytes T

Chez la souris, il a été avancé qu'en plus des DCs, les LyT CD4<sup>+</sup> mémoires de la LP et des ganglions exprimeraient l'*Il22ra2* (Pelczar et al., 2016b). D'autres données du même groupe, ont démontré une induction d'*Il22ra2* par les LyT infiltrant le foie au cours d'un modèle expérimental d'hépatite (Kleinschmidt et al., 2017). Pourtant, ces résultats sont controversés par différents rapports ayant démontré une absence d'expression d'*Il22ra2* par les LyT CD4<sup>+</sup> murins de la LP (Guendel et al., 2020b; Savage et al., 2017) ou des OLS (Laaksonen et al., 2014b) ou alors avec des niveaux équivalents aux LyB (Fukaya et al., 2018) actuellement non considérés comme une source d'IL-22BP. De même, chez le rat, nous n'avons pas mis en évidence d'expression significative d'*Il22ra2* par les LyT triés de la rate (Martin et al., 2014a) ou des OLS (Lindahl et al., 2019a). Des travaux récents de notre groupe ont confirmé ces résultats à l'aide de rats rapporteurs IL-22BP<sup>eGFP</sup> qui ne retrouvent aucun signal GFP dans les fractions T. De plus, l'expression d'*Il22ra2* a été retrouvée de façon indétectable dans les LyT CD4<sup>+</sup> mémoires fraîchement isolés de GM de rats (Abidi et al, résultats non publiés).

Un argument important dans la publication de Pelczar et al. repose sur la démonstration de l'induction d'un phénotype protecteur au cours du modèle de colite induit par le transfert de LyT CD4<sup>+</sup> naïfs isolés d'un animal déficient en IL-22BP chez des souris receveuses *Rag1*<sup>-/-</sup> (Pelczar et al., 2016b). Par ailleurs, nous avons déjà démontré que les rats déficients en IL-22BP présentaient un phénotype protecteur au cours d'un modèle de colite au DSS par opposition aux rats sauvages (Martin et al., 2016b). Malgré l'absence d'argument probant d'une production d'IL-22BP par les LyT de rat, nous avons évalué les effets de l'injection de LyT naïfs déficients en IL-22BP chez des rats immunodéprimés (*Il2rg*<sup>-/-</sup>). Contrairement à S. Huber, nous n'avons pas observé de différence sur la perte de poids entre les rats ayant reçu l'injection de lymphocytes T naïfs *Il22ra2*<sup>-/-</sup> et *Il22ra2*<sup>+/+</sup> (**Article 1**). Ainsi, l'injection de LyT issus d'un animal ne produisant pas d'IL-22BP n'a pas réduit le phénotype clinique de la colite renforçant l'idée qu'ils n'en expriment pas. Cependant, il est important de mentionner que notre modèle de colite n'est pas exactement comparable à celui de S. Huber : injection de LyT

naïfs CD45RC<sup>high</sup> pour nous *versus* CD45RB<sup>high</sup>, animaux receveurs immunodéficients *Il2rg*<sup>-/-</sup> pour nous *versus Rag1*<sup>-/-</sup> et espèces différentes : rat *versus* souris. Concernant l'espèce ; ce n'est pas la première fois que des discordances sont observées au cours de modèles de colite. En effet, alors que nous avons observé un phénotype protecteur chez les rats déficients en IL-22BP au cours d'un modèle de colite au DSS (Martin et al., 2016a) S. Huber n'a observé aucune différence entre ces souris *Il22ra2*<sup>-/-</sup> et *Il22ra2*<sup>+/+</sup> (Huber et al., 2012a; Kempski et al., 2020), expliquée par la diminution drastique d'expression d'IL-22BP au cours d'un modèle de DSS uniquement chez la souris (Huber et al., 2012a). Ainsi, nous pouvons poser la même hypothèse d'une discordance entre le rat et la souris concernant le modèle de colite par transfert, d'autant que les cinétiques d'expression d'IL-22BP au cours de ce modèle n'ont pas été évaluées. Une autre hypothèse proposée serait que les LyT isolés de souris déficientes en IL-22BP présenteraient un phénotype particulier. Cependant, aucune différence sur les expressions cytokiniques ou de Foxp3 n'a été rapportée entre les animaux déficients en IL-22BP et sauvages (Pelczar et al., 2016a).

Chez l'homme, le groupe de S. Huber a démontré une expression d'IL-22BP par les LyT CD4<sup>+</sup> localisés dans les muqueuses intestinales normales et inflammatoires (Pelczar et al., 2016b). Un récent rapport du même groupe a conforté ces résultats en démontrant une expression en ARNm et protéique d'IL-22BP par les LyT dans un contexte de CRC (Kempski et al., 2020). D'après eux, dans les muqueuses inflammatoires MICI, les LyT se mettraient à produire plus d'IL-22BP en comparaison aux DCs (Pelczar et al., 2016b). Cependant, leurs résultats témoignent aussi d'une induction d'IL-22BP par les DCs, même si elle n'est pas mentionnée (Pelczar et al., 2016b). Nous n'avons pas confirmé une expression majoritaire d'*IL22RA2* par les LyT isolés de muqueuses inflammatoires de patients atteints de MC (**Article 1**). En effet, nous avons observé que l'expression d'*IL22RA2* par les LyT CD4<sup>+</sup>, isolés de la LP ou des GM, était relativement faible voir indétectable. Dans tous les cas, elle apparaît 100 à 1000 fois plus faible en comparaison aux DCs. De plus, l'activation des LyT n'a pas induit l'expression d'*IL22RA2*. Bien que les niveaux soient extrêmement faibles en qPCR, nous ne pouvons pas exclure qu'une fraction infime des LyT produise de l'IL-22BP. Cependant, les données transcriptomiques au niveau unicellulaire obtenues sur une cohorte de patients atteints de MC renforcent nos résultats puisqu'ils n'ont identifié aucune expression d'IL-22BP dans les fractions T (Martin et al., 2019).

Leur résultats d'expression d'*IL22RA2* par les LyT CD4<sup>+</sup> sont appuyés par une validation protéique en cytométrie en flux (Kempski et al., 2020; Pelczar et al., 2016b). Ces marquages intracellulaires de l'IL-22BP soulèvent cependant quelques interrogations puisque l'ensemble des DCs apparaissent positives alors qu'un sous-type de DCs a été clairement identifié comme producteur majoritaire d'IL-22BP. De plus, nous n'avons pas reproduit ces marquages en FACS avec le même anticorps. Enfin, des marquages en IFI sur des muqueuses MC n'ont pas mis en évidence de double positivité entre les cellules IL22BP<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup> (Martin et al., 2016a). Pour renforcer notre propos, ces mêmes marquages sont actuellement en cours de réalisation sur des coupes de GM issues de patients atteints de MC.

### c. Les éosinophiles

Nos travaux précédents ont identifié les éosinophiles résidents de la LP intestinale comme la source cellulaire principale d'IL-22BP dans un tissu sain et inflammatoire chez l'homme (Martin et al., 2016b). Cette nouvelle source d'IL-22BP, propre à l'homme, a par la suite été confirmée par d'autres travaux (Kempski et al., 2020; Pelczar et al., 2016b) dont celui présenté dans l'**Article 1**. Ces données indiquent donc des variabilités inter-espèces concernant la production d'IL-22BP bien que certains points mécanistiques restent à élucider.

Chez l'homme, nous savons que les ligands de AhR (récepteur d'aryl hydrocarbure) présents dans l'alimentation (dérivés du tryptophane, flavonoïdes and glucosinolates) et l'environnement (fumées de cigarette) (Ouyang and O'Garra, 2019), ou encore le rythme circadien (Teng et al., 2019) et les facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules gliales (Ibiza et al., 2016) correspondent à des signaux inducteurs de l'expression d'IL-22. Une étude a par ailleurs montré qu'une alimentation pauvre en ligands de l'AhR provoquait chez la souris, une diminution significative de la fraction des ILC3 ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (Kiss et al., 2011). Ainsi, nous pouvons poser l'hypothèse qu'en raison des différences sur l'exposition à ces inducteurs d'IL-22, les niveaux basals de production d'IL-22 dans la LP entre le rongeur de laboratoire et l'homme sont différents. Des quantifications d'expressions d'IL-22 à partir de sondes ciblant les séquences conservées entre l'homme et la souris seraient intéressantes (80% d'homologie entre l'IL-22 humaine et celle de rongeur). Plusieurs travaux chez la souris ont démontré que l'IL-22BP produite à l'état basal jouerait un rôle prépondérant dans le contrôle des actions homéostatiques de l'IL-22. En effet, en l'absence d'IL-22BP, un renforcement des actions induite par l'IL-22 a été observé à l'homéostasie : induction de l'expression du PAM *Reg3g*

(Couturier-Maillard et al., 2018a), diminution des transporteurs épithéliaux lipidiques (Guendel et al., 2020b) ou encore une résistance aux infections (Fachi et al., 2020). C'est pourquoi, nous pouvons supposer qu'au niveau de la LP humaine, les niveaux de production d'IL-22 à l'homéostasie par les ILC3 et les LyT ont nécessité un contrôle additionnel *via* un mécanisme adaptatif de production par les PNE. De plus, chez le rongeur comme chez l'homme, la production homéostatique d'IL-22 est plus importante dans l'iléon en comparaison au colon (Krämer et al., 2017), corrélant avec l'infiltration des PNE dans la LP humaine qui est maximale au niveau de l'iléon (DeBrosse et al., 2006; Lee et al., 2018; Loktionov, 2019; Matsushita et al., 2015). Nos résultats montrent des niveaux protéiques intestinaux d'IL-22BP significativement plus élevés dans l'iléon par rapport au colon à la fois dans des tissus humains normaux et inflammatoires (**Article 1**). De plus, ces niveaux intestinaux sont corrélés avec ceux de l'éotaxine 2, une chimiokine clé impliquée dans le recrutement des PNE dans la LP (Rothenberg and Hogan, 2006). Bien que cette hypothèse d'une production par les PNE nous apparaisse la plus plausible compte tenu de leur fréquence dans la LP, ces forts niveaux d'IL-22BP iléaux pourraient aussi être expliqués par une forte accumulation de DCs au niveau des PP (Buettner and Lochner, 2016) ou des FLI (Moghaddami et al., 1998). De même, les PP qui sont retrouvées uniquement dans l'iléon (Cornes, 1965; Ganusov and De Boer, 2007) laissent supposer une fréquence plus importante de LyT à ce niveau bien que certaines études ne l'aient pas démontrée (Reikvam et al., 2011; Wolff et al., 2012). De plus, nous n'avons pas démontré de corrélation positive entre les niveaux protéiques intestinaux d'IL-22BP et du TNF $\alpha$  (**Article 1**), contrairement à S. Huber sur les expressions *IL22RA2* et *TNF $\alpha$*  (Pelczar et al., 2016b).

Aucune production d'IL-22BP n'a été détectée dans les PNE circulants (Martin et al., 2016a) suggérant qu'après leur infiltration dans la LP, l'environnement intestinal induit cette capacité à produire de l'IL-22BP. De plus, l'expression d'IL-22BP par d'autres éosinophiles tissulaires comme ceux de la glande mammaire exprimant, comme dans l'intestin, de l'IL-22BP à l'homéostasie serait intéressante à caractériser, d'autant que les PNE largement infiltrés dans ces glandes contribuent à leur développement (Weller and Spencer, 2017). L'absence de détection d'expression d'IL-22BP par les PNE de rongeur pourrait ainsi s'expliquer par un environnement intestinal chez ces animaux de laboratoire dépourvus de signaux inducteurs du phénotype de PNE producteur d'IL-22BP. Il apparaît donc important avant de conclure à cette variabilité inter-espèce, d'explorer la production d'IL-22BP par les PNE intestinaux isolés

d'un animal sauvage. Au sein des tissus, les PNE relarguent des médiateurs, selon un mode de dégranulation qualifié de fragmentaire, en réponse à des influx cytokiniques comme l'IFN $\gamma$  ou les éotaxines produites par les macrophages et les CEI (Melo et al., 2008; Spencer et al., 2014). Cependant les signaux modulant la production et la sécrétion d'IL-22BP par les PNE n'ont pas encore été décrits.

En conclusion de cette partie, il apparaît que les DC2 et les éosinophiles constituent la source majoritaire d'IL-22BP dans l'intestin chez l'homme à l'homéostasie et en cas d'inflammation.

## II. Rôle de l'IL-22BP au cours de la maladie de Crohn

### a) L'expression d'IL-22BP est hétérogène au cours de la MC

Contrairement aux colites d'origine infectieuse, il a été décrit une augmentation de l'expression d'IL-22BP au niveau des muqueuses inflammatoires des patients MICI expliquée par une accumulation de PNE (Martin et al., 2016b) ou par une production accrue par des LyT CD4<sup>+</sup> (Pelczar et al., 2016b). Dans ce travail, nous n'avons pas mis en évidence de différences concernant les niveaux de sécrétion d'IL-22BP entre des biopsies de muqueuses intestinales saines et MC (**Article 1**, Figure 3). Comme pour l'expression en ARNm, nous avons cependant constaté une grande hétérogénéité d'expression d'IL-22BP dans la LP humaine. Nous avons cherché à comprendre cette variabilité et ainsi identifié que la production iléale était plus importante, probablement en lien avec l'infiltration des éosinophiles dans ces tissus. De plus, de façon intéressante, nous avons observé, que les forts niveaux de sécrétion d'IL-22BP des muqueuses coliques MC correspondaient uniquement à des patients fumeurs actifs (**Article 1**, Figure 4). Ces dosages d'IL-22BP ne sont pas corrélés à un profil inflammatoire de sécrétion de cytokines/chimiokines par les LyT et/ou les macrophages intestinaux. Pourtant, nous savons que le tabac induit les expressions de cytokines et de chimiokines inflammatoires (CCL20, IL-6 et IL-8) (Allais et al., 2020; Oberg et al., 2011). Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces forts niveaux d'IL-22BP. Ainsi, le tabac pourrait induire le recrutement de PNE dans la LP comme démontré dans le poumon avec l'observation d'une augmentation significative des éotaxines chez les fumeurs (Krisiukeniene et al., 2009). L'imprégnation tabagique pourrait aussi promouvoir la production par les DCs *via* l'inhibition de leur maturation (Liao et al., 2015) connue pour diminuer drastiquement la production d'IL-22BP. L'induction de forts niveaux d'IL-22BP chez les patients fumeurs pourrait ainsi constituer un mécanisme additif à celui de la nicotine pour inhiber la signalisation de l'axe IL-22/IL-22R. En effet, il a été récemment démontré que la nicotine provoquait une diminution de l'expression d'IL-22R à la surface des cellules épithéliales pulmonaires et inhibait la sécrétion d'IL-22 par les LyT (Nguyen et al., 2020). Il est important de noter que dans notre cohorte MC, tous les fumeurs n'ont pas présenté de fort taux d'IL-22BP. Ainsi, cette observation pourrait être expliquée par un effet à court terme du tabac qui induirait une sécrétion rapide d'IL-22BP. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée car nous ne connaissons pas chez nos

patients fumeurs, le recul exact entre leur dernière cigarette et leur prélèvement endoscopique.

Le tabac est un facteur de risque bien connu (OR :2) de développement de la MC (Piovani et al., 2019). De plus chez ces patients, l'imprégnation tabagique est associée à une moins bonne évolution de leur maladie. En effet, les patients MC fumeurs présentent plus de poussées (To et al., 2016), d'hospitalisations (Cosnes et al., 1999) ou de manifestations extra-digestives (Lunney et al., 2015; Ott et al., 2014) et enfin ils requièrent plus souvent un traitement immunosuppresseur (Cosnes et al., 2002). De plus, la cigarette peut influencer la rémission clinique sous anti-TNF. En effet, un rapport a récemment mis en évidence que les patients MC fumeurs présentaient significativement moins de rémission clinique sous anti-TNF par rapport à ceux qui n'ont jamais fumé (Lee et al., 2021). Il existe de plus une association claire entre le tabac et des atteintes iléales de la MC (Aldhous and Satsangi, 2010) connues pour évoluer vers des formes sténosantes et/ou fistulisantes. Le tabac est aussi associé à une augmentation accrue du risque chirurgical (45.8% vs 37.8%)(Lunney et al., 2015; To et al., 2016), bien que certains l'aient démontré uniquement pour les patients sans traitements immunosuppresseurs (Cosnes et al., 2002). Enfin, après une chirurgie, il est associé à des facteurs prédictifs de moins bonne évolution, puisque les patients fumeurs vont présenter un risque de récurrence chirurgicale 2,5 fois plus élevé et un risque de récurrence clinique deux fois plus élevé que les non-fumeurs (Reese et al., 2008; To et al., 2016). A un an d'une chirurgie de résection iléo-colique, il a été démontré une persistance chez 70% des patients fumeurs versus 35% chez les non-fumeurs des atteintes macroscopiques au niveau du site de l'anastomose (Yamamoto and Keighley, 2000).

Ainsi, ces forts niveaux d'IL-22BP pourraient constituer un mécanisme supplémentaire expliquant les effets délétères du tabac sur la muqueuse intestinale en bloquant les effets protecteurs de l'IL-22. Le tabac est aussi responsable d'une diminution de la contractilité des muscles, de la perméabilité intestinale ou encore des modifications de la micro-vascularisation ainsi que de la composition du mucus (Berkowitz et al., 2018). Il a été aussi montré que le tabac induisait une altération des capacités antibactériennes des cellules de Paneth murines (Berkowitz et al., 2019) sécrétant des PAMs en réponse à l'IL-22. Chez les patients atteints de MC, il a été démontré que la combinaison du tabac avec la mutation du gène *ATG16L1* provoquait une diminution significative du nombre et des capacités sécrétoires des cellules de Paneth (Liu et al., 2018). Nous avons observé que parmi les patients fumeurs actifs seulement

un sous-groupe est fort sécréteur d'IL-22BP. De la même façon, des niveaux de sécrétion plus important d'IL-22BP ont aussi été mesurés dans les surnageants de MoDC. Ces données suggèrent que la sécrétion d'IL-22BP pourrait être régulée par une combinaison des effets du tabac à un terrain génétique particulier, d'autant que des rapports ont décrit des polymorphismes dans le gène *IL22RA2* associés à une plus forte expression d'IL-22BP (Lindahl et al., 2019b; Sertorio et al., 2015) tandis qu'un autre SNP plus rare (rs28385692) est associé à une diminution de la sécrétion d'IL-22BP (Gómez-Fernández et al., 2020).

b) Les réponses biologiques médiées par l'IL-22 et l'IL-17 sont bloquées par l'IL-22BP au cours de la MC

Au cours de notre étude, nous avons caractérisé les actions biologiques contrôlées par l'IL-22 et IL-17 sur la muqueuse intestinale humaine en analysant les modifications transcriptomiques induites par ces cytokines sur des biopsies coliques de témoins sains cultivées *ex vivo*. Ainsi, nous avons démontré sur des tissus intestinaux humains que les effets combinés de l'IL-22 et de l'IL-17 pouvaient participer à renforcer les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale (Partie 2 des résultats) notamment en induisant des PAMs. Une étude sur des biopsies intestinales humaines saines (Coorens et al., 2019) conforte nos résultats en ayant démontré une augmentation des expressions de PAMs après stimulation cytokinique. De plus, nous avons identifié des gènes définissant un programme moléculaire largement induit par la combinaison de l'IL-22 et de l'IL-17 exerçant des effets d'addition et de synergie comme suggéré dans d'autres rapports (Liang et al., 2006b; Powell et al., 2020). Le modèle utilisé au cours de notre étude a permis de caractériser des actions biologiques induites par les cytokines en intégrant les réponses sur les épithélia dans un système plus large *via* leur communication avec d'autres populations cellulaires, cependant nous avons été confronté à des temps relativement courts de stimulation de cellules dont la viabilité/fonctionnalité n'a pas été analysée. Par ailleurs, les effets de l'IL-22 ont été modestes en comparaison à d'autres études récemment publiées (Patnaude et al., 2021; Powell et al., 2020).

Au cours des MICI, l'affaiblissement de la barrière intestinale est à l'origine de translocations bactériennes provoquant une activation du SI muqueux et l'induction de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-22 et l'IL-17 (Andoh et al., 2005; Brand et al., 2006; Geremia et al., 2011). De façon intéressante, nous avons observé que les inductions d'IL-22 étaient

hétérogènes au sein des muqueuses inflammatoires des patients MICI. L'analyse des données d'expressions d'IL-22 disponibles dans l'étude de Brand a aussi mis en évidence une variabilité d'induction entre les patients (Brand et al., 2006). Les stratégies thérapeutiques au cours des MICI ont pour objectif principal d'apaiser l'inflammation intestinale tout en permettant une cicatrisation des muqueuses. De nombreuses cibles thérapeutiques antagonistes des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-23, IL-12, IL-6) sont disponibles (Feagan et al., 2016, 2018b; Loftus et al., 2016b; Sands et al., 2004) mais sont souvent confrontés à des effets indésirables importantes ou à des effets limités chez un sous-groupe de patients (Ollech et al., 2021; Schmidt et al., 2018). Ainsi, afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques nous avons évalué l'intérêt d'un renforcement des actions de l'IL-22 et l'IL-17 sur des muqueuses intestinales de patients atteints de MC.

Nous avons identifié des gènes définissant un programme moléculaire largement induit par l'IL-22 et l'IL-17 dont les expressions peuvent être restaurer dans des muqueuses MC après stimulation *ex vivo* en accord avec les travaux d'un autre groupe (Patnaude et al., 2021). Parmi les gènes du programme moléculaire, il est admis que l'induction de PAMs, de chimiokines ou encore de ROS contribuent à protéger les muqueuses intestinales des agressions par des germes pathogènes/commensaux comme observé au cours des MICI (Kumar et al., 2020; Lambeth and Neish, 2014; Zheng et al., 2008b). C'est d'ailleurs l'absence de cicatrisation de l'épithélium qui contribue à la perpétuation de l'inflammation intestinale et donc à une maladie cliniquement active (de Souza and Fiocchi, 2016b). Ainsi, ces résultats tendent à démontrer un potentiel thérapeutique intéressant à renforcer les actions de l'IL-22 et l'IL-17 en cas de poussées inflammatoires MICI. De plus, nous avons identifié une hétérogénéité d'expression des gènes du programme moléculaire dans les muqueuses fraîches MICI, en lien avec une moindre induction des cytokines, sans toutefois pouvoir clairement (effectif restreint de malades n=10) démontrer que ces faibles niveaux des gènes du programme moléculaire pourraient être associés à une évolution plus sombre de la maladie. Cependant, nous avons tout de même observé que 100% des patients exprimant plus faiblement le programme avait eu une chirurgie contre 50% chez les autres patients (résultats non montrés).

Nos résultats apportent un argument supplémentaire aux échecs des anti-IL-17 (Hueber et al., 2012b) ou anti-IL-17R (Targan et al., 2012) chez des patients MC. De plus, ils peuvent nous interroger sur l'efficacité d'un blocage thérapeutique de l'IL-23, une cytokine largement responsable des productions intestinales d'IL-22 et d'IL-17 (Geremia et al., 2011; Wolk et al.,

2002b) au cours de la MC. Un Ac monoclonal dirigé contre la sous-unité p40 [Ustekinumab] (commune entre IL-12 et IL-23) a été approuvé dans le traitement de la MC (Feagan et al., 2016) tandis que ceux dirigés contre la sous-unité p19 [Risankizumab ou Brazikumab](chaîne spécifique de l'IL-23) sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase II au cours de la MC (Feagan et al., 2017, 2018b; Sands et al., 2017). De façon intéressante au cours de ces essais, bien qu'ayant démontré une efficacité du MEDI2070 (anti IL-23p19) chez 49% des malades versus 27% pour le placebo, les meilleures réponses ont été observées chez des malades ayant présenté des taux sériques initiaux d'IL-22 plus élevés pouvant suggérer des effets bénéfiques de la cytokine (Sands et al., 2017). Les effets à long terme de ces traitements, actuellement en cours d'évaluation (étude UNITI-2), seront particulièrement intéressants à évaluer puisqu'ils proposent une stratégie thérapeutique inverse à celle proposée au cours de notre étude. Par ailleurs, des travaux ont démontré qu'en plus d'induire des gènes impliqués dans le renforcement des propriétés de barrière, l'IL-22 induisait aussi les expressions de gènes associés au stress du RE dans les CEI (Powell et al., 2020) amplifiées en présence d'IL-17. Ils démontrent une forte expression du module transcriptionnel associé au stress du RE dans les muqueuses inflammatoires de patients MC, corrélée à l'IL-22 et à des marqueurs biologiques d'activité de la maladie. Finalement, ils montrent qu'un blocage de l'IL-23 s'associe à une diminution de l'expression du module lié au stress du RE, démontrant un effet délétère de la signalisation induite par l'IL-22+IL-17 sur les muqueuses intestinales, s'opposant ainsi à nos résultats. Afin de démontrer les effets protecteurs de la stratégie thérapeutique envisagée (à savoir renforcer IL-22+IL-17), il convient de corréler l'expression du programme moléculaire IL-22+IL-17 dans des biopsies fraîches MICI aux données cliniques d'évolution de la maladie comme par exemple le risque de chirurgie ou alors les réponses aux traitements par anti-TNF ou anti-IL-23 (Arijs et al., 2010; Haberman et al., 2014). Selon notre hypothèse proposée, la faible expression de la signature IL-22+IL-17 pourrait être associée à un pronostic plus sombre, même si de nombreux autres facteurs sont aussi impliqués (différentes populations cellulaires dans la LP plus ou moins activées communiquant avec les épithéliums).

Alors que ces réponses biologiques ne sont pas totalement caractérisées et qu'elles tendent plutôt à proposer une modulation fine des actions induites par les cytokines, les effets d'une administration d'IL-22 recombinante (IL-22-IgG4, UTTR1147A) sont actuellement en cours d'évaluation dans les formes modérées à sévères de MC et RCH (NCT02749630 ;

NCT03650413 ; NCT03558152). Les études de phase I chez des volontaires sains ont relevé une bonne tolérance clinique de l'UTTR1147A sans effets indésirables (EI) graves (Rothenberg et al., 2019). Cependant, chez certains sujets des manifestations cutanées, comme des érythèmes ou des zones de desquamation, sont apparues consécutives à l'administration d'IL-22 (Rothenberg et al., 2019; Tang et al., 2019). Ces EI, fortement associés aux lésions de parakératoses décrites au cours des poussées de psoriasis, sont rattachés au rôle délétère d'un excès d'IL-22 au niveau des cellules épithéliales de la peau (Sabat et al., 2014). En effet, en signalant sur les kératinocytes, l'IL-22 contribue au renforcement de la barrière cutanée en induisant l'expression de PAMs mais elle diminue l'expression de protéines impliquées dans la différenciation des kératinocytes comme les kératines 1 et 10, la profilaggrine ou encore la kallikreine. Par ailleurs, l'IL-22 induit les expressions de chimiokines comme CXCL1/CXCL2/CXCL5/CXCL8 contribuant au recrutement de PNN et à l'amplification de l'inflammation. Nous l'avons déjà mentionné précédemment au niveau des CEI, l'IL-22 induit des métalloprotéinases contribuant au remodelage des tissus. Ainsi, au niveau cutané, l'IL-22 en induisant la prolifération accrue de kératinocytes indifférenciés contribue au développement de phénomène d'acanthose/parakératose ainsi qu'à l'hypogranulosité correspondant aux manifestations cliniques observées chez les patients atteints de psoriasis. De plus, nous savons que des actions exacerbées d'IL-22 sont aussi impliquées dans les processus tumoraux (Hernandez et al., 2018b; Koltsova and Grivennikov, 2014) et l'inflammation intestinale chronique présente au cours des MICI prédispose au développement de CRC (Bernstein et al., 2001b). Ces informations suggèrent donc qu'une signalisation prolongée avec de l'IL-22 de muqueuses intestinales inflammatoires pourrait conduire à des transformations tumorales. Il a d'ailleurs été démontré qu'une stimulation avec de l'IL-22 d'une lignée cellulaire colique cancéreuse (DDL1) mutée pour KRAS induisait l'expression d'un programme de gènes associé à la voie proto-oncogène c-myc (McCuaig et al., 2020).

A la lumière de ces données, il apparaît donc que les administrations de large quantité d'IL-22 pourraient ne pas être dénuées de danger et qu'une modulation plus physiologique de l'IL-22 serait plus optimum au cours de la MC. Nous avons démontré au cours de ce travail que les actions induites par l'IL-22 étaient bloquées en présence d'IL-22BP. Ainsi en présence d'IL-22BP, l'induction des expressions des gènes du programme moléculaire largement dépendant des effets combinés des deux cytokines n'est plus possible. En outre, de part sa présence dans

les muqueuses inflammatoires de patients MICI, l'IL-22BP contribue à moduler les quantités d'IL-22 disponible pour agir avec l'IL-17 et renforcer, entre autres les fonctions de barrière de la muqueuse intestinale. Nous avons démontré qu'un faible ratio IL-22/IL-22BP était associé à une moindre induction des gènes régulés par IL-22 et IL-17 dans les muqueuses fraîches de patients MICI. Ces résultats sont appuyés par un autre rapport ayant démontré que les ratios IL-22/IL-22BP étaient corrélés avec les réponses induites par l'IL-22 (Schwarzkopf et al., 2019). Nos données obtenues *ex vivo* suggèrent donc fortement que le programme moléculaire induit par l'IL-22 et l'IL-17 pourrait être modulé *in vivo* dans les muqueuses de patients MC en ciblant directement l'IL-22BP. Ainsi, le développement d'inhibiteur anti-IL-22BP permettrait de rétablir de façon plus physiologique les niveaux intestinaux d'IL-22 nécessaire pour exercer ces actions protectrices avec l'IL-17, bien que nous n'ayons pas pu le démontrer *ex vivo*.

En conclusion, nos résultats supportent que les actions médiées par les cytokines IL-22 et IL-17 contribuent, au moins en partie, à renforcer les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale, remplissant ainsi les objectifs visés par les stratégies thérapeutiques mises en place au cours des MICI. Ces données obtenues *ex vivo* devront toutefois être validées *in vivo* dans des cohortes plus larges et indépendantes de patients atteints de MICI. Il convient aussi de comprendre/caractériser les effets médiés par la signalisation induite par l'IL-22 et l'IL-17 sur des muqueuses pathogéniques afin d'en prévenir de potentiels effets délétères. De plus, des tests fonctionnels comme l'étude de la perméabilité permettront de valider que les expressions de gènes impliqués dans les propriétés de barrière sont bien associées à des effets protecteurs. L'induction de gènes codant pour des PAMs pourra aussi être évaluée par des marquages en IHC sur des biopsies stimulées.

# *CONCLUSION*

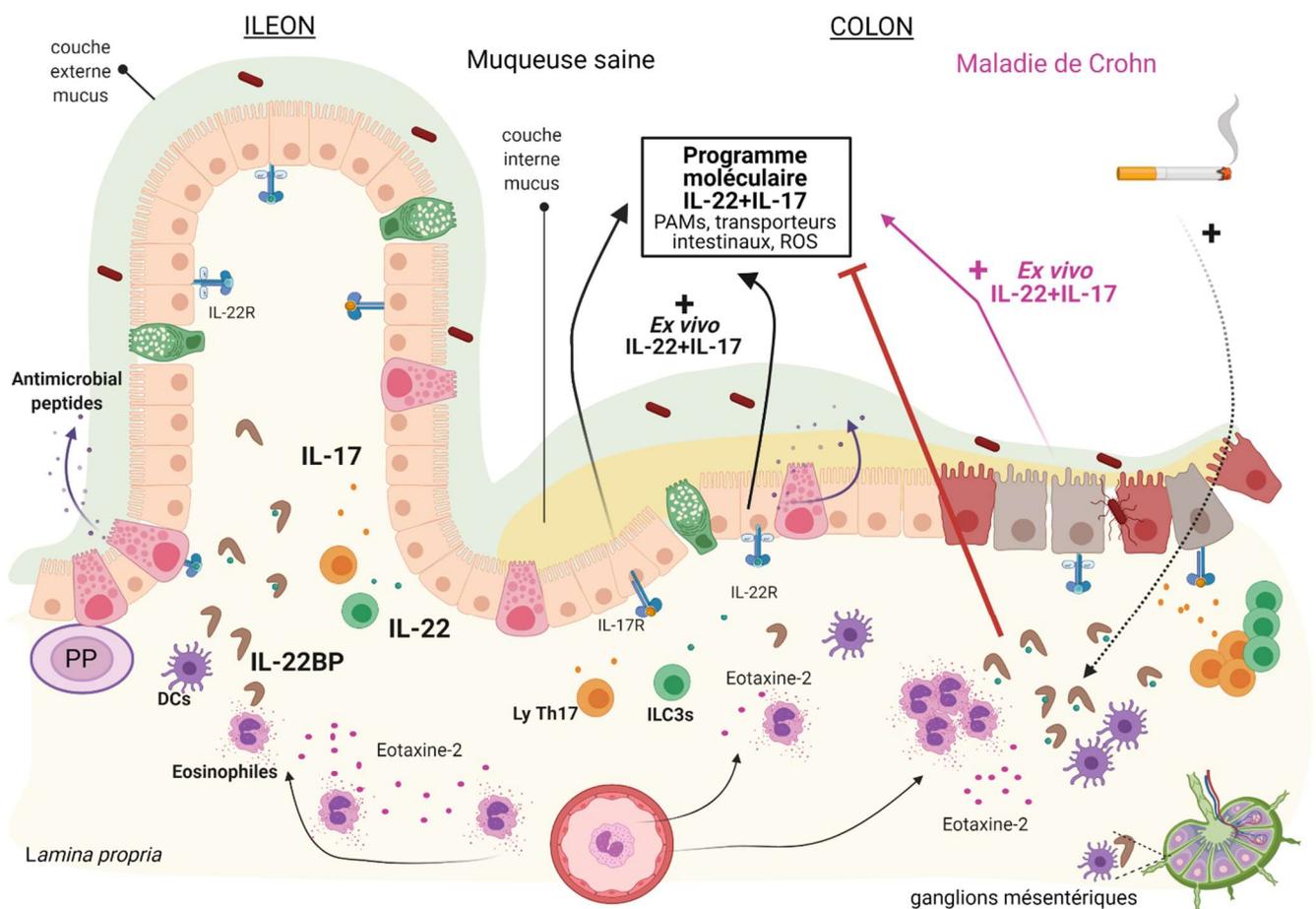
## Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce projet de doctorat ont permis de ré-affirmer que l'IL-22BP est majoritairement produite par les DCs et les éosinophiles résidents de la LP de patients atteints de MC. Nous avons caractérisé pour la première fois une production d'IL-22BP par les DCs isolées de GM de patients atteints de MC (**Figure 37**). Par ailleurs chez l'homme, nous avons démontré que les niveaux intestinaux d'IL-22BP sont plus élevés dans l'iléon en regard du colon à la fois dans les muqueuses de patients contrôles et souffrant de MC (**Figure 37**). Ces niveaux intestinaux sont corrélés significativement à ceux de l'éotaxine-2, une chimiokine clé impliquée dans le recrutement des PNE dans la LP, suggérant que cette plus forte production iléale est imputable aux PNE bien que nous n'ayons pas pu clairement le démontrer. En outre nous avons observé dans les muqueuses coliques de patients MC de forts niveaux d'IL-22BP uniquement chez des patients patients fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Ces résultats, bien qu'ils méritent d'être confirmés, ouvrent la voie vers de nouvelles pistes physiopathologiques notamment d'un effet délétère renforcé de l'IL-22BP dans l'iléon des patients fumeurs.

L'IL-22BP produite dans l'intestin bloque les actions induites par l'IL-22 et celles en combinaison avec l'IL-17 produites en réponse à une inflammation. Une caractérisation poussée des actions induites par ces cytokines, au cours de ce doctorat, a permis de mieux décrire leurs effets respectifs et donc d'anticiper le potentiel intérêt thérapeutique de les réguler. Les résultats obtenus supportent des actions bénéfiques de l'IL-22 et l'IL-17 en contribuant, au moins en partie, à renforcer les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale, remplissant ainsi les objectifs pointés par les stratégies thérapeutiques mises en place au cours des MICI. En effet, nous avons identifié dans des tissus coliques normaux un programme moléculaire largement induit par la combinaison de l'IL-22 et l'IL-17 (**Figure 37**), permettant l'expression de gènes impliqués dans les propriétés de barrière et important pour limiter la perpétuation d'une inflammation aux conséquences délétères pour les CEI. Dans notre cohorte de patients atteints de MICI, nous avons identifié exprimant faiblement le programme moléculaire, cependant, nous avons montré que nous pouvions le restaurer au cours de la MC en apportant artificiellement les cytokines (**Figure 37**). Finalement, nous proposons de renforcer les actions combinées de l'IL-22 et l'IL-17 *via* la modulation de l'IL-22BP, dont nous avons démontré le pouvoir inhibiteur sur l'expression du programme

moléculaire (**Figure 37**). Cette stratégie présente l'intérêt de renforcer les actions médiées par l'IL-22 et l'IL-17 de façon plus physiologique et moins dangereuse en comparaison à l'injection d'IL-22 prônée par d'autres groupes.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail sont résumés dans la ... et ont contribué à enrichir les connaissances sur les sources, la régulation et les fonctions de l'IL-22BP afin de mieux comprendre et maîtriser l'interaction IL-22/IL-22BP au cours de la MC.



**Figure 37 : Schéma bilan décrivant les sources et l'impact de l'IL-22BP sur la réponse moléculaire induite par l'IL-22 et l'IL-17 au cours de la MC.**

## Références bibliographiques

Abood, R.N., McHugh, K.J., Rich, H.E., Ortiz, M.A., Tobin, J.M., Ramanan, K., Robinson, K.M., Bomberger, J.M., Kolls, J.K., Manni, M.L., et al. (2019). IL-22-binding protein exacerbates influenza, bacterial super-infection. *Mucosal Immunol.* *12*, 1231–1243.

Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2066–2078.

Agace, W.W., and Persson, E.K. (2012). How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol.* *33*, 42–48.

Aggarwal, S., and Gurney, A.L. (2002). IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc. Biol.* *71*, 1–8.

Alam, M.S., Maekawa, Y., Kitamura, A., Tanigaki, K., Yoshimoto, T., Kishihara, K., and Yasutomo, K. (2010). Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4<sup>+</sup> T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5943–5948.

Albanesi, C., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1999). IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 494–502.

Aldhous, M.C., and Satsangi, J. (2010). The impact of smoking in Crohn's disease: no smoke without fire. *Frontline Gastroenterol.* *1*, 156–164.

Allais, L., Verschuere, S., Maes, T., Smet, R.D., Devriese, S., Gonzales, G.B., Peeters, H., Crombruggen, K.V., Bachert, C., Vos, M.D., et al. (2020). Translational research into the effects of cigarette smoke on inflammatory mediators and epithelial TRPV1 in Crohn's disease. *PLOS ONE* *15*, e0236657.

Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z.J., Pollard, K.S., Sakharova, E., Parks, D.H., Hugenholtz, P., et al. (2020). A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.*

Amatya, N., Garg, A.V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* *38*, 310–322.

Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 205–217.

Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 808–814.

Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* *124*, 40–46.

- Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., et al. (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* *129*, 969–984.
- Aparicio-Domingo, P., Romera-Hernandez, M., Karrich, J.J., Cornelissen, F., Papazian, N., Lindenbergh-Kortleve, D.J., Butler, J.A., Boon, L., Coles, M.C., Samsom, J.N., et al. (2015). Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J. Exp. Med.* *212*, 1783–1791.
- Arab, J.P., Sehrawat, T.S., Simonetto, D.A., Verma, V.K., Feng, D., Tang, T., Dreyer, K., Yan, X., Daley, W.L., Sanyal, A., et al. (2019). An Open Label, Dose Escalation Study To Assess The Safety And Efficacy Of IL-22 Agonist F-652 In Patients With Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*. Baltim. Md.
- Arijs, I., Li, K., Toedter, G., Quintens, R., Van Lommel, L., Van Steen, K., Leemans, P., De Hertogh, G., Lemaire, K., Ferrante, M., et al. (2009). Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* *58*, 1612–1619.
- Arijs, I., Quintens, R., Van Lommel, L., Van Steen, K., De Hertogh, G., Lemaire, K., Schraenen, A., Perrier, C., Van Assche, G., Vermeire, S., et al. (2010). Predictive value of epithelial gene expression profiles for response to infliximab in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 2090–2098.
- Arike, L., and Hansson, G.C. (2016). The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J. Mol. Biol.* *428*, 3221–3229.
- Armbruster, N.S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2017). In the Wnt of Paneth Cells: Immune-Epithelial Crosstalk in Small Intestinal Crohn's Disease. *Front. Immunol.* *8*, 1204.
- Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* *517*, 293–301.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* *473*, 174–180.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). T reg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* *500*, 232–236.
- Atreya, R., Neumann, H., Neufert, C., Waldner, M.J., Billmeier, U., Zopf, Y., Willma, M., App, C., Münster, T., Kessler, H., et al. (2014). In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat. Med.* *20*, 313–318.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* *14*, 275–281.

- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1380–1389.
- Baptista, A.P., Olivier, B.J., Goverse, G., Greuter, M., Knippenberg, M., Kusser, K., Domingues, R.G., Veiga-Fernandes, H., Luster, A.D., Lugering, A., et al. (2013). Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal Immunol.* *6*, 511–521.
- Baratin, M., Simon, L., Jorquera, A., Ghigo, C., Dembele, D., Nowak, J., Gentek, R., Wienert, S., Klauschen, F., Malissen, B., et al. (2017). T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* *47*, 349-362.e5.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet Lond. Engl.* *369*, 1641–1657.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 1590–1605.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., et al. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* *1*, 403–418.
- Begue, B., Verdier, J., Rieux-Laucat, F., Goulet, O., Morali, A., Canioni, D., Hugot, J.-P., Daussy, C., Verkarre, V., Pigneur, B., et al. (2011). Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 1544–1555.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* *157*, 121–141.
- Belkaid, Y., and Harrison, O.J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* *46*, 562–576.
- Ben-Horin, S., Waterman, M., Kopylov, U., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Awadie, H., Weiss, B., and Chowers, Y. (2013). Addition of an immunomodulator to infliximab therapy eliminates antidrug antibodies in serum and restores clinical response of patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *11*, 444–447.
- Ben-Horin, S., Kopylov, U., and Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* *13*, 24–30.
- Bergmann, H., Roth, S., Pechloff, K., Kiss, E.A., Kuhn, S., Heikenwälder, M., Diefenbach, A., Greten, F.R., and Ruland, J. (2017). Card9-dependent IL-1 $\beta$  regulates IL-22 production from group 3 innate lymphoid cells and promotes colitis-associated cancer. *Eur. J. Immunol.* *47*, 1342–1353.

- Berkowitz, L., Schultz, B.M., Salazar, G.A., Pardo-Roa, C., Sebastián, V.P., Álvarez-Lobos, M.M., and Bueno, S.M. (2018). Impact of Cigarette Smoking on the Gastrointestinal Tract Inflammation: Opposing Effects in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Front. Immunol.* *9*.
- Berkowitz, L., Pardo-Roa, C., Salazar, G.A., Salazar-Echegarai, F., Miranda, J.P., Ramírez, G., Chávez, J.L., Kalergis, A.M., Bueno, S.M., and Álvarez-Lobos, M. (2019). Mucosal Exposure to Cigarette Components Induces Intestinal Inflammation and Alters Antimicrobial Response in Mice. *Front. Immunol.* *10*, 2289.
- Bernshtein, B., Curato, C., Ioannou, M., Thaïss, C.A., Gross-Vered, M., Kolesnikov, M., Wang, Q., David, E., Chappell-Maor, L., Harmelin, A., et al. (2019). IL-23-producing IL-10R $\alpha$ -deficient gut macrophages elicit an IL-22-driven proinflammatory epithelial cell response. *Sci. Immunol.* *4*.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliever, E., and Wajda, A. (2001a). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* *91*, 854–862.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliever, E., and Wajda, A. (2001b). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* *91*, 854–862.
- Bessman, N.J., and Sonnenberg, G.F. (2016a). Emerging roles for antigen presentation in establishing host-microbiome symbiosis. *Immunol. Rev.* *272*, 139–150.
- Bessman, N.J., and Sonnenberg, G.F. (2016b). Emerging roles for antigen presentation in establishing host-microbiome symbiosis. *Immunol. Rev.* *272*, 139–150.
- Best, W.R., Bectel, J.M., Singleton, J.W., and Kern, F. (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* *70*, 439–444.
- Beyeen, A.D., Adzemovic, M.Z., Öckinger, J., Stridh, P., Becanovic, K., Laaksonen, H., Lassmann, H., Harris, R.A., Hillert, J., Alfredsson, L., et al. (2010). IL-22RA2 Associates with Multiple Sclerosis and Macrophage Effector Mechanisms in Experimental Neuroinflammation. *J. Immunol.* *185*, 6883–6890.
- Biasci, D., Lee, J.C., Noor, N.M., Pombal, D.R., Hou, M., Lewis, N., Ahmad, T., Hart, A., Parkes, M., McKinney, E.F., et al. (2019). A blood-based prognostic biomarker in IBD. *Gut* *68*, 1386–1395.
- Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., and Hansson, G.C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* *8*, 712–719.
- Bleicher, L., de Moura, P.R., Watanabe, L., Colau, D., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Polikarpov, I. (2008). Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett.* *582*, 2985–2992.
- Bollrath, J., Pheesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., et al. (2009). gp130-mediated Stat3 activation in

enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15, 91–102.

Bonder, M.J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E.F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A.V., Deelen, P., Vatanen, T., Schirmer, M., Smeekens, S.P., et al. (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat. Genet.* 48, 1407–1412.

Braat, H., Peppelenbosch, M.P., and Hommes, D.W. (2003). Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 725–731.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.-M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., et al. (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G827-838.

Brazil, J.C., Louis, N.A., and Parkos, C.A. (2013). The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1556–1565.

Brockmann, L., Soukou, S., Steglich, B., Czarnewski, P., Zhao, L., Wende, S., Bedke, T., Ergen, C., Manthey, C., Agaloti, T., et al. (2018). Molecular and functional heterogeneity of IL-10-producing CD4+ T cells. *Nat. Commun.* 9, 5457.

Broquet, A., Jacqueline, C., Davieau, M., Besbes, A., Roquilly, A., Martin, J., Caillon, J., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., Heslan, M., et al. (2017). Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Sci. Rep.* 7, 11010.

Bryant, R.V., Winer, S., Travis, S.P.L., and Riddell, R.H. (2014). Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is “complete” remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J. Crohns Colitis* 8, 1582–1597.

Buettner, M., and Lochner, M. (2016). Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon. *Front. Immunol.* 7, 342.

Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M.J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z.D., Ratanasirintrao, S., Zhang, X., et al. (2015). Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* 162, 412–424.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744.

Chen, K., Magri, G., Grasset, E.K., and Cerutti, A. (2020). Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 427–441.

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y.C., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.* *203*, 2841–2852.

Chivese, T., Esterhuizen, T.M., Basson, A.R., and Watermeyer, G. (2018). Correction: The Influence of Second-Hand Cigarette Smoke Exposure during Childhood and Active Cigarette Smoking on Crohn's Disease Phenotype Defined by the Montreal Classification Scheme in a Western Cape Population, South Africa. *PLoS One* *13*, e0190822.

Choi, Y.J., Kim, S., Choi, Y., Nielsen, T.B., Yan, J., Lu, A., Ruan, J., Lee, H.-R., Wu, H., Spellberg, B., et al. (2019). SERPINB1-mediated checkpoint of inflammatory caspase activation. *Nat. Immunol.* *20*, 276–287.

Cibrian, D., Saiz, M.L., de la Fuente, H., Sánchez-Díaz, R., Moreno-Gonzalo, O., Jorge, I., Ferrarini, A., Vázquez, J., Punzón, C., Fresno, M., et al. (2016). CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nat. Immunol.* *17*, 985–996.

Cleynen, I., Boucher, G., Jostins, L., Schumm, L.P., Zeissig, S., Ahmad, T., Andersen, V., Andrews, J.M., Annese, V., Brand, S., et al. (2016). Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet Lond. Engl.* *387*, 156–167.

Cohen, L.J., Cho, J.H., Gevers, D., and Chu, H. (2019). Genetic Factors and the Intestinal Microbiome Guide Development of Microbe-Based Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *156*, 2174–2189.

Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Reinisch, W., Mantzaris, G.J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R.H., Broussard, D.L., et al. (2010). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1383–1395.

Coomes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 435–446.

Coorens, M., Rao, A., Gräfe, S.K., Unelius, D., Lindforss, U., Agerberth, B., Mjösberg, J., and Bergman, P. (2019). Innate lymphoid cell type 3-derived interleukin-22 boosts lipocalin-2 production in intestinal epithelial cells via synergy between STAT3 and NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* *294*, 6027–6041.

Cording, S., Medvedovic, J., Aychek, T., and Eberl, G. (2016). Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat. Immunol.* *17*, 755–757.

Cornes, J.S. (1965). Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut* *6*, 225–229.

Corneth, O.B.J., Reijmers, R.M., Mus, A.M.C., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Papazian, N., Siegers, J.Y., Mourcin, F., Amin, R., Tarte, K., et al. (2016). Loss of IL-22 inhibits autoantibody formation in collagen-induced arthritis in mice. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1404–1414.

- Cosnes, J., Carbonnel, F., Carrat, F., Beaugerie, L., Cattan, S., and Gendre, J. (1999). Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *13*, 1403–1411.
- Cosnes, J., Cattan, S., Blain, A., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Parc, R., and Gendre, J.-P. (2002). Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *8*, 244–250.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 1785–1794.
- Couturier-Maillard, A., Froux, N., Piotet-Morin, J., Michaudel, C., Brault, L., Le Bérichel, J., Sénéchal, A., Robinet, P., Chenuet, P., Jejou, S., et al. (2018a). Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii*-induced intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* *11*, 1181–1190.
- Couturier-Maillard, A., Froux, N., Piotet-Morin, J., Michaudel, C., Brault, L., Le Bérichel, J., Sénéchal, A., Robinet, P., Chenuet, P., Jejou, S., et al. (2018b). Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii* -induced intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* *11*, 1181–1190.
- Da Silva, C., Wagner, C., Bonnardel, J., Gorvel, J.-P., and Lelouard, H. (2017). The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection. *Front. Immunol.* *8*, 1254.
- Danese, S., Vermeire, S., Hellstern, P., Panaccione, R., Rogler, G., Fraser, G., Kohn, A., Desreumaux, P., Leong, R.W., Comer, G.M., et al. (2019). Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). *Gut* *68*, 40–48.
- Daperno, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Baert, F., Bulois, P., Maunoury, V., Sostegni, R., Rocca, R., Pera, A., Gevers, A., et al. (2004). Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* *60*, 505–512.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- De Luca, A., Zelante, T., D'Angelo, C., Zagarella, S., Fallarino, F., Spreca, A., Iannitti, R.G., Bonifazi, P., Renauld, J.-C., Bistoni, F., et al. (2010). IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol.* *3*, 361–373.
- DeBrosse, C.W., Case, J.W., Putnam, P.E., Collins, M.H., and Rothenberg, M.E. (2006). Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* *9*, 210–218.
- Ding, N.S., Hart, A., and De Cruz, P. (2016). Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - algorithm for practical management. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *43*, 30–51.

- Dubinsky, M.C., Kugathasan, S., Mei, L., Picornell, Y., Nebel, J., Wrobel, I., Quiros, A., Silber, G., Wahbeh, G., Katzir, L., et al. (2008). Increased immune reactivity predicts aggressive complicating Crohn's disease in children. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 6, 1105–1111.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., and van den Brink, M.R.M. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 747–785.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863.
- Dumoutier, L., Louahed, J., and Renault, J.C. (2000a). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 1814–1819.
- Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D., and Renault, J.C. (2000b). Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10144–10149.
- Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D., and Renault, J.C. (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 7090–7095.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823–836.
- Eisenstein, M. (2016). Biology: A slow-motion epidemic. *Nature* 540, S98–S99.
- Eken, A., Singh, A.K., Treuting, P.M., and Oukka, M. (2014). IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunol.* 7, 143–154.
- Evans, A.T., and Lee, S.D. (2012). A review and expert opinion of the use of certolizumab for Crohn's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 363–370.
- Eyerich, K., Dimartino, V., and Cavani, A. (2017). IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* 47, 607–614.
- Fachi, J.L., Sécca, C., Rodrigues, P.B., Mato, F.C.P. de, Di Luccia, B., Felipe, J. de S., Pral, L.P., Rungue, M., Rocha, V. de M., Sato, F.T., et al. (2020). Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. *J. Exp. Med.* 217.

Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A., and Hammarstrom, M.-L. (2004). beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* *137*, 379–385.

Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K.-W., Zigmond, E., Furtado, G.C., Lira, S.A., and Shakhar, G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* *38*, 581–595.

Faubion, W.A., Fletcher, J.G., O’Byrne, S., Feagan, B.G., de Villiers, W.J., Salzberg, B., Plevy, S., Proctor, D.D., Valentine, J.F., Higgins, P.D., et al. (2013). EMerging BiomARKers in Inflammatory Bowel Disease (EMBARK) study identifies fecal calprotectin, serum MMP9, and serum IL-22 as a novel combination of biomarkers for Crohn’s disease activity: role of cross-sectional imaging. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 1891–1900.

Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S., and Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* *96*, 719–726.

Feagan, B.G., Sandborn, W.J., Gasink, C., Jacobstein, D., Lang, Y., Friedman, J.R., Blank, M.A., Johans, J., Gao, L.-L., Miao, Y., et al. (2016). Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn’s Disease. *N. Engl. J. Med.* *375*, 1946–1960.

Feagan, B.G., Sandborn, W.J., D’Haens, G., Panés, J., Kaser, A., Ferrante, M., Louis, E., Franchimont, D., Dewit, O., Seidler, U., et al. (2017). Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn’s disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 1699–1709.

Feagan, B.G., Sands, B.E., Rossiter, G., Li, X., Usiskin, K., Zhan, X., and Colombel, J.-F. (2018a). Effects of Mongersen (GED-0301) on Endoscopic and Clinical Outcomes in Patients With Active Crohn’s Disease. *Gastroenterology* *154*, 61-64.e6.

Feagan, B.G., Panés, J., Ferrante, M., Kaser, A., D’Haens, G.R., Sandborn, W.J., Louis, E., Neurath, M.F., Franchimont, D., Dewit, O., et al. (2018b). Risankizumab in patients with moderate to severe Crohn’s disease: an open-label extension study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 671–680.

Fellermann, K., Stange, D.E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C.L., Reinisch, W., Teml, A., Schwab, M., Lichter, P., et al. (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 439–448.

van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 5836–5845.

- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* *432*, 917–921.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13780–13785.
- Friedrich, M., Pohin, M., and Powrie, F. (2019). Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* *50*, 992–1006.
- Frolkis, A.D., Dykeman, J., Negrón, M.E., Debruyn, J., Jette, N., Fiest, K.M., Frolkis, T., Barkema, H.W., Rioux, K.P., Panaccione, R., et al. (2013). Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology* *145*, 996–1006.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* *52*, 65–70.
- Fukaya, T., Fukui, T., Uto, T., Takagi, H., Nasu, J., Miyanaga, N., Arimura, K., Nakamura, T., Koseki, H., Chojookhuu, N., et al. (2018). Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation. *Front. Immunol.* *9*, 1418.
- Fumery, M., Singh, S., Dulai, P.S., Gower-Rousseau, C., Peyrin-Biroulet, L., and Sandborn, W.J. (2018). Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *16*, 343–356.e3.
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 503–516.
- Ganusov, V.V., and De Boer, R.J. (2007). Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* *28*, 514–518.
- Gassler, N. (2017). Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* *8*, 150–160.
- Gaudino, S.J., Beaupre, M., Lin, X., Joshi, P., Rathi, S., McLaughlin, P.A., Kempen, C., Mehta, N., Eskiocak, O., Yueh, B., et al. (2020). IL-22 receptor signaling in Paneth cells is critical for their maturation, microbiota colonization, Th17-related immune responses, and anti- Salmonella immunity. *Mucosal Immunol.* 1–13.
- Geboes, K., Riddell, R., Ost, A., Jensfelt, B., Persson, T., and Löfberg, R. (2000). A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* *47*, 404–409.
- Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 19–34.

- Geremia, A., and Arancibia-Cárcamo, C.V. (2017). Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* *8*, 1296.
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *208*, 1127–1133.
- Godinho-Silva, C., Domingues, R.G., Rendas, M., Raposo, B., Ribeiro, H., da Silva, J.A., Vieira, A., Costa, R.M., Barbosa-Morais, N.L., Carvalho, T., et al. (2019). Light-entrained and brain-tuned circadian circuits regulate ILC3s and gut homeostasis. *Nature* *574*, 254–258.
- Gómez-Fernández, P., Urtasun, A., Paton, A.W., Paton, J.C., Borrego, F., Dersh, D., Argon, Y., Alloza, I., and Vandebroek, K. (2018a). Long Interleukin-22 Binding Protein Isoform-1 Is an Intracellular Activator of the Unfolded Protein Response. *Front. Immunol.* *9*, 2934.
- Gómez-Fernández, P., Urtasun, A., Paton, A.W., Paton, J.C., Borrego, F., Dersh, D., Argon, Y., Alloza, I., and Vandebroek, K. (2018b). Long Interleukin-22 Binding Protein Isoform-1 Is an Intracellular Activator of the Unfolded Protein Response. *Front. Immunol.* *9*, 2934.
- Gómez-Fernández, P., Urtasun, A., Astobiza, I., Mena, J., Alloza, I., and Vandebroek, K. (2019). Pharmacological Targeting of the ER-Resident Chaperones GRP94 or Cyclophilin B Induces Secretion of IL-22 Binding Protein Isoform-1 (IL-22BP1). *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Gómez-Fernández, P., Lopez de Lapuente Portilla, A., Astobiza, I., Mena, J., Urtasun, A., Altmann, V., Matesanz, F., Otaegui, D., Urcelay, E., Antigüedad, A., et al. (2020). The Rare IL22RA2 Signal Peptide Coding Variant rs28385692 Decreases Secretion of IL-22BP Isoform-1, -2 and -3 and Is Associated with Risk for Multiple Sclerosis. *Cells* *9*.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., et al. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* *345*, 1254009.
- Greuter, T., Biedermann, L., Rogler, G., Sauter, B., and Seibold, F. (2016). Alicaforsen, an antisense inhibitor of ICAM-1, as treatment for chronic refractory pouchitis after proctocolectomy: A case series. *United Eur. Gastroenterol. J.* *4*, 97–104.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., et al. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* *15*, 103–113.
- Gronke, K., and Diefenbach, A. (2015). Regenerative biology: Innate immunity repairs gut lining. *Nature* *528*, 488–489.
- Gronke, K., Hernández, P.P., Zimmermann, J., Klose, C.S.N., Kofoed-Branzk, M., Guendel, F., Witkowski, M., Tizian, C., Amann, L., Schumacher, F., et al. (2019). Interleukin-22 protects intestinal stem cells against genotoxic stress. *Nature* *566*, 249–253.

Guendel, F., Kofoed-Branzk, M., Gronke, K., Tizian, C., Witkowski, M., Cheng, H.-W., Heinz, G.A., Heinrich, F., Durek, P., Norris, P.S., et al. (2020a). Group 3 Innate Lymphoid Cells Program a Distinct Subset of IL-22BP-Producing Dendritic Cells Demarcating Solitary Intestinal Lymphoid Tissues. *Immunity* 53, 1015-1032.e8.

Guendel, F., Kofoed-Branzk, M., Gronke, K., Tizian, C., Witkowski, M., Cheng, H.-W., Heinz, G.A., Heinrich, F., Durek, P., Norris, P.S., et al. (2020b). Group 3 Innate Lymphoid Cells Program a Distinct Subset of IL-22BP-Producing Dendritic Cells Demarcating Solitary Intestinal Lymphoid Tissues. *Immunity* 53, 1015-1032.e8.

Gurney, A.L. (2004). IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues. *Int. Immunopharmacol.* 4, 669–677.

Haber, A.L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R.H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T.M., Howitt, M.R., Katz, Y., et al. (2017). A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* 551, 333–339.

Haberman, Y., Tickle, T.L., Dexheimer, P.J., Kim, M.-O., Tang, D., Karns, R., Baldassano, R.N., Noe, J.D., Rosh, J., Markowitz, J., et al. (2014). Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *J. Clin. Invest.* 124, 3617–3633.

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 12, 3668–3672.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207–211.

Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., et al. (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339–350.

Hanauer, S.B., Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D., Panaccione, R., Wolf, D., and Pollack, P. (2006). Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 130, 323–333; quiz 591.

Hanauer, S.B., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Gasink, C., Jacobstein, D., Zou, B., Johanns, J., Adedokun, O.J., Sands, B.E., Rutgeerts, P., et al. (2020). IM-UNITI: Three-year Efficacy, Safety, and Immunogenicity of Ustekinumab Treatment of Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* 14, 23–32.

Hancock, R.E.W., Haney, E.F., and Gill, E.E. (2016a). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 321–334.

Hancock, R.E.W., Haney, E.F., and Gill, E.E. (2016b). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 321–334.

- Happel, K.I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L.J., Lockhart, E., Ramsay, A.J., Shellito, J.E., Schurr, J.R., Bagby, G.J., Nelson, S., et al. (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4432–4436.
- Hasnain, S.Z., and Begun, J. (2019). Interleukin-22: friend or foe? *Immunol. Cell Biol.* *97*, 355–357.
- Hazlett, L., and Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* *343*, 175–188.
- Hebert, K.D., Mclaughlin, N., Galeas-Pena, M., Zhang, Z., Eddens, T., Govero, A., Pilewski, J.M., Kolls, J.K., and Pociask, D.A. (2020). Targeting the IL-22/IL-22BP axis enhances tight junctions and reduces inflammation during influenza infection. *Mucosal Immunol.* *13*, 64–74.
- Heliö, T., Halme, L., Lappalainen, M., Fodstad, H., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Färkkilä, M., Krusius, T., and Kontula, K. (2003). CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* *52*, 558–562.
- Hernandez, P., Gronke, K., and Diefenbach, A. (2018a). A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur. J. Immunol.* *48*, 15–31.
- Hernandez, P., Gronke, K., and Diefenbach, A. (2018b). A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur. J. Immunol.* *48*, 15–31.
- Hernández-Ruiz, M., and Zlotnik, A. (2017). Mucosal Chemokines. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *37*, 62–70.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.-C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* *124*, 993–1000.
- Hölttä, V., Klemetti, P., Sipponen, T., Westerholm-Ormio, M., Kociubinski, G., Salo, H., Räsänen, L., Kolho, K.-L., Färkkilä, M., Savilahti, E., et al. (2008). IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 1175–1184.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 159–169.
- Hoorweg, K., Peters, C.P., Cornelissen, F., Aparicio-Domingo, P., Papazian, N., Kazemier, G., Mjösberg, J.M., Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Functional Differences between Human NKp44(-) and NKp44(+) RORC(+) Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* *3*, 72.
- Horsthuis, K., Bipat, S., Bennink, R.J., and Stoker, J. (2008). Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: meta-analysis of prospective studies. *Radiology* *247*, 64–79.
- Huang, B., Chen, Z., Geng, L., Wang, J., Liang, H., Cao, Y., Chen, H., Huang, W., Su, M., Wang, H., et al. (2019). Mucosal Profiling of Pediatric-Onset Colitis and IBD Reveals Common Pathogenics and Therapeutic Pathways. *Cell* *179*, 1160-1176.e24.

Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* *190*, 624–631.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., et al. (2012a). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* *491*, 259–263.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., et al. (2012b). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* *491*, 259–263.

Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D.R., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., et al. (2012a). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* *61*, 1693–1700.

Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D.R., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., et al. (2012b). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* *61*, 1693–1700.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 599–603.

Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* *535*, 440–443.

Iliev, I.D., Funari, V.A., Taylor, K.D., Nguyen, Q., Reyes, C.N., Strom, S.P., Brown, J., Becker, C.A., Fleshner, P.R., Dubinsky, M., et al. (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* *336*, 1314–1317.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* *365*.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C.A., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* *476*, 214–219.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* *45*, 1353–1360.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., et al. (2009). Differential Roles of Interleukin-17A and -17F

in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* 30, 108–119.

Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., et al. (2008). Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 12–16.

Iwata, M., and Yokota, A. (2011). Retinoic acid production by intestinal dendritic cells. *Vitam. Horm.* 86, 127–152.

Jaensson-Gyllenbäck, E., Kotarsky, K., Zapata, F., Persson, E.K., Gundersen, T.E., Blomhoff, R., and Agace, W.W. (2011). Bile retinoids imprint intestinal CD103+ dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. *Mucosal Immunol.* 4, 438–447.

Jarry, A., Bossard, C., Droy-Dupré, L., Volteau, C., Bourreille, A., Meurette, G., Mosnier, J.-F., and Laboisse, C.L. (2015). Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN- $\gamma$  axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 95, 1207–1217.

Ji, Y., Yang, X., Li, J., Lu, Z., Li, X., Yu, J., and Li, N. (2014). IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 3694–3703.

Jiang, R., Wang, H., Deng, L., Hou, J., Shi, R., Yao, M., Gao, Y., Yao, A., Wang, X., Yu, L., et al. (2013). IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* 13, 59.

Jinnohara, T., Kanaya, T., Hase, K., Sakakibara, S., Kato, T., Tachibana, N., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Sato, T., Watarai, H., et al. (2017). IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J. Exp. Med.* 214, 1607–1618.

Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016a). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 639–649.

Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016b). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 639–649.

Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 281–291.

Jones, B.C., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2008a). Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1333–1344.

Jones, B.C., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2008b). Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1333–1344.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124.

Kalla, R., Kennedy, N.A., Ventham, N.T., Boyapati, R.K., Adams, A.T., Nimmo, E.R., Visconti, M.R., Drummond, H., Ho, G.-T., Pattenden, R.J., et al. (2016). Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *Am. J. Gastroenterol.* *111*, 1796–1805.

Kalla, R., Adams, A.T., Ventham, N.T., Kennedy, N.A., White, R., Clarke, C., Ivens, A., Bergemalm, D., Vatn, S., Lopez-Jimena, B., et al. (2020). Whole blood profiling of T-cell derived miRNA allows the development of prognostic models in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis*.

Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 321–335.

Kamanaka, M., Huber, S., Zenewicz, L.A., Gagliani, N., Rathinam, C., O'Connor, W., Wan, Y.Y., Nakae, S., Iwakura, Y., Hao, L., et al. (2011). Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J. Exp. Med.* *208*, 1027–1040.

Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Sato, T., Yamazaki, M., Okamoto, S., Ishii, H., Totsuka, T., Iiyama, R., Okamoto, R., et al. (2001). Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* *121*, 875–888.

Kaplan, G.G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 720–727.

Karrich, J.J., Romera-Hernández, M., Papazian, N., Veenbergen, S., Cornelissen, F., Aparicio-Domingo, P., Stenhouse, F.H., Peddie, C.D., Hoogenboezem, R.M., den Hollander, C.W.J., et al. (2019). Expression of Plet1 controls interstitial migration of murine small intestinal dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *49*, 290–301.

Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* *134*, 743–756.

Kashani, A., and Schwartz, D.A. (2019). The Expanding Role of Anti-IL-12 and/or Anti-IL-23 Antibodies in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 255–265.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* *13*, 1173–1175.

Kempski, J., Giannou, A.D., Riecken, K., Zhao, L., Steglich, B., Lücke, J., Garcia-Perez, L., Karstens, K.-F., Wöstemeier, A., Nawrocki, M., et al. (2020). IL22BP Mediates the Anti-Tumor Effects of Lymphotoxin Against Colorectal Tumors in Mice and Humans. *Gastroenterology*.

Kennedy, N.A., Heap, G.A., Green, H.D., Hamilton, B., Bewshea, C., Walker, G.J., Thomas, A., Nice, R., Perry, M.H., Bouri, S., et al. (2019). Predictors of anti-TNF treatment failure in anti-

TNF-naive patients with active luminal Crohn's disease: a prospective, multicentre, cohort study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 4, 341–353.

Kevans, D., Turpin, W., Madsen, K., Meddings, J., Shestopaloff, K., Xu, W., Moreno-Hagelsieb, G., Griffiths, A., Silverberg, M.S., Paterson, A., et al. (2015). Determinants of intestinal permeability in healthy first-degree relatives of individuals with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 879–887.

Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317.

Kim, S.W., Kim, E.S., Moon, C.M., Park, J.J., Kim, T.I., Kim, W.H., and Cheon, J.H. (2011). Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut* 60, 1527–1536.

Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H.C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118, 1001–1011.

Kirchberger, S., Royston, D.J., Boulard, O., Thornton, E., Franchini, F., Szabady, R.L., Harrison, O., and Powrie, F. (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J. Exp. Med.* 210, 917–931.

Kiss, E.A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., and Diefenbach, A. (2011). Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. *Science* 334, 1561–1565.

Klag, T., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 31, 310–316.

Kleinschmidt, D., Giannou, A.D., McGee, H.M., Kempinski, J., Steglich, B., Huber, F.J., Ernst, T.M., Shiri, A.M., Wegscheid, C., Tasika, E., et al. (2017). A Protective Function of IL-22BP in Ischemia Reperfusion and Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 199, 4078–4090.

Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., and Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1342–1352.

Knoop, K.A., and Newberry, R.D. (2012). Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. *Front. Immunol.* 3, 84.

Knoop, K.A., and Newberry, R.D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.* 11, 1551–1557.

Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682–1689.

Koenders, M.I., Kolls, J.K., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Joosten, L.A.B., Schurr, J.R., Schwarzenberger, P., van den Berg, W.B., and Lubberts, E. (2005). Interleukin-17 receptor

deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 3239–3247.

Kolls, J.K., McCray, P.B., and Chan, Y.R. (2008). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 829–835.

Koltsova, E.K., and Grivennikov, S.I. (2014). IL-22 gets to the stem of colorectal cancer. *Immunity* 40, 639–641.

Kopylov, U., and Seidman, E. (2016). Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 9, 513–526.

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

Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001). Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 7096–7103.

Krämer, B., Goeser, F., Lutz, P., Glässner, A., Boesecke, C., Schwarze-Zander, C., Kaczmarek, D., Nischalke, H.D., Branchi, V., Manekeller, S., et al. (2017). Compartment-specific distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy. *PLOS Pathog.* 13, e1006373.

Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renauld, J.-C., and Becher, B. (2007). IL-22 Is Expressed by Th17 Cells in an IL-23-Dependent Fashion, but Not Required for the Development of Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179, 8098–8104.

Krisiukeniene, A., Babusyte, A., Stravinskaite, K., Lotvall, J., Sakalauskas, R., and Sitkauskiene, B. (2009). Smoking affects eotaxin levels in asthma patients. *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma* 46, 470–476.

Kronenberger, B., Rudloff, I., Bachmann, M., Brunner, F., Kapper, L., Filmann, N., Waidmann, O., Herrmann, E., Pfeilschifter, J., Zeuzem, S., et al. (2012). Interleukin-22 predicts severity and death in advanced liver cirrhosis: a prospective cohort study. *BMC Med.* 10, 102.

Kruglov, A.A., Grivennikov, S.I., Kuprash, D.V., Winsauer, C., Prepens, S., Seleznik, G.M., Eberl, G., Littman, D.R., Heikenwalder, M., Tumanov, A.V., et al. (2013). Nonredundant function of soluble LT $\alpha$ 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 342, 1243–1246.

Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., et al. (2014a). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* 40, 772–784.

- Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., et al. (2014b). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* *40*, 772–784.
- Kumar, A., Priyamvada, S., Ge, Y., Jayawardena, D., Singhal, M., Anbazhagan, A.N., Chatterjee, I., Dayal, A., Patel, M., Zadeh, K., et al. (2020). A Novel Role of SLC26A3 in the Maintenance of Intestinal Epithelial Barrier Integrity. *Gastroenterology*.
- Laaksonen, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Adzemovic, M.Z., Parsa, R., Zeitelhofer, M., Jagodic, M., and Olsson, T. (2014a). The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes Immun.* *15*, 457–465.
- Laaksonen, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Adzemovic, M.Z., Parsa, R., Zeitelhofer, M., Jagodic, M., and Olsson, T. (2014b). The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes Immun.* *15*, 457–465.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* *22*, 598–605.
- Lambeth, J.D., and Neish, A.S. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 119–145.
- Langley, R.G., Elewski, B.E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C.E.M., Papp, K., Puig, L., Nakagawa, H., Spelman, L., Sigurgeirsson, B., et al. (2014). Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N. Engl. J. Med.* *371*, 326–338.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233–240.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* *12*, 99–113.
- Larsen, S., Bendtzen, K., and Nielsen, O.H. (2010). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann. Med.* *42*, 97–114.
- Laurans, L., Venteclef, N., Haddad, Y., Chajadine, M., Alzaid, F., Metghalchi, S., Sovran, B., Denis, R.G.P., Dairou, J., Cardellini, M., et al. (2018). Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health. *Nat. Med.* *24*, 1113–1120.
- Lee, E.H., Yang, H.R., and Lee, H.S. (2018). Quantitative Analysis of Distribution of the Gastrointestinal Tract Eosinophils in Childhood Functional Abdominal Pain Disorders. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 614–627.

Lee, J.C., Lyons, P.A., McKinney, E.F., Sowerby, J.M., Carr, E.J., Bredin, F., Rickman, H.M., Ratlamwala, H., Hatton, A., Rayner, T.F., et al. (2011). Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* *121*, 4170–4179.

Lee, J.C., Espéli, M., Anderson, C.A., Linterman, M.A., Pocock, J.M., Williams, N.J., Roberts, R., Viatte, S., Fu, B., Peshu, N., et al. (2013). Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* *155*, 57–69.

Lee, J.C., Biasci, D., Roberts, R., Geary, R.B., Mansfield, J.C., Ahmad, T., Prescott, N.J., Satsangi, J., Wilson, D.C., Jostins, L., et al. (2017). Genome-wide association study identifies distinct genetic contributions to prognosis and susceptibility in Crohn's disease. *Nat. Genet.* *49*, 262–268.

Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Gulan, F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., et al. (2015a). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* *43*, 727–738.

Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Gulan, F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., et al. (2015b). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* *43*, 727–738.

Lee, S., Kuenzig, M.E., Ricciuto, A., Zhang, Z., Shim, H.H., Panaccione, R., Kaplan, G.G., and Seow, C.H. (2021). Smoking May Reduce the Effectiveness of Anti-TNF Therapies to Induce Clinical Response and Remission in Crohn's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Crohns Colitis* *15*, 74–87.

Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., and Renauld, J.-C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J. Biol. Chem.* *277*, 33676–33682.

Leonardi, I., Li, X., Semon, A., Li, D., Doron, I., Putzel, G., Bar, A., Prieto, D., Rescigno, M., McGovern, D.P.B., et al. (2018). CX3CR1+ mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science* *359*, 232–236.

Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, I.I., Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., et al. (2009). RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* *136*, 257–267.

Levin, A.D., Wildenberg, M.E., and van den Brink, G.R. (2016). Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* *10*, 989–997.

Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., and Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 219–232.

- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., et al. (2014a). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* *32*, 834–841.
- Li, L.-J., Gong, C., Zhao, M.-H., and Feng, B.-S. (2014b). Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 18177–18188.
- Li, L.-J., Gong, C., Zhao, M.-H., and Feng, B.-S. (2014c). Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 18177–18188.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006a). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* *203*, 2271–2279.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006b). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* *203*, 2271–2279.
- Liao, S.-X., Ding, T., Rao, X.-M., Sun, D.-S., Sun, P.-P., Wang, Y.-J., Fu, D.-D., Liu, X.-L., and Ou-Yang, Y. (2015). Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol. Med. Rep.* *11*, 219–225.
- Liesenfeld, O. (2002). Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* *185 Suppl 1*, S96-101.
- Liévin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2013). Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *77*, 380–439.
- Lim, C., Hong, M., and Savan, R. (2016a). Human IL-22 binding protein isoforms act as a rheostat for IL-22 signaling. *Sci. Signal.* *9*, ra95–ra95.
- Lim, C., Hong, M., and Savan, R. (2016b). Human IL-22 binding protein isoforms act as a rheostat for IL-22 signaling. *Sci. Signal.* *9*, ra95.
- Lindahl, H., Martini, E., Brauner, S., Nikamo, P., Gallais Serezal, I., Guerreiro-Cacais, A.O., Jagodic, M., Eidsmo, L., Stähle, M., and Olsson, T. (2017). IL-22 binding protein regulates murine skin inflammation. *Exp. Dermatol.* *26*, 444–446.
- Lindahl, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Bedri, S.K., Linnerbauer, M., Lindén, M., Abdelmagid, N., Tandre, K., Hollins, C., Irving, L., Glover, C., et al. (2019a). IL-22 Binding Protein Promotes the Disease Process in Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
- Lindahl, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Bedri, S.K., Linnerbauer, M., Lindén, M., Abdelmagid, N., Tandre, K., Hollins, C., Irving, L., Glover, C., et al. (2019b). IL-22 Binding Protein Promotes the Disease Process in Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *203*, 888–898.
- Lindemans, C.A., Calafiore, M., Mertelsmann, A.M., O'Connor, M.H., Dudakov, J.A., Jenq, R.R., Velardi, E., Young, L.F., Smith, O.M., Lawrence, G., et al. (2015). Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* *528*, 560–564.

Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., et al. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* *47*, 979–986.

Liu, T.-C., Gurram, B., Baldridge, M.T., Head, R., Lam, V., Luo, C., Cao, Y., Simpson, P., Hayward, M., Holtz, M.L., et al. (2016). Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI Insight* *1*, e86907.

Liu, T.-C., Kern, J.T., VanDussen, K.L., Xiong, S., Kaiko, G.E., Wilen, C.B., Rajala, M.W., Caruso, R., Holtzman, M.J., Gao, F., et al. (2018). Interaction between smoking and ATG16L1T300A triggers Paneth cell defects in Crohn's disease. *J. Clin. Invest.* *128*, 5110–5122.

Lo, B.C., Shin, S.B., Canals Hernaez, D., Refaeli, I., Yu, H.B., Goebeler, V., Cait, A., Mohn, W.W., Vallance, B.A., and McNagny, K.M. (2019). IL-22 Preserves Gut Epithelial Integrity and Promotes Disease Remission during Chronic Salmonella Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *202*, 956–965.

Loftus, E.V., Harewood, G.C., Loftus, C.G., Tremaine, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Jewell, D.A., and Sandborn, W.J. (2005). PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* *54*, 91–96.

Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Vermeire, S., Sandborn, W.J., Sands, B.E., Danese, S., D'Haens, G.R., Kaser, A., Panaccione, R., et al. (2016a). Long-term Efficacy of Vedolizumab for Ulcerative Colitis. *J. Crohns Colitis*.

Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Vermeire, S., Sandborn, W.J., Sands, B.E., Danese, S., D'Haens, G.R., Kaser, A., Panaccione, R., et al. (2016b). Long-term Efficacy of Vedolizumab for Ulcerative Colitis. *J. Crohns Colitis*.

Logsdon, N.J., Jones, B.C., Josephson, K., Cook, J., and Walter, M.R. (2002). Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *22*, 1099–1112.

Loktionov, A. (2019). Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J. Gastroenterol.* *25*, 3503–3526.

Longman, R.S., Diehl, G.E., Victorio, D.A., Huh, J.R., Galan, C., Miraldi, E.R., Swaminath, A., Bonneau, R., Scherl, E.J., and Littman, D.R. (2014). CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.* *211*, 1571–1583.

Louis, E., Collard, A., Oger, A.F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F.A., and Belaiche, J. (2001a). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* *49*, 777–782.

Louis, E., Collard, A., Oger, A.F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F.A., and Belaiche, J. (2001b). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* *49*, 777–782.

Lunney, P.C., Kariyawasam, V.C., Wang, R.R., Middleton, K.L., Huang, T., Selinger, C.P., Andrews, J.M., Katelaris, P.H., and Leong, R.W.L. (2015). Smoking prevalence and its influence on disease course and surgery in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *42*, 61–70.

Ma, C.S., Chew, G.Y.J., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., and Cook, M.C. (2008). Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* *205*, 1551–1557.

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

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* *303*, 1662–1665.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* *3*, 1021–1035.

Magro, F., Gionchetti, P., Eliakim, R., Ardizzone, S., Armuzzi, A., Barreiro-de Acosta, M., Burisch, J., Gecse, K.B., Hart, A.L., Hindryckx, P., et al. (2017). Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J. Crohns Colitis* *11*, 649–670.

Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* *81*, 1462–1471.

Mahid, S.S., Minor, K.S., Stromberg, A.J., and Galandiuk, S. (2007). Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 431–438.

Martin, J.C., Bériou, G., Heslan, M., Bossard, C., Jarry, A., Abidi, A., Hulin, P., Ménoret, S., Thinard, R., Anegon, I., et al. (2016a). IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol.* *9*, 539–549.

Martin, J.C., Bériou, G., Heslan, M., Bossard, C., Jarry, A., Abidi, A., Hulin, P., Ménoret, S., Thinard, R., Anegon, I., et al. (2016b). IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol.* *9*, 539–549.

Martin, J.C., Wolk, K., Bériou, G., Abidi, A., Witte-Händel, E., Louvet, C., Kokolakis, G., Drujon, L., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., et al. (2017a). Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 3671–3678.

Martin, J.C., Wolk, K., Bériou, G., Abidi, A., Witte-Händel, E., Louvet, C., Kokolakis, G., Drujon, L., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., et al. (2017b). Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a

Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *198*, 3671–3678.

Martin, J.C., Chang, C., Boschetti, G., Ungaro, R., Giri, M., Grout, J.A., Gettler, K., Chuang, L.-S., Nayar, S., Greenstein, A.J., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* *178*, 1493-1508.e20.

Martin, J.C.J., Bériou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utriainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., et al. (2014a). Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* *7*, 101–113.

Martin, J.C.J., Bériou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utriainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., et al. (2014b). Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* *7*, 101–113.

Mary, J.Y., and Modigliani, R. (1989). Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. *Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). Gut* *30*, 983–989.

Masahata, K., Umemoto, E., Kayama, H., Kotani, M., Nakamura, S., Kurakawa, T., Kikuta, J., Gotoh, K., Motooka, D., Sato, S., et al. (2014). Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat. Commun.* *5*, 3704.

Mathur, R., Alam, M.M., Zhao, X.-F., Liao, Y., Shen, J., Morgan, S., Huang, T., Lee, H., Lee, E., Huang, Y., et al. (2019). Induction of autophagy in Cx3cr1+ mononuclear cells limits IL-23/IL-22 axis-mediated intestinal fibrosis. *Mucosal Immunol.* *12*, 612–623.

Matsushita, T., Maruyama, R., Ishikawa, N., Harada, Y., Araki, A., Chen, D., Tauchi-Nishi, P., Yuki, T., and Kinoshita, Y. (2015). The number and distribution of eosinophils in the adult human gastrointestinal tract: a study and comparison of racial and environmental factors. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 521–527.

Matthews, J.R., Sansom, O.J., and Clarke, A.R. (2011). Absolute requirement for STAT3 function in small-intestine crypt stem cell survival. *Cell Death Differ.* *18*, 1934–1943.

Maxwell, J.R., Zhang, Y., Brown, W.A., Smith, C.L., Byrne, F.R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J.A., Rottman, J.B., et al. (2015). Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity* *43*, 739–750.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1+ macrophages to CD103+ dendritic cells. *Immunity* *40*, 248–261.

McCarroll, S.A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S.D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M.C., Hall, J.L., Brant, S.R., Cho, J.H., et al. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genet.* *40*, 1107–1112.

- McCuaig, S., Barras, D., Mann, E.H., Friedrich, M., Bullers, S.J., Janney, A., Garner, L.C., Domingo, E., Koelzer, V.H., Delorenzi, M., et al. (2020). The Interleukin 22 Pathway Interacts with Mutant KRAS to Promote Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *26*, 4313–4325.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103 + dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.
- McDonald, K.G., McDonough, J.S., Dieckgraefe, B.K., and Newberry, R.D. (2010). Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* *176*, 2367–2377.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* *8*, 1390–1397.
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., and Gaffen, S.L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* *50*, 892–906.
- McKinney, E.F., Lee, J.C., Jayne, D.R.W., Lyons, P.A., and Smith, K.G.C. (2015). T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* *523*, 612–616.
- Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* *7*, 493–504.
- Melo, R.C.N., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2008). Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 229–236.
- Milling, S., Yrlid, U., Cerovic, V., and MacPherson, G. (2010). Subsets of migrating intestinal dendritic cells. *Immunol. Rev.* *234*, 259–267.
- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 763–776.
- Mitrev, N., Vande Castele, N., Seow, C.H., Andrews, J.M., Connor, S.J., Moore, G.T., Barclay, M., Begun, J., Bryant, R., Chan, W., et al. (2017). Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *46*, 1037–1053.
- Mizoguchi, A. (2012). Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1777–1784.
- Moayyedi, P., Surette, M.G., Kim, P.T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., Armstrong, D., Marshall, J.K., Kassam, Z., Reinisch, W., et al. (2015). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* *149*, 102-109.e6.

Moghaddami, M., Cummins, A., and Mayrhofer, G. (1998). Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology* *115*, 1414–1425.

Moller, F.T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., and Jess, T. (2015). Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am. J. Gastroenterol.* *110*, 564–571.

Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* *142*, 46-54.e42; quiz e30.

Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* *141*, 237–248, 248.e1.

Moschen, A.R., Gerner, R.R., Wang, J., Klepsch, V., Adolph, T.E., Reider, S.J., Hackl, H., Pfister, A., Schilling, J., Moser, P.L., et al. (2016). Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host Microbe* *19*, 455–469.

de Moura, P.R., Watanabe, L., Bleicher, L., Colau, D., Dumoutier, L., Lemaire, M.M., Renaud, J.-C., and Polikarpov, I. (2009). Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS Lett.* *583*, 1072–1077.

Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 667–685.

Muise, A.M., Walters, T.D., Glowacka, W.K., Griffiths, A.M., Ngan, B.-Y., Lan, H., Xu, W., Silverberg, M.S., and Rotin, D. (2009). Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut* *58*, 1121–1127.

Muñoz, M., Heimesaat, M.M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I.R., Wolk, K., et al. (2009). Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med.* *206*, 3047–3059.

Muñoz, M., Eidenschenk, C., Ota, N., Wong, K., Lohmann, U., Köhl, A.A., Wang, X., Manzanillo, P., Li, Y., Rutz, S., et al. (2015). Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity* *42*, 321–331.

Nagalakshmi, M.L., Murphy, E., McClanahan, T., and de Waal Malefyt, R. (2004). Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int. Immunopharmacol.* *4*, 577–592.

Naganuma, M., Sugimoto, S., Mitsuyama, K., Kobayashi, T., Yoshimura, N., Ohi, H., Tanaka, S., Andoh, A., Ohmiya, N., Saigusa, K., et al. (2018). Efficacy of Indigo Naturalis in a Multicenter

Randomized Controlled Trial of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 154, 935–947.

Nagao-Kitamoto, H., Leslie, J.L., Kitamoto, S., Jin, C., Thomsson, K.A., Gilliland, M.G., Kuffa, P., Goto, Y., Jenq, R.R., Ishii, C., et al. (2020). Interleukin-22-mediated host glycosylation prevents *Clostridioides difficile* infection by modulating the metabolic activity of the gut microbiota. *Nat. Med.* 26, 608–617.

Nagem, R.A.P., Colau, D., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Ogata, C., and Polikarpov, I. (2002). Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Struct. Lond. Engl.* 1993 10, 1051–1062.

Nalleweg, N., Chiriac, M.T., Podstawa, E., Lehmann, C., Rau, T.T., Atreya, R., Krauss, E., Hundorfean, G., Fichtner-Feigl, S., Hartmann, A., et al. (2015). IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut* 64, 743–755.

Nanda, K.S., Cheifetz, A.S., and Moss, A.C. (2013). Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 40–47; quiz 48.

Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329–342.

Neurath, M.F. (2019). Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat. Immunol.* 20, 970–979.

Ngo, V.L., Abo, H., Maxim, E., Harusato, A., Geem, D., Medina-Contreras, O., Merlin, D., Gewirtz, A.T., Nusrat, A., and Denning, T.L. (2018). A cytokine network involving IL-36 $\gamma$ , IL-23, and IL-22 promotes antimicrobial defense and recovery from intestinal barrier damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5076–E5085.

Nguyen, H.M.-H., Torres, J.A., Agrawal, S., and Agrawal, A. (2020). Nicotine Impairs the Response of Lung Epithelial Cells to IL-22 (Hindawi).

Nielsen, O.H., Kirman, I., Rüdiger, N., Hendel, J., and Vainer, B. (2003). Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 180–185.

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., et al. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258.

Norman, J.M., Handley, S.A., Baldridge, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., et al. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160, 447–460.

Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C.D., Graham, M., Elinav, E., et al. (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* 163, 1444–1456.

- Oberg, M., Jaakkola, M.S., Woodward, A., Peruga, A., and Prüss-Ustün, A. (2011). Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet Lond. Engl.* *377*, 139–146.
- Ochsenkühn, T., Tillack, C., Szokodi, D., Janelidze, S., and Schnitzler, F. (2020). Clinical outcomes with ustekinumab as rescue treatment in therapy-refractory or therapy-intolerant ulcerative colitis. *United Eur. Gastroenterol. J.* *8*, 91–98.
- O'Connor, W., Kamanaka, M., Booth, C.J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J.K., and Flavell, R.A. (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 603–609.
- Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004a). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *110*, 55–62.
- Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004b). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *110*, 55–62.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603–606.
- Okumura, R., and Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* *49*, e338.
- O'Leary, A.D., and Sweeney, E.C. (1986). Lymphoglandular complexes of the colon: structure and distribution. *Histopathology* *10*, 267–283.
- Ollech, J.E., Normatov, I., Peleg, N., Wang, J., Patel, S.A., Rai, V., Yi, Y., Singer, J., Dalal, S.R., Sakuraba, A., et al. (2021). Effectiveness of Ustekinumab Dose Escalation in Patients With Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *19*, 104–110.
- Onishi, R.M., and Gaffen, S.L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* *129*, 311–321.
- Ott, C., Taksas, A., Obermeier, F., Schnoy, E., and Müller, M. (2014). Smoking increases the risk of extraintestinal manifestations in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 12269–12276.
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., and Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* *53*, 685–693.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*, 104.
- Ouellette, A.J., and Bevins, C.L. (2001). Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm. Bowel Dis.* *7*, 43–50.

Ouyang, W., and O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* 50, 871–891.

Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821–832.

Panés, J., Sandborn, W.J., Schreiber, S., Sands, B.E., Vermeire, S., D'Haens, G., Panaccione, R., Higgins, P.D.R., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., et al. (2017). Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. *Gut* 66, 1049–1059.

Parikh, K., Antanaviciute, A., Fawcner-Corbett, D., Jagielowicz, M., Aulicino, A., Lagerholm, C., Davis, S., Kinchen, J., Chen, H.H., Alham, N.K., et al. (2019). Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature* 567, 49–55.

Park, C.H., Lee, A.-R., Ahn, S.B., Eun, C.S., and Han, D.S. (2020). Role of innate lymphoid cells in chronic colitis during anti-IL-17A therapy. *Sci. Rep.* 10, 297.

Patnaude, L., Mayo, M., Mario, R., Wu, X., Knight, H., Creamer, K., Wilson, S., Pivorunas, V., Karman, J., Phillips, L., et al. (2021). Mechanisms and regulation of IL-22-mediated intestinal epithelial homeostasis and repair. *Life Sci.* 119195.

Pelaseyed, T., and Hansson, G.C. (2020). Membrane mucins of the intestine at a glance. *J. Cell Sci.* 133.

Pelczar, P., Witkowski, M., Perez, L.G., Kempinski, J., Hammel, A.G., Brockmann, L., Kleinschmidt, D., Wende, S., Haueis, C., Bedke, T., et al. (2016a). A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* 354, 358–362.

Pelczar, P., Witkowski, M., Perez, L.G., Kempinski, J., Hammel, A.G., Brockmann, L., Kleinschmidt, D., Wende, S., Haueis, C., Bedke, T., et al. (2016b). A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* 354, 358–362.

Perriard, G., Mathias, A., Enz, L., Canales, M., Schlupe, M., Gentner, M., Schaeren-Wiemers, N., and Du Pasquier, R.A. (2015). Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J. Neuroinflammation* 12, 119.

Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., et al. (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38, 958–969.

Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K.S. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15813–15818.

Pham, T.A.N., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumasaka, N., Kane, L., et al. (2014). Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation

promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. *Cell Host Microbe* 16, 504–516.

Pickard, J.M., and Chervonsky, A.V. (2015). Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 5588–5593.

Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., and Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.* 279, 70–89.

Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.-A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., et al. (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206, 1465–1472.

Pilarczyk-Zurek, M., Chmielarczyk, A., Gosiewski, T., Tomusiak, A., Adamski, P., Zwolinska-Wcislo, M., Mach, T., Heczko, P.B., and Strus, M. (2013). Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.* 13, 61.

Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., Nikolopoulos, G.K., Lytras, T., and Bonovas, S. (2019). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 157, 647-659.e4.

Powell, N., Pantazi, E., Pavlidis, P., Tsakmaki, A., Li, K., Yang, F., Parker, A., Pin, C., Cozzetto, D., Minns, D., et al. (2020). Interleukin-22 orchestrates a pathological endoplasmic reticulum stress response transcriptional programme in colonic epithelial cells. *Gut* 69, 578–590.

Powrie, F., Coffman, R.L., and Correa-Oliveira, R. (1994). Transfer of CD4+ T cells to C.B-17 SCID mice: a model to study Th1 and Th2 cell differentiation and regulation in vivo. *Res. Immunol.* 145, 347–353.

Prasad, S.V., Fiedoruk, K., Daniluk, T., Piktel, E., and Bucki, R. (2019). Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites. *Int. J. Mol. Sci.* 21.

Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., et al. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med.* 207, 291–297.

Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., et al. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65–68.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.

Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., et al. (2016). Identification of an anti-

inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415–425.

Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 39, 1332–1342.

Raffatellu, M., George, M.D., Akiyama, Y., Hornsby, M.J., Nuccio, S.-P., Paixao, T.A., Butler, B.P., Chu, H., Santos, R.L., Berger, T., et al. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 5, 476–486.

Reese, G.E., Nanidis, T., Borysiewicz, C., Yamamoto, T., Orchard, T., and Tekkis, P.P. (2008). The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int. J. Colorectal Dis.* 23, 1213–1221.

Reikvam, D.H., Perminow, G., Lyckander, L.G., Gran, J.M., Brandtzaeg, P., Vatn, M., and Carlsen, H.S. (2011). Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 550–560.

van Rheenen, P.F., Van de Vijver, E., and Fidler, V. (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 341, c3369.

Riley, S.A., Mani, V., Goodman, M.J., Dutt, S., and Herd, M.E. (1991). Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 32, 174–178.

Robb, C.T., McSorley, H.J., Lee, J., Aoki, T., Yu, C., Crittenden, S., Astier, A., Felton, J.M., Parkinson, N., Ayele, A., et al. (2018). Prostaglandin E2 stimulates adaptive IL-22 production and promotes allergic contact dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 152–162.

Rozenbaum, R., and Mebius, R.E. (2011). Stromal cell-immune cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 23–43.

Rossen, N.G., Fuentes, S., van der Spek, M.J., Tijssen, J.G., Hartman, J.H.A., Duflou, A., Löwenberg, M., van den Brink, G.R., Mathus-Vliegen, E.M.H., de Vos, W.M., et al. (2015). Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 149, 110-118.e4.

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

Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 147–174.

Rothenberg, M.E., Wang, Y., Lekkerkerker, A., Danilenko, D.M., Maciuga, R., Erickson, R., Herman, A., Stefanich, E., and Lu, T.T. (2019). Randomized Phase I Healthy Volunteer Study of

UTTR1147A (IL-22Fc): A Potential Therapy for Epithelial Injury. *Clin. Pharmacol. Ther.* 105, 177–189.

Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattéi, M.G., Denizot, F., and Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 5445–5456.

Rudloff, I., Jardé, T., Bachmann, M., Elgass, K.D., Kerr, G., Engel, R., Richards, E., Oliva, K., Wilkins, S., McMurrick, P.J., et al. (2020). Molecular signature of interleukin-22 in colon carcinoma cells and organoid models. *Transl. Res.* 216, 1–22.

Ruffin, M., Mercier, J., Calmel, C., Mésinèle, J., Bigot, J., Sutanto, E.N., Kicic, A., Corvol, H., and Guillot, L. (2020). Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3311–3323.

Rutgeerts, P., Geboes, K., Vantrappen, G., Beyls, J., Kerremans, R., and Hiele, M. (1990). Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 99, 956–963.

Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol. Rev.* 252, 116–132.

Rutz, S., Wang, X., and Ouyang, W. (2014). The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 783–795.

Sabat, R. (2010). IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 315–324.

Sabat, R., Ouyang, W., and Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 21–38.

Sakamoto, K., Kim, Y.-G., Hara, H., Kamada, N., Caballero-Flores, G., Tolosano, E., Soares, M.P., Puente, J.L., Inohara, N., and Núñez, G. (2017). IL-22 Controls Iron-Dependent Nutritional Immunity Against Systemic Bacterial Infections. *Sci. Immunol.* 2.

Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., and Bevins, C.L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526.

Sandborn, W.J., Gasink, C., Gao, L.-L., Blank, M.A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Rutgeerts, P., et al. (2012). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 1519–1528.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Wolf, D.C., D'Haens, G., Vermeire, S., Hanauer, S.B., Ghosh, S., Smith, H., Cravets, M., Frohna, P.A., et al. (2016). Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 374, 1754–1762.

Sandborn, W.J., Su, C., Sands, B.E., D'Haens, G.R., Vermeire, S., Schreiber, S., Danese, S., Feagan, B.G., Reinisch, W., Niezychowski, W., et al. (2017). Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 376, 1723–1736.

Sandborn, W.J., Lee, S.D., Tarabar, D., Louis, E., Klopocka, M., Klaus, J., Reinisch, W., Hébuterne, X., Park, D.-I., Schreiber, S., et al. (2018). Phase II evaluation of anti-MAdCAM antibody PF-00547659 in the treatment of Crohn's disease: report of the OPERA study. *Gut* *67*, 1824–1835.

Sands, B.E., Anderson, F.H., Bernstein, C.N., Chey, W.Y., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Kamm, M.A., Korzenik, J.R., Lashner, B.A., Onken, J.E., et al. (2004). Infliximab Maintenance Therapy for Fistulizing Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* *350*, 876–885.

Sands, B.E., Chen, J., Feagan, B.G., Penney, M., Rees, W.A., Danese, S., Higgins, P.D.R., Newbold, P., Faggioni, R., Patra, K., et al. (2017). Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* *153*, 77-86.e6.

Sartor, R.B., and Wu, G.D. (2017). Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* *152*, 327-339.e4.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262–265.

Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* *209*, 1135–1152.

Savage, A.K., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2017). The Development of Steady-State Activation Hubs between Adult LT $\alpha$  ILC3s and Primed Macrophages in Small Intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *199*, 1912–1922.

Sazonovs, A., Kennedy, N.A., Moutsianas, L., Heap, G.A., Rice, D.L., Reppell, M., Bewshea, C.M., Chanchlani, N., Walker, G.J., Perry, M.H., et al. (2020). HLA-DQA1\*05 Carriage Associated With Development of Anti-Drug Antibodies to Infliximab and Adalimumab in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* *158*, 189–199.

Schmid, M., Fellermann, K., Fritz, P., Wiedow, O., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2007). Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 907–915.

Schneider, C., O'Leary, C.E., and Locksley, R.M. (2019). Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 584–593.

Schwarzkopf, K., Rüschenbaum, S., Barat, S., Cai, C., Mücke, M.M., Fitting, D., Weigert, A., Brüne, B., Zeuzem, S., Welsch, C., et al. (2019). IL-22 and IL-22-Binding Protein Are Associated With Development of and Mortality From Acute-on-Chronic Liver Failure. *Hepatology* *3*, 392–405.

Sertorio, M., Hou, X., Carmo, R.F., Dessein, H., Cabantous, S., Abdelwahed, M., Romano, A., Albuquerque, F., Vasconcelos, L., Carmo, T., et al. (2015). IL-22 and IL-22 binding protein (IL-

22BP) regulate fibrosis and cirrhosis in hepatitis C virus and schistosome infections. *Hepatology*. Baltimore, Md 61, 1321–1331.

Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J.R., Walland, A.C., Bornstein, V.U., Chen, K., He, B., Cassis, L., Bigas, A., Cols, M., et al. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 342, 447–453.

Sheehan, D., Moran, C., and Shanahan, F. (2015). The microbiota in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 50, 495–507.

Shivaji, U.N., Sharratt, C.L., Thomas, T., Smith, S.C.L., Iacucci, M., Moran, G.W., Ghosh, S., and Bhala, N. (2019). Review article: managing the adverse events caused by anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 49, 664–680.

Shmidt, E., Kochhar, G., Hartke, J., Chilukuri, P., Meserve, J., Chaudrey, K., Koliiani-Pace, J.L., Hirten, R., Faleck, D., Barocas, M., et al. (2018). Predictors and Management of Loss of Response to Vedolizumab in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 2461–2467.

Simmons, J.D., Mullighan, C., Welsh, K.I., and Jewell, D.P. (2000). Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut* 47, 211–214.

Smillie, C.S., Biton, M., Ordovas-Montanes, J., Sullivan, K.M., Burgin, G., Graham, D.B., Herbst, R.H., Rogel, N., Slyper, M., Waldman, J., et al. (2019). Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. *Cell* 178, 714-730.e22.

Smith, C.L., Arvedson, T.L., Cooke, K.S., Dickmann, L.J., Forte, C., Li, H., Merriam, K.L., Perry, V.K., Tran, L., Rottman, J.B., et al. (2013). IL-22 regulates iron availability in vivo through the induction of hepcidin. *J. Immunol.* Baltimore, Md 1950 191, 1845–1855.

Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Doré, J. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 106–111.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736.

Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048.

Song, X., Dai, D., He, X., Zhu, S., Yao, Y., Gao, H., Wang, J., Qu, F., Qiu, J., Wang, H., et al. (2015). Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage. *Immunity* 43, 488–501.

Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011a). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* 12, 383–390.

Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011b). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* *12*, 383–390.

Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., et al. (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* *336*, 1321–1325.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016a). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 13–27.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016b). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 13–27.

Spehlmann, M.E., Begun, A.Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., and Schreiber, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 968–976.

Spencer, L.A., Bonjour, K., Melo, R.C.N., and Weller, P.F. (2014). Eosinophil Secretion of Granule-Derived Cytokines. *Front. Immunol.* *5*.

Stefanich, E.G., Rae, J., Sukumaran, S., Lutman, J., Lekkerkerker, A., Ouyang, W., Wang, X., Lee, D., Danilenko, D.M., Diehl, L., et al. (2018). Pre-clinical and translational pharmacology of a human interleukin-22 IgG fusion protein for potential treatment of infectious or inflammatory diseases. *Biochem. Pharmacol.* *152*, 224–235.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008a). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* *118*, 534–544.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008b). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* *118*, 534–544.

Sun, T., Nguyen, A., and Gommerman, J.L. (2020). Dendritic Cell Subsets in Intestinal Immunity and Inflammation. *J. Immunol.* *204*, 1075–1083.

Takayama, T., Kamada, N., Chinen, H., Okamoto, S., Kitazume, M.T., Chang, J., Matuzaki, Y., Suzuki, S., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2010). Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* *139*, 882–892, 892.e1-3.

Tang, C., Kakuta, S., Shimizu, K., Kadoki, M., Kamiya, T., Shimazu, T., Kubo, S., Saijo, S., Ishigame, H., Nakae, S., et al. (2018). Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by inducing Treg cells through modification of the intestinal microbiota. *Nat. Immunol.* *19*, 755–765.

Tang, K.-Y., Lickliter, J., Huang, Z.-H., Xian, Z.-S., Chen, H.-Y., Huang, C., Xiao, C., Wang, Y.-P., Tan, Y., Xu, L.-F., et al. (2019). Safety, pharmacokinetics, and biomarkers of F-652, a

recombinant human interleukin-22 dimer, in healthy subjects. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 473–482.

Targan, S.R., Feagan, B.G., Vermeire, S., Panaccione, R., Melmed, G.Y., Blosch, C., Newmark, R., Zhang, N., Chon, Y., Lin, S.-L., et al. (2012). Mo2083 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* *143*, e26.

Targan, S.R., Feagan, B., Vermeire, S., Panaccione, R., Melmed, G.Y., Landers, C., Li, D., Russell, C., Newmark, R., Zhang, N., et al. (2016). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease. *Am. J. Gastroenterol.* *111*, 1599–1607.

Teng, F., Goc, J., Zhou, L., Chu, C., Shah, M.A., Eberl, G., and Sonnenberg, G.F. (2019). A circadian clock is essential for homeostasis of group 3 innate lymphoid cells in the gut. *Sci. Immunol.* *4*.

Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* *535*, 65–74.

Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., and Loftus, E.V. (2010). Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* *139*, 1147–1155.

Thompson, C.L., Plummer, S.J., Tucker, T.C., Casey, G., and Li, L. (2010). Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control CCC* *21*, 1165–1170.

Tindemans, I., Joosse, M.E., and Samsom, J.N. (2020). Dissecting the Heterogeneity in T-Cell Mediated Inflammation in IBD. *Cells* *9*, 110.

To, N., Gracie, D.J., and Ford, A.C. (2016). Systematic review with meta-analysis: the adverse effects of tobacco smoking on the natural history of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *43*, 549–561.

Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 1741–1755.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* *71*, 1263–1271.

Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., and Peschon, J. (2006a). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 36–39.

Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., and Peschon, J. (2006b). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 36–39.

- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* *11*, 55–62.
- Travis, S.P.L., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M.T., Altman, D.G., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lémann, M., Lichtenstein, G.R., et al. (2012). Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* *61*, 535–542.
- Trevejo-Nunez, G., Elsegeiny, W., Aggor, F.E.Y., Tweedle, J.L., Kaplan, Z., Gandhi, P., Castillo, P., Ferguson, A., Alcorn, J.F., Chen, K., et al. (2019). Interleukin-22 (IL-22) Binding Protein Constrains IL-22 Activity, Host Defense, and Oxidative Phosphorylation Genes during Pneumococcal Pneumonia. *Infect. Immun.* *87*.
- Tsai, P.-Y., Zhang, B., He, W.-Q., Zha, J.-M., Odenwald, M.A., Singh, G., Tamura, A., Shen, L., Sailer, A., Yeruva, S., et al. (2017). IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance. *Cell Host Microbe* *21*, 671-681.e4.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* *29*, 261–271.
- Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Guo, X., Wang, Y., Kruglov, A., Nedospasov, S., and Fu, Y.-X. (2011). Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* *10*, 44–53.
- Turpin, W., Goethel, A., Bedrani, L., and Croitoru MdcM, K. (2018). Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 1133–1148.
- Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., et al. (2006). Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* *25*, 309–318.
- Ulm, H., Wilmes, M., Shai, Y., and Sahl, H.-G. (2012). Antimicrobial Host Defensins – Specific Antibiotic Activities and Innate Defense Modulation. *Front. Immunol.* *3*.
- Ungar, B., Levy, I., Yavne, Y., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Loebstein, R., Chowers, Y., Eliakim, R., Kopylov, U., et al. (2016). Optimizing Anti-TNF- $\alpha$  Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *14*, 550-557.e2.
- Ungar, B., Kopylov, U., Engel, T., Yavzori, M., Fudim, E., Picard, O., Lang, A., Williet, N., Paul, S., Chowers, Y., et al. (2017). Addition of an immunomodulator can reverse antibody formation and loss of response in patients treated with adalimumab. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *45*, 276–282.

Ungaro, R., Bernstein, C.N., Geary, R., Hviid, A., Kolho, K.-L., Kronman, M.P., Shaw, S., Van Kruiningen, H., Colombel, J.-F., and Atreja, A. (2014). Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 1728–1738.

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P.B., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 1756–1770.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255–258.

Vande Casteele, N., Ferrante, M., Van Assche, G., Ballet, V., Compernelle, G., Van Steen, K., Simoons, S., Rutgeerts, P., Gils, A., and Vermeire, S. (2015). Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *148*, 1320-1329.e3.

VanDussen, K.L., Liu, T.-C., Li, D., Towfic, F., Modiano, N., Winter, R., Haritunians, T., Taylor, K.D., Dhall, D., Targan, S.R., et al. (2014). Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology* *146*, 200–209.

Vavricka, S.R., Schoepfer, A., Scharl, M., Lakatos, P.L., Navarini, A., and Rogler, G. (2015). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 1982–1992.

Veldhoen, M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.* *18*, 612–621.

Vermeire, S., O'Byrne, S., Keir, M., Williams, M., Lu, T.T., Mansfield, J.C., Lamb, C.A., Feagan, B.G., Panes, J., Salas, A., et al. (2014). Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* *384*, 309–318.

Vermeire, S., Loftus, E.V., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Sandborn, W.J., Sands, B.E., Danese, S., D'Haens, G.R., Kaser, A., Panaccione, R., et al. (2016). Long-term Efficacy of Vedolizumab for Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis.*

Vermeire, S., Schreiber, S., Petryka, R., Kuehbacher, T., Hebuterne, X., Roblin, X., Klopocka, M., Goldis, A., Wisniewska-Jarosinska, M., Baranovsky, A., et al. (2017a). Clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's disease treated with filgotinib (the FITZROY study): results from a phase 2, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *389*, 266–275.

Vermeire, S., Sandborn, W.J., Danese, S., Hébuterne, X., Salzberg, B.A., Klopocka, M., Tarabar, D., Vanasek, T., Greguš, M., Hellstern, P.A., et al. (2017b). Anti-MAdCAM antibody (PF-00547659) for ulcerative colitis (TURANDOT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *390*, 135–144.

- Victor, A.R., Nalin, A.P., Dong, W., McClory, S., Wei, M., Mao, C., Kladney, R.D., Youssef, Y., Chan, W.K., Briercheck, E.L., et al. (2017). IL-18 Drives ILC3 Proliferation and Promotes IL-22 Production via NF- $\kappa$ B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *199*, 2333–2342.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* *174*, 1054–1066.
- Voglis, S., Moos, S., Kloos, L., Wanke, F., Zayoud, M., Pelczar, P., Giannou, A.D., Pezer, S., Albers, M., Luessi, F., et al. (2018a). Regulation of IL-22BP in psoriasis. *Sci. Rep.* *8*, 5085.
- Voglis, S., Moos, S., Kloos, L., Wanke, F., Zayoud, M., Pelczar, P., Giannou, A.D., Pezer, S., Albers, M., Luessi, F., et al. (2018b). Regulation of IL-22BP in psoriasis. *Sci. Rep.* *8*, 5085.
- Vuitton, L., Koch, S., and Peyrin-Biroulet, L. (2013). Preventing postoperative recurrence in Crohn's disease: what does the future hold? *Drugs* *73*, 1749–1759.
- Wade, R., Di Bernardo, M.C., Richards, S., Rossi, D., Crowther-Swanepoel, D., Gaidano, G., Oscier, D.G., Catovsky, D., and Houlston, R.S. (2011). Association between single nucleotide polymorphism-genotype and outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized chemotherapy trial. *Haematologica* *96*, 1496–1503.
- Walsh, A.J., Bryant, R.V., and Travis, S.P.L. (2016). Current best practice for disease activity assessment in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 567–579.
- Wang, B., Zhao, P., Zhou, Y., Meng, L., Zhu, W., Jiang, C., Wang, L., Cai, Y., Lu, S., and Hou, W. (2017a). Increased expression of Th17 cytokines and interleukin-22 correlates with disease activity in pristane-induced arthritis in rats. *PLoS One* *12*, e0188199.
- Wang, B., Lim, J.-H., Kajikawa, T., Li, X., Vallance, B.A., Moutsopoulos, N.M., Chavakis, T., and Hajishengallis, G. (2019). Macrophage  $\beta$ 2-Integrins Regulate IL-22 by ILC3s and Protect from Lethal *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Cell Rep.* *26*, 1614-1626.e5.
- Wang, B., Han, D., Li, F., Hou, W., Wang, L., Meng, L., Mou, K., Lu, S., Zhu, W., and Zhou, Y. (2020a). Elevated IL-22 in psoriasis plays an anti-apoptotic role in keratinocytes through mediating Bcl-xL/Bax. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *25*, 663–673.
- Wang, Y., Mumm, J.B., Herbst, R., Kolbeck, R., and Wang, Y. (2017b). IL-22 Increases Permeability of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Enhancing Claudin-2 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *199*, 3316–3325.
- Wang, Y., Song, W., Wang, J., Wang, T., Xiong, X., Qi, Z., Fu, W., Yang, X., and Chen, Y.-G. (2020b). Single-cell transcriptome analysis reveals differential nutrient absorption functions in human intestine. *J. Exp. Med.* *217*.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98–108.

- Weber, G.F., Schlautkötter, S., Kaiser-Moore, S., Altmayr, F., Holzmann, B., and Weighardt, H. (2007). Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect. Immun.* 75, 1690–1697.
- Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2010). Paneth's disease. *J. Crohns Colitis* 4, 523–531.
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (2002). Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 745–752.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K.R., Fellermann, K., Schroeder, J.M., and Stange, E.F. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 9, 215–223.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.
- Wehkamp, J., Schmid, M., and Stange, E.F. (2007). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 370–378.
- Weller, P.F., and Spencer, L.A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 746–760.
- Whibley, N., and Gaffen, S.L. (2015). Gut-Busters: IL-17 Ain't Afraid of No IL-23. *Immunity* 43, 620–622.
- Whittington, H.A., Armstrong, L., Uppington, K.M., and Millar, A.B. (2004). Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 220–226.
- Withers, D.R., Hepworth, M.R., Wang, X., Mackley, E.C., Halford, E.E., Dutton, E.E., Marriott, C.L., Brucklacher-Waldert, V., Veldhoen, M., Kelsen, J., et al. (2016). Transient inhibition of ROR- $\gamma$ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat. Med.* 22, 319–323.
- Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., Sabat, R., and Wolk, K. (2010). Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 365–379.
- Wolff, M.J., Leung, J.M., Davenport, M., Poles, M.A., Cho, I., and Loke, P. (2012). TH17, TH22 and TReg Cells Are Enriched in the Healthy Human Cecum. *PLOS ONE* 7, e41373.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002a). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 5397–5402.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002b). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 5397–5402.

- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1309–1323.
- Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.-D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.-D., Wittig, B.M., and Sabat, R. (2007). IL-22 Induces Lipopolysaccharide-Binding Protein in Hepatocytes: A Potential Systemic Role of IL-22 in Crohn's Disease. *J. Immunol.* *178*, 5973–5981.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 30–48.
- Wu, L.-Y., Liu, S., Liu, Y., Guo, C., Li, H., Li, W., Jin, X., Zhang, K., Zhao, P., Wei, L., et al. (2015). Up-regulation of interleukin-22 mediates liver fibrosis via activating hepatic stellate cells in patients with hepatitis C. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *158*, 77–87.
- Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., and Gurney, A.L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J. Biol. Chem.* *275*, 31335–31339.
- Xu, T., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2005). Structure of insect-cell-derived IL-22. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *61*, 942–950.
- Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., et al. (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9511–9516.
- Yamamoto, T., and Keighley, M.R. (2000). Smoking and disease recurrence after operation for Crohn's disease. *Br. J. Surg.* *87*, 398–404.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., et al. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature* *430*, 218–222.
- Yanai, H., Lichtenstein, L., Assa, A., Mazor, Y., Weiss, B., Levine, A., Ron, Y., Kopylov, U., Bujanover, Y., Rosenbach, Y., et al. (2015). Levels of drug and antidrug antibodies are associated with outcome of interventions after loss of response to infliximab or adalimumab. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *13*, 522-530.e2.
- Yang, H., McElree, C., Roth, M.P., Shanahan, F., Targan, S.R., and Rotter, J.I. (1993). Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* *34*, 517–524.
- Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.-H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., et al. (2008). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* *205*, 1063–1075.

- Yilmaz, B., Juillerat, P., Øyås, O., Ramon, C., Bravo, F.D., Franc, Y., Fournier, N., Michetti, P., Mueller, C., Geuking, M., et al. (2019). Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nat. Med.* *25*, 323–336.
- Yue, F.Y., Merchant, A., Kovacs, C.M., Loutfy, M., Persad, D., and Ostrowski, M.A. (2008). Virus-specific interleukin-17-producing CD4+ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* *82*, 6767–6771.
- Zeisel, M.B., Dhawan, P., and Baumert, T.F. (2019). Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut* *68*, 547–561.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* *29*, 947–957.
- Zha, J.-M., Li, H.-S., Lin, Q., Kuo, W.-T., Jiang, Z.-H., Tsai, P.-Y., Ding, N., Wu, J., Xu, S.-F., Wang, Y.-T., et al. (2019). Interleukin 22 Expands Transit-Amplifying Cells While Depleting Lgr5+ Stem Cells via Inhibition of Wnt and Notch Signaling. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *7*, 255–274.
- Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P., and Kolls, J.K. (2006). Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 382–388.
- Zhao, D., Kim, Y.-H., Jeong, S., Greenson, J.K., Chaudhry, M.S., Hoepting, M., Anderson, E.R., van den Brink, M.R., Peled, J.U., Gomes, A.L., et al. (2018). Survival signal REG3 $\alpha$  prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *128*, 4970–4979.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008a). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008b). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.
- Zhou, G., Yu, L., Fang, L., Yang, W., Yu, T., Miao, Y., Chen, M., Wu, K., Chen, F., Cong, Y., et al. (2018a). CD177+ neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* *67*, 1052–1063.
- Zhou, H., Xie, G., Mao, Y., Zhou, K., Ren, R., Zhao, Q., Wang, H., and Yin, S. (2018b). Enhanced Regeneration and Hepatoprotective Effects of Interleukin 22 Fusion Protein on a Predamaged Liver Undergoing Partial Hepatectomy. *J. Immunol. Res.* *2018*, 5241526.
- Ziesché, E., Bachmann, M., Kleinert, H., Pfeilschifter, J., and Mühl, H. (2007). The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 16006–16015.
- Zindl, C.L., Lai, J.-F., Lee, Y.K., Maynard, C.L., Harbour, S.N., Ouyang, W., Chaplin, D.D., and Weaver, C.T. (2013). IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and

restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12768–12773.

Zundler, S., Becker, E., Schulze, L.L., and Neurath, M.F. (2019). Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut* *68*, 1688–1700.

Zwarycz, B., Gracz, A.D., Rivera, K.R., Williamson, I.A., Samsa, L.A., Starmer, J., Daniele, M.A., Salter-Cid, L., Zhao, Q., and Magness, S.T. (2019). IL22 Inhibits Epithelial Stem Cell Expansion in an Ileal Organoid Model. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *7*, 1–17.

**Titre :** Sources cellulaires et impact de l'interleukine 22 *binding protein* (IL-22BP) sur la réponse moléculaire induite par les interleukines 22 et 17 au cours de la maladie de Crohn

**Mots clés :** Interleukine-22 *binding protein*, interleukines 22 et 17, barrières épithéliales, muqueuse intestinale, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, maladie de Crohn

**Résumé :** Les interleukines IL-22 (IL-22) et IL-17 (IL-17) exercent des actions bénéfiques sur les cellules épithéliales intestinales (CEI) en renforçant les propriétés de barrière de la muqueuse intestinale *via* l'induction de peptides antimicrobiens ou encore l'induction de processus de réparation. Dans un objectif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), nous avons voulu évaluer au cours de ce projet, l'intérêt d'un renforcement de leurs actions.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'inhibiteur soluble et spécifique de l'IL-22 : l'interleukine-22 *binding protein* (IL-22BP). De nombreux travaux ont clairement admis sa capacité à bloquer les actions de l'IL-22 *in vivo* et *in vitro*, tandis que d'autres ont identifié les cellules dendritiques et les éosinophiles

comme ces principales sources de production dans l'intestin. Au niveau des muqueuses inflammatoires de patients MICI, l'IL-22BP est augmenté, suggérant qu'il pourrait inhiber les actions induites par l'IL-22.

Ce travail présente donc pour objectifs principaux d'évaluer au cours de la maladie de Crohn (MC) l'impact de l'IL-22BP sur la réponse moléculaire induite par l'IL-22 et IL-17, préalablement caractérisée à partir de données de transcriptomique issues de la stimulation *ex-vivo* de biopsies intestinales saines. Dans un objectif secondaire, et au vue des récentes données de la littérature, nous avons caractérisé les sources cellulaires d'IL-22BP au cours de la MC. Ainsi une meilleure compréhension de l'IL-22BP permettra de mieux appréhender l'intérêt d'une modulation de l'interaction IL-22/IL-22BP au cours de la MC.

**Title :** Cellular sources and impact of interleukin 22 binding protein (IL-22BP) on the molecular response induced by interleukins 22 and 17 during Crohn's disease.

**Keywords :** Interleukin-22 binding protein, interleukin-22, interleukin-17, epithelial barriers, intestine mucosa, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease

**Abstract :** The interleukins IL-22 (IL-22) and IL-17 (IL-17) exert beneficial and synergistic actions on intestinal epithelial cells (IECs) by reinforcing the barrier properties of the intestinal mucosa through the induction of antimicrobial peptides or the induction of repair processes. With the objective of developing new therapeutic strategies in the management of chronic inflammatory bowel diseases (IBD), we wanted to evaluate during this project, the interest of strengthening their actions.

We focused on the soluble and specific inhibitor of IL-22: the interleukin 22 binding protein (IL-22BP). Numerous studies have clearly recognized its ability to block the actions of IL-22 *in vivo* and *in vitro*, while others have identified dendritic cells and eosinophils as the

main sources of production in the gut. In the inflammatory mucosa of IBD patients, IL-22BP is increased, suggesting that it may inhibit IL-22-induced actions.

The main objectives of this work are therefore to evaluate the impact of IL-22BP on the molecular response induced by IL-22 and IL-17 during Crohn's disease (CD), previously characterised using transcriptomic data from *ex-vivo* stimulation of healthy intestinal biopsies. As a secondary objective, and in view of recent data in the literature, we have characterised the cellular sources of IL-22BP during CD. Thus, a better understanding of IL-22BP will allow to better apprehend the interest of a modulation of the IL-22/IL-22BP interaction during CD.