

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue par Fatou THIAM

Le 14 décembre 2011

TITRE :

**EFFETS DE DIFFERENTS ADJUVANTS DE LA FAMILLE DE LA TOXINE DU CHOLERA SUR LES
LYMPHOCYTES T CD4 DANS UN MODELE MURIN D'IMMUNISATION INTRARECTALE AVEC
DES PSEUDOPARTICULES VIRALES DE ROTAVIRUS**

Jury :

Madame le Professeur Evelyne KOHLI

Directrice de thèse

Madame le Docteur Christelle BASSET

Co-encadrante de thèse

Madame le Professeur Danièle BENSOUSSAN

Rapporteur

Madame le Professeur Sabine RIFFAULT

Rapporteur

Ecole doctorale E2S : ENVIRONNEMENT-SANTE-STIC

Unité de recherche : Laboratoire des Interactions Muqueuses-Agents Transmissibles (**LIMA**)

Je dédie cette thèse,

A mes parents

Pour leur amour, leur soutien et tous les sacrifices qu'ils ont fait pour leurs enfants. Qu'ils trouvent dans ce travail une récompense des espoirs qu'ils ont su mettre en moi.

A mes Sœurs

Oumy, Amar, Mberry, Diarra et Moumy. Vous me manquez énormément

A tous mes amis

Sant Yalla, Yonentibi ak Cheikhoul Khadim

REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire des Interactions Muqueuses-Agents Transmissibles (LIMA) dirigé par le Professeur **Alain BONNIN**. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de faire ma thèse dans le laboratoire LIMA.*

*Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur **Danièle BENSOUSSAN**, PU-PH dans l'unité de Thérapie Cellulaire et Tissus au CHU de Nancy et à Madame le Professeur **Sabine RIFFAULT** de l'unité de Virologie et Immunologie Moléculaire à l'INRA Jouy-en-josas, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci pour votre disponibilité et le temps que vous m'accordez.*

*Mes plus sincères remerciements vont à ma directrice de thèse, le Professeur **Evelyne KOHLI**, qui m'a guidée depuis mon stage de Master 2. Tout au long de ces quatre années, vous avez su me faire partager votre enthousiasme, rigueur, bienveillance et surtout votre passion pour la recherche. Je vous remercie aussi pour votre confiance, votre disponibilité et votre écoute compréhensive. J'ai énormément appris à vos côtés. Egalement, merci pour l'effort et l'acharnement que vous avez eu pendant la rédaction de cette thèse, vous n'avez pas ménagé vos efforts. Vous allez me manquer.*

*Un grand merci à ma co-encadrante de thèse, amie et complice, le Docteur **Christelle BASSET**. Durant ces quatre années tu m'as énormément appris, les mots me manquent pour te témoigner toute ma reconnaissance. Merci pour ton soutien permanent, pour ta gentillesse et ta disponibilité, tu vas beaucoup me manquer.*

*Je tiens aussi à remercier **Sébastien SOLANAS**. Tu m'as beaucoup aidé au niveau des manip mais également pour la mise en forme de cette thèse.*

*Merci à Cyrille **Di MARTINO** qui a soutenu sa thèse l'année dernière et à Abdel Karim **ALKADAH** qui est actuellement en dernière année de thèse. Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble et pour l'aide que vous avez pu m'apporter.*

*Merci également au Docteur **Claire CACHIA**, ma statisticienne préférée. Tu m'as consacré énormément de ton temps, sans toi ce travail n'aurait pas pu se faire.*

*Je tiens également à remercier **Arlette HAMMANN** et **Annabelle SEQUEIRA-LE GRAND** du plateau Technique de cytométrie, Inserm U866, IFR Santé-STIC. Merci pour votre disponibilité, votre aide et vos conseils avisés.*

*Merci également au personnel de L'UFR Pharmacie : **Carine, Ghislaine, Evelyne, Elisabeth**, merci pour nos moments de rigolade et pour vos encouragements, cela m'a beaucoup touché.*

*Enfin je voudrais remercier tout le personnel du **laboratoire des Interactions muqueuses-Agents Transmissibles (LIMA)** et un encouragement pour les thésards qui vont bientôt soutenir leur thèse.*

*Je voudrais tout particulièrement remercier tous les membres de mon **Dahira**. Etre loin de son pays n'est pas facile mais grâce à vous le manque a été plus supportable. Diadieuf.*

*Merci à **Awa** ma moitié comme tu dis. Tu es plus qu'une amie tu es une sœur. Mes années passées à Dijon ont été moins longues à tes côtés. Je te souhaite le meilleur dans la vie. Merci également à **Baye Saliou** et à tous mes amis.*

*Un grand merci à ma cousine **Nabou**, son mari et sa petite princesse Nafissa, merci pour les moments passés en famille, ça m'a énormément fait du bien.*

*Une pensée toute particulière à ma Sœur **Oumy**, depuis que tu es arrivée le manque de la famille est moins importante. Je te souhaite le meilleur dans la vie, tu es une battante. J'espère qu'en étudiant les droits de l'Homme tu pourras apporter une pierre à l'édifice et aider ton prochain dans ce monde si injuste. Je suis fière de toi.*

Enfin je remercie les deux personnes qui ont fait de moi ce que je suis : papa et maman. Tous les mots ne suffiront pas pour vous témoigner ma reconnaissance. Vous vous êtes sacrifiés pour moi, m'amener étudier en France n'a pas été facile pour vous mais vous n'avez pas hésité une seconde. Ces longues années passées loin de vous n'ont pas été faciles mais j'espère que vous êtes fiers de moi. Le seul regret que j'ai c'est de ne pas vous avoir à côté de moi le jour J. Je vous aime.

RESUME

La vaccination muqueuse est un moyen efficace de lutter contre les pathogènes qui utilisent les muqueuses comme porte d'entrée. Cependant, la vaccination muqueuse avec des antigènes non réplicatifs nécessite l'utilisation d'adjuvants.

Les molécules de la famille de la toxine du choléra, l'entérotoxine thermolabile d' *E.coli* (LT), la toxine du choléra (CT) ainsi que le mutant LT-R192G et les sous-unités B non toxiques de ces toxines (LTB et CTB) ont été montrées augmenter les réponses immunitaires contre des antigènes coadministrés par voie muqueuse. Cependant leur mécanisme d'action est complexe et reste encore mal connu et des différences entre molécules entières et sous-unités B ont été rapportées ainsi que, pour une même molécule, des différences selon le modèle utilisé.

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de ces cinq molécules sur les réponses anticorps ainsi que sur les lymphocytes T CD4 dans un modèle murin d'immunisation intrarectale avec des pseudoparticules virales de rotavirus (VLP-2/6).

Chez les souris non immunisées, nous avons montré que ces molécules, à l'exception de la CTB, diminuent *in vitro* les lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25+Foxp3+, probablement par un mécanisme d'apoptose.

Chez les souris immunisées, toutes les molécules étudiées induisent une même réponse anticorps sérique et fécale spécifique des VLP-2/6, qu'il s'agisse des molécules entières connues pour leur fort pouvoir adjuvant ou des sous-unités B qui, elles, ont été rapportées avoir un plus faible effet adjuvant voire un effet tolérogène dans certaines études.

Concernant la réponse T CD4, les réponses spécifiques de l'antigène et de l'adjuvant ont été analysées. Des différences importantes ont été mises en évidence entre ces molécules. Notamment, seules les molécules entières (LT, LT-R192G et CT) induisent la production d'IL-2 et l'activation de lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- mémoires spécifiques de l'antigène tout en permettant la mise en place d'une régulation médiée par des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ (boucle d'auto-régulation), qui pourraient jouer un rôle majeur lors d'une réponse secondaire, afin d'éviter les réactions inflammatoires délétères.

Malgré ces différences, toutes les molécules étudiées induisent la production d'IL-17, suggérant le rôle majeur de cette cytokine dans l'effet adjuvant.

L'influence de la voie d'administration sur ces effets est en cours d'étude grâce à la comparaison avec la voie intranasale.

Mots clés: vaccination muqueuse, adjuvant, entérotoxine thermolabile d'*E. coli*, toxine du choléra, LT-R192G, sous-unité B, lymphocyte T CD4, lymphocyte T régulateur, Foxp3, IL-2

ABSTRACT

Mucosal immunization is an important goal of vaccine development to protect against pathogens that use mucosa as portals of entry. However, the use of non-replicating antigens requires the addition of adjuvants.

Cholera-like enterotoxins, cholera toxin (CT) from *Vibrio cholerae* and the heat-labile enterotoxin (LT) from toxinogenic strains of *E. coli*, as well as the mutant LR-192G and their B subunits (CTB and LTB) have been shown to increase immune responses against unrelated co-administered antigens by mucosal routes. However, their mechanism of action is very complex and not completely understood and differences exist between holotoxins and B subunits and within molecules, differences exist between the models used.

In this work, we have studied the effects of these five molecules on antibody responses and on CD4⁺ T cell responses in a murine model of intrarectal immunization using rotavirus-like particles (2/6-VLP).

In non immunized mice, we have shown that all molecules, except CTB, decreased CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ natural regulatory T cells, probably by induction of apoptosis.

In immunized mice, all molecules induced similar VLP-2/6 specific systemic and fecal antibody responses, teither he holotoxins, which are well known for their strong adjuvanticity or their B subunits with a less strong adjuvanticity but with also a tolerogenic effect in some studies.

Regarding the CD4⁺ T cell response, antigen- and adjuvant- specific responses have been analysed. Important differences have been highlighted between the molecules. Among others things, only whole toxins (LT, LT-R192G and CT) trigger IL-2 production and activation of antigen specific memory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T cells and at the same time antigen specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are activated which may control the effector response (Feedback loop regulation) and avoid deleterious inflammation.

In spite of these differences, all studied molecules triggered IL-17 production, suggesting the major role of this cytokine in adjuvanticity.

We are currently comparing the intrarectal and intranasal routes in order to evaluate the role played by the route of immunisation in different effects of these molecules

Key words: mucosal immunization, adjuvant, *E. coli* heat-labile enterotoxin, cholera toxin, LT-R192G, B subunit, CD4 T lymphocyte, regulatory T cell, Foxp3, IL-2

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	p11
LISTE DES TABLEAUX	p12
LISTE DES ABREVIATIONS	p13
INTRODUCTION GENERALE	p15
Première Partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	p19
CHAPITRE I : IMMUNITE MUQUEUSE INTESTINALE	p20
I. les Sites inducteurs et effecteurs de la muqueuse intestinale	p21
I.1. Sites inducteurs de l'immunité intestinale	p22
I.1.1 les Plaques de Peyer	p22
I.1.2 les ganglions mésentériques	p23
I.1.3. les follicules rectaux	p23
I.1.4 Les ganglions lombaires	p23
I.2. La lamina propria : le site effecteur de la muqueuse intestinale	p23
II. Immunité muqueuse intestinale	p24
II.1. Voie d'entrée des antigènes	p24
II.2. Les cellules présentatrices d'antigènes	p25
II.2.1. Les cellules dendritiques	p25
II.2.2. les lymphocytes B	p25
II.3. Réponses immunitaires effectrices	p27
II.3.1. Réponses humorale : IgA sécrétoires	p27
II.3.2. Réponses immunitaires cellulaires T	p29
<i>II.3.2.1. Les lymphocytes T non conventionnels</i>	<i>p29</i>
<i>II.3.2.2. Les lymphocytes T CD8</i>	<i>p30</i>
<i>II.3.2.3. Les lymphocytes T CD4</i>	<i>p31</i>
CHAPITRE II : LA REPONSE T CD4	p32
I. caractéristiques des lymphocytes Th1, Th2 et Th17	p33
I.1. Les lymphocytes Th1	p33
I.2 Les Lymphocytes Th2	p34

I.3. Les lymphocytes Th17	p34
II. Les facteurs influençant la différenciation des lymphocytes T CD4	p36
II.1. La différenciation Th1	p36
II.2. La différenciation Th2	p37
II.3. La différenciation Th17	p39
III. Interconnexion des différentes orientations et notion d'équilibre	p40
CHAPITRE III : TOLERANCE MUQUEUSE ET LYMPHOCYTES T REGULATEURS	p42
I. Tolérance muqueuse	p43
I.1. L'ignorance	p43
I.2. L'anergie	p43
I.3. La mort cellulaire induite par l'activation	p43
I.4. La régulation immunitaire	p44
II. les lymphocytes T régulateurs	p44
II.1. Naissance du concept de lymphocytes régulateurs	p44
II.2. De la découverte à la caractérisation	p47
II.2.1 la recherche du marqueur des ntregs CD4+	p47
II.2.2. Origine et développement des nTregs CD4+CD25+	p49
II.2.3. Rôle clé de Foxp3	p52
II.2.4. l'IL-2 : Rôle essentiel dans le maintien des Tregs Foxp3+	p53
II.2.5 les nTregs CD8+CD25+	p55
II.3. Les lymphocytes T régulateurs induits	p55
II.3.1 Les iTregs CD4+CD25+Foxp3+	p56
II.3.2 Les Tregs Tr1	p59
II.3.3. Les Tregs Th3	p59
II.3.4. Les iTregs CD8+	p59
II.4. Importance de la balance Treg/Th17	p59
II.5 Activité suppressive et mécanismes d'action des nTregs	p61
II.5.1. Mécanisme de suppression par contact direct : cytolyse	p63
II.5.2. Mécanisme de suppression par production de cytokines	p63
II.5.3. Privation de cytokines de survie	p65

II.5.4. Suppression via les APC	p65
II.5.4.1 CTLA-4	p66
II.5.4.2. LAG-3	p66
II.6. Les fonctions physiologiques	p67
II.6.1. Généralités	p67
II.6.2. Modulation des fonctions anti-infectieuses	p67
II.6.3. Tregs et Vaccination	p68
CHAPITRE IV : LES ADJUVANTS D'IMMUNISATION MUQUEUSE	p70
I. Avantage de la vaccination par voie muqueuse	p71
II. Les adjuvants de la famille de la toxine du choléra	p73
II.1. Les toxines entières : structures, effet toxique	p74
II.1.1. Structure de la toxine du choléra	p74
II.1.2 Structure de la LT	p75
II.1.3. Les gangliosides	p75
II.1.4. Effets toxiques	p76
II.2. Les dérivés non toxiques de la LT et de la CT	p78
II.2.1. Les mutants non toxiques	p78
II.2.2. Les sous-unités B	p79
III. Effets immunomodulateurs	p80
III.1. Effet adjuvant	p80
III.1.1. Effet sur les cellules épithéliales	p81
III.1.2. Effet sur les APC	p81
III.1.2.1. CD	p82
III.1.2.2. Lymphocytes B	p83
III.1.2.3. Monocytes/Macrophages	p84
III.1.3. Effet sur l'orientation des T CD4	p84
III.1.3.1. orientation Th2 et Th2	p84
III.1.3.2. Orientation Th17	p85
III.1.3.3. Orientation phénotype Treg	p86
III.2. Effet Toléroène	p86

REVUE : Cholera-like Enterotoxins and Regulatory T cells	p87
<i>Deuxième Partie : TRAVAIL EXPERIMENTAL</i>	p110
Article 1: Unexpected Modulation of Recall B and T Cell Responses after Immunization with Rotavirus-like Particles in the presence of LT-R192G	p111
I. Introduction de l'article 1	p112
Article	p117
II. Discussion	p138
Article 2: Cholera toxin (CT), thermolabile enterotoxin of <i>E. coli</i> (LT), its B subunit (LTB) and LT-R192G, but not the B subunit of CT (CTB), induce the decrease of resting CD4+CD25+Foxp3+ T cells <i>in vitro</i>	p142
I. Introduction de l'article 1	p143
Article	p149
III. Discussion	p172
Article 3: <i>Escherichia coli</i> enterotoxin mutant (LT-R192G), Cholera toxin and its B subunit (CTB) promote similar systemic and fecal antibody titers as well as Th17 response to rotavirus 2/6-VLP but different CD4+CD25+Foxp3- and Foxp3+ T cell responses	p174
I. Introduction de l'article 1	p175
Article	p177
II. Discussion	p198
III. Résultats complémentaires	p201
DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES	p207
CONCLUSION	p213
BIBLIOGRAPHIE	p216

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Induction des réponses immunitaires au niveau du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (GALT).</i>	p22
Figure 2 : <i>Capture de l'antigène au niveau de la muqueuse intestinale</i>	p24
Figure 3 : <i>Génération de la réponse B</i>	p27
Figure 4 : <i>Structure d'une IgA sécrétoire humaine</i>	p29
Figure 5 : <i>Différentes orientations de la réponse immune T CD4</i>	p35
Figure 6 : <i>Facteurs impliqués dans la différenciation Th1</i>	p37
Figure 7 : <i>Facteurs impliqués dans la différenciation Th2</i>	p38
Figure 8 : <i>Facteurs impliqués dans la différenciation Th17</i>	p40
Figure 9 : <i>Les mécanismes de la tolérance périphérique</i>	p44
Figure 10 : <i>Les lymphocytes T régulateurs</i>	p46
Figure 11 : <i>Les différents marqueurs des nTreg et leur découverte</i>	p48
Figure 12 : <i>Voies de signalisation en aval du TCR</i>	p53
Figure 13 : <i>Rôle clé de l'IL-2 dans l'homéostasie immunitaire</i>	p54
Figure 14 : <i>Induction de lymphocytes T régulateurs durant une infection</i>	p58
Figure 15: <i>La différenciation des Th17 et la dichotomie Treg/Th17</i>	p61
Figure 16 : <i>les différents mécanismes de suppression</i>	p62
Figure 17 : <i>Rôle bénéfique ou délétère des Treg dans les processus physiopathologiques</i>	p67
Figure 18 : <i>Modèle de homing des lymphocytes depuis les sites inducteurs du système immunitaire vers les tissus cibles</i>	p72
Figure 19 : <i>Famille des toxines à structure AB₅</i>	p73
Figure 20 : <i>Structures cristallines de la CT, de la LT-I et de la LT-IIb</i>	p75
Figure 21 : <i>Structure du récepteur de type ganglioside GM1</i>	p76

Figure 22 : Séquence des événements intracellulaires lors de l'invasion des cellules par l'entérotoxine thermolabile d'E. coli	p77
Figure 23 : Exemples de mutants non toxiques de la toxine du choléra et de l'entérotoxine thermolabile d'E. coli	p79
Figure 24 : Estimation de la distribution des décès dus au rotavirus (RV) en 2004 chez les enfants de moins de cinq ans	p113
Figure 25 : Particules de rotavirus observées au microscope électronique	p115
Figure 26 : Etude de la réponse anticorps chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 et la LTBl _a LT-R192G et la CT	p201
Figure 27 : Etude de la réponse T mémoire auxiliaire CD4+CD25+Foxp3 ⁻ et régulatrice CD4+CD25+Foxp3 ⁺ spécifique de l'antigène et de la LTB , après immunisation de souris par voie intrarectale avec les VLP-2/6 et la LTB	p203
Figure 28 : Etude de la réponse T mémoire CD4+CD25+Foxp3 ⁻ et CD4+CD25+Foxp3 ⁺ spécifique de l'antigène et de l'adjuvant, après immunisation de souris par voie intrarectale avec des VLP-2/6 et la LT	205

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structure et activité enzymatique de la toxine du choléra (CT) et de l'entérotoxine thermolabile d'E. coli (LT)	p74
Tableau 2 : Effets de la CT sur les cellules dendritiques : expression de cytokines, chimiokines et molécules de costimulation	p83
Tableau 3 : Etude de l'effet de la toxine du choléra (CT) et de sa sous-unité B (CTB) sur les lymphocytes T	p146
Tableau 4 : Etude de l'effet de l'entérotoxine thermolabile d'E. coli (LT) et de sa sous-unité B (LTB) sur les lymphocytes T	p147-148
Tableau 5 : Récapitulatif des différentes molécules étudiées et leurs effets sur la mort cellulaire des lymphocytes T	p211

LISTE DES ABBREVIATIONS

7AAD	7-AminoActinomycin D	FAE	Epithelium Associé aux Follicules
AC	adénylate cyclase	FR	follicules rectaux
Ag	antigène	FR4	Folate Receptor 4, marqueur de surface, sous-type de récepteur à l'acide folique
AICD	<i>activation-induced cell death</i>	Foxp3	Forkhead box p3
ARNm	acide ribonucléique messenger	GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
ATRA	all-trans retinoic acid	GITR	Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related gene
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue	GL	ganglions lombaires
BCR	récepteur à l'antigène du lymphocyte B	GM	ganglions mésentériques
Bregs	lymphocytes T régulateurs	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
CCR	chemokine (C-C motif) receptor	HEV	haute paroi endothéliale
CD	classe de différenciation	ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité	IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
CPA	cellules présentatrices d'antigènes	IEL	lymphocytes intraépithéliaux
CT	toxine du choléra	IFN	interféron
CTB	sous-unités B de la CT	Ig	immunoglobuline
CTL	lymphocytes T cytotoxiques	IL	interleukine
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen -4	IPEX	syndrome of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
DC	cellules dendritiques	Jak	Janus kinases
EAE	encéphalomyélite autoimmune expérimentale	LGALS1	galectine-1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	LP	lamina propria

LT	entérotoxine thermolabile d' <i>Escherichia coli</i>	RORγt	retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- γ t), facteur de transcription impliqué dans la différenciation des Th17
LTB	sous-unités B de la LT		
LT-R192G	mutant non toxique de la LT	SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
MAIT	Mucosal Associated Invariant T cells	SED	dôme sous-épithélial
MALT	Mucosal-Associated Lymphoid Tissue	S-IgA	immunoglobulines sécrétoires de type IgA
MBP	myelin basic protein	TCR	récepteur à l'antigène du lymphocyte T
MICI	<i>Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin</i>	T1D	diabète de type 1
MLA	monophosphoryl lipide A, dérivé du lipopolysaccharide	TGF-β	Transforming growth factor
NALT	Nasal-Associated Lymphoid Tissue	Th	lymphocytes T helper
NFAT cells	nuclear factor of activated T cells	TLR	toll like receptor
NKT	cellules Natural Killer T	TNBS	trinitrobenzene sulfonic
NO	Nitrate oxydase	TNF	tumor necrosis factor acid
ODN	oligodéoxynucléotides synthétiques	TRAIL-DR5	tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5
pIgR	récepteur des immunoglobulines polymériques	Tregs	lymphocytes T régulateurs
PKC	protein kinase C	nTregs	Tregs naturels
PLCγ	phospholipase C γ	iTregs	Tregs induits
PN	polynucléaires	VLP	pseudo-particules virales de rotavirus
PP	Plaques de Peyer	VLP-2/6	VLP comprenant les protéines VP2 et VP6 du rotavirus
RE	réticulum endoplasmique		

INTRODUCTION GENERALE

Les muqueuses constituent la principale voie d'entrée des pathogènes dans l'organisme. Elles représentent de ce fait un site privilégié de stimulation des défenses anti-infectieuses et donc de vaccination. **La muqueuse intestinale** est l'une des interfaces principales entre l'organisme et le milieu extérieur. Elle est exposée de façon chronique à des stimuli antigéniques d'origine alimentaire, environnementale ou provenant de la microflore bactérienne intestinale résidente. Le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale a des propriétés particulières qui le distinguent du système immunitaire général. Il doit en particulier permettre le maintien de l'homéostasie intestinale, un équilibre entre réponses immunes pro-inflammatoires contre les micro-organismes pathogènes et capacité de « tolérer » les bactéries commensales et les antigènes alimentaires ou inoffensifs.

La défense contre les agents pathogènes fait appel à la fois à l'immunité cellulaire et humorale, cette dernière étant caractérisée par les immunoglobulines sécrétées de type IgA (S-IgA), anticorps prédominants au niveau muqueux.

La **tolérance immunologique** au niveau des muqueuses est assurée par plusieurs mécanismes immunologiques dont l'induction de **lymphocytes T régulateurs** (Tregs) ou suppresseurs qui peuvent réguler négativement les réponses immunes spécifiques *via* différents mécanismes. Les Tregs ont été découverts par Sakaguchi en 1995, ils permettent le maintien de l'homéostasie immunitaire et la tolérance au soi. Il existe des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ et CD8⁺ et parmi les lymphocytes CD4, on distingue deux populations principales, les Tregs naturels (nTregs) produits dans le thymus et les Tregs induits (iTregs) produits en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs, suite à l'activation par l'antigène.

Les antigènes non réplicatifs sont en principe peu immunogènes par voie muqueuse et de ce fait, la vaccination muqueuse avec des antigènes non réplicatifs nécessite l'utilisation d'adjuvants. La **toxine du choléra (CT)** de *Vibrio cholerae* et l'**entérotoxine thermolabile d'Escherichia coli (LT)** sont capables d'induire une réponse immunitaire après administration orale. En plus d'être très immunogènes, ces toxines sont des adjuvants parmi les plus puissants, à la fois par voie parentérale et muqueuse. Elles présentent une forte parenté structurale avec environ 80% d'homologie de séquence. Elles sont formées de deux sous-unités A et B responsables respectivement de l'activité enzymatique (toxicité : diarrhée) et de l'attachement aux cellules *via* des récepteurs de la famille des gangliosides (GM1 principalement). A cause de leur toxicité, ces molécules ne peuvent donc pas être utilisées chez l'homme. Des mutants non toxiques ont été générés afin d'inhiber leur toxicité tout en préservant leur effet adjuvant, comme la LT-R192G, un mutant non toxique de la LT.

Les sous-unités B, non toxiques, CTB et LTB, conservent aussi des propriétés adjuvantes. Cependant, ces sous-unités et notamment la CTB, ont été montrées avoir un effet adjuvant moindre et même dans certains cas induire une tolérance vis-à-vis d'antigènes co-administrés ou conjugués dans différents modèles animaux.

Ces molécules ont fait l'objet de nombreuses études, cependant leur mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules et leurs effets sur les réponses immunitaires au niveau des muqueuses, l'équipe a mis en place un modèle murin d'immunisation muqueuse avec des pseudo-particules virales de rotavirus (VLP) en présence ou en l'absence d'adjuvant. Des études précédentes ont permis de montrer que lors d'une première immunisation chez la souris par voie intranasale ou intrarectale avec des VLP-2/6 (VLP-2/6 comprenant les protéines VP2 et VP6 du rotavirus) en présence de la LT-R192G, une expansion massive de lymphocyte B spécifiques était observée dans différents tissus lymphoïdes en fonction de la voie d'immunisation. La majorité des lymphocytes B induits exprimaient le marqueur CD5, marqueur des lymphocytes B-1a potentiellement auto-réactifs. De façon inattendue et malgré une réponse anticorps secondaire forte, l'expansion massive observée lors de la première immunisation n'était pas retrouvée lors du rappel. A l'opposé, en immunisant des souris avec des VLP-2/6 seules en l'absence d'adjuvant, une réponse anticorps très faible était observée, associée à une expansion des lymphocytes B très hétérogène et sans diminution lors du rappel. De plus, après immunisation intranasale un profil de cytokines incomplet comportant de l'IFN γ et de l'IL-10 sans IL-2 ni IL-4 était observé et la présence de LT ou de CT lors de l'immunisation permettait de compléter ce profil.

Ces observations laissaient supposer 1) une anergie ou une régulation négative des réponses immunitaires lors de la primo-immunisation avec les VLP seules 2) une régulation négative lors du rappel en présence de l'adjuvant. La LT-R192G pourrait être impliquée en agissant sur les lymphocytes T régulateurs et ainsi réguler les réponses immunitaires au niveau des muqueuses au cours de la vaccination avec les VLP-2/6.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier l'éventuel effet des VLP seules sur les lymphocytes T régulateurs ainsi que celui de la LT-R192G dans notre modèle murin d'immunisation muqueuse avec des pseudoparticules virales de rotavirus, après une seule

immunisation par voie intrarectale. Nous avons analysé les cellules T CD4+CD25+Foxp3+ et Foxp3- de différents organes lymphoïdes après restimulation *in vitro* avec l'antigène seul, l'adjuvant seul ou les deux. Les cellules T CD4+CD25+, Foxp3+ et Foxp3-, ont été quantifiées par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs CD4, CD25 et Foxp3, après 2 et 4 jours de culture et l'IL-2 a été dosée dans les surnageants par une technique ELISA.

Au cours de cette étude, nous avons observé une diminution des cellules T CD4+CD25+Foxp3+ après un premier contact *in vitro* avec la LT-R192G. Certaines études ont montré que les adjuvants de la famille de la toxine du cholera (LT et CT) ainsi que leur sous-unités B peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Le second objectif a été de vérifier que, comme la LT-R192G, la LT, la CT et leurs sous-unités B, LTB et CTB, induisaient également la diminution des cellules T CD4+CD25+Foxp3+ après contact *in vitro*. Puis nous avons voulu montrer que cette diminution était due à un phénomène d'apoptose. Pour cela, les cellules de ganglions mésentériques de souris non immunisées ont été cultivées en présence de ces différentes molécules, puis l'apoptose a été analysée par un marquage Annexin-V/7AAD.

Enfin le troisième objectif de notre travail a été de comparer l'effet adjuvant de la LT-R192G observé dans notre modèle avec celui de la CT. Nous avons également comparé l'effet des toxines entières à celui des sous-unités B non toxiques, CTB et LTB. En effet, ces molécules ont été rapportées avoir des effets très différents sur les réponses immunitaires même si elles sont très proches structurellement. Cette étude a été réalisée en comparant leur effet sur les cellules CD4+CD25+Foxp3+ et Foxp3- provenant de ganglions mésentériques de souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence d'adjuvant, LT-R192G, LT, CT, CTB ou LTB puis restimulation *in vitro* avec l'antigène, l'adjuvant ou les deux. Le profil T CD4 a été complété grâce au dosage de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-17.

Après une étude bibliographique portant sur l'immunité intestinale et l'orientation phénotypique des lymphocytes T CD4 lors des réponses immunitaires ainsi que sur les adjuvants de la famille de la toxine du choléra, j'aborderai successivement la contribution de notre travail à la connaissance des mécanismes d'action de ces adjuvants.

Première partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
IMMUNITE MUQUEUSE INTESTINALE

Les muqueuses sont en contact direct avec le milieu extérieur et de ce fait, elles sont en première ligne de défense contre un grand nombre de pathogènes et d'antigènes (bactéries, virus, parasites, ect...). Elles doivent également tolérer les agents microbiens non pathogènes (flore bactérienne commensale) et les substances inoffensives de l'environnement (antigènes alimentaires, par exemple). L'ensemble des muqueuses de l'organisme représente une surface d'échange de plus de 400 m² chez l'homme adulte, dont 250 m² associés au tube digestif [1]. Les muqueuses sont composées d'une couche de cellules épithéliales qui forment une barrière (épithélium) et d'une couche de tissu conjonctif (chorion). Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT « Mucosal-Associated Lymphoid Tissue » constitue un organe à part entière. Il comporte à la fois des infiltrats lymphocytaires diffus et des agrégats volumineux mais non encapsulés [2]. Ces structures ont des caractéristiques communes et représentent les sites d'activation des lymphocytes ou sites inducteurs à partir desquels se fait la migration vers les sites effecteurs. Le MALT est réparti dans les différentes muqueuses, au niveau de l'intestin il est appelé GALT (gut-associated lymphoid tissue), BALT (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) au niveau des bronches ou encore NALT (nasal-associated lymphoid tissue, NALT) au niveau des voies respiratoires supérieures.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux réponses immunes induites suite à une immunisation par voie intra-rectale, c'est pourquoi nous décrivons uniquement les sites associés au tube digestif.

I. LES SITES EFFECTEURS ET INDUCTEURS DE LA MUQUEUSE INTESTINALE

Le système digestif produit 60% des immunoglobulines corporelles totales et contient la majorité des lymphocytes du corps humain, évaluée à 10⁶ lymphocytes/g de tissu[3]. Le système immunitaire intestinal comprend des structures parfaitement organisées qui constituent les principaux sites inducteurs (GALT) des réponses immunitaires intestinales (plaques de Peyer et ganglions mésentériques ainsi que les follicules rectaux et les ganglions lombaires pour la muqueuse rectale), des structures plus diffuses (follicules lymphoïdes disséminés) et des cellules immunocompétentes dispersées dans la muqueuse [4, 5]. La *lamina propria* est un site effecteur diffus contenant un grand nombre de cellules immunitaires activées et mémoires, des lymphocytes T dont une majorité de cellules T de type helper (CD4+) et des lymphocytes B et plasmocytes dont 90% synthétisent des IgA [5] (**Figure 1**). La *lamina propria* contient également des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (cellules dendritiques (CD), macrophages).

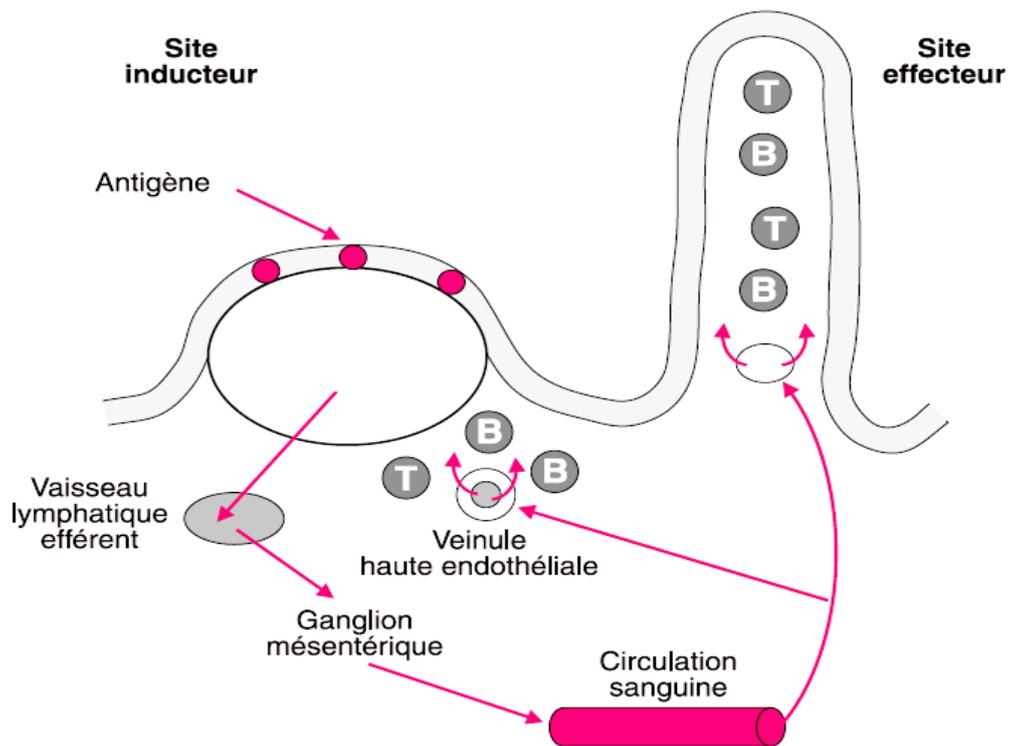


Figure 1 : Induction des réponses immunitaires au niveau du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (GALT). Les lymphocytes stimulés après contact avec l'antigène dans les sites inducteurs (exemple les plaques de Peyer) migrent via les vaisseaux lymphatiques efférents vers les ganglions locaux (exemple les ganglions mésentériques). Après maturation, ils gagnent la circulation sanguine via le canal thoracique. Ils sont alors préférentiellement domiciliés en tant que cellules effectrices ou mémoires aux sites effecteurs muqueux, lamina propria, grâce à l'expression de récepteurs spécifiques (modifié d'après [6])

I.1. Sites Inducteurs de l'immunité intestinale

I.1.1. Les plaques de Peyer

Les Plaques de Peyer (PP) sont des structures lymphoïdes secondaires de l'intestin. Elles ont été décrites par Johann Conrad Peyer, en Suisse, au cours du 17^e siècle [7]. Les PP sont des agrégats de follicules lymphoïdes répartis tout au long de l'intestin grêle, et présentent une structure semblable à celle des ganglions lymphatiques périphériques. Elles sont formées de follicules lymphoïdes composés essentiellement de lymphocytes B naïfs porteurs d'IgM, séparés par des zones interfolliculaires riches en lymphocytes T et en cellules dendritiques (CD) matures. Ce tissu lymphoïde est séparé de l'épithélium associé aux follicules (FAE, « Follicle-Associated Epithelium ») par une zone riche en cellules dendritiques appelée

dôme sous-épithélial (SED). Le FAE contient des cellules caractéristiques, les cellules M [8], chargées comme les CD, de capter puis présenter les antigènes [9]. Contrairement aux autres organes lymphoïdes, les PP sont dépourvues de canaux lymphatiques afférents, mais sont drainées vers les ganglions mésentériques par des canaux efférents.

1.1.2. Les ganglions mésentériques

Les ganglions mésentériques (GM) centralisent la réponse immunitaire intestinale. Un ganglion est irrigué par une lymphe afférente qui a drainé les PP ou la *lamina propria*. Cette lymphe afférente transporte ainsi différents types de CD (caractérisées par CD11b, CD11c et CD103 chez la souris [10], exprimant la chimiokine CCR7 [11] et initiant les réponses immunitaires. La lymphe efférente permet la mise en circulation des cellules activées (lymphocytes T et B) dans le compartiment sanguin *via* le canal thoracique. Ces cellules activées gagnent ensuite les sites effecteurs

1.1.3. Les follicules rectaux

Diverses équipes ont montré que la voie intra-rectale était une voie d'administration efficace chez la souris pour induire des réponses immunes et conférer une protection contre différents pathogènes, notamment le rotavirus [12]. La muqueuse rectale est caractérisée par la présence de structures lymphoïdes semblables aux PP, les follicules rectaux (FR). Ces structures ont été proposées comme sites inducteurs des réponses immunes chez la souris BALB/c [13]. Di Martino et al (Di martino, 2007) ont confirmé la migration des lymphocytes B spécifiques de l'antigène dans les ganglions lombaires suite à une immunisation intrarectale.

1.1.4. Les ganglions lombaires

Chez la souris, les GL sont au nombre de trois [14]. Les GL sont irrigués par une lymphe efférente qui permet la recirculation des cellules activées *via* la lymphe et la circulation générale d'où elles gagnent les sites effecteurs (*lamina propria* rectale et colique).

1.2. La lamina propria : le site effecteur de l'immunité intestinale

La lamina propria (LP) représente un compartiment lymphoïde diffus comprenant différents types cellulaires. La LP contient des lymphocytes T, majoritairement CD4+ exprimant un TCR $\alpha\beta$ et présentant un phénotype de cellules activées/mémoires (CD45RO+) et de nombreux plasmocytes à IgA. Elle comprend aussi des cellules présentatrices de

l'antigène (CPA) (cellules dendritiques et macrophages) et de nombreuses cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles). La LP comporte des cellules dendritiques (CD) [15] capables d'émettre des prolongements cytoplasmiques pour capturer des agents pathogènes présents dans la lumière intestinale [16].

II. IMMUNITE MUQUEUSE INTESTINALE

II.1. Voie d'entrée des antigènes

Au niveau des muqueuses et essentiellement des plaques de Peyer, il existe deux grands modes de capture des antigènes présents dans la lumière des muqueuses [17] :

- Endocytose des antigènes par les cellules M ou cellules à « micropuits » (**Figure 2**) de la muqueuse intestinale puis capture par les cellules dendritiques sous-jacentes [18].
- Au niveau des villosités, des cellules dendritiques émettent des pseudopodes entre les cellules épithéliales pour sonder en permanence les microorganismes qui sont dans la lumière.

Il est à noter que la prise en charge de l'antigène au niveau de la muqueuse rectale n'a pas été aussi bien documentée. Lee et al [19] ont rapporté la mobilisation de CD (CD11c CMH classe II +) dans les follicules coliques, la muqueuse colique, les ganglions ciliaques et mésentériques après immunisation intrarectale.

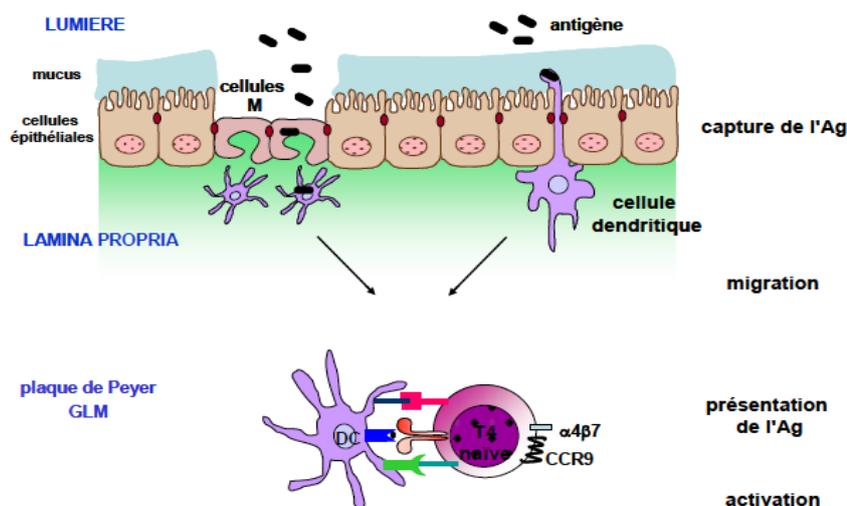


Figure 2 : Capture de l'antigène au niveau de la muqueuse intestinale

II.2. Les cellules présentatrices de l'antigène

Trois types de cellules ont une fonction de présentation des antigènes : les cellules dendritiques capables de présenter les antigènes à des cellules T naïves et les lymphocytes B et les macrophages qui eux présentent les antigènes à des cellules T préactivées [20]. Nous ne développerons ici que les CD et les lymphocytes B.

II.2.1. les cellules dendritiques

Les CD sont identifiées par le marqueur CD11c et constituent une population très hétérogène de CPA. Les fonctions des CD dépendent de leur maturation, des interactions avec les autres cellules et de l'environnement cytokinique dans lequel elles se trouvent. Elles jouent un rôle dans la polarisation des lymphocytes CD4. Selon leur maturité et leur modulation elles peuvent activer ou supprimer les réponses T auxiliaires ou encore induire l'anergie des lymphocytes T [21]. Après maturation (activation par les ligands des TLRs ou par les cytokines) elles vont migrer dans les organes lymphoïdes, les molécules du CMH de classe vont être redistribuées à la membrane et les molécules de co-stimulation activées [22]. Les CD jouent un rôle important à la fois dans l'induction de la réponse immunitaire intestinale et dans le maintien de la tolérance. Une fois l'antigène capté, Les CD vont ensuite migrer dans les zones T des sites inducteurs où elles vont interagir avec des lymphocytes naïfs. Les cellules B et T ainsi activées vont soit, se différencier localement ou rejoindre les ganglions locaux *via* les canaux lymphatiques afférents où elles vont se différencier avant de rejoindre la circulation sanguine puis la muqueuse intestinale.

II.2.2. les lymphocytes B

Les lymphocytes B naïfs circulent dans les tissus lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'ils rencontrent leur antigène spécifique. Lorsqu'ils quittent la moelle osseuse, ils gagnent les ganglions lymphatiques *via* les veinules à haute paroi endothéliale (HEV), pénétrant ainsi dans un premier temps dans les zones T (**Figure 3**). Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène puis interagissent avec les lymphocytes T CD4+ auxiliaires spécifiques. Ils vont ainsi pouvoir être activés et proliférer, certains sont responsables d'une production rapide d'IgM, ce sont les lymphocytes B extrafolliculaires. Par ailleurs, certains lymphocytes B quittent la zone T et migrent vers les follicules lymphoïdes primaires pour former ainsi un centre germinatif. A l'intérieur de ce dernier, les lymphocytes B prolifèrent et subissent de nombreux remaniements (hypermutations somatiques, commutation isotypique,

maturation d'affinité...). Certaines zones des centres germinatifs sont riches en cellules dendritiques folliculaires, permettant de présenter l'antigène aux lymphocytes B. Ceux qui n'ont pas rencontré l'antigène meurent par apoptose. Ainsi l'antigène est présenté soit par des cellules dendritiques soit par les cellules B, aux lymphocytes T CD4+ spécifiques auxiliaires qui sont alors activés, afin d'initier la réponse immunitaire effectrice.

En plus des lymphocytes B conventionnels (lymphocytes B-2), il existe des lymphocytes B non conventionnels ou innés-like (lymphocytes B-1). Les cellules B-1 sont la principale source d'anticorps naturels (IgM). A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur spécifique pour les lymphocytes B-1, cependant certains d'entre eux expriment le marqueur CD5 : les lymphocytes B-1a. En effet, les cellules B-1 peuvent être divisées en 2 sous-groupes lymphocytaires, ayant des propriétés distinctes, selon l'expression de CD5 : celles qui ne sont pas CD5+, les cellules B-1b, intervenant dans les réponses humorales, et celles qui expriment CD5, lymphocytes B innés-like, ayant un rôle dans l'immunité innée en produisant des anticorps naturels, ces anticorps pouvant être auto-réactifs. Ces lymphocytes innés-like reconnaissent les antigènes de plusieurs agents pathogènes courants, et sont donc très importants pour la réponse rapide aux infections bactériennes et virales. *In vitro*, l'expression de CD5 à la surface des lymphocytes B peut être induite par la stimulation simultanée du BCR et des molécules de surface CD40, tout comme l'IL-6 [23]. Finalement une troisième population de lymphocytes B a été décrite récemment, il s'agit des lymphocytes B régulateurs (Bregs). L'existence de Breg a été pour la première fois proposée par le groupe de Janeway dans le modèle de l'EAE (encéphalomyélite autoimmune expérimentale) [24]. Ces Bregs sont sécrétors d'IL-10 [25]. Les Breg sont impliqués dans l'homéostasie intestinale. Il a par ailleurs été démontré que les Bregs puissent jouer le rôle de CPA tolérogènes, notamment dans l'inhibition de l'allergie [26]. Les Breg, exprimant CD1d pourraient en outre promouvoir l'expansion de populations régulatrices comme les LT CD8+ $\alpha\alpha$ ou les lymphocytes NKT [27]. Enfin, la fonction sécrétoire des Breg a été mise en avant : des anticorps spécifiques de la galectine 4, qui stimulent la production d'IL-6 par les LT CD4+ colitogènes, sont sécrétés par les LB des ganglions mésentériques. [28].

Une fois l'antigène présenté aux cellules T CD4+ auxiliaires, la réponse effectrice se déroule au niveau de la muqueuse. Cette réponse peut être à médiation humorale ou à médiation cellulaire.

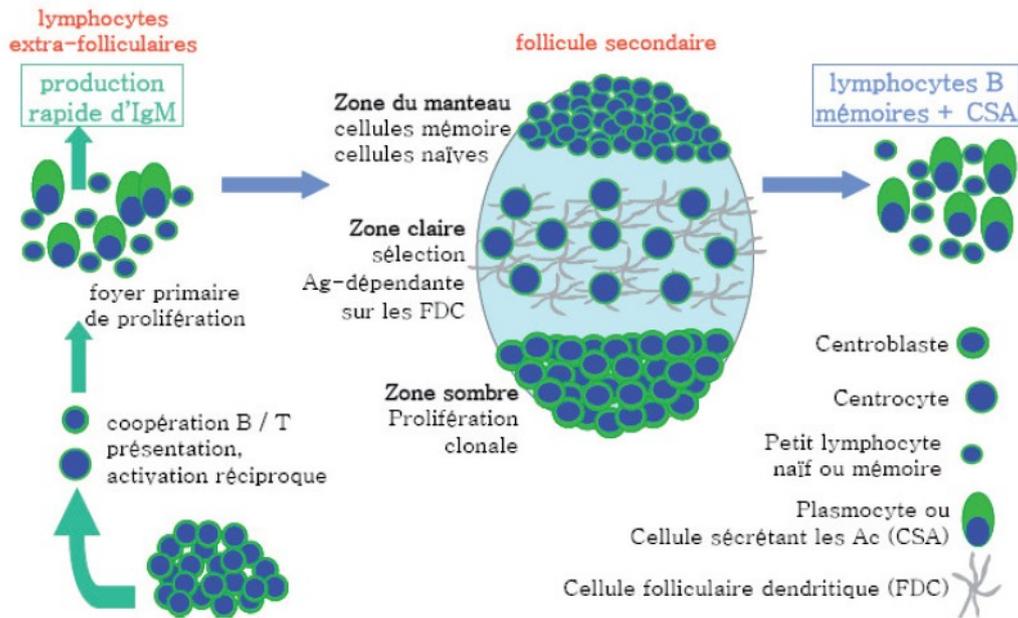


Figure 3 : Génération de la réponse B

Lymphocytes B extra-folliculaires et lymphocytes B des centres germinatifs. Un premier signal permet à certains lymphocytes B de se différencier en cellules sécrétant les IgM : Lymphocytes B extra-folliculaires. D'autres lymphocytes B seront activés par l'Ag dans le cadre d'une coopération T/B, dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires : lymphocytes B des centres germinatifs

II.3 Réponses immunitaires effectrices

II.3.1. Réponse humorale : les IgA sécrétoires, principaux anticorps des muqueuses

La défense immunitaire humorale spécifique des surfaces muqueuses est contrôlée principalement par les immunoglobulines sécrétoires de type IgA (S-IgA), anticorps prédominants (environ 90%) des sécrétions humaines [29]. Les 10 % restant étant constitués d'immunoglobulines de type IgM, IgG et IgE. La production des IgA spécifiques dirigées contre des pathogènes muqueux ou des antigènes protéiques solubles est T dépendante [30]. Il existe également une réponse IgA T indépendante [29]. Les IgA sécrétoires protègent les muqueuses notamment par exclusion immunitaire en piégeant les antigènes alimentaires et les microorganismes dans le mucus qui recouvre la barrière épithéliale [31]. Les IgA sont synthétisées par les plasmocytes notamment au niveau de la

lamina propria. Dans l'intestin grêle, les plaques de Peyer contiennent un environnement riche en diverses cytokines, telles que le TGF- β [32] qui facilite l'expansion des cellules B exprimant des IgA et leur différenciation en plasmocytes [33]. De plus, diverses équipes ont montré que d'autres populations cellulaires étaient impliquées dans la tolérance et l'homéostasie intestinale, telles que les lymphocytes T régulateurs qui en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β , participent également à la production d'IgA par les cellules B intestinales [31]. D'autres mécanismes concourent à l'augmentation de la réponse IgA intestinale, notamment *via* les cellules dendritiques par la voie de l'acide rétinoïque ou de la NO synthase inductible [31]. En effet, l'acide rétinoïque permet la domiciliation intestinale des cellules B IgA+, en induisant l'expression de CCR9 et de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ [34]; tandis que d'autres équipes ont montré que les souris déficientes en NO synthase inductible, avaient des réponses IgA diminuées [35]. Dans la *lamina propria* intestinale, les cellules B IgA+ terminent leur différenciation en plasmocytes sécrétant des IgA [36]. Ces plasmocytes synthétisent la pièce J qui permet la formation d'un dimère stable d'IgA et augmente également l'avidité pour l'antigène. Les cellules épithéliales captent les IgA dimériques car elles expriment au niveau de leur membrane basolatérale le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR), ce qui permet l'internalisation de ce complexe (IgA + pièce J) formant ainsi des IgA sécrétoires. Ces IgA sont transportées dans des vésicules à travers la cellule vers le pôle apical, où le récepteur sera clivé, permettant ainsi la sécrétion des IgA dans la lumière intestinale (**Figure 4**). A noter qu'une partie du récepteur reste fixée à l'anticorps pour former le composant sécrétoire, rendant l'Ig plus résistant à la protéolyse [37]. De plus chez les rongeurs, ces IgA sécrétoires peuvent être fabriquées au niveau hépatique, puis relarguées dans l'intestin grâce aux sécrétions biliaires [38].

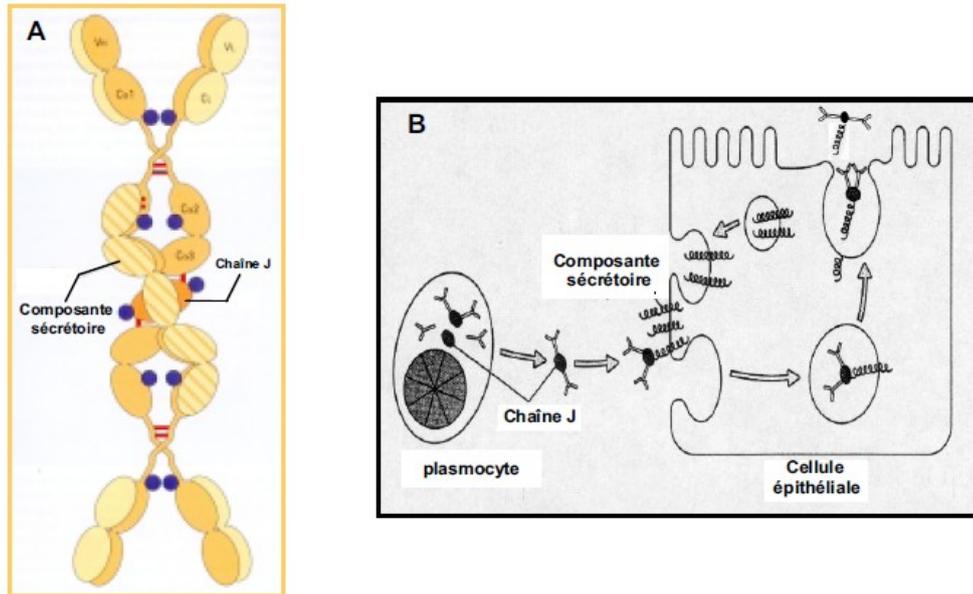


Figure 4 : A. Structure d'une d'IgA sécrétoire humaine.

Les IgA monomériques (jaune) sont reliées par leur extrémité C-terminale grâce à la chaîne J (orange). La composante sécrétoire, constituée de 5 domaines (hâchurés en jaune), est greffée au dimère et attachée par deux ponts disulfures (rouge) au domaine Ca2 de chaque monomère. B. Transport d'IgA à travers l'épithélium intestinal.

II.3.2. Réponse immunitaire cellulaire T

Les lymphocytes T proviennent de la moelle osseuse et contrairement aux cellules B qui arrivent à maturité dans la moelle osseuse, les cellules T migrent vers le thymus pour effectuer leur maturation. Lorsqu'une cellule T naïve rencontre l'antigène combiné à une molécule du CMH à la surface d'une cellule, la cellule T prolifère et se différencie en cellules T mémoires ou en différentes cellules T effectrices. Il y a deux sous populations bien définies de cellules T : les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+. Toutes les sous-populations des cellules T expriment le récepteur CD3. En plus de ces lymphocytes T conventionnels, il existe au niveau des muqueuses diverses sous-populations de cellules T non conventionnelles se situant à mi-chemin entre l'immunité innée et acquise.

II.3.2.1. Les lymphocytes T non conventionnels (innés-like)

Ces lymphocytes possèdent un répertoire très restreint, donc ils vont reconnaître un nombre limité de pathogènes comparé aux lymphocytes T conventionnels qui reconnaissent un nombre très important de pathogènes grâce à un répertoire extrêmement large. Par

contre leur réponse est très rapide, 1 à 2 jours contre 8 jours pour les lymphocytes T conventionnels et donc interviennent lors de la phase précoce de l'infection. Ces lymphocytes n'ayant pas de marqueurs spécifiques (CD4-CD8-), de nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier et de caractériser les différentes sous-populations. Ils sont répartis en 2 grandes populations : les lymphocytes $T\alpha\beta$ (comme la majorité des lymphocytes T conventionnels) et les lymphocytes $T\gamma\delta$. Les lymphocytes $T\alpha\beta$ invariants possèdent un TCR avec une chaîne α invariante et aujourd'hui on distingue de nombreuses sous-populations parmi lesquelles :

- les MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells) [39] qui sont toujours associés aux muqueuses chez la souris. Ils sont localisés dans la *lamina propria* mais également dans les *GM* et les *PP*. Leur sélection et expansion se font *via* la molécule MR1 (molécule du CMH de classe Ib). La fonction des MAIT est encore inconnue, mais il semblerait qu'elle soit liée avec la localisation dans la muqueuse intestinale qui est en permanence en contact avec des antigènes [40, 41].
- les cellules NKT qui ont des fonctions diverses et importantes dans le système immunitaire. Ils possèdent un TCR semi-invariant et reconnaissent des molécules glycolipidiques présentées par la molécule CD1d [42]).
- Les Lymphocytes $T\gamma\delta$ ne représentent que 2-3% des cellules T [43], et sont majoritairement retrouvés dans les épithélia [43, 44]. Ces cellules ont un potentiel cytotoxique et sécrètent des cytokines telles que l'IFN γ [45]. Ils participent à l'immunité anti-infectieuse, à la réponse anti-tumorale et à la cicatrisation. Une activité suppressive a également été proposée, notamment dans l'homéostasie intestinale [46].

II.3.2.2. Cellules T CD8

Les lymphocytes T CD8 conventionnels sont de deux types : les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) [47]. Il existe également d'autres populations à activité régulatrice, les lymphocytes T régulateurs CD8+.

Les CTL sont des cellules CD8 activées dans les sites inducteurs par les CPA et par des cellules T CD4. Les CTL sont des cellules effectrices majeures dans la défense immunitaire contre les infections par des pathogènes intracellulaires au niveau des muqueuses (bactéries, virus et parasites) [48-50]. Les CTL peuvent migrer vers les sites effecteurs où ils tueront les cellules infectées en déclenchant un mécanisme d'apoptose. Les pathogènes, ou des vecteurs vivants atténués, sont les plus efficaces pour induire des réponses T

cytotoxiques dans les muqueuses. Les toxines bactériennes natives ou leurs dérivés détoxifiés peuvent également induire des CTL [51].

Les IEL ont essentiellement un rôle cytotoxique comme les CTL, mais persistent longtemps dans l'épithélium qui se régénère autour d'eux [52]. Le fait que les IEL de l'intestin comportent 50% de cellules exprimant le TCR $\gamma\delta$ ainsi que leur capacité à produire des cytokines non inflammatoires mais plutôt régulatrices (TGF- β et IL-10) suggèrent que les IEL pourraient contribuer à la tolérance orale et au maintien de l'homéostasie intestinale [53, 54]. En outre, des études récentes chez l'homme montrent que les cellules épithéliales intestinales induisent *in vitro* la prolifération de cellules T CD8+ à fonction régulatrice [55]. Cependant, le rôle des IEL dans la tolérance orale n'a pas été formellement démontré.

II.3.2.3. Les cellules T CD4

Dans la zone T des sites inducteurs, les lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène rencontrent l'antigène présenté par les cellules dendritiques ou les cellules B. Ils se différencient en lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th) Th1, Th2 ou Th17 ainsi qu'en lymphocytes T régulateurs. Cette sous-population de lymphocytes T CD4 sera développée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II :
LA REponse T CD4

Après leur activation par les CD, les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en trois sous-populations effectrices Th1 (T helper 1), Th2 et Th17 (**Figure 5**). Ces différentes sous-populations se caractérisent par leur profil cytokinique qui leur permet d'orchestrer la réponse immunitaire face à différents pathogènes [56-59]. Les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent également se différencier en sous-populations régulatrices qui seront développées dans le chapitre suivant.

I. CARACTÉRISTIQUES DES LYMPHOCYTES TH1, TH2 ET TH17

En 1986, Mosmann *et al.* montrent que des clones de lymphocytes T CD4 murins peuvent être divisés en 2 populations distinctes, les Th1 et les Th2, selon leur profil de production de cytokines [56]. Une troisième sous-population a été décrite plus récemment, il s'agit des lymphocytes Th17.

I.1. les Lymphocytes Th1

Les lymphocytes T CD4 Th1 sécrètent de l'IFN- γ , de l'IL-2, du TNF- α , et du TNF- β . Il est classiquement admis que les lymphocytes Th1 favorisent plus particulièrement l'éradication des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries et parasites) (**Figure 5**). La cytokine caractéristique des Th1, l'IFN- γ possède deux rôles clés [57, 60]. Tout d'abord, elle permet l'activation des macrophages et augmente ainsi leur activité phagocytaire, l'expression des molécules du CMH-I et II, l'induction d'IL-12, de NO (Nitric Oxide) et la production d'anion superoxide, importants pour l'élimination des pathogènes intracellulaires [61, 62]. L'IFN- γ favorise également la commutation isotypique en IgG2a et IgG3 chez la souris [63] correspondant probablement aux IgG1 et IgG3 chez l'homme. Cette cytokine va donc favoriser la production d'IgG qui en se fixant aux récepteur Fc γ et au complément entraîne l'opsonisation et la phagocytose de certains pathogènes. Cependant, les Th1 sont aussi responsables de la réaction d'hypersensibilité retardée dans laquelle l'IFN- γ et le TNF- β induisent une forte inflammation et des lésions tissulaires. De plus, les Th1 peuvent acquérir des capacités cytolytiques suite à l'expression de FasL à leur surface [64]. L'IL-2 et l'IFN- γ vont promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules cytotoxiques actives. Historiquement, les lymphocytes Th1 ont été fortement reliés à de nombreux syndromes auto-immuns comme la sclérose en plaques, le diabète et le lupus érythémateux systémique

[65]. Mais ces données ont récemment été remises en question par la découverte des lymphocytes Th17 [66]. Les Th1 semblent aussi impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn [65].

I.2. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2, quant à eux, sont impliqués dans l'élimination de pathogènes intracellulaires comme le toxoplasme, les leishmanies, ou encore les parasites intestinaux (les helminthes) (**Figure 5**). Ils sont caractérisés par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les lymphocytes Th2, en produisant l'IL-4, favorisent la commutation isotypique en IgE, isotype qui joue un rôle prépondérant dans la dégranulation des mastocytes. Les Th2 aident aussi les lymphocytes B à produire la sous-classe IgG2_a chez la souris et son homologue IgG1 chez l'homme, sous-classes ne fixant pas le complément. L'IL-5 est la principale cytokine responsable de la différenciation, de l'activation et du recrutement des polynucléaires éosinophiles. Quant à l'IL-13, elle est, comme l'IL-4, importante pour stimuler la croissance et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE. Mais les lymphocytes Th2 peuvent aussi être à l'origine de maladies allergiques. En effet, les IgE et les mastocytes provenant de l'activation de Th2 spécifiques d'allergènes peuvent entraîner des réactions allergiques et de l'asthme [67-69].

I.3. Les lymphocytes Th17

Récemment, le paradigme Th1/Th2 a été revu à la suite de la découverte en 2005 par Langrich et coll. d'une troisième sous-population effectrice de lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-17, les Th17 (**Figure 5**) [70, 71]. Cette population joue un rôle dans l'élimination de certains pathogènes spécifiques qui requièrent une inflammation massive et que les Th1 et Th2 ne peuvent pas contrôler. Les Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17 (IL-17A), d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22. Chez la souris, les Th17 peuvent aussi produire du TNF- α et de l'IL-6. La cinétique d'apparition des lymphocytes Th17 sur le site de l'inflammation est rapide. Grâce à l'induction de ces nombreuses chimiokines, les lymphocytes Th17 peuvent induire l'immunité innée et adaptative et attirer d'autres sous-populations T auxiliaires sur le site de l'inflammation comme les lymphocytes T innés-like (cellules T $\gamma\delta$) [72]. L'IL-17 et l'IL-17F sont des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines stimulent les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, à produire de multiples médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , l'oxyde nitrique, des métalloprotéases et des chimiokines. Toutes ces molécules

conduisent à l'induction d'une inflammation [73]. Ces cytokines sont aussi responsables du recrutement de polynucléaires neutrophiles, eux-mêmes producteurs d'IL-17 [74]. De nombreux modèles expérimentaux ont permis de montrer l'implication des lymphocytes Th17 dans les maladies infectieuses, les réactions d'auto-immunité, l'alloréactivité, l'allergie et les cancers. Des études chez l'homme suggèrent l'importance des Th17 dans le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la colite, l'asthme ainsi que certaines infections bactériennes et fongiques [70]. Récemment, un rôle protecteur des Th17 a été apporté dans un modèle de colite [75]. En effet, le transfert de cellules CD45RB^{high} CD25-CD4⁺, provenant de souris IL-17A déficientes, chez des souris RAG^{-/-}, accélère et aggrave la maladie et cela est associé à une augmentation de la réponse Th1.

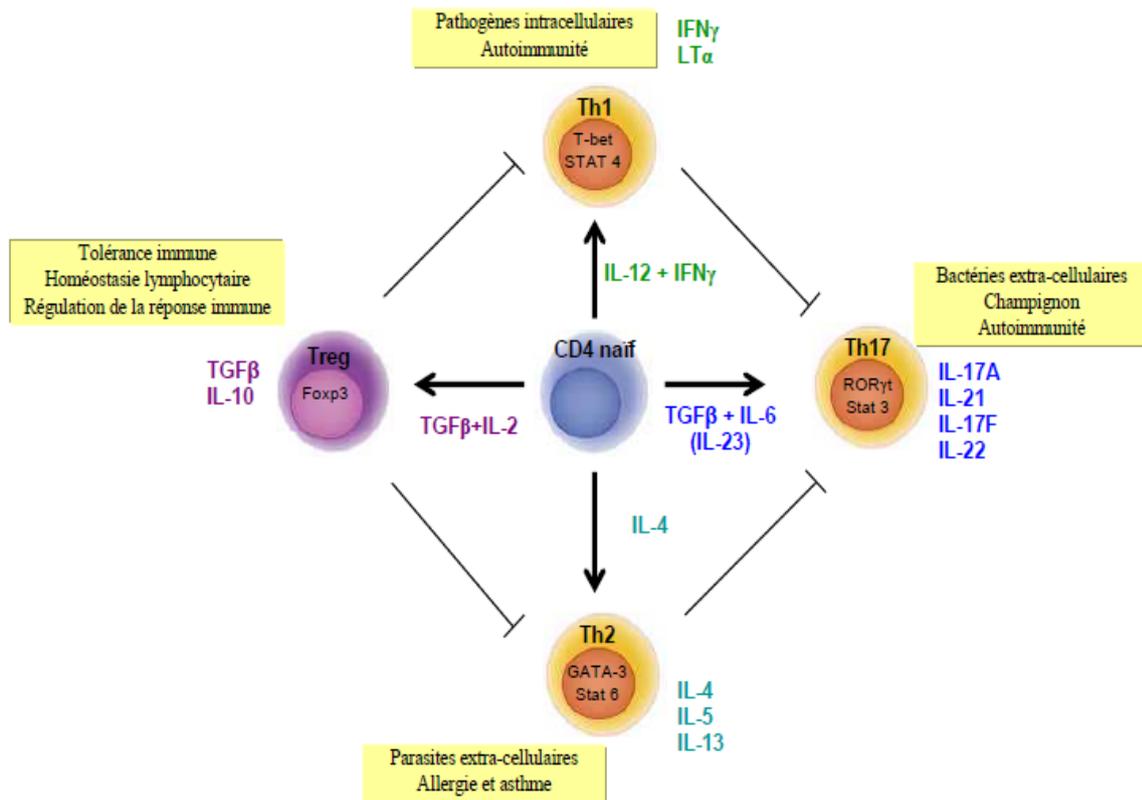


Figure 5 : Différentes orientations de la réponse immune T CD4⁺

II. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4

Chaque sous-population est capable de promouvoir son propre développement et d'inhiber le développement des autres sous-populations *via* les cytokines qu'elle sécrète [76] (**figure 5**). Immédiatement après l'engagement du TCR, de nombreux facteurs influencent la différenciation vers un lignage Th1, Th2 ou Th17: les cytokines présentes dans l'environnement [77], la nature et la dose de l'antigène [78], le type de cellules présentatrices d'antigène [79], et leur degré de différenciation ou de maturation [80]. Les facteurs les mieux décrits restent les cytokines présentes dans l'environnement lors du processus de différenciation.

II.1. La différenciation Th1

L'IL-12 a été initialement caractérisée comme une cytokine majeure dans la différenciation Th1 (**Figure 6**) [81]. Par la suite, l'implication d'autres cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-18 a été mise en évidence [82, 83]. L'IL-12 est sécrétée par les CPA activées telles que les macrophages et les CD [81, 84]. L'IL-12 se fixe sur son récepteur dont les deux chaînes IL-12R β 1 et IL-12R β 2 sont induites suite à l'activation *via* le TCR. Cela va induire l'activation de STAT-4 nécessaire à la différenciation optimale des cellules T naïves en cellules Th1 productrices d'IFN- γ [65]. L'IL-12 joue un rôle central en promouvant la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules Th1 effectrices. De plus, l'IL-12 stimule les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T CD8 à produire de l'IFN- γ . L'IL-4 inhibe l'expression de l'IL-12 par les CD, ainsi que l'expression de la chaîne β 2 du récepteur à l'IL-12 par les lymphocytes T CD4 [65]. L'IFN- γ est une cytokine pléiotropique qui joue un rôle essentiel à la fois dans la réponse immunitaire innée et adaptative [65, 82]. L'IFN- γ se fixe sur son récepteur composé de 2 chaînes R1 et R2 et active les Janus kinases Jak1 et Jak2 qui vont à leur tour activer STAT-1. Cette activation induit alors l'expression de T-bet, facteur de transcription essentiel au développement des Th1 [85], qui va remodeler la chromatine du gène de l'IFN- γ et permettre sa transactivation [86]. Ceci conduit à une augmentation d'IFN- γ dans l'environnement local créant ainsi une boucle de régulation positive de la différenciation Th1. T-bet induit aussi l'expression d'IL-12-R β 2, permettant à l'IL-12 produite par les CPA, d'activer STAT-4 [87]. STAT-4 et T-bet induisent l'expression d'IFN- γ qui renforce alors l'engagement en Th1 via STAT-1. En parallèle, T-bet va réprimer GATA-3, un facteur clé de la différenciation Th2 [88], ainsi que le gène de l'IL-4 [89] et inhiber ainsi la différenciation Th2. Des données récentes suggèrent que la fonction majeure de T-bet serait de réguler négativement GATA-3 plutôt que de favoriser la transcription du gène de l'IFN- γ

[90]. Les souris invalidées pour le gène *T-bet* sont incapables de développer une réponse Th1 après infection par *Leishmania major*. Les souris déficientes pour l'IFN- γ , IFN- γ R1, IFN- γ R2 ou STAT-1 ont des réponses immunitaires affaiblies, conduisant à une augmentation de la susceptibilité à certains pathogènes [91-93]. Chez l'homme, une mutation dans un des composants de la voie de signalisation de l'IFN- γ R est associée à une immunodéficiência profonde face à des bactéries intracellulaires [94, 95]. La production de l'IFN- γ , par les lymphocytes T CD4, peut être également induite par la stimulation du TCR, indépendamment de la voie IL-12/STAT-4, et favorise une réponse Th1 [96]. L'IL-18 sert de co-facteur pour l'induction des Th1 *via* l'IL-12 et pour l'augmentation de la production d'IFN- γ par les Th1 effecteurs [93].

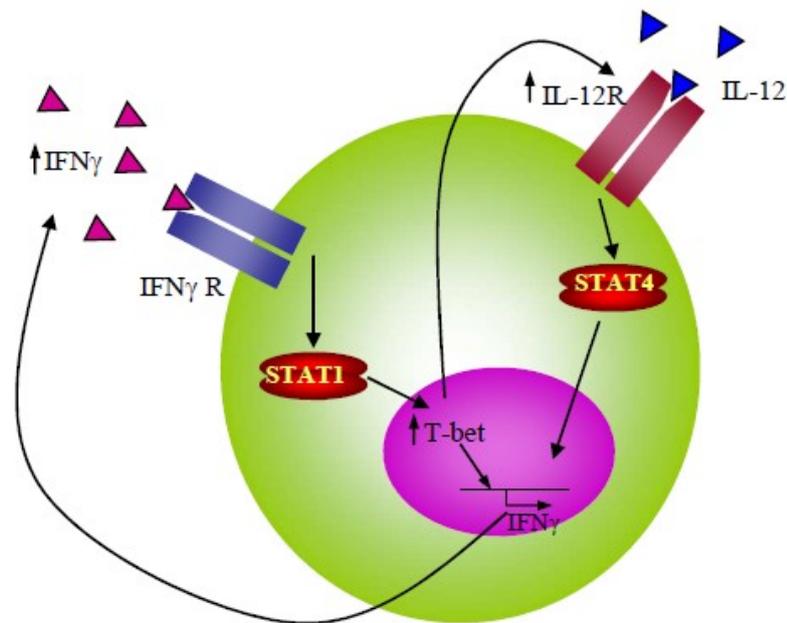


Figure 6 : Facteurs impliqués dans la différenciation Th1

II.2. La différenciation Th2

L'IL-4 est la cytokine clé du développement des lymphocytes Th2 comme le montrent les souris invalidées pour le gène codant pour l'IL-4 ou pour son récepteur : ces souris ne développent pas de réponse Th2 (**Figure 7**) [97]. Les lymphocytes T CD4 naïfs semblent en être la source initiale. Même s'ils n'en produisent que de très faibles quantités en comparaison des lymphocytes Th2, ils peuvent en produire assez pour initier leur différenciation en Th2 [98]. La fixation de l'IL-4 au TCR des lymphocytes T naïfs conduit à

l'augmentation d'expression des ARNm de l'IL-4 et de GATA-3 (GATA binding protein 3). L'IL-4 peut-être également produite par les mastocytes [99] et les polynucléaires (PN) basophiles [100], les polynucléaires éosinophiles (Moqbel, 1995) et les cellules NKT [101]. Très récemment, il a été montré que les PN basophiles peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'antigènes et pourraient induire des réponses Th2 *in vivo* en réponse à des allergènes [102, 103] et à des infections par les helminthes [104]. Le récepteur de l'IL-4 est exprimé par les lymphocytes T naïfs. La fixation de l'IL-4 sur son récepteur conduit à l'activation du facteur de transcription STAT-6 [105], qui avec NFAT, AP-1 et NFκB induisent l'expression de l'IL-4 et du facteur de transcription GATA-3, un facteur de régulation majeur de la différenciation Th2 [106]. STAT6, en se fixant sur le promoteur du gène de l'IL-4, modifie la structure de la chromatine et facilite l'accès du gène aux facteurs de transcription et augmente ainsi la transcription de l'IL-4. GATA-3 qui est induit via la signalisation jagged/notch [107, 108], favorise la réponse Th2 en induisant la transcription du gène de l'IL-5 et de l'IL-13, situé sur le locus *Il4* du chromosome. Mais GATA-3 prévient aussi le développement de la réponse Th1 en inhibant l'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-12 via STAT-4. Après l'activation T, l'IL-2 est nécessaire pour stabiliser l'expression du gène de *Il4* via STAT-5, dans les Th2 en développement [109].

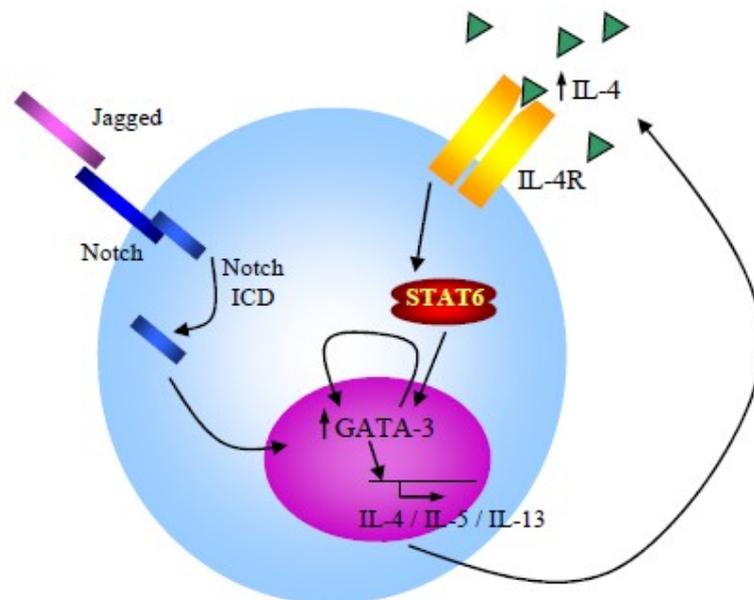


Figure 7 : Facteurs impliqués dans la différenciation Th2

II.3. La différenciation Th17

En 2006, trois études indépendantes ont montré que la combinaison du TGF- β et de l'IL-6 était essentielle pour induire la production d'IL-17 par les cellules T CD4 naïves (**Figure 8**) [110-112]. Le TGF- β est une cytokine régulatrice aux fonctions variées intervenant dans le développement, l'homéostasie et la tolérance des lymphocytes T [113]. Étant produit par de nombreux lignages de lymphocytes et par les cellules stromales, il est difficile de déterminer la source de TGF- β essentielle au développement des Th17. Mais il semblerait que la production de cette cytokine par les lymphocytes T eux-mêmes soit importante pour la génération des lymphocytes Th17 [114]. Les CD semblent aussi jouer un rôle dans l'augmentation du TGF- β activé dans l'environnement local, même si elles ne sont pas la source première de TGF- β [115]. Comme le TGF- β , l'IL-6 possède beaucoup de fonctions en dehors du système immunitaire [116]. L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules telles que les CD, les monocytes/macrophages, les mastocytes, les lymphocytes B et des lymphocytes T activés mais aussi par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. L'interaction entre l'IL-6 et le TGF- β dans l'induction du programme transcriptionnel n'est pas entièrement comprise. L'IL-6 via la signalisation STAT-3 semble requise pour la fonction de ROR γ t (retinoic-acid-eceptor-related orphan receptor- γ t), facteur de transcription impliqué dans la différenciation des Th17 [70, 117]. L'induction complète de ROR γ t n'est terminée qu'en présence de TGF- β . Le TGF- β inhibe la différenciation en Th1 et Th2, et promeut la différenciation en Th17 et en lymphocytes T régulateurs (Treg) en induisant les facteurs de transcription ROR γ t et Foxp3 requis pour respectivement les Th17 et les Tregs [111, 118, 119]. En l'absence d'IL-6, Foxp3 inhibe ROR γ t bloquant ainsi la différenciation Th17. En présence d'IL-6, STAT-3 est activé et inhibe l'expression de Foxp3 [120]. L'IL-21 en présence de TGF- β est aussi capable d'induire la différenciation en Th17 via ROR γ t, même si *in vivo* il semblerait que l'IL-6 ait un rôle dominant [114, 121]. L'IL-21 produite par les Th17 pourrait agir de façon autocrine, en amplifiant la fréquence des précurseurs Th17. Les lymphocytes Th17 ont été mis en évidence par la découverte d'une nouvelle cytokine l'IL-23. L'IL-23 est un hétérodimère composé de la sous-unité p19 et la sous-unité p40 partagée par l'IL-12. Les souris déficientes pour la sous-unité p19, contrairement aux souris déficientes pour la sous-unité p40 de l'IL-12, sont résistantes à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et leurs cellules sécrètent peu d'IL-17. Une relation forte entre ces deux cytokines a été établie lorsqu'une étude a montré que l'IL-23 promouvait la production d'IL-17 par les lymphocytes T activés et que les lymphocytes T amplifiés avec IL-23 étaient capables de transférer l'EAE

et l'arthrite. Mais l'IL-23R n'est pas exprimé par les lymphocytes T naïfs et après l'identification des facteurs nécessaires à la différenciation des Th17 (TGF- β , IL-6 et IL-21), il est devenu clair que l'IL-23 n'était pas impliquée dans la différenciation des Th17. L'IL-23 pourrait servir à l'expansion et à la stabilisation de la réponse Th17. Il a été montré, très récemment, que l'IL-17 pouvait directement inhiber la différenciation des Th1 *in vitro* en inhibant l'expression de T-bet [75]. De plus, lorsque les souris sont invalidées pour le gène de l'IL-17, ces dernières développent une réponse Th1 exacerbée [75, 122].

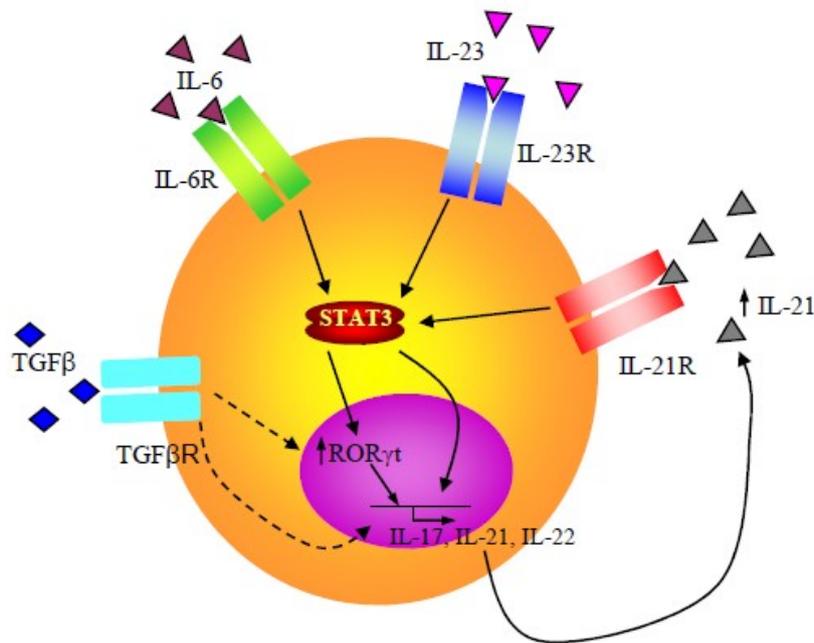


Figure 8 : Facteurs impliqués dans la différenciation Th17

III. INTERCONNEXION DES DIFFERENTES ORIENTATIONS ET NOTION D'EQUILIBRE

La différenciation en l'un des sous-types de cellules Th implique des rétro-contrôles négatifs provenant des autres polarisations. La suppression mutuelle de l'IFN γ et de l'IL-4 a été à l'origine des études sur la régulation croisée des différentes sous-populations de lymphocytes T helper [57, 123]. L'absence d'IFN γ dans la culture de cellules Th2 semble jouer un rôle important dans l'orientation Th2. Pendant le procédé de différenciation Th2, les cellules en développement perdent leur capacité à répondre à l'IL-12 par la diminution d'expression de la chaîne IL-12R β 2 [124]. De la même façon, le TGF β supprime la différenciation Th1 et Th2 [125] et l'IL-4 et l'IFN γ inhibent la différenciation Th17 [58, 126,

127]. L'inhibition des autres types de Th par les cytokines peut partiellement être expliquée par l'activation de facteurs de transcription comme GATA-3 et T-bet qui sont mutuellement antagonistes : lorsque les niveaux d'IFN γ , d'IL-12 et de T-bet sont élevés, la production de GATA-3 est inhibée et lorsque les niveaux d'IL-4 et de GATA-3 augmentent, T-bet est réprimé [86, 128]. T-bet en se liant à GATA-3 inhibe sa fonction [88] empêchant ainsi la différenciation Th2. La signalisation via l'IL-12 et GATA-3 est également opposée : la surexpression de GATA-3 dans des cellules Th1 entraîne la diminution de l'expression de l'IL-12R β 2 et ainsi la diminution de la réponse Th1 [128]. Le TGF β semble inhiber la différenciation Th1 et Th2 en inhibant l'expression de T-bet et GATA-3 [125, 129]. De même, l'induction de Foxp3 par le TGF β chez la souris avec une stimulation dépendante du TCR est inhibée par les cytokines orientant vers les profils Th1 et Th2. C'est-à-dire que l'ajout d'IL-4 et la surexpression de GATA-3 ou de T-bet inhibe l'induction de Foxp3 alors que l'utilisation d'un anticorps anti-IL-4 augmente l'induction de foxp3 [130]. Ainsi, le contexte environnemental dans lequel se trouvent les cellules effectrices guide leur différenciation. Le succès d'une réponse immune, adaptée aux pathogènes dépend de l'équilibre entre les différentes sous-populations de cellules T.

CHAPITRE III :
TOLERANCE MUQUEUSE ET LYMPHOCYTES T REGULATEURS

I. TOLERANCE MUQUEUSE

La tolérance périphérique permet d'éviter les réactions auto-immunes lorsque la tolérance centrale est incomplète et que des lymphocytes matures reconnaissent des antigènes du soi dans les tissus périphériques. Elle permet, en sus, de prévenir les réponses lymphocytaires T à des antigènes du soi qui ne sont pas présents dans le thymus, mais qui peuvent être présents dans les tissus périphériques. En cas d'inflammation et de lésion tissulaire notamment, certains antigènes qui habituellement ne sont pas exposés peuvent être anormalement dévoilés et faire l'objet de réactions auto-immunes en périphérie. Au niveau des muqueuses, la tolérance intervient pour éviter des réactions immunitaires contre les antigènes alimentaires ou inhalés (antigènes inoffensifs). Plusieurs mécanismes interviennent dans le processus de tolérance périphérique; l'ignorance [131], l'anergie [132], la mort cellulaire et la régulation immunitaire [133, 134] (**Figure 9**).

I.1. L'ignorance

L'ignorance immunologique correspond à l'absence d'activation des lymphocytes T en présence de l'antigène. Ce mécanisme intervient lorsque le taux d'antigène est insuffisant ou lorsque les antigènes ne sont pas présentés aux lymphocytes [131].

I.2. L'anergie

L'anergie se définit comme l'inactivation fonctionnelle des lymphocytes. Elle se caractérise par l'absence de prolifération et de production d'IL-2 en réponse aux signaux activateurs [132]. Cet état réversible intervient soit lorsque les cellules reconnaissent des antigènes sans le niveau adéquat de molécules de co-stimulation, soit lorsque des cellules activées sont incapables de répondre à une nouvelle stimulation, même en présence des signaux adéquats [135]. Plusieurs mécanismes peuvent participer à l'anergie des cellules; la présence d'IL-10 lors de la reconnaissance antigénique [136], l'altération du signal transmis par le TCR *via* des peptides altérés, et la liaison de récepteurs inhibiteurs sur les lymphocytes T, tels que CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen -4*) [137].

I.3. La mort cellulaire induite par l'activation

L'activation répétée des lymphocytes matures par des antigènes du soi, ou la re-stimulation par un antigène sans une co-stimulation appropriée déclenche la mort cellulaire par apoptose. Ce processus appelé mort cellulaire induite par l'activation (AICD pour *activation-induced cell death*) met en jeu des mécanismes dépendants de récepteurs de mort tel que

Fas-FasL et le TNFR, ainsi que des mécanismes indépendants des récepteurs de mort [138, 139].

I.4. La régulation immunitaire

La tolérance périphérique peut aussi être induite par des cellules qui suppriment les fonctions effectrices de cellules voisines. Les lymphocytes T, notamment, peuvent se différencier en lymphocytes T régulateurs dans le thymus (lymphocytes T régulateurs naturels ou nTregs) ou dans les tissus périphériques (lymphocytes T régulateurs induits ou iTregs). Des cellules du système immunitaire inné peuvent, elles aussi, inhiber des réponses immunitaires T. Elles font partie intégrante du réseau de mécanismes de suppression en périphérie. Certaines de ces cellules régulatrices sont décrites ci-dessous.

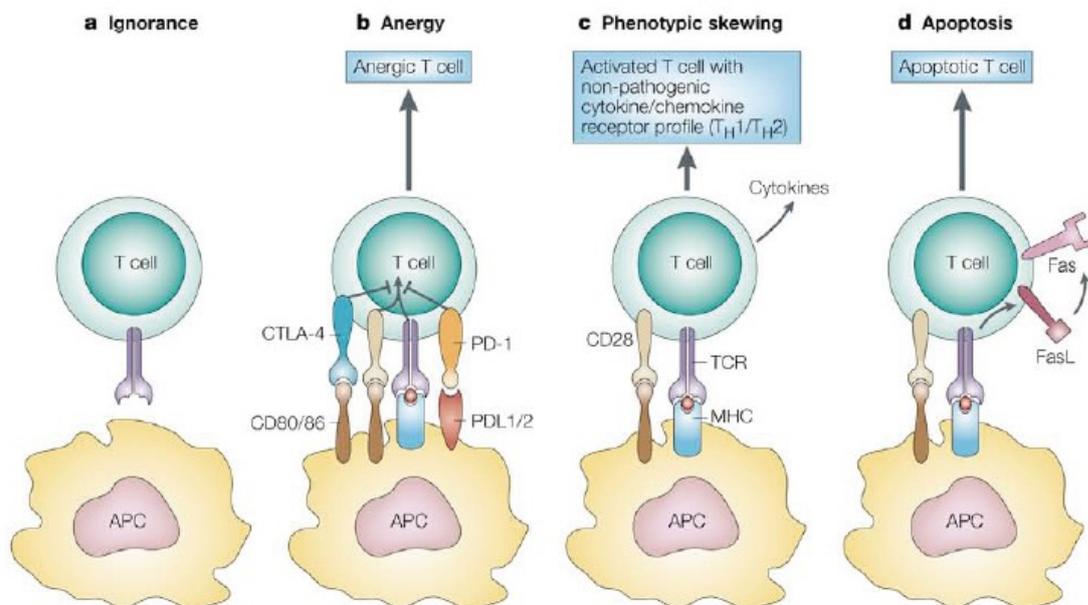


Figure 9 : Les mécanismes de la tolérance périphérique (Extrait de Walker[140] Nat Rev Immunol 2002)

II. LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS

II.1. Naissance du concept de lymphocytes régulateurs

Le concept d'immunosuppression médiée par les lymphocytes T n'est pas récent. Dans les années 1970, RK Gershon avait proposé que des lymphocytes T pouvaient également

inhiber d'autres cellules T, et de ce fait, induire la tolérance immunitaire notamment lors de la discrimination du soi et du non-soi [141]. Ces lymphocytes T, alors appelés lymphocytes suppresseurs, ont été caractérisés par l'expression du marqueur CD8 et ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques [142]. Pourtant, l'existence de ces cellules en tant que sous-population lymphocytaire a été sujet à controverse [143] et le concept même de l'existence de lymphocytes T immunosuppresseurs a été abandonné dans les années 1980, en raison du manque de caractérisation et de marqueurs spécifiques de ces cellules et surtout parce que Gershon postulait un mode d'action de ces cellules restreint à une région I-J du CMH (H2), supposée coder une molécule qui serait intimement liée à la fonction suppressive de ces cellules [142, 144, 145]. Le concept de lymphocytes T suppresseurs ou régulateurs (Tregs) est réapparu dans les années 1990 suite aux travaux de Sakaguchi *et al.* démontrant le rôle de ces cellules dans la prévention des maladies auto-immunes [146]. Ces travaux ont consisté à administrer à des souris athymiques une suspension de cellules lymphoïdes T CD4+ de souris BALB/c déplétées en cellules T CD4+CD25+. Suite à ce transfert, les souris ont développé des maladies auto-immunes. En revanche, l'injection de cellules T CD4+CD25+ en même temps que les cellules T CD4+CD25+ prévenait l'apparition de maladies auto-immunes indiquant que les cellules CD4+CD25+ avaient un rôle régulateur **(Voir paragraphe suivant)**.

A l'heure actuelle en fonction de leur origine, génération et mécanisme d'action, deux sous-populations de lymphocytes T régulateurs sont définies : les lymphocytes Tregs naturels (nTregs) et les lymphocytes Tregs induits ou adaptatifs (iTregs) **(Figure 10)** [147].

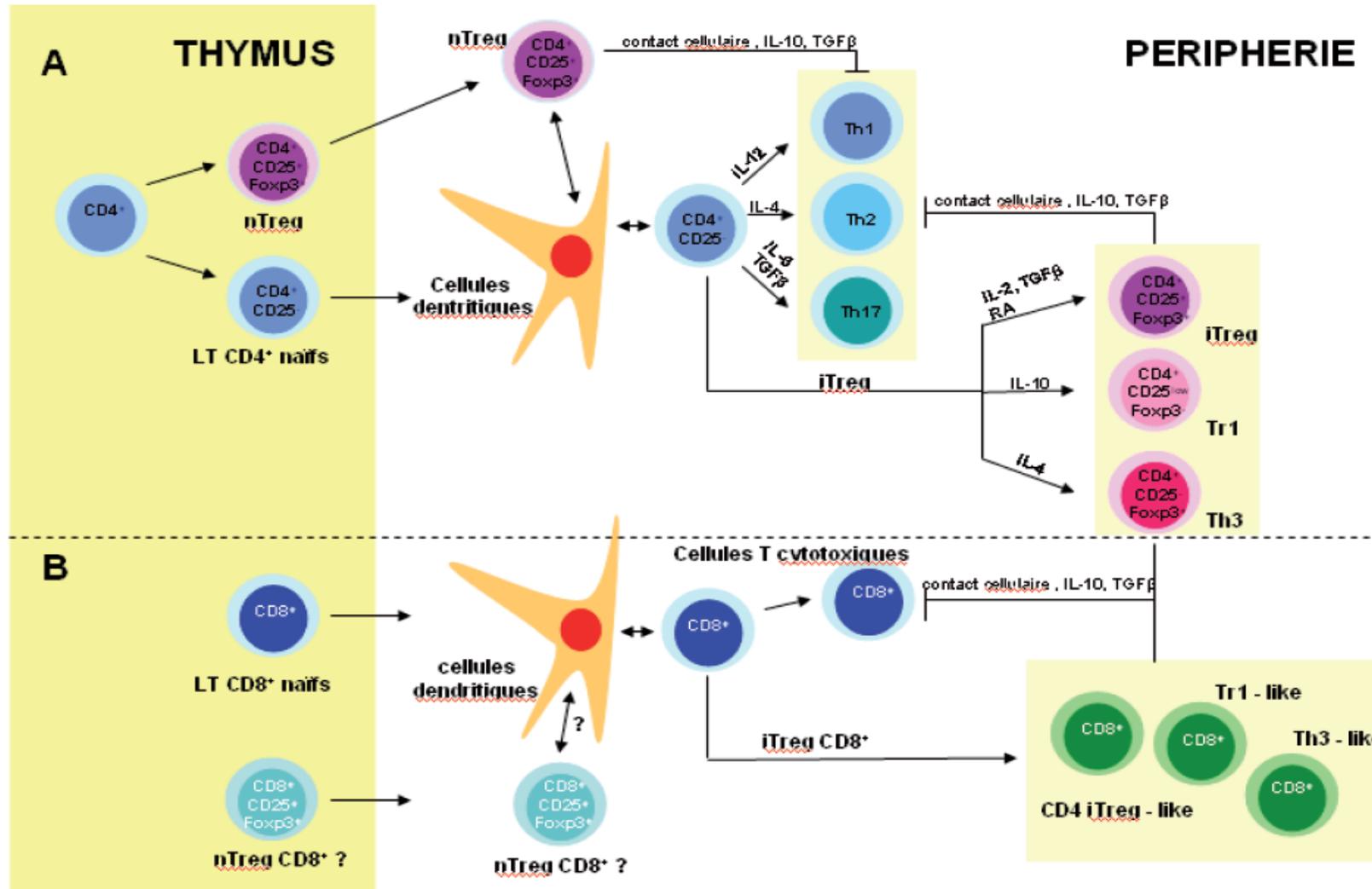


Figure 10 : Les lymphocytes T régulateurs (d'après Basset et al., 2010)

II.2. De la découverte à la caractérisation des lymphocytes T régulateurs naturels

En 1969, alors qu'ils tentent de statuer sur le rôle du thymus dans le système immunitaire, Nishizuka et Sakahura réalisent des thymectomies néonatales de souris [148, 149]. Ils se rendent alors compte que chez des femelles dont l'ablation a été réalisée 3 jours après la naissance, les ovaires s'atrophient puis dégénèrent dans les mois qui suivent l'opération. Dans ce modèle, l'analyse histologique montre clairement que les signes cliniques observés ne sont pas imputables à un simple défaut hormonal, comme cela avait été suggéré dans des travaux antérieurs. De plus, contrairement à ce qui est observé chez des animaux ayant subi une ablation de l'hypophyse, les ovaires ne présentent pas simplement un blocage ou un retard dans leur développement. Ils subissent une attaque qui aboutit à la destruction des follicules.

Un phénotype analogue est observé quatre ans plus tard chez des rats Wistar thymectomisés à l'âge adulte et irradiés à dose sublétales à plusieurs reprises [150]. Dans les semaines suivant le conditionnement, une destruction de la thyroïde consécutive à une infiltration de cellules mononucléées est observée. Dans les deux cas, la greffe d'un thymus syngénique ou le transfert de lymphocytes T, en particulier de cellules CD4+, permet de protéger les animaux de ces pathologies [151, 152].

Ces résultats suggèrent pour la première fois, l'existence d'une sous-population de cellules T suppressives dans le thymus qui aurait pour rôle de contrôler en périphérie le compartiment lymphocytaire T auto-spécifique. Pendant de longues années, de nombreuses équipes ont essayé dans différents modèles de mieux caractériser, phénotyper et isoler cette sous-population lymphocytaire suppressive. Elles ont rencontré de nombreuses difficultés ainsi qu'un scepticisme d'une partie de la communauté scientifique allant jusqu'à remettre en cause l'existence même d'une telle sous-population de cellules ayant des propriétés régulatrices, du fait du manque de marqueurs réellement spécifiques et du flou autour de leur mécanisme d'action.

II.2.1. A la recherche du marqueur des nTregs CD4+

Ce n'est qu'en 1981 que Sakaguchi *et al.* ont apporté de nouvelles évidences dans la caractérisation de cette population lymphocytaire suppressive. Toujours en utilisant le modèle murin de thymectomie néonatale, ils ont montré que le transfert de splénocytes pouvait prévenir le développement d'une ovarite auto-immune chez la souris en montrant

que la population cellulaire responsable de la protection pouvait être restreinte par le phénotype suivant : T CD4+CD5^{high} [152]. CD5 est une glycoprotéine transmembranaire, exprimée fortement par les lymphocytes T activés, qui antagonise la signalisation en aval du récepteur à l'antigène dans les cellules T et B. De façon intéressante, cette molécule permet aussi de définir une sous-population de lymphocytes B, appelée cellules B1, jouant un rôle « immunomodulateur » [153]. Pour tester l'hypothétique fonction suppressive des différentes sous-populations de cellules T CD4+, la stratégie fut dès lors d'essayer de créer une brèche dans la tolérance en déplaçant les sous-populations soupçonnées d'être régulatrices puis de vérifier que la reconstitution du compartiment éliminé permettait d'inhiber la survenue et le développement d'un syndrome auto-immun.

En utilisant cette démarche, l'équipe de Shimon Sakaguchi a confirmé en 1985 des résultats obtenus 3 ans plus tôt [154]. Ces auteurs ont montré que l'élimination *ex vivo* des cellules T CD4+CD5+ permettait l'induction, par la population CD4+CD5- résiduelle, d'une pathologie auto-immune multi-organes après transfert dans des souris *nude*. L'injection de cellules T CD4+CD5^{high} suffisait à prévenir le développement de la pathologie. Suivant cette logique, l'effort de recherche s'est concentré sur le fait de mieux distinguer cette population régulatrice particulière des populations effectrices, différents marqueurs ont alors été proposés afin de mieux identifier ces cellules T CD4+ (**Figure11**).

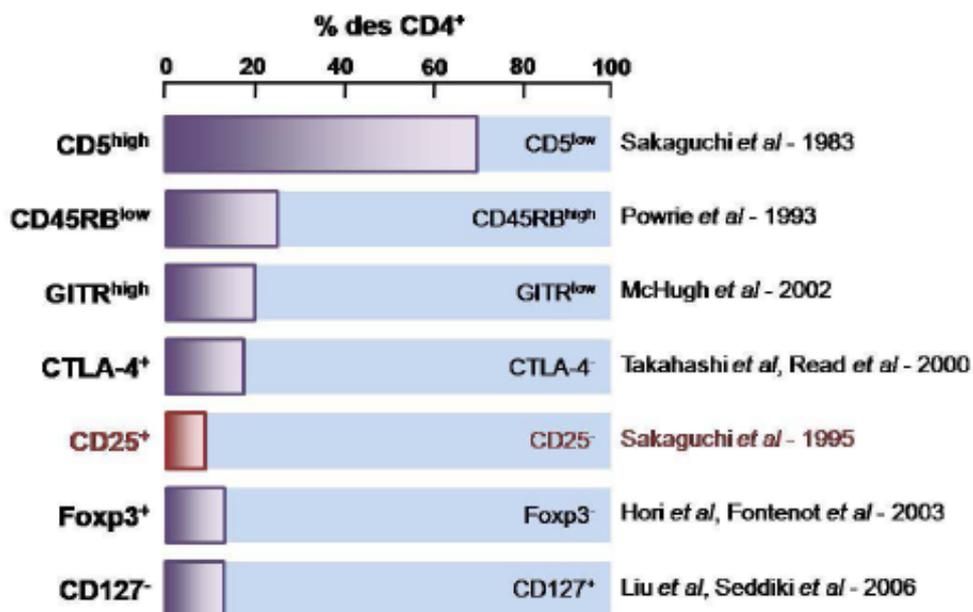


Figure 11 : les différents marqueurs des nTregs et leur découverte Modifié de Sakaguchi *et al*, Annual Review of Immunology, 2004 [147]

Le marqueur CD45RB (protéine tyrosine phosphatase exprimée par la quasi-totalité des cellules d'origines hématopoïétiques) a été proposé par Powrie *et al.* en 1990. Ils ont montré que l'injection de la sous-population T CD4+CD45RB^{high} à des rats congéniques athymiques induisait une pathologie sévère s'accompagnant d'une perte de poids et d'une infiltration massive de cellules dans de nombreux organes. A l'inverse, le transfert adoptif de la fraction cellulaire T CD4+CD45RB^{low} n'était pas pathogène, les animaux continuant à gagner du poids normalement. De façon encore plus surprenante, le transfert de lymphocytes T CD4+ totaux n'était associé qu'à une morbidité mineure [155, 156]. Même quantitativement minoritaire, la population T CD4+CD45RB^{low} est donc capable de contrôler la population effectrice T CD4+CD45RB^{high}.

En 1993, Powrie *et al.* et Morrissey *et al.* ont montré simultanément que le transfert de lymphocytes T CD4+CD45RB^{high} à des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) induisait le développement d'une pathologie inflammatoire et autoimmune au niveau de la muqueuse intestinale ou MICI (*Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin*). L'injection de la fraction autologue T CD4+CD45RB^{low} ou bien la co-injection des fractions T CD4+CD45RB^{high} et T CD4+CD45RB^{low} n'induisait pas de MICI [157, 158].

L'inconvénient principal de ces marqueurs est qu'ils englobent des populations cellulaires trop diverses pour permettre vraiment de distinguer précisément les populations T régulatrices et effectrices. Les lymphocytes T CD4+CD45RB^{low} représentent en effet entre 25 et 30% des lymphocytes T CD4+ totaux chez une souris naïve [147].

C'est en 1995 que Sakaguchi et son équipe identifient chez la souris une population douée de propriétés immunorégulatrices, caractérisée par l'expression constitutive de CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R α)). Un grand pas est alors franchi puisque ce marqueur permet réellement de différencier, au moins fonctionnellement, la population de lymphocytes T CD4+ régulateurs des autres populations T.

II.2.2. Origine et développement des nTregs CD4⁺CD25⁺

Les nTregs ont été identifiés en 1995 chez la souris [146] puis en 2001 chez l'homme [159, 160].

Les nTregs sont définis comme une sous-population de lymphocyte T CD4+ exprimant constitutivement et fortement la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R α),

CD25. Les nTregs CD4+CD25+ sont produits dans le thymus où ils deviennent matures avec l'expression d'un répertoire de récepteurs de cellules T (TCR) qui reconnaissent les antigènes du soi [161, 162].

Chez la souris, les nTregs qui migrent ensuite en périphérie représentent 5 à 10% des cellules T [133, 163]. Chez l'homme, environ 30% des lymphocytes T CD4+ sont CD25+, mais seuls les lymphocytes T CD4+ exprimant fortement la molécule CD25 (1-3% de lymphocytes T CD4+) ont une action suppressive [164, 165]. Chez l'homme, les nTregs se développent également dans le thymus, mais les étapes précises de leur développement sont peu connues.

Les nTregs sont fonctionnellement matures et spécialisés dans la suppression de la réponse immunitaire tant physiologique que pathologique, contribuant au maintien de la tolérance au soi et à l'homéostasie du système immunitaire [166, 167]. Ils peuvent inhiber l'activation et l'expansion des lymphocytes T autoréactifs. Chez les animaux naïfs, la déplétion de ces nTregs par thymectomie 3 jours après la naissance peut engendrer des maladies auto-immunes spécifiques d'organes, telles que la gastrite auto-immune, la thyroïdite, et le diabète de type I, alors que la reconstitution de cette population empêche le développement de ces maladies [146, 168]. De plus, il a été montré que, chez l'homme, une anomalie de cette population de cellules peut être la cause majeure de maladies auto-immunes et inflammatoires comme l'IPEX (syndrome of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) [169]. En plus de leur rôle dans le maintien de la tolérance au soi, les lymphocytes nTregs peuvent également contrôler la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales [159], des allergènes [170], des agents microbiens pathogènes de la flore commensale [171], des alloantigènes [172] et du fœtus au cours de la grossesse [173].

Toutefois, le marqueur CD25, étant exprimé par les lymphocytes T activés, n'est, tout comme les précédents, pas spécifique du compartiment régulateur. La quête pour un marqueur unique a donc continué et a permis de mettre en évidence l'expression d'autres marqueurs, tels CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) [116, 174], CD62L (L-selectin) [175], CD122, CD103 ($\alpha 4\beta 7$ integrin) [176] et les membres de la famille du récepteur de TNF tels que GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related gene) [177]. Cependant, ces derniers sont eux-aussi exprimés par les lymphocytes T conventionnels après activation.

En 2003, les nTregs ont été montrés exprimer de manière constitutive le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) [178, 179]. Ce fut une grande avancée dans la caractérisation de cette sous-population lymphocytaire. Foxp3 reste, aujourd'hui, un des marqueurs les plus fiables. La molécule Foxp3 joue un rôle critique dans le développement et la fonction de ces cellules [180] et est responsable de la fonction suppressive des Tregs. Cependant, chez l'homme, l'expression peut être induite également dans les lymphocytes T activés mais ces cellules ne possèdent pas de fonction suppressive [181], ce qui n'est pas le cas chez la souris où Foxp3 est exprimé de façon constitutive (également inductible pour les iTregss) avec une fonction suppressive avérée. Pour cette raison, l'identification des Tregs chez l'homme ne peut être basée sur la seule étude du phénotype. En 2006, deux groupes ont parallèlement mis en évidence que les Tregs CD4+CD25+Foxp3+ n'exprimaient que faiblement CD127, la chaîne α du récepteur de l'IL-7, alors que les lymphocytes T effecteurs activés (CD25+) ou non activés (CD25-) étaient CD127^{high} [182, 183]. Des analyses moléculaires par CHIP (puces à ADN) suggèrent que le promoteur du gène codant pour CD127 est une cible pour le facteur de transcription Foxp3. De plus la surexpression de Foxp3 chez une souris transgénique conduit à une population de cellules exprimant de manière homogène CD127^{low} et possédant des propriétés suppressives [182]. Les cellules T effectrices/mémoires et naïves CD4+CD25+CD127^{low} présentent toutes deux des propriétés suppressives lors de tests fonctionnels *in vitro* au contraire des cellules T CD4+CD25+CD127^{high} qui ne possèdent aucune activité suppressive. CD127 semble donc au final un très bon marqueur de surface permettant d'identifier et d'isoler en combinaison avec CD25 des populations pures de Tregs chez des individus sains ou bien chez des patients atteints de diabète de type 1 [182] pour des études *in vitro* ou pour d'éventuelles stratégies de thérapie cellulaire. Enfin, en 2007, le groupe de Sakaguchi a identifié chez la souris un nouveau marqueur de surface FR4 (*Folate Receptor 4*), un sous-type de récepteur à l'acide folique, exprimé fortement et constitutivement sur les Tregs CD4+CD25+CD127^{low}Foxp3+. Ce marqueur permet aussi de distinguer entre Tregs (CD4+CD25+FR4^{high}) et T conventionnels activés (CD4+CD25+FR4^{low}). L'élimination *in vivo* chez la souris des lymphocytes T CD4+FR4^{high} avec des anticorps déplétants conduit, suivant la dose administrée soit, à forte dose, au développement de pathologies auto-immunes soit, à faible dose, et si la souris porte une tumeur, à une régression de la masse ce qui n'est pas le cas à forte dose, ce qui suggère un effet dose dépendant [184]. De plus, la surexpression rétrovirale de Foxp3 dans des lymphocytes T CD4+ conduit à un phénotype FR4^{high} suggérant ainsi que Foxp3 contrôle le niveau d'expression de FR4 [184].

II.2.3. Rôle clé de Foxp3

Foxp3 a été identifié comme un facteur de transcription essentiel au développement et à la fonction des nTregs [180]. La transfection du gène FOXP3 dans les lymphocytes T CD4+CD25- peut les convertir en lymphocytes Tregs CD4+CD25+ en tous points identiques aux lymphocytes nTregs tant sur le plan phénotypique que fonctionnel [185].

Chez la souris, l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes nTregs commence à partir du stade double positif. Le rôle essentiel de Foxp3 a été découvert chez la souris Scurfy qui présente une mutation dans le gène FoxP3. Cette mutation était accompagnée d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun et d'un défaut en lymphocytes Tregs, qui a pour conséquence la mort de ces souris à l'âge de 3-4 semaines [186]. Chez les patients atteints de l'IPEX syndrome (immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome), des mutations du gène FOXP3 ont été retrouvées et suggérées être la cause majeure de ce syndrome [187, 188]. Chez ces patients, une variété de maladies auto-immunes spécifiques d'organe se développent, telles que le diabète de type 1, la thyroïdite, les MICI, la dermatite allergique, l'allergie alimentaire, des désordres hématologiques d'origine auto-immune [189], liées à un déficit en lymphocytes nTregs [113, 190].

Il a été mis en évidence, que l'activation des lymphocytes nTregs nécessitait une stimulation antigénique via le TCR. Cependant, ils répondent différemment des autres lymphocytes T, lors de l'engagement du TCR. Ceci est dû essentiellement à la modulation de la transduction du signal médiée par le gène FOXP3 [180]. Le facteur de transcription Foxp3 en effet peut moduler directement la transcription des gènes associés à l'activation et la fonction des lymphocytes T. Il a été montré que le gène FOXP3 se lie à un des membres de la famille Rel des facteurs de transcription, tels que NFAT (nuclear factor of activated T cells), et bloque son interaction avec NF- κ B et AP1 (activator protein 1). Cette association inhibe l'activation de ces facteurs, ce qui est essentiel pour la transcription des cytokines notamment l'IL-2, l'IL-4, l'IFN γ et le TNF α [111]. Au contraire, Foxp3 peut promouvoir la transcription de molécules associées aux lymphocytes Tregs: les molécules CD25, CTLA-4 et GITR [191]. D'autre part, FoxP3 a un effet indirect sur l'activation des lymphocytes T probablement *via* l'interaction d'autres molécules inhibitrices proches du TCR. Des études ont démontré une atténuation de la transduction du signal médié par le TCR dans les lymphocytes nTregs, tels que l'activation de la PLC γ (phospholipase C γ) et de la PKC (protein kinase C) [192]. Par ailleurs, FOXP3 peut également augmenter l'expression des molécules associées à la migration des lymphocytes Tregs dans les tissus inflammatoires, telles que CD103 [176] et CCR6 [193] (**Figure 12**).

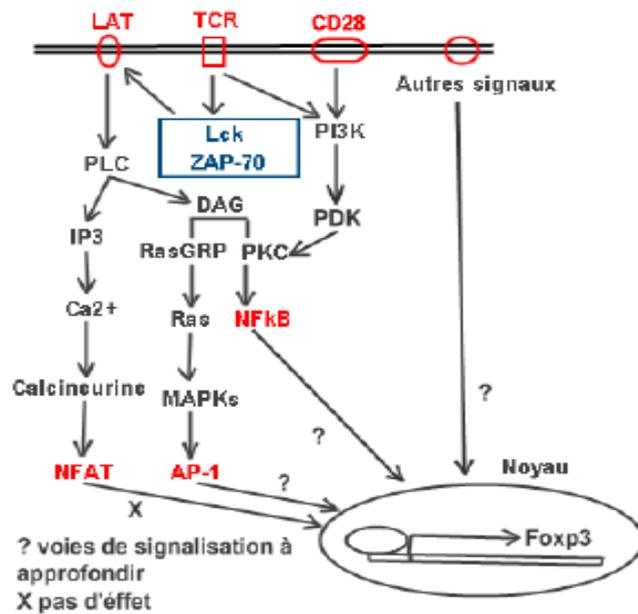


Figure 12 : Voies de signalisation en aval du TCR aboutissant à la synthèse de Foxp3 dans le lymphocyte T régulateur (modifiée d'après [194].

II.2.4. L'interleukine 2 : rôle essentiel dans le maintien des Tregs Foxp3+

L'interleukine 2 (IL-2) est une autre molécule essentielle pour le développement et la fonction des nTregs. Le marqueur CD25 des Tregs correspond à la chaîne α du récepteur à IL-2 (IL-2R) de haute affinité. Pendant longtemps l'IL-2 a été considérée comme étant une cytokine importante pour la prolifération et la différenciation des cellules T, en raison des effets sur la croissance des cellules T *in vitro*. Il a donc été surprenant de découvrir que les souris dépourvues d'IL-2 ne présentent pas de défauts graves dans la différenciation et la fonction des cellules T. Au lieu de cela, ces souris développent spontanément une lymphoprolifération fatale des lymphocytes T et des maladies inflammatoires auto-immunes ainsi qu'une hyperréactivité aux microbes commensaux [195, 196]. Les souris déficientes en CD25 ou CD122 (une autre composante du récepteur β de l'IL-2) succombent également aux mêmes symptômes, généralement appelés « syndrome de déficience en IL-2 ». Chez l'homme, une carence en CD25, s'accompagne de pathologies auto-immunes graves et d'allergie, indissociable de l'IPEX [197]. Des études suggèrent que le syndrome est dû à une carence ou un dysfonctionnement des Tregs Foxp3+.

- Premièrement, le nombre de Tregs Foxp3+ est réduit chez les souris dépourvues soit de CD25 ou d'IL-2 [198], et l'auto-immunité induite chez les souris CD25 déficientes peut être prévenue en leur inoculant des cellules T CD4+CD25+ naïves [195, 196].
- Deuxièmement, les cellules T spécifiques déficientes en STAT5a et b, qui médient la signalisation de la chaîne β de l'IL-2R au noyau, n'ont pas de développement des Tregs Foxp3+, et développent des maladies auto-immunes et [199, 200].
- Troisièmement, l'administration d'une dose élevée d'anticorps monoclonaux anti-IL-2 neutralisants à des souris néonatales normales réduit considérablement le nombre de cellules T CD4+CD25+Foxp3+ pour une période limitée et suscite des maladies auto-immunes similaires à celles observées en l'absence des Tregs [201]. De plus, l'IL-2 est nécessaire à l'expression soutenue de Foxp3 et de CD25 dans les Tregs naturels et améliore leur fonction suppressive, au moins *in vitro* [163, 202]. Bien que d'autres cytokines (IL-15, IL-7, IL-9, IL-21) contribuent également au développement et au maintien des Tregs, elles sont incapables de remplacer entièrement le rôle de l'IL-2 ou d'empêcher les syndromes liés à la déficience en IL-2 [202, 203].
- La principale source d'IL-2 est les cellules T activées, aussi il y a un rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire *via* l'IL-2, produite par les cellules T activées ce qui contribue au maintien, à l'expansion et à l'activation des lymphocytes T régulateurs naturels, ce qui limite l'expansion des cellules T conventionnelles non Tregs (**Figure 13**). La perturbation de cette boucle de rétrocontrôle médiée par l'IL-2 à toute étape favorise le développement de maladies auto-immunes et inflammatoires.

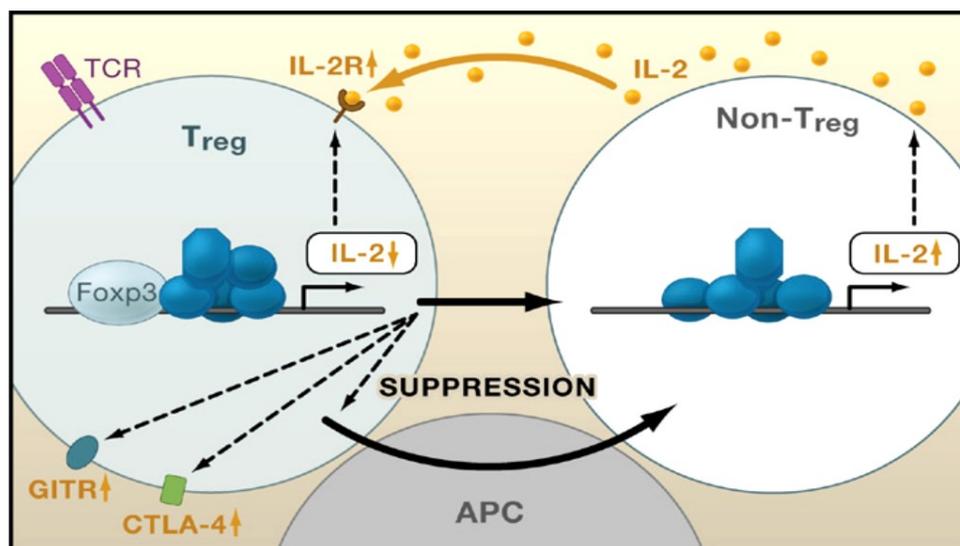


Figure 13 : Rôle clé de l'IL-2 dans l'homéostasie immunitaire[196].

II.2.5. Les lymphocytes T régulateurs naturels CD8+CD25+

Cosmi L et coll. ont identifié des lymphocytes Tregs CD8+CD25+ dans le thymus humain [204]. Ces cellules partagent plusieurs caractéristiques communes avec les lymphocytes nTregs tant phénotypiquement que fonctionnellement. Elles expriment les molécules FoxP3 et GITR à taux élevés. Plus précisément, sur le plan phénotypique, elles expriment constitutivement les molécules membranaires CCR8, TNF-R2, CTLA-4 et TGFβ membranaire. Les lymphocytes Tregs CD8+CD25+ sont anergiques aux stimuli allogéniques et peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes T autologues CD4+CD25- et CD8+CD25- induite par un antigène allogénique [205]. Cette suppression est dépendante de la concentration des lymphocytes T CD8+CD25+ et du contact cellulaire avec les lymphocytes. Lors de la stimulation par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, ils ne produisent pas de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IFNγ. Les mécanismes concernés dans cette suppression sont associés à l'expression de Foxp3, de CTLA-4 et de TGF-β. De plus, ils peuvent aussi induire une diminution d'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) des lymphocytes T effecteurs, et les rendre insensibles à l'IL2. Par ailleurs, l'effet de ces lymphocytes T CD8+CD25+ est restreint par les molécules CMH de classe I. Il a été suggéré que ces cellules jouent probablement un rôle important dans la régulation de l'immunité contre les virus et les cellules tumorales.

II.3. Les lymphocytes T régulateurs induits

Contrairement aux nTregs qui sont produits naturellement dans le thymus, d'autres Tregs peuvent être « induits », « adaptés » ou « convertis » à partir de cellules T naïves T CD4+ durant des processus inflammatoires dans les tissus périphériques ou générés expérimentalement à des fins thérapeutiques [206-208]. Ils ont pour rôle de contrôler les lymphocytes T naïfs auto-réactifs ayant échappé à la sélection thymique et régulent également *in vitro* les réponses immunes. La fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs induits semble passer par l'IL-10 et par leur capacité à réduire la production d'IL-2. Ils pourraient également diminuer l'expression des molécules du CMH et des molécules costimulatrices par les cellules présentatrices d'antigènes.

Il existe plusieurs populations de iTregs : les lymphocytes CD4+CD25+Foxp3+ ayant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles semblables aux nTregs, les Tr1, les Th3 et les Tregs CD8 .

D'autres populations lymphocytaires telles que les cellules T CD4-/CD8- double négatives [209, 210], une sous-population de lymphocytes T CD8 IL10+ [211], les cellules T gamma/delta [212], les cellules NKT [213] et enfin récemment certains lymphocytes B [9, 25] ont dans certaines circonstances un potentiel régulateur. Ces différents types cellulaires pourraient donc aussi jouer un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique.

II.3.1. Les iTregs CD4+CD25+Foxp3+

Les iTregs CD4+CD25+Foxp3+ ont des propriétés phénotypiques et fonctionnelles semblables aux nTregs [178, 214, 215]. Contrairement à ces derniers, les iTregs Foxp3+ sont générés en périphérie et à partir de cellules T naïves CD4+CD25- suite à l'engagement du TCR en présence de signaux dépendants de la voie STAT5, de l'expression de CTLA-4 [216] et d'un milieu cytokinique favorable contenant du TGF- β [214, 217, 218]. L'induction de iTregs Foxp3+ ne requiert qu'un faible signal TCR et est indépendante de la co-stimulation par CD28. Les iTregs expriment le facteur de transcription Foxp3 et la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), ainsi que GITR et des inhibiteurs de l'activation du TCR comme CTLA4 et PD-1.

Chez l'homme, il est possible d'induire, *in vitro*, l'expression de Foxp3 dans des cellules naïves périphériques CD4+CD25-Foxp3-, par stimulation du TCR en présence de TGF- β [219]. Ces cellules acquièrent le phénotype et la fonction des Tregs [214]. À la différence des nTregs, leur expression de Foxp3 est faible, instable et transitoire [172]. L'IL-2 facilite *in vitro* la conversion induite par le TGF- β [220], alors que l'IL-6 l'inhibe [221].

Chez la souris, l'induction et l'expansion des Tregs peuvent se faire *in vitro* par stimulation des cellules T CD4+CD25- en présence de TGF β ou d'acide rétinoïque (ATRA, pour all-trans retinoic acid) et, comme pour les nTregs, le transfert adoptif de ces cellules iTregs supprime les maladies autoimmunes [21, 222, 223]. Le TGF β ou l'ATRA peuvent également induire l'expression de Foxp3, après stimulation des cellules T naïves humaines (CD4+CD25-CD45RA+). Cette étude a montré que ces cellules exercent une activité suppressive [215, 224], mais d'autres études rapportent une fonction suppressive modeste voire nulle [225-227]. De même, l'équipe de Hippen et coll. a rapporté que la rapamycine (Rapa) augmente l'expression de Foxp3 TGF β -dépendante dans les cellules T naïves (CD4+CD25-CD45RA+) et les rend fortement suppressives [228, 229]. Les iTregs induits par le mélange Rapa/TGF β

expriment fortement CD25 à un niveau supérieur aux nTregs. Ceci est corrélé avec la présence de peu de cellules sécrétrices d'IL-2, d'IFN γ ou d'IL-17 [59].

L'induction des iTregs Foxp3⁺ peut être initiée *in vivo* par la présence d'antigènes lors d'infection chronique [230, 231]. En effet, lors de l'infection, les réactions inflammatoires sont souvent associées à des processus anti-inflammatoires, comme la production de TGF- β afin d'éviter les réactions délétères. Par ailleurs, certains agents pathogènes infectent des sites dans lesquels le TGF- β est abondant, comme le tractus gastro-intestinal, la peau et les yeux [232]. Le TGF- β peut également être produit par les cellules infectées ou des cellules qui sont en contact avec les microorganismes. Fait intéressant, chez l'homme à la suite d'une infection *par Plasmodium falciparum*, les réponses des cellules Tregs Foxp3⁺ ainsi que la production de TGF- β sont augmentées dans le sang périphérique en corrélation avec une augmentation du taux de croissance parasitaire [233].

De nombreuses équipes ont démontré que le GALT est un site préférentiel pour l'induction périphérique de cellules Foxp3⁺ [234-238]. Le rôle des cellules dendritiques locales dans le processus de conversion des cellules Foxp3⁻ en Foxp3⁺ a été défini. En présence de TGF- β exogène, les CD de la *lamina propria*, de l'intestin grêle, et des ganglions mésentériques induisent davantage l'expression de Foxp3 par les cellules T naïves que les CD de la rate [234, 235]. De même, les macrophages de la *lamina propria* peuvent efficacement induire des cellules T Foxp3⁺ [238]. De plus, les CD exprimant CD103⁺ peuvent induire des cellules T Foxp3⁺ en l'absence de toute facteur exogène [234, 235]. Ces iTregs Foxp3⁺ induits dans la muqueuse appartiennent au pool des Tregs qui circulent en périphérie (**Figure 14**). Les iTregs Foxp3⁺ jouent un rôle important dans la tolérance vis-à-vis de la flore commensale intestinale [207] et sont nécessaires non seulement pour la tolérance périphérique, mais aussi pour prévenir les maladies lymphoprolifératives en réponse à certains types d'infections chroniques [228, 239]. Ils jouent également un rôle dans le contrôle des maladies chroniques graves et dans l'inflammation allergique [240]. Cependant, ils agissent également comme des obstacles en empêchant l'élimination de microorganismes et de tumeurs [231, 241].

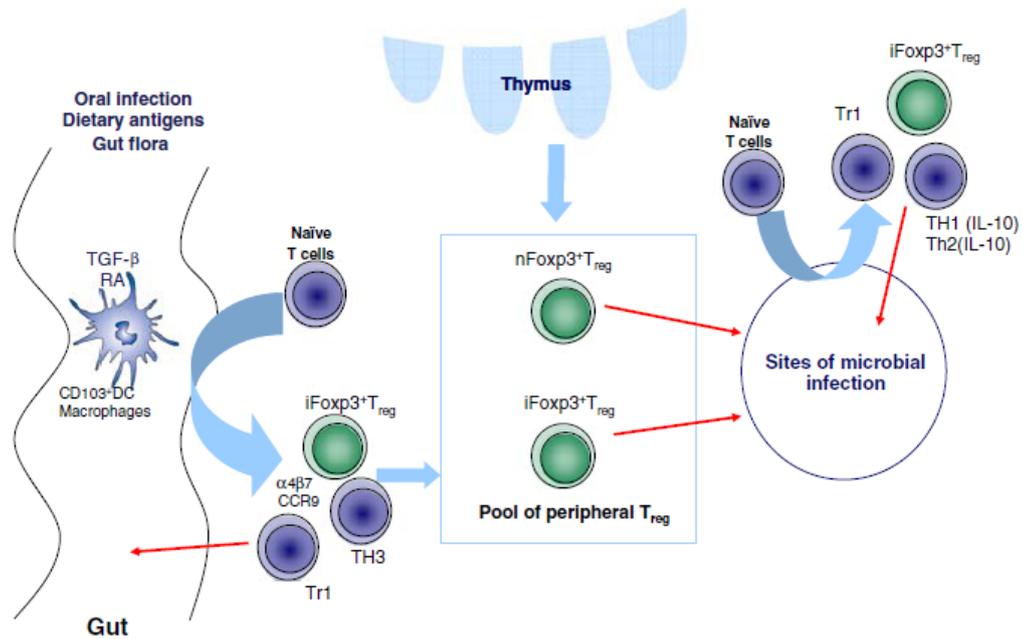


Figure 14 : Induction de lymphocytes T régulateurs durant l'infection (d'après [231]).

II.3.2. Les Tregs Tr1

Les lymphocytes T_{R1} (Interleukin-10 (IL-10)-secreting T regulatory type 1) sont des lymphocytes T $CD4^+$ produits *in vivo* ou *in vitro* en présence d'antigène et d'une forte concentration d'IL-10 [136, 172]. Leur développement semble également favorisé par l'IFN γ . Les T_{R1} sécrètent des cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF- β . Ces cellules peuvent également être distinguées des cellules Th1 et Th2, parce qu'elles produisent de faibles taux d'IL-2 et pas d'IL-4, ce qui les distingue des Th2. De plus, en fonction des conditions expérimentales, elles peuvent également sécréter des quantités élevées de TGF β et d'IL-5 et de faibles quantités d'IFN γ et d'IL-2 [242]. L'origine naturelle des cellules T_{R1} n'est pas clairement établie. Il semble que la présentation d'antigènes par des cellules dendritiques immatures pourrait favoriser leur développement. Contrairement aux Tregs $CD4^+CD25^+$ qui expriment de façon constitutive Foxp3. Les cellules T_{R1} , elles, ne l'expriment pas de façon constitutive mais lors de leur activation *in vitro*, Foxp3 peut être exprimé à des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ [243, 244]. Les Cellules T_{R1} n'ont aucun marqueur spécifique mis en évidence à ce jour mais sont Foxp3- $CD25^{low}$.

II.3.3. Les Tregs Th3

Les lymphocytes Th3 ont été découverts chez la souris lors d'une induction de tolérance orale vis-à-vis de la MBP (myelin basic protein). La plupart des lymphocytes T CD4+ spécifiques de la MBP sécrètent du TGF- β , mais ne sécrètent pas d'IL-2, ni d'IL-10, d'IL-13, ou d'IFN- γ . Ces cellules peuvent inhiber *in vivo* l'induction d'EAE (experimental autoimmune encephalitis) par la MBP [245, 246]. Les lymphocytes Th3 inhibent la prolifération et l'activation des lymphocytes T effecteurs. Cet effet est dépendant de TGF- β . Le fait que le TGF β puisse inhiber la réponse immunitaire *via* la modulation de plusieurs types de cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques montre que les lymphocytes Th3 sécrétant du TGF β peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'homéostasie des réponses immunitaires [247].

II.3.4. Les Tregs induits CD8+

Des Tregs CD8+ reconnaissant des peptides associés aux molécules du CMH de classe I et impliqués dans la protection contre l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) ont également été décrits [248]. Par ailleurs, dans l'intestin, des lymphocytes intraépithéliaux (IEL) ont été démontrés avoir des propriétés suppressives notamment les IEL TCR $\gamma\delta$ qui sécrètent du TGF β et les IEL CD8 $\alpha\alpha$ qui eux sécrètent de l'IL-10. Enfin, des CD8+ Tregs sont également présents dans la *lamina propria* intestinale [249].

A côté des cellules Tr1 CD4+, des Tregs Tr1 CD8+ produisant de l'IL-10 ont également été rapportés [172, 250, 251]. Ces cellules sont anergiques et suppriment les réponses prolifératives *via* l'IL-10 et peuvent être générées *in vitro* par stimulation des cellules T CD8+ naïves activées soit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes [250] ou par les cellules dendritiques myéloïdes sécrétrices d'IL-10 [251]. Dans ces études il a été montré que l'induction de ces Tr1 est IL-10 dépendant.

II.4. Importance de la balance Treg/Th17

La découverte des facteurs impliqués dans la différenciation des lymphocytes Tregs et Th17 suggère l'existence d'une balance critique, gouvernée par l'IL-6, entre les lymphocytes Tregs et Th17 (**Figure 15**). Les lymphocytes Tregss permettent une protection lors de

nombreuses réactions auto-immunes. Cependant, la production d'IL-6 pendant les réactions inflammatoires induit des lymphocytes Tregs non fonctionnels et la génération de lymphocytes proinflammatoires [252]. Ainsi, des lymphocytes Tregs spécifiques de la myéline migrent dans le système nerveux central durant le développement de l'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis ou encéphalomyélite expérimentale auto-immune déjà citée, modèle murin de sclérose en plaques) mais sont incapables d'inhiber l'inflammation, conduisant inexorablement à la progression de la maladie. En effet, l'IL-6 et le TNF α , produits lors de l'inflammation par les cellules Th17, interfèrent avec les lymphocytes Tregs [252]. Ceci soulève la question de l'efficacité des stratégies d'immunothérapie chez des patients atteints de maladies auto-immunes inflammatoires basées sur le transfert adoptif de lymphocytes Tregs dans le but de réguler l'inflammation. Les lymphocytes Tr1 pourraient représenter une alternative au problème de régulation des lymphocytes Th17. En effet, les lymphocytes Tr1, de part leur production d'IL-10, sont importants dans la régulation de l'inflammation, notamment dans les maladies auto-immunes [253]. L'IL-10 est une puissante cytokine anti-inflammatoire qui neutralise les réponses Th1 en inhibant la production d'IFN γ et la présentation antigénique [55]. La déficience en IL-10 conduit à des colites spontanées dues à une activation excessive des CD et des voies de signalisation des toll-like receptors [254] mais aussi à sa capacité à inhiber la génération des lymphocytes Th17. De plus, les lymphocytes Tr1 étant générés en présence d'IL-27, une déficience en récepteur pour l'IL-27 (aussi appelé WSX-1) chez des souris conduit à une sévère EAE associée à une augmentation du nombre de lymphocytes Th17 [255]. En conclusion, bien que l'IL-27 inhibe la génération des lymphocytes Tregs FOXP3+ induits par le TGF β , elle permet la différenciation des lymphocytes Tr1 qui, via la production d'IL-10, vont permettre une protection contre l'EAE [256]. Ces observations indiquent un rôle crucial des lymphocytes Tr1 dans le maintien de la tolérance au soi, ces lymphocytes Tr1 pourraient donc représenter un outil important en immunothérapie.

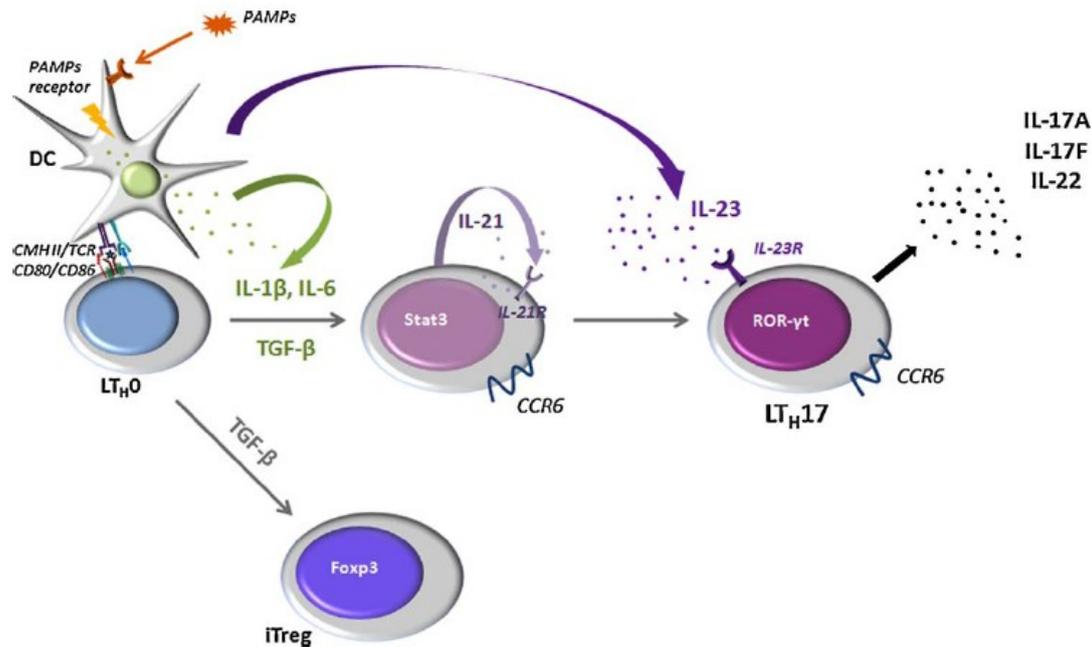


Figure 15 : La différenciation des Th17 et la dichotomie Treg/Th17 [257].

II.5. Activité suppressive et mécanismes d'action des T régulateurs naturels

Trouver « Le » mécanisme d'action des Tregs a été un aussi grand challenge durant les dix dernières années que celui de l'identification d'un marqueur spécifique. Cependant après avoir abordé cette question par de multiples systèmes expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, il ne semble pas qu'il y ait un mécanisme d'action principal, mais plusieurs mécanismes d'action différents mis en place suivant le contexte et la fonction cellulaire régulée (prolifération, production de cytokines...). Il est de plus imaginable que, *in vivo*, la régulation s'opère différemment suivant le type de réponse immunitaire à réguler et utilise des combinaisons de plusieurs mécanismes (**Figure 16**).

Il y a maintenant une accumulation d'évidences montrant que les Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ naturels inhibent l'activation et/ou l'expansion de différentes cellules immunitaires. Il a tout d'abord été montré par Sakaguchi *et al.* que les Tregs inhibaient *in vivo* l'activation et l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs. En effet, la déplétion en Tregs conduit au développement de pathologies auto-immunes T CD4⁺ dépendantes pouvant être corrigées par transfert adoptif de Tregs [146]. Depuis cette approche expérimentale a été étendue à de nombreux modèles de pathologies auto-immunes chez la souris [147]. Des études *in vitro* ont montré que les Tregs supprimaient efficacement l'activation, prolifération et/ou production de cytokines de lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ aussi bien dans des systèmes avec des CPA que dans des systèmes sans CPA, avec des stimulations polyclonales de type

CD3/CD28 [173, 258-260]. *In vivo*, il a été récemment observé par des approches de microscopie biphotonique intravivale que les Tregs peuvent bloquer l'exocytose des granules lytiques des CTL [261]. Les Tregs sont également capables d'inhiber les lymphocytes B à plusieurs niveaux. Ils peuvent inhiber leur prolifération, la production d'immunoglobulines ainsi que la commutation isotypique [166, 262]. L'aptitude des Tregs à inhiber les cellules NK (*Natural Killer*) et les cellules NKT (*Natural Killer T*) a été également documentée [263, 264]. Les Tregs peuvent également moduler la maturation des DC [265]. La suppression induite par les Tregs peut se faire sur des cellules T naïves, effectrices ou bien mémoires. Cependant leur potentiel régulateur sur l'activation ou bien la réponse proliférative est plus efficace sur des populations lymphocytaires T naïves [266, 267]. Ce chapitre aura pour but d'évoquer de façon non exhaustive les différents mécanismes de suppression connus à ce jour à que sont : la suppression par contact direct ou cytolyse, la suppression par production de cytokines, la suppression par privation de cytokines et enfin la suppression *via* les cellules présentatrices d'antigènes notamment les cellules dendritiques (**Figure 16**).

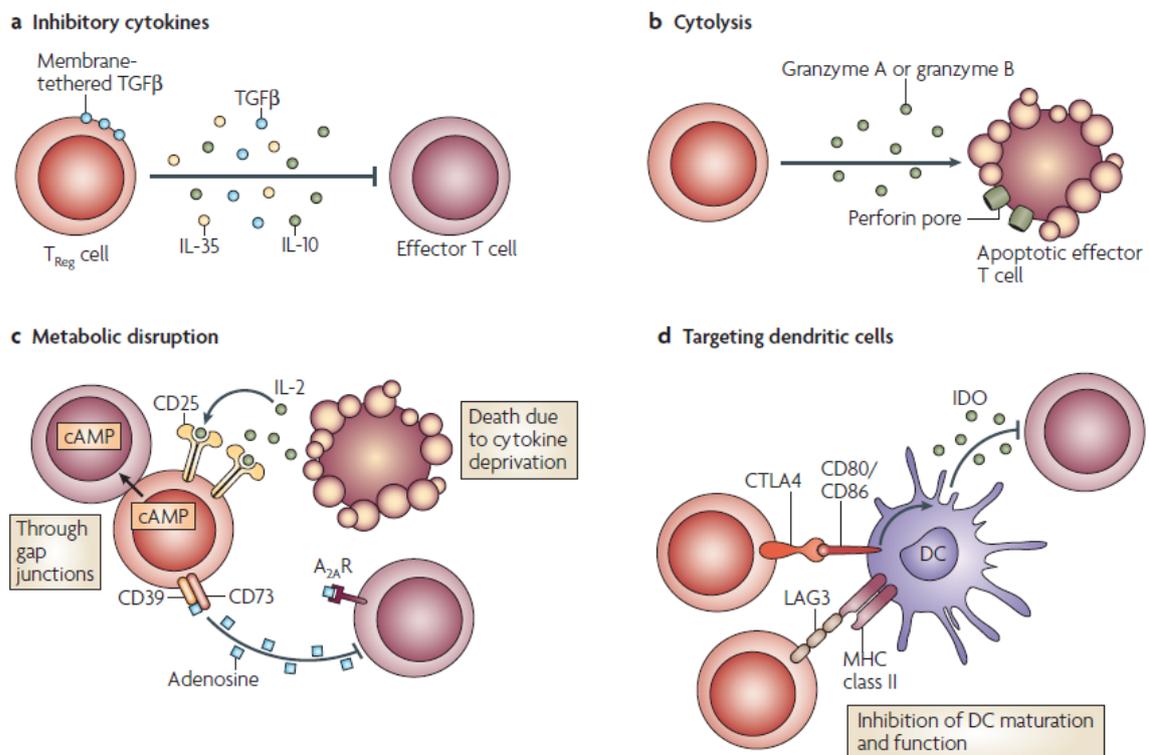


Figure 16 : les différents mécanismes de suppression (D'après Dario, 2009)

II.5.1 Mécanisme de suppression par contact direct : cytolyse

L'expression de granzymes par les lymphocytes T régulateurs humains activés avait soulevé l'hypothèse d'une cytotoxicité directe des Tregs vis-à-vis des cellules effectrices [268]. Une lyse dépendante de la perforine a pu être démontrée vis-à-vis de lymphocytes T CD4 et CD8 humains [268]. Chez la souris, l'équipe de Ley a pu éclaircir l'apparent paradoxe d'une immunité tumorale plus efficace chez les animaux déficients en granzyme B, en montrant que les Tregs du micro-environnement tumoral sont capables de lyser des cellules CD8+ et les cellules natural killer [269]. En outre, plusieurs études ont établi une cytotoxicité des Tregs envers les lymphocytes B, avec lesquels ils interagissent en tant que CPA, soit par la voie perforine/granzyme [270], soit par l'interaction Fas/FasL [271].

Bien qu'à ce jour, la majorité des recherches concernant l'apoptose induite par les Tregs se focalisent sur les mécanismes médiés par le granzyme B, une étude récente a suggéré que les Tregs activés induisaient l'apoptose des lymphocytes T effecteurs par la voie TRAIL-DR5 (tumeur-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand–death receptor 5) [85].

Par ailleurs, la galectine-1 (aussi connue sous le nom de LGALS1), qui peut induire l'apoptose des lymphocytes T, a été montrée être surexprimée dans les Tregs chez la souris et chez l'homme. De plus les cellules Tregs galectine-1 déficiente ont une activité suppressive diminuée *in vitro* [85].

II.5.2 Mécanisme de suppression par production de cytokines

Le mécanisme d'action par contact cellulaire pourrait faire penser que la sécrétion de cytokines par les Tregs n'intervient pas dans leurs propriétés immunosuppressives. Il est vrai qu'*in vitro*, l'utilisation d'anticorps bloquant anti-IL-10 et/ou anti-TFG- β n'altère nullement leurs fonctions [147, 272, 273]. Pourtant, *in vivo*, de nombreuses données ont clairement démontré le contraire. Ainsi l'IL-10 est requise dans le contrôle de la colite par les Tregs CD4+CD25+CD45RB^{low}. En effet, des Tregs isolés à partir de souris IL10-/- ne peuvent pas prévenir cette pathologie [98]. De plus, Kingsley *et al.* ont montré que l'IL-10 était impliquée dans l'inhibition par les Tregs du rejet de greffe de peau, l'administration d'anticorps anti-IL-10 bloquants accélérant le rejet [102]. Il a récemment été observé que les Tregs infiltrant la *lamina propria* intestinale ou le système nerveux central peuvent respectivement inhiber le développement de la colite et de l'EAE par une sécrétion locale d'IL-10. De plus, après analyse des différents pools de Tregs, il apparaît que les Tregs

infiltrant l'intestin produisent de l'IL-10 au contraire des Tregs spléniques, ces données suggérant peut-être que l'environnement influence le profil de sécrétion des Tregs et les fonctions effectrices suppressives mises en place [274, 275]. Les premières cibles de l'IL-10 sont les cellules myéloïdes dont elle restreint l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des molécules de CMH de classe II et de co-stimulation [276]. Une partie de l'effet de l'IL-10 pourrait également découler de l'induction de lymphocytes Tr1 ou de cellules dendritiques tolérogènes, cellules qui amplifieraient la suppression en produisant elles-mêmes cette cytokine [277, 278]. Il faut toutefois remarquer que chez l'homme, par opposition à ses propriétés immunosuppressives, l'IL-10 a un effet stimulant sur la prolifération et la cytotoxicité des LT CD8+ activés par un anti-CD3 en présence de faibles doses d'IL-2 [279].

L'autre cytokine immunosuppressive majeure est le TGF- β , et une part importante de l'action des Tregs lui est attribuée. Le TGF- β intervient entre autres sur la maturation des cellules dendritiques [280], la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4+, en particulier les lymphocytes Th17 [110, 221, 281, 282] et des lymphocytes B [283, 284], ou encore sur les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ [285] et des cellules NK [264]. Une propriété non négligeable est de participer à la génération de novo de Tregs à partir de lymphocytes T CD4+Foxp3- [214, 246]. A la sécrétion de TGF- β par les Tregs pourrait venir s'ajouter celle induite chez les cellules dendritiques de manière à créer un microenvironnement tolérogène. Ainsi, dans le modèle de la colite, l'expression d'un dominant négatif du récepteur TGF- β RII par les lymphocytes T CD4+ colitogènes a montré que ceux-ci doivent être sensibles au TGF- β pour être inhibés. L'origine du TGF- β est encore aujourd'hui controversée. Ainsi, dans le même modèle de colite, l'équipe de Powrie a montré que cette cytokine n'était pas produite par les cellules T régulatrices [286] alors qu'à l'inverse, le groupe de Flavell a montré qu'elles étaient à l'origine de cette production [287]. En s'appuyant sur des marquages en cytométrie, Nakamura et al. ont émis l'hypothèse que le TGF- β produit se retrouverait adsorbé à la surface et serait délivré à la cellule cible par contact [288]. Ce concept est étayé par le fait que le TGF- β soit sécrété sous une forme inactive qui doit être clivée pour acquérir son activité biologique. Il a été récemment découvert que l'intégrine $\alpha\beta$ 8 joue ce rôle dans les cellules dendritiques [115]. Dans les Tregs, la molécule équivalente a été identifiée comme la furine.

Une nouvelle cytokine immuno-suppressive est venue, il y a peu, rejoindre l'IL-10 et le TGF- β : l'IL-35 [289]. Composée de deux chaînes, IL-12 α et IL-27 β , son expression semble spécifique aux Tregs, car l'IL-27 β est régulée par Foxp3. En son absence, les Tregs sont inefficaces à endiguer la prolifération de lymphocytes T transférés chez un animal immunodéficient, comme ils échouent à protéger du développement de la colite. Par ailleurs, elle est la seule cytokine dont le défaut a une influence sur leur capacité à inhiber la prolifération des cellules CD4+ *in vitro*.

II.5.3. Privation des cytokines de survie

On a longtemps cru que l'inhibition de la prolifération s'expliquait par une inhibition de la transcription d'IL-2 par les lymphocytes effecteurs [258]. Les travaux de Pandiyan et coll ont proposé une autre hypothèse, déjà proposée en 2004 [290]: le concept de privation du micro-environnement. Ils ont réussi à montrer que la présence de Tregs dans les co-cultures induisait une diminution de la concentration en IL-2, mais contrairement à ce qui était auparavant avancé, ils n'ont pas observé de diminution de la transcription [291]. Ils ont donc proposé que la privation en IL-2 qui consiste en une 'consommation' de l'IL-2 environnementale par les Tregs exprimant fortement CD25, mais aussi d'IL-7 induirait l'apoptose des cellules effectrices par une voie dépendante du facteur pro-apoptotique Bim [85, 258, 292], l'IL-2 étant nécessaire à la survie des lymphocytes T effecteurs. De plus, les Tregs sont impuissants à contrôler une colite induite par des lymphocytes T colitogènes déficients pour Bim. L'induction de l'apoptose des cellules effectrices pourrait aussi se faire par libération d'AMPc. La coexpression des ectoenzymes CD39 et CD73 (peptidases) par les Tregs permet la transformation de l'ATP en AMPc. L'AMPc en se fixant sur le récepteur à la surface des cellules T effectrices et des CPA induit un signal anti-inflammatoire et pro-apoptotique [293].

II.5.4. Suppression via les cellules présentatrices d'antigène : cellules dendritiques

En plus de l'effet direct des Treg sur la fonction des lymphocytes T, les lymphocytes T régulateurs pourrait également moduler la maturation et/ou la fonction des cellules dendritiques, requises pour l'activation des cellules T naïves. Bien que ce soit une hypothèse intéressante, les données à l'appui de cette théorie sont limitées [294]. Différentes expériences utilisant des « transwell » ont clairement établi que le contact cellulaire était indispensable entre les Tregs et les cellules effectrices pour que l'inhibition

de la prolifération puisse avoir lieu [258, 272]. Cependant, l'expression constitutive par les Tregs d'une molécule inhibitrice de l'activation T comme CTLA-4 ou LAG3 ne pouvait qu'attirer l'attention des chercheurs, d'autant que ses ligands, CD80 et CD86 (ligands de CTLA-4) sont exprimés par les cellules dendritiques

II.5.4.1. CTLA-4

La molécule CTLA-4 est constitutivement exprimée par les lymphocytes nTregs. Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la molécule CTLA-4 joue un rôle important dans la suppression médiée par ces cellules. Le blocage de CTLA-4 chez la souris naïve induit le développement de maladies auto-immunes spécifiques d'organe ressemblant à l'effet observé lors de la déplétion de lymphocytes nTregs [167]. L'anticorps neutralisant l'action de la molécule CTLA-4 peut abroger l'activité protectrice des lymphocytes Tregs CD4+CD25+, favorisant le développement du diabète chez la souris prédisposée au diabète de type 1 (T1D) [174, 295]. Les mécanismes médiés par la molécule CTLA-4 agissent probablement par plusieurs voies:

➤ L'interaction de CTLA-4 avec les molécules CD80/CD86 sur les CPAs pourrait transmettre un signal suppresseur dans les lymphocytes nTregs [116].

➤ Via IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) : la liaison avec les molécules CD80/CD86 stimule l'expression d'IDO dans les CD, qui à leur tour inhibent l'activité ou induisent l'apoptose des lymphocytes T effecteurs *via* la dégradation du tryptophane [296, 297]. L'IDO peut aussi induire la transformation de lymphocytes T CD4+CD25⁻ en lymphocytes Tregs CD4+CD25⁺ [298].

Par ailleurs, il a été rapporté que la molécule CTLA-4 induisait aussi l'expression de la molécule LFA-1, qui favorise l'interaction entre les lymphocytes Tregs et les CPA ou les lymphocytes T effecteurs [299].

II.5.4.2. LAG3

La molécule LAG3 est une molécule d'adhésion qui est exprimée par les lymphocytes nTregs lors de l'activation et peut se lier aux molécules du CMH-II. Les anticorps anti-LAG3 peuvent abroger l'effet suppresseur des lymphocytes nTregs [300].

II.6. Fonctions physiologiques et physiopathologiques

II.6.1.Généralités

Le potentiel immunosuppresseur des Tregs joue un rôle majeur dans la régulation des réponses immunes. Toutefois, selon le processus pathologique impliqué, leur rôle pourra être bénéfique, comme lors de la prévention de l'auto-immunité, de l'inflammation ou la tolérance foeto-maternelle, ou au contraire fortement délétère lors d'une réponse anti-tumorale (**Figure 17**).

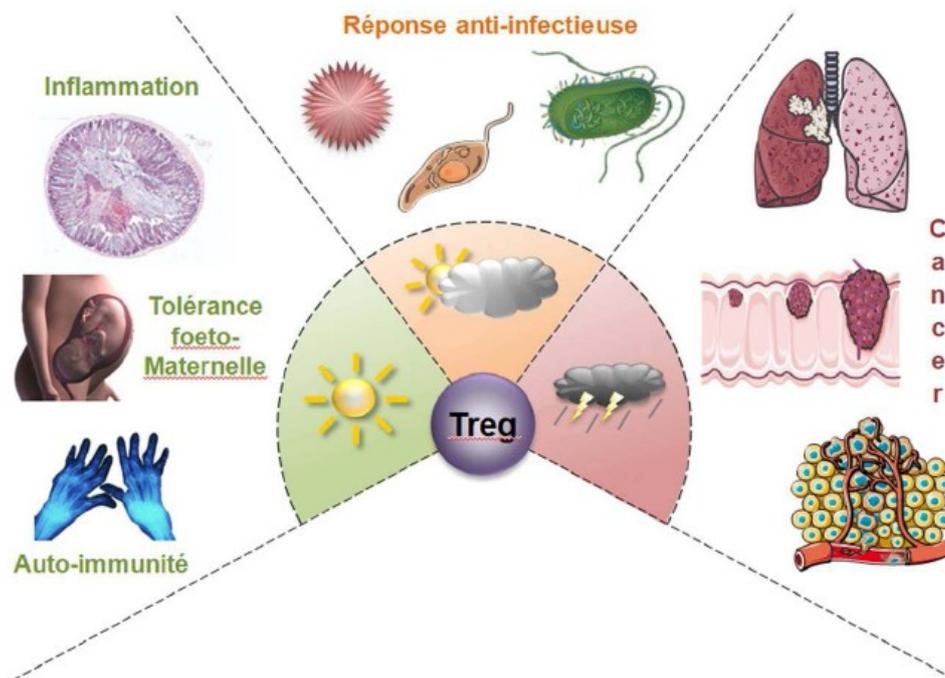


Figure 17 : Rôle bénéfique ou délétère des Tregs dans les processus physiopathologiques

II.6.2. Modulation des réponses anti-infectieuses

Lors d'une réponse immunitaire anti-infectieuse, le système immunitaire met en place différents mécanismes effecteurs : la production de cytokines pro-inflammatoires, la production de chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires sur le lieu de l'infection et finalement l'activation de cellules cytotoxiques comme les CTL et les NK qui vont pouvoir lyser les cellules infectées. Bien que ces mécanismes soient cruciaux pour limiter la propagation de l'agent pathogène dans l'organisme ainsi que pour éliminer le pathogène de l'organisme, ils doivent être drastiquement contrôlés afin d'éviter tout risque d'hyper-inflammation et de dommages tissulaires collatéraux. En effet, il est possible que lors de la réponse immunitaire adaptative contre les antigènes du pathogène, il y ait

génération d'une réaction immunitaire dite croisée ou « *cross-réactive* » contre des antigènes du soi aboutissant alors au développement de pathologies auto-immunes. C'est pour pallier à cela que le système immunitaire a développé des mécanismes suppresseurs afin de préserver l'homéostasie de l'organisme. Il a tout d'abord été décrit des mécanismes de régulation consistant en la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée. Plus récemment, l'implication de l'immunité adaptative a été largement documentée dans différents modèles infectieux avec le rôle capital que jouent les Tregs Foxp3+ [301]. La plupart des infections où les Tregs ont un rôle protecteur important sont des cas d'infections chroniques [302]. L'isolement de Tregs à partir de patients atteints d'une infection chronique par *Helicobacter pylori*, montre que ces cellules régulatrices sont capables d'inhiber des réponses cellulaires T spécifiques des antigènes bactériens mais pas des réponses cellulaires T spécifiques d'autres antigènes [303]. Un exemple bien documenté à ce jour est le cas de l'infection par *Helicobacter hepaticus* qui est responsable chez la souris d'inflammation intestinale. Le transfert de cellules T CD4+ isolées à partir d'une souris IL-10-/- infectée par *Helicobacter hepaticus* dans une souris RAG-/- infectée par cette même bactérie va permettre un excellent contrôle de l'infection, mais cela va également augmenter l'inflammation intestinale et induire l'apparition d'une colite inflammatoire. Le transfert de lymphocytes T CD4+ totaux isolés à partir d'une souris sauvage infectée par *Helicobacter hepaticus* dans une souris RAG-/- également infectée par la même bactérie va permettre d'induire une réponse immunitaire contre le pathogène moins importante, mais en évitant le développement de la colite. Les auteurs de ce travail ont donc montré l'importance de la génération d'un pool de Tregs antigène spécifiques qui va moduler la réponse immunitaire anti-bactérienne *via* un mécanisme dépendant de l'IL-10 [304]. Toutefois, le revers de la médaille est que certains pathogènes utilisent en leur faveur cette immunorégulation afin de restreindre la réponse immune. C'est le cas des infections dues à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Leishmania major*, au virus de l'hépatite Cat au virus de l'herpès [302].

II.6.3. Lymphocytes T régulateurs et Vaccination

Les différentes fonctions imputées aux Tregs ont conduit de nombreuses équipes à développer des modèles expérimentaux de thérapie cellulaire reposant sur l'utilisation de leurs capacités immunosuppressives. Influencer l'activité des Tregs est également envisagé dans le cadre de nouvelles approches vaccinales: les Tregs peuvent en effet moduler l'intensité de la réponse secondaire, et donc compromettre l'efficacité d'un vaccin.

Différentes expériences ont donc évalué l'effet d'une inhibition des Tregs au moment de l'inoculation sur la réponse mémoire. Ainsi une amélioration de l'efficacité a été obtenue par cette approche dans un modèle murin de malaria, avec un meilleur contrôle du parasite lors de la seconde infection et une extension de la réponse à des épitopes sous-dominants [305]. L'effet bénéfique de la déplétion est observé sur une large variété de stratégies vaccinales et d'antigènes du soi et du non-soi. L'importance du contrôle des populations régulatrices dans le cadre de la vaccination pourrait par ailleurs se justifier par le fait que l'exposition à un antigène dans des conditions sub-optimales de présentation peut mener à la conversion de LT CD4+ en Tregs. Ainsi la vaccination dans certaines situations pourrait être génératrice de Tregs. Des études ont montré que la vaccination contre l'antigène de *Leishmania. major*, LACK, en l'absence d'adjuvant favorisait l'apparition de cellules Tr1, ce qui en provoquait l'échec [306]. Dans le cas de la vaccination contre le BCG chez les adultes, il a été montré que la faible protection serait due à l'induction de Tregs, qui lors du rappel compromettent l'efficacité de la vaccination [307]. Ceci pose donc un véritable problème, de ce fait différentes stratégies ont été poursuivies pour contourner l'activité des Tregs durant l'immunisation, mais le manque d'outils spécifiques pour leur étude a conduit parfois à des conclusions controversées. Ainsi la neutralisation des cellules régulatrices ou l'ajout d'adjuvant pour stimuler les réponses immunes pourraient résoudre le problème. Cependant certains adjuvants peuvent induire des Tregs lors de la vaccination (**Voir revue**). Ainsi une meilleure compréhension de l'effet de ces adjuvants lors de la vaccination, en particulier leurs effets sur les lymphocytes T régulateurs permettrait d'améliorer les stratégies vaccinales.

CHAPITRE IV :
LES ADJUVANTS D'IMMUNISATION MUQUEUSE

I. AVANTAGES DE LA VACCINATION PAR VOIE MUQUEUSE

L'enjeu de la vaccination muqueuse est d'induire une barrière immunitaire muqueuse adaptée au pathogène, constituée d'IgA sécrétoires neutralisantes et/ou de lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Les anticorps sécrétoires pourront ainsi bloquer la colonisation de l'épithélium muqueux par des bactéries invasives, ou empêcher l'attachement de toxines microbiennes sur les cellules épithéliales, les lymphocytes T cytotoxiques pourront éliminer les cellules infectées et empêcher la multiplication microbienne.

Alors que les vaccins administrables par voie parentérale stimulent principalement des réponses systémiques, les vaccins administrés par voie muqueuse miment la réponse immunitaire à une infection naturelle et peuvent ainsi conduire à des réponses muqueuses et systémiques efficaces [308]. L'administration par voie muqueuse offre en outre plusieurs avantages par rapport à l'immunisation parentérale. D'une part, elle pourrait minimiser les effets secondaires en évitant le contact direct avec la circulation systémique. D'autre part, l'administration par voie muqueuse réduit également le besoin en personnel spécialisé requis pour l'administration d'injections et permet d'éviter l'utilisation de seringues. Et enfin, la vaccination contre de multiples maladies devient de plus en plus complexe, à moins de pouvoir les associer. L'administration de vaccins associés serait plus aisée par voie muqueuse et permettrait de réduire le nombre de vaccins injectés par voie parentérale. En conséquence les vaccins administrables par voie muqueuse sont particulièrement appropriés pour des programmes d'immunisation massive, ciblant entre autres les enfants en bas âge.

L'une des particularités de la vaccination au niveau des muqueuses vient du fait que les muqueuses sont hautement compartimentalisées. Des études sur la compartimentalisation **(Figure 18)** [309-312] des réponses immunitaires révèlent qu'une immunisation par voie orale, peut induire une forte réponse anticorps au niveau de l'intestin grêle proximal, du colon ascendant, des glandes mammaires et salivaires, mais cette réponse est faible dans les segments distaux du gros intestin ou dans les sécrétions génitales. L'immunisation intranasale quant à elle, peut induire une réponse au niveau des muqueuses respiratoires et dans les sécrétions régionales telles que les sécrétions nasales et salivaires et dans l'intestin mais aussi au niveau vaginal. Ainsi, chez la femme, pour prévenir la transmission des infections sexuelles, l'immunisation vaginale de même que l'immunisation intra-nasale peuvent induire une réponse anticorps IgA et IgG dans les sécrétions cervico-vaginales [313].

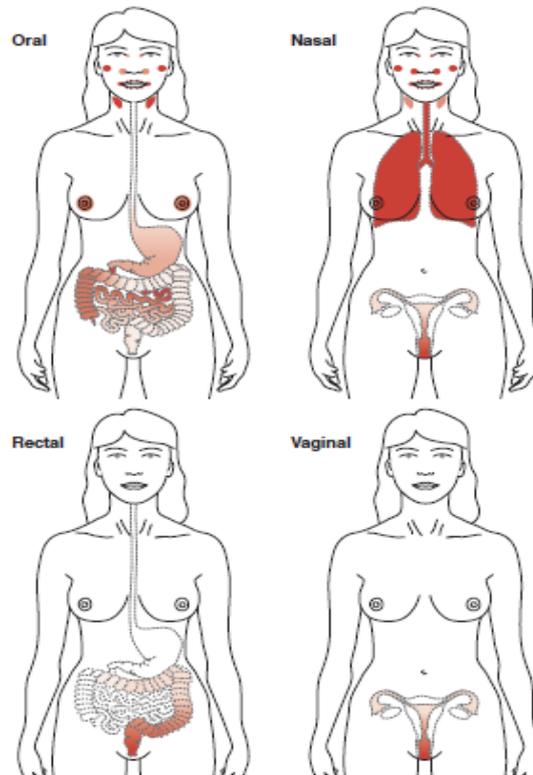


Figure 18 : Modèle de homing des lymphocytes depuis les sites inducteurs du système immunitaire vers les tissus cibles. Le recrutement des cellules lymphoïdes vers les tissus cibles nécessite l'expression de chimiokines et d'adressines ainsi que leurs récepteurs respectifs [310].

Les antigènes de l'environnement inhalés ou ingérés sont généralement peu immunogènes et déclenchent plutôt une tolérance qui évite les lésions inflammatoires néfastes pour les muqueuses [144, 314]. Un adjuvant est une molécule qui, lorsqu'elle est co-administrée avec l'antigène, est capable d'induire une réponse immunitaire plus rapide, plus intense et généralement de plus longue durée.

Différents adjuvants ont été testés pour la vaccination muqueuse, notamment des dérivés bactériens comme le monophosphoryl lipide A (MLA, dérivé du lipopolysaccharide) [315], les oligodéoxynucléotides synthétiques (ODN) contenant des motifs dinucléotides CpG non méthylés [316, 317] et certaines toxines bactériennes et leurs dérivés.

Les toxines bactériennes comme la toxine du choléra (CT) et l'entérotoxine thermolabile d'*Echerichia coli* (LT) sont des adjuvants puissants du système immunitaire muqueux. Divers travaux ont montré que leur administration chez l'animal, par différentes voies muqueuses, avec différents antigènes, permettait d'induire des réponses immunitaires fortes [318].

II. LES ADJUVANTS DE LA FAMILLE DE LA TOXINE DU CHOLERA

Cette famille est divisée en deux sous-familles en fonction de caractéristiques génétiques, biochimiques et immunologiques [319]. Le type I comprend la toxine du choléra (CT) de *Vibrio cholerae* et l'entérotoxine thermolabile LT-I (souvent appelée LT) de *Escherichia coli*, [319]. Le type II comprend les enterotoxines LT-IIa et LT-IIb de *E. coli* [320].

Elles appartiennent aux toxines bactériennes de classe AB₅ qui sont constituées d'une sous-unité A porteuse de l'activité enzymatique et de cinq sous-unités B responsables de la fixation aux cellules (**Figure 19**) (**Table 1**). La CT et la LTI présentent de fortes parentés structurales et fonctionnelles avec 80% d'homologie de séquence en acides aminés (AA) [321].

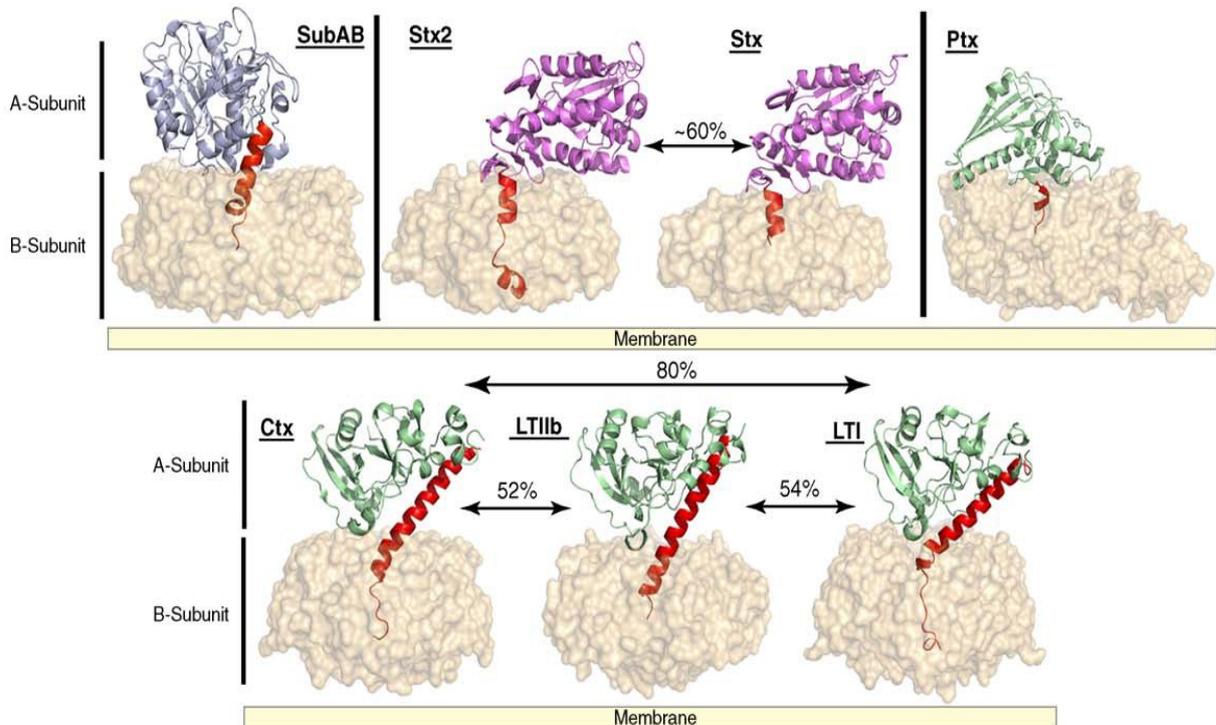


Figure 19 : Famille des toxines à structure AB₅ comprenant : (i) la cytotoxine subtilase (SubAB) produite par une souche de STEC (Shiga-like toxin producing *E. coli*) ; (ii) la toxine Shiga produite par certaines souches d'*E. coli* (Stx2) et de *Shigella dysenteria* (Stx) ; (iii) la toxine pertussique (Ptx) ; (iv) la toxine du choléra et l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* (Ctx, LTI et LTIIb) (modifié d'après Odumoso, 2010 [322]).

	Sous-unité A	Sous-unité B	Activité enzymatique	Cible	Récepteur
CT	A1 : 22kDa A2 : 5kDa	(x5) 10.6kDa	ADP-ribosyl Transférerase	Adénylate cyclase Protéine-G ($G_{5\alpha}$)	Ganglioside GM1
LT	A1 : 22kDa A2 : 5kDa	(x5) 11.6kDa	ADP-ribosyl Transférerase	Protéine-G ($G_{5\alpha}$)	Ganglioside GM1, GM2 Asialoganglioside GD1a, GD1a

Tableau 1 : Structure et activité enzymatique de la toxine du choléra (CT) et de l'entérotoxine thermolabile d'E. coli (LT) (modifié d'après Odumosu, 2010 [322]).

II.1. Les toxines entières : structure, effet toxique

II.1.1. Structure de la toxine du choléra

La CT se compose d'une sous-unité A (CTA) d'environ 27 kDa et d'une sous-unité B pentamérique (CTB) d'environ 10,6 kDa par monomère [323] (**Figure20**). En 1975, La sous-unité A de la CT a été montrée composée de deux sous-unités CTA1 et CTA2 liées par un pont disulfure. Le fragment CTA1 est responsable de la toxicité du fait d'une activité enzymatique ADP-ribosyl transférase [324]. Le fragment CTA2 est responsable de l'intégration du fragment CTA1 dans le centre de l'anneau formé par la sous-unité pentamérique B [325]. En outre, la sous-unité CTB, maintenue par un ensemble de liaisons hydrogène et de ponts disulfures se lie au ganglioside GM1 [Gal (β 1-3) GalNAc (β 1-4) (NeuA-c (α 2-3) Gal (β 14) Glc] \rightarrow céramide présent sur la membrane de toutes les types cellulaires, en particulier sur les cellules épithéliales intestinales [326-328]. La toxine du choléra se fixe avec une forte affinité de liaison à son récepteur GM1 [329-331].

II.1.2. Structure de l'entérotoxine thermolabile d'*Escherichia coli*

Les LT, produites par certaines souches d'*E. coli* entérotoxiques sont classées en deux sous-famille: la sous-famille de type I (LT-I ou encore LT) et de type II (LT-IIa et LT-IIb). La LT comporte une sous-unité catalytique A (LTA), liée à un pentamère de sous-unités B non toxiques (LTB). La structure cristallographique de la LT-I établie en 1991 [332] montre que la LTA (27 kDa) est composée de deux sous-unités reliées par un pont disulfure unique: A1, la partie enzymatiquement active, et A2, un peptide de liaison qui relie la sous-unité A1 au pentamère LTB (**Figure 20**). La sous unité B se lie fortement aux récepteurs gangliosides GM1 [333] mais également aux paraglobosides, GM2 avec une affinité plus faible. La LT-IIa et la LT-IIb se lient à d'autres récepteurs. La LT-IIa se lie préférentiellement aux gangliosides GD1d, mais peut aussi se lier à GD1a et GM1 avec une plus faible affinité [334]. La LT-IIb se lie quand à elle à GD1d [334].

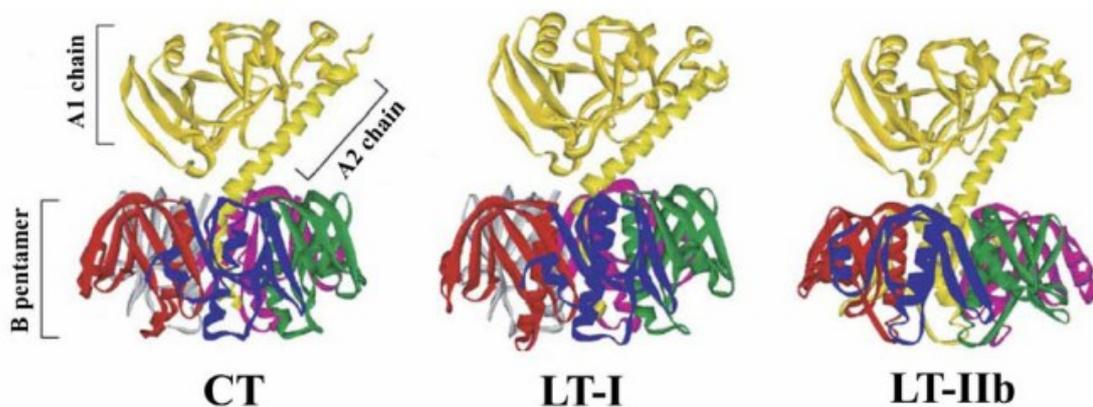


Figure 20 : Structures cristallines de la CT, de la LT-I et de la LT-IIb. Figure modifiée à partir de (Lencer, 2005 [335]).

II.1.3. Les gangliosides

Les gangliosides sont des glycosphingolipides complexes exprimés de manière ubiquitaire sur la membrane plasmique de toutes les cellules eucaryotes [336]. Structurellement, les gangliosides sont des glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acide sialique. Le noyau céramide est généralement ancré dans la bicouche lipidique de la cellule tandis que les sucres sont normalement exposés à la

surface de la cellule. La diversité dans la famille découle de divers arrangements par lesquels les groupes de sucre sont disposés sur le noyau de céramide [337] (**Figure 21**). Les types de gangliosides varient énormément tant entre les différentes espèces et entre les différents types de cellules au sein d'une seule espèce, par exemple, les lymphocytes T sont enrichis en gangliosides GM3 et ganglioside GD1a [338, 339], tandis que les macrophages de souris expriment les gangliosides GD1a, GM1b et GM1a [340].

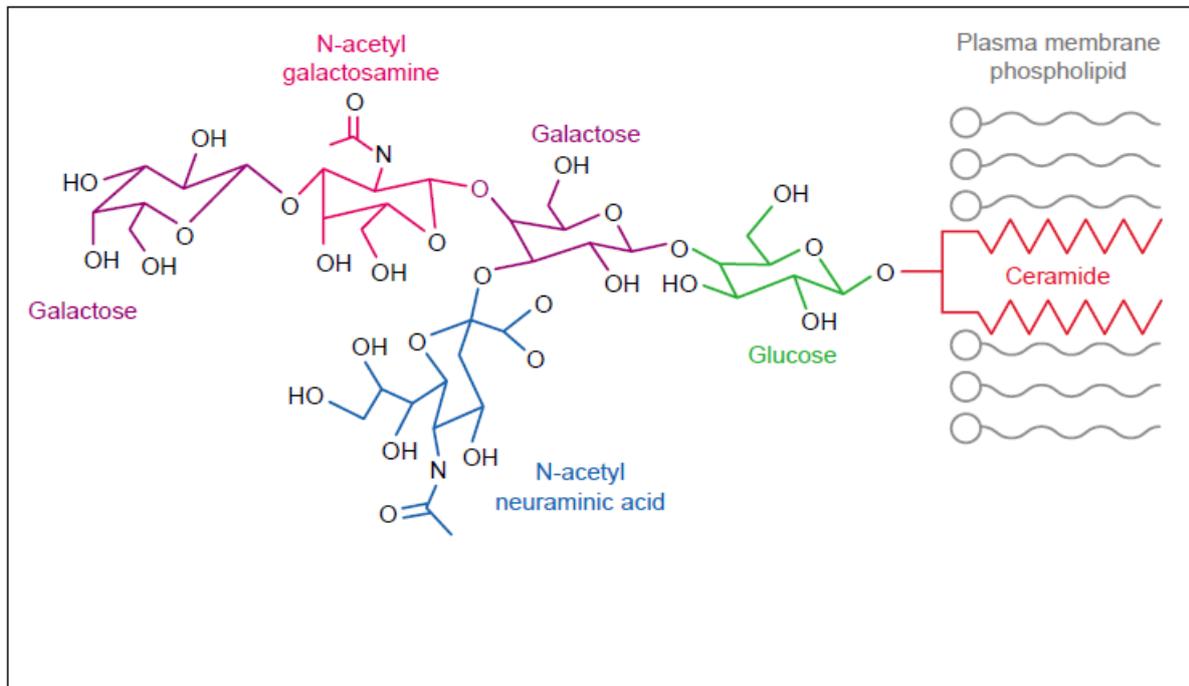


Figure 21 : Structure du récepteur de type ganglioside GM1 (d'après Salmond 2002, *Reviews in Molecular Medicine* [341]).

II.1.4. Effet toxique

Le mécanisme d'action de la CT et de la LT conduisant à l'intoxication cellulaire est semblable et comporte plusieurs étapes [321]. La sous-unité A (ou, plus précisément, le fragment A1) doit être transportée vers le cytosol pour activer l'adénylate cyclase (AC) (**Figure 22**). Le mécanisme précis par lequel le fragment CTA1 atteint le cytosol n'est pas encore entièrement élucidé. Toutefois, la CT ou la LT peut être endocytosée, selon le type cellulaire par des vésicules recouvertes de cavéoline ou de clathrine [335, 342]. L'endocytose au niveau des cellules peut aussi se faire par une voie ARF6-dépendante mais également par d'autres voies indépendantes d'ARF6 (ARF6 étant une protéine qui régule le

transport vésiculaire en agissant sur la structure et la composition de la membrane lipidique de la cellule, mais aussi sur l'organisation du cytosquelette d'actine). Après endocytose, la CT migre vers le réticulum endoplasmique (RE) où la sous-unité A se dissocie de la sous-unité B. Le motif carboxy-terminal KDEL du fragment A2 est un signal classique pour la rétention dans la lumière du RE. La migration de la sous-unité A1 vers le cytosol est l'étape clé pour l'intoxication cellulaire, en effet, une fois dans le cytosol, A1 catalyse l'ADP- ribosylation de la protéine G, sous- unité régulatrice de l'adénylate cyclase. Après l'ADP ribosylation de la protéine G, l'activité GTPase est inhibée, il en résulte une activation constitutive de l'adénylate cyclase. Le taux d'AMP cyclique augmente dans la cellule, l'activité de la protéine kinase A est stimulée et il en résulte une phosphorylation des protéines membranaires qui se traduit par une perturbation du transport des électrolytes, inhibition de l'absorption de NaCl et stimulation de la sécrétion de Cl⁻ par ouverture du canal CFTR. L'effet combiné produit une diarrhée sévère qui dans les cas extrêmes peut induire une perte de liquide jusqu'à 2 litres par heure.

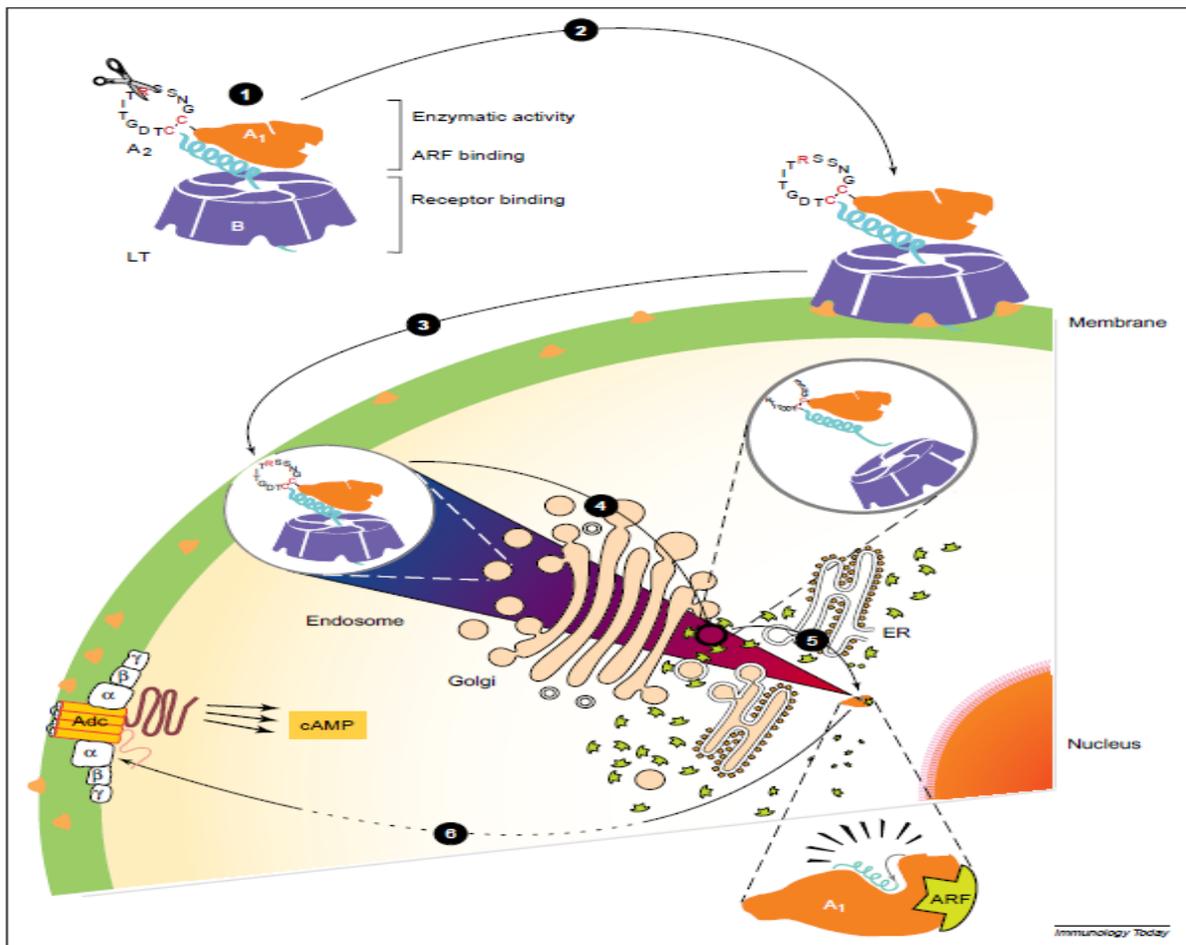


Figure 22 : Séquence des événements intracellulaires lors de l'invasion des cellules par l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* [321].

(1) Représentation schématique d'une entérotoxine thermolabile (LT), montrant les sous-unités A et B, leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles importantes et le site de clivage protéolytique de la boucle entre les domaines A1 et A2. (2) LT se lie au récepteur situé sur la membrane plasmique des cellules eucaryotes. (3) LT est internalisée dans les vésicules. (4) Les vésicules sont transportées vers l'appareil de Golgi où l'holotoxine est démontée. (5) La sous-unité A est transportée de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (RE), la sous-unité A1 est transloquée à partir du RE dans le cytosol, où elle peut interagir avec les facteurs solubles (ARF) pour l'ADP-ribosylation. (6) Le fragment A1 activé migre vers la membrane plasmique où le substrat, la protéine Gs, est situé. L'ADP-ribosylation de la sous-unité α de Gs induit une activation permanente de l'adénylcyclase et donc l'accumulation intracellulaire d'AMPc.

II.2. Les dérivés non toxiques de la CT et de la LT

La CT et la LT ont été testées comme adjuvants dans plusieurs modèles animaux mais à cause de leur toxicité, ces deux toxines ne peuvent pas être utilisées chez l'homme. Des mutants non toxiques ont été construits par mutagénèse dirigée conservant un pouvoir adjuvant, et ainsi peuvent être utilisés chez l'homme. Les sous-unités B, non toxiques, ont également été testées pour leur pouvoir adjuvant.

II.2.1. Les mutants non toxiques

Des mutants de la LT et de la CT ont été construits dans la perspective de dissocier l'effet entérotoxique de ces molécules, de leur activité adjuvante (**Figure 23**). Ces mutations sont effectuées au niveau du site actif ou du site de clivage et un certain nombre de mutants de la LT et de la CT ont été caractérisés. Les deux mutations du site actif qui ont été le plus largement caractérisées pour la LT sont la substitution de la lysine par une sérine en position 63 (LT-S63K) et de l'arginine par l'alanine en position 72 (LT-A72R) [343]. Ces deux mutants diffèrent dans la quantité d'activité enzymatique résiduelle, la LT-A72R conservant une activité enzymatique plus élevée. Les deux ont été montrées posséder une activité adjuvante dans de nombreux modèles animaux [318, 321, 344-347]. Une approche alternative à la détoxification de la LT a été examinée par Dickinson et Clements [348]. Ils ont construit un mutant de la LT contenant un seul acide aminé de substitution afin de modifier le site de clivage protéolytique au sein de la région du pont disulfure qui lie A1 et A2: substitution de l'arginine en position 192 par une glycine (LT-R192G). La LT-R192G, possède une activité enzymatique résiduelle faible et a été également montrée avoir une activité adjuvante dans de nombreux modèles animaux lorsqu'elle est administrée par voie intranasale, orale, rectale ou transcutanée [318, 349-351].

Une autre approche pour détoxifier la CT a été proposée par Agren et al. [352] en reliant le fragment CTA1 responsable de l'activité enzymatique de la sous-unité A à un analogue

synthétique de la protéine A de *Staphylococcus aureus* constitué d'un dimère d'un fragment (D) de liaison aux immunoglobulines (Ig). Ce mutant appelé CTA1-DD se fixe exclusivement sur les lymphocytes B. La protéine de fusion, CTA1-DD, dépourvue de la sous-unité B, ne peut pas se lier aux récepteurs gangliosides et a été montrée avoir une activité adjuvante dans des modèles animaux et est totalement non toxique [353-357]. Ce mutant augmente fortement la synthèse de molécules de costimulation et empêche l'apoptose en induisant le facteur Bcl-2 intracellulaire [317]. Un autre mutant avec un peptide plus long lié à CTA1 (CT23) et aucune activité toxique détectable a aussi été construit. Ce mutant a un effet adjuvant beaucoup moins puissant que la CT mais supérieur à la CTB [312].

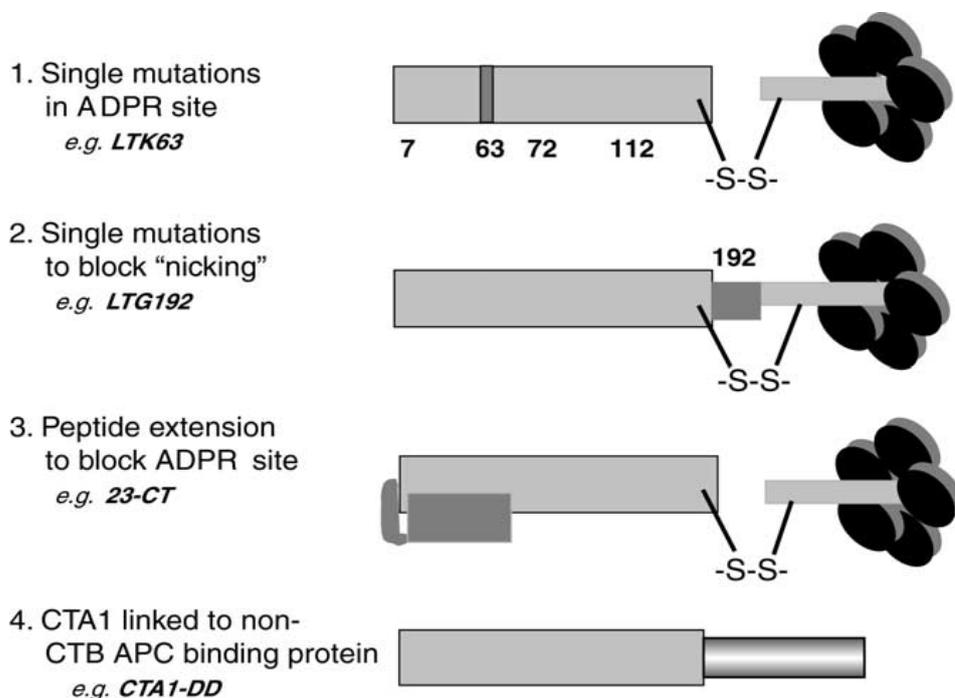


Figure 23: Exemples de mutants non toxiques de la toxine du choléra et de l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* [312].

II.2.2. Les sous-unités B

Les sous-unités B sont les premiers dérivés non toxiques de la LT et de la CT qui ont été produits [321]. La CTB et la LTB ont été examinées pour leur capacité à augmenter les réponses immunitaires à des antigènes hétérologues. Dépourvues d'activité enzymatique, elles sont responsables de la liaison cellulaire et pourraient être utilisées chez l'homme. Les sous-unités B ont été testées dans de nombreux modèles animaux. La LTB a été montrée

avoir un effet adjuvant par voie intranasale chez la souris quand elle est co-administrée avec un antigène [341, 358, 359]. Chez la souris, la LTb a été montrée posséder *in vivo* un effet adjuvant sur les réponses immunes humorales en réponse à des antigènes recombinants exprimés dans le BCG [360]. L'effet adjuvant de la CTb est plus confus, bien que quelques études rapportent que la CTb augmente les réponses immunes quand elle est co-administrée par voie nasale avec un antigène [321, 326, 361-363]. Ainsi les sous-unités B possèdent un effet adjuvant, bien qu'il soit plus faible que celui observé pour les toxines entières. Cependant, elles ont aussi été montrées promouvoir plutôt une tolérance vis-à-vis d'antigènes co-administrés ou conjugués dans certains modèles [312, 328, 364-366].

La liaison de la sous-unité B de la LT-IIb au ganglioside GD1a facilite le recrutement et l'activation de TLR2 et confère probablement à la molécule son potentiel pro-inflammatoire spécifique et son activité adjuvante [367]. Cette observation souligne l'importance de la liaison cellulaire dans les propriétés immunomodulatrices de ces molécules.

III. EFFET IMMUNOMODULATEUR

Les toxines de la famille de la toxine du choléra et leurs mutants non toxiques ont un effet immuno-modulateur sur les réponses immunitaires. Ces molécules augmentent les réponses immunitaires vis-à-vis des antigènes co-administrés. Malgré de nombreuses études, les interactions moléculaires et cellulaires liées à l'effet adjuvant de la CT et de la LT ne sont pas complètement comprises [318, 321, 347, 368-371]. Plusieurs modèles ont été proposés, beaucoup sont contradictoires et aucun n'est complètement satisfaisant. De plus, comme indiqué précédemment, les sous-unités B ont été rapportées induire la tolérance dans un certain nombre d'études [364, 372]. Ainsi, mieux comprendre le mécanisme d'action de ces toxines est essentiel dans l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales par voie muqueuse. Dans ce chapitre nous allons développer le mécanisme d'action de ces molécules.

III.1. Effet adjuvant

De multiples mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet adjuvant de ces molécules [318, 321, 347, 359, 368] et il est probable que ces molécules exercent leur fonction en interagissant avec une variété de types cellulaires, notamment les cellules épithéliales, les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques et macrophages) et de l'immunité adaptative (les lymphocytes T et B) présentes dans la muqueuse [373-376]. La CT et la LT

élèvent le taux d'AMPc intracellulaire dans une variété de types cellulaires et l'effet adjuvant est au moins en partie lié à cette fonction [377].

III.1.1. Effet sur les cellules épithéliales

Chez la souris, la CT peut augmenter la perméabilité intestinale aux peptides de faible poids moléculaire mais pas aux grosses protéines, facilitant ainsi l'accès des antigènes au système immunitaire [342]. Mais les cellules épithéliales ne sont pas qu'une barrière mécanique inerte, elles jouent également un rôle dynamique du fait de leurs interactions avec les cellules immunitaires et inflammatoires. Elles modulent la réponse immunitaire grâce à la sécrétion de différentes cytokines suite à une infection par des micro-organismes invasifs ou en réponse à la stimulation par des cytokines comme le TNF α et l'IL-1, permettant l'activation des polynucléaires ou des macrophages et des lymphocytes T [378]. Les cellules épithéliales sont les cibles initiales des toxines, à la fois pendant l'infection ou après immunisation par voie muqueuse, l'effet des adjuvants de la famille de la toxine du choléra se traduit par un effet sur les cellules épithéliales en modulant leur production de cytokines. Ainsi l'équipe de McGhee a montré que la CT était capable de promouvoir fortement la production d'IL-6 par des cellules épithéliales de rat IEC-6, alors que la sous-unité B (CTB) non recombinante n'avait aucun effet [308]. Il a été aussi montré que la LT, mais pas la LTB, entraînait la sécrétion de cytokines par des cellules T84, cellules épithéliales intestinales humaines [377]. L'effet de ces molécules sur les cellules épithéliales semble donc dépendant de l'activité adénylate cyclase. Cet effet sur les cellules épithéliales est important dans le recrutement et l'activation de cellules présentatrices d'antigènes, mais également dans la mise en place d'une réponse immunitaire effectrice [318]. Une étude publiée par l'équipe de Lopes a montré que l'interaction de la LT mais pas de la LTB avec la surface apicale d'une monocouche de cellules Caco-2 induisait la libération de prostaglandine, avec pour conséquence, d'inhiber la production d'IL-2 par les cellules T activées. Ainsi les toxines bactériennes, en modulant l'ADP-ribosylation stimulent ou inhibent la sécrétion par les cellules épithéliales de cytokines importantes dans l'activation des réponses immunes [377, 379].

III.1.3. Effet sur les cellules présentatrices d'antigènes

Des études suggèrent que de petites quantités d'adjuvants de la famille de la toxine du choléra peuvent être prises en charge par les cellules M qui recouvrent l'épithélium intestinal (FAE) et être transportées aux lymphocytes T et B et aux cellules dendritiques

sous-jacentes. Une fois pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes, ces adjuvants peuvent également avoir un effet direct sur les CPA et avoir un effet immunomodulateur à ce niveau.

III.1.2.1. Cellules dendritiques

L'effet sur les cellules dendritiques n'est pas bien connu, cependant la CT entraîne une surexpression des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité sur les CD et donc, augmente leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T [374].

L'équipe de Lee a montré que l'administration par voie IR d'OVA en présence de CT mobilise les CD CD11c+ dans les ganglions lombaires et cervicaux en interagissant avec CCR7 [19]. De plus, L'administration orale de fortes doses de CT a été montrée augmenter le nombre de cellules dendritiques dans l'épithélium recouvrant le dôme des PP ou FAE. La CT induit également la migration des cellules dendritiques du dôme sous-épithélial des plaques de Peyer vers les cellules de la zone T interfolliculaire adjacente [380]. La CT, la CTB, et vraisemblablement la LT ont des effets directs sur les CD *in vitro*. Par exemple elle induisent la maturation des CD (expression de CD80 et CD86 et augmentation de la production d'IL-1 α , IL-1 β et IL-23) [381] (Table 2) et régulent positivement l'expression de CCR6 et de CCR7, récepteurs de chimiokines qui assurent la migration des CD vers leurs ligands comme MIP3 β et MIP-3 α se trouvant dans la zone T[251, 382]. Ceci est probablement lié à leur capacité à augmenter l'AMPc intracellulaire [359].

	Induit	Augmenté	Inhibé
Cytokines			
MIP-2	+		
IL-1B		+	
IL-6		+	
IL-10		+	
IL-12p70			+
IL-12p40			+
TNF-a			+
MIP-1a			+
MIP-1b			+
MCP-1			+
Molécules de costimulation et de surface			
CD80	+	+	
CD86	+		
OX40	+	+	
CD14	+		
CD40			+
ICMA-1			+

Table 2 : Effets de la CT sur les cellules dendritiques : expression de cytokines, chimiokines et molécules de costimulation.

III.1.2.2. Les lymphocytes B

Plusieurs études ont démontré la capacité de ces toxines à induire la commutation isotypique des cellules B chez la souris [326, 383] et la régulation positive des marqueurs d'activation dans les cellules B à la fois humaines et murines [371, 384, 385]. Récemment, des études ont démontré qu'en l'absence de la sous-unité A toxique, la sous-unité B de la CT (CTB) en se fixant sur son récepteur, induisait une signalisation intracellulaire via les MAP kinases qui va aboutir à l'activation *in vitro* des cellules B et des macrophages murins [365, 386]. L'équipe de Negri a quant à elle démontré que l'activité enzymatique des toxines était indispensable pour l'activation *in vitro* de cellules B humaines et l'amélioration de leur capacité présentatrice d'antigènes [387]. La LT et la CT induisent l'activation de marqueurs

de surface d'activation sur les cellules B, tels que CD86 et HLA-DR. Ceci est dépendant de l'activité adénylate cyclase puisque ni la CTB, ni la LTK63 n'ont le même effet. L'activation des lymphocytes B entraîne une augmentation de l'expression des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que des molécules B7, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) et CD40 [359].

III.1.2.3. Effet sur les Monocytes et Macrophages

La CT induit une maturation phénotypique et fonctionnelle de monocytes périphériques en augmentant l'expression des molécules HLA-DR et de la molécule de co-stimulation B7-1 [382]. L'équipe de Veglia a récemment montré qu'en traitant des monocytes par la toxine du choléra (CT) en présence de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et d'IL-4, ceux-ci se différencient en un phénotype de type macrophage (CD14^{high} CD1a^{low}) et non de type cellule dendritique classique (CD14^{low}CD1a^{high}) [388]. Ces macrophages différenciés en présence de CT expriment fortement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de classe II. Ils expriment également des molécules de costimulation comme CD80 et CD86 et produisent de grandes quantités d'IL-1, IL-6 et IL-10, mais pas de TNF α et d'IL-12 [389]. Ainsi il s'avère que les monocytes différenciés en présence de CT induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype Th2. *In vivo*, la CT interfère également avec la différenciation des monocytes en CD et induit l'activation des lymphocytes T spécifiques [388].

III.1.3. Effet sur l'orientation des réponses T CD4

Les adjuvants de la famille de la toxine du choléra modulent les réponses des lymphocytes T CD4, en orientant la réponse soit vers un profil de type Th2, ou vers une réponse mixte Th1/Th2. Récemment, il a été montré que ces toxines pouvaient également orienter les réponses CD4 vers un profil Th17 et vers un profil T régulateur.

III.1.3.1. Orientation Th1 et Th2

Chez la souris, la toxine du choléra est connue pour induire une réponse Th2 prédominante, associée à une production accrue d'interleukine-4 (IL-4), IL-5, IL-6 et IL-10 ainsi qu'une production à un niveau élevé d'immunoglobuline IgG₁, IgE et IgA systémiques et muqueuses [318, 382, 390, 391]. D'autres études ont montré que la CT pouvait induire une réponse mixte Th1/Th2 [392-394]. Il a aussi été montré que la LT, la LT-IIa et la LT-IIb induisaient

une réponse mixte Th1/Th2 avec présence d'IgA sécrétoires, d'IgG₁, IgG_{2a} et d'IgA systémiques vis-à-vis de l'antigène co-administré [318, 382, 390, 391].

L'administration nasale du mutant LTK63, totalement dépourvu d'activité toxique, produit une réponse Th1 et Th2, alors que celle du mutant LT-R72 qui conserve 1 % de son activité enzymatique provoque une réponse Th2 à faible dose et une réponse Th1 et Th2 à plus forte dose [395]. Le mutant LTK63 augmente l'activation du facteur nucléaire NFκB et la transcription d'IL-12 et des molécules de costimulation B7 des macrophages. De ce fait, le mutant LT-K63 augmente l'activation des lymphocytes T, notamment Th1 [395]. Cette fonction dépendrait notamment de l'activité de liaison de la sous-unité B aux gangliosides GM1 des surfaces cellulaires. Au contraire, l'activité enzymatique de la sous-unité A qui provoque l'accumulation intracellulaire de cAMP favoriserait la réponse Th2 et inhiberait la réponse Th1 et ses effets inflammatoires. LT et LT-R72 inhibent la production d'IL-12 *in vivo* dans un modèle murin de choc septique [395]. La réponse immunitaire obtenue avec la LT pourrait donc dépendre de l'équilibre entre ces orientations Th1 et Th2. Concernant les sous-unités B, l'équipe de Plant a montré que la sous-unité B de la LT induit comme la CT, une réponse Th2 prédominante [396]. La LTB entraîne également l'activation des des macrophages et des lymphocytes T qui expriment alors la molécule CD25 [359].

III.1.3.2. Orientation Th17

Trois études récentes ont suggéré des mécanismes supplémentaires pour l'induction de l'effet adjuvant. Lee et al. ont montré que l'administration par voie intranasale de CT induisait de fortes réponses de type Th17 [397], alors que jusqu'à présent la CT était connue pour induire des réponses anti-inflammatoires (par l'induction de réponses de type Th2 et l'inhibition des réponses Th1). Par ailleurs, la sous-unité CTB pourrait être responsable de la capacité de la CT à de telles réponses ce qui est en contradiction avec le rôle tolérogène de la CTB (voir chapitre ci-dessous) [398]. L'équipe de Brereton a également montré que la LT induisait une réponse Th17 forte [399], de plus cette réponse est déterminante pour l'effet adjuvant. La LT a également été montrée inhiber les réponses Th1 et induire une réponse Th17 dans un modèle auto-immun d'uvéite (EAU) [400]. De plus, l'équipe de Ward a montré que l'immunisation intranasale ou intrarectale avec des VLP-6 en présence de LT-R192G induit une forte production d'IL-17 par les lymphocytes T intestinaux suite au challenge avec le rotavirus, cette production d'IL-17 étant corrélée avec une protection efficace [349, 351].

III.1.3.3. Orientation phénotype T régulateur

Les toxines de la famille toxine du choléra sont également capables d'orienter les réponses vers un profil régulateur. Ainsi la chez la souris, la CT a été montrée induire des Tregs Tr1 spécifiques de l'antigène (Lipopolysaccharide, LPS). Ces toxines sont également capables d'induire des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (**voir revue CHOLERA LIKE ENTEROTOXINS AND TREG**).

III.2. Effet tolérogène

Certaines études rapportent que les sous-unités B de la CT et de la LT induisent la tolérance à des antigènes hétérologues coadministrés ou conjugués [401, 402]. La tolérance induite par la CTB ou la LTB peut résulter d'une déplétion directe des cellules T effectrices, ainsi les sous-unités B de la CT et de la LT ont été montrées induire l'apoptose des lymphocytes T CD4+ et CD8+ [321] mais c'est aussi le cas des toxines entières. Un autre mécanisme a été récemment proposé par Wang et al. qui ont montré que la fixation de la CTB sur GM1 aboutit à l'activation transitoire des canaux TRPC5 (receptor potentiel canonique (TRPC) 5) ce qui induit l'afflux de Ca²⁺ dans les cellules T effectrices et contribue à la suppression de l'autoimmunité dans un modèle d'EAE [403](Wang 2009). Cet effet imite celui des Tregs activés via Gal-1 sur les lymphocytes T effecteurs. En fait, le mécanisme de tolérance le plus étudié est celui médié par des Tregs directement ou *via* la modulation des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Ce chapitre a fait l'objet d'une revue de la littérature présentée ci-dessous. (**voir revue CHOLERA LIKE ENTEROTOXINS AND TREG**).

Revue :

Cholera-Like Enterotoxins and Regulatory T cells

Toxins, 2010, 2 : 1774-1795

Deuxième partie : TRAVAIL EXPERIMENTAL

Article I:

UNEXPECTED MODULATION OF RECALL B AND T CELL RESPONSES AFTER IMMUNIZATION
WITH ROTAVIRUS-LIKE PARTICLES IN THE PRESENCE OF LT-R192G

TOXINS, 2010, 2: 2007-2027

I. Introduction à l'article

La vaccination muqueuse est en principe le meilleur moyen de lutter contre les pathogènes qui utilisent les muqueuses comme porte d'entrée. En effet, elle induit à la fois une protection muqueuse et systémique. Cependant cette alternative n'est pas sans inconvénient puisque les muqueuses ont la propriété d'induire des phénomènes de tolérance, les antigènes non réplicatifs étant de ce fait peu immunogènes par voie muqueuse. Il est alors nécessaire d'ajouter des adjuvants d'immunisation. Les adjuvants de la famille de la toxine du choléra ont été très étudiés. Ils comportent la toxine du choléra (CT) et l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* (LT). En raison de leur toxicité, ils ne peuvent être utilisés chez l'homme, des mutants non toxiques ont alors été produits qui conservent un effet adjuvant, comme la LT-R192G. Cependant, le mécanisme d'action de ces adjuvants reste à ce jour mal connu et s'avère très complexe.

Dans la perspective de mieux appréhender l'effet des adjuvants de la famille de la toxine du choléra lors d'une immunisation muqueuse avec un antigène non réplicatif, notre équipe a mis au point un modèle murin d'immunisation muqueuse avec des pseudo-particules virales de rotavirus en présence ou en l'absence d'adjuvant.

I.1. Choix du modèle

Le rotavirus (RV) du groupe A est la cause majeure de gastro-entérites aiguës (GEA) sévères chez le jeune enfant jusqu'à l'âge de cinq ans, aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement. Ce virus appartient à la famille des *Reoviridae*, [404] et infecte les entérocytes matures des villosités de l'intestin grêle. Selon Parashar et al., avant l'introduction de la vaccination, environ 500 000 enfants âgés de moins de cinq ans mouraient chaque année d'une infection à RV, la majorité vivant dans les pays à faible niveau socio-économique (**Figure 24**) [405]. Dans les pays occidentaux, la mortalité est faible, mais la morbidité reste élevée malgré le niveau sanitaire élevé et les mesures d'hygiène. Pour ces raisons, le développement et l'introduction d'un vaccin contre le RV ont été considérés comme une priorité par l'OMS [406] et plusieurs candidats-vaccins ont été développés depuis le début des années 1980 [407]. A l'heure actuelle, deux vaccins sont commercialisés et utilisés dans le monde, le ROTATEQ® et le ROTARIX®. Ces deux vaccins sont des vaccins vivants atténués oraux, basés chacun sur une approche différente, développés et mis sur le marché depuis 2006 [408]. Ils ont fait la preuve de leur efficacité

dans les pays à hauts et moyens revenus. Cependant, dans les pays en voie de développement, l'efficacité des vaccins serait moindre, ceci constitue un problème car plus de 85% des décès annuels à RV surviennent dans ces mêmes pays [409]. Cette efficacité moindre pourrait s'expliquer par l'état nutritionnel des enfants, le fait qu'ils soient poly-infectés ou encore par l'allaitement maternel. De plus dans les pays industrialisés, même si l'efficacité des vaccins est prouvée, tous les problèmes ne sont pas résolus. En effet, si les deux vaccins ont montré une bonne tolérance lors des essais cliniques et des études après mise sur le marché, un risque faible d'invagination intestinale aiguë a été mis en évidence dans certains pays après la première dose [407]. Du fait de ces questions non résolues et du poids important des infections à RV, le développement d'autres stratégies vaccinales doit être poursuivi. Parmi les stratégies vaccinales développées, il y a l'utilisation de pseudo-particules virales (VLP) de rotavirus.

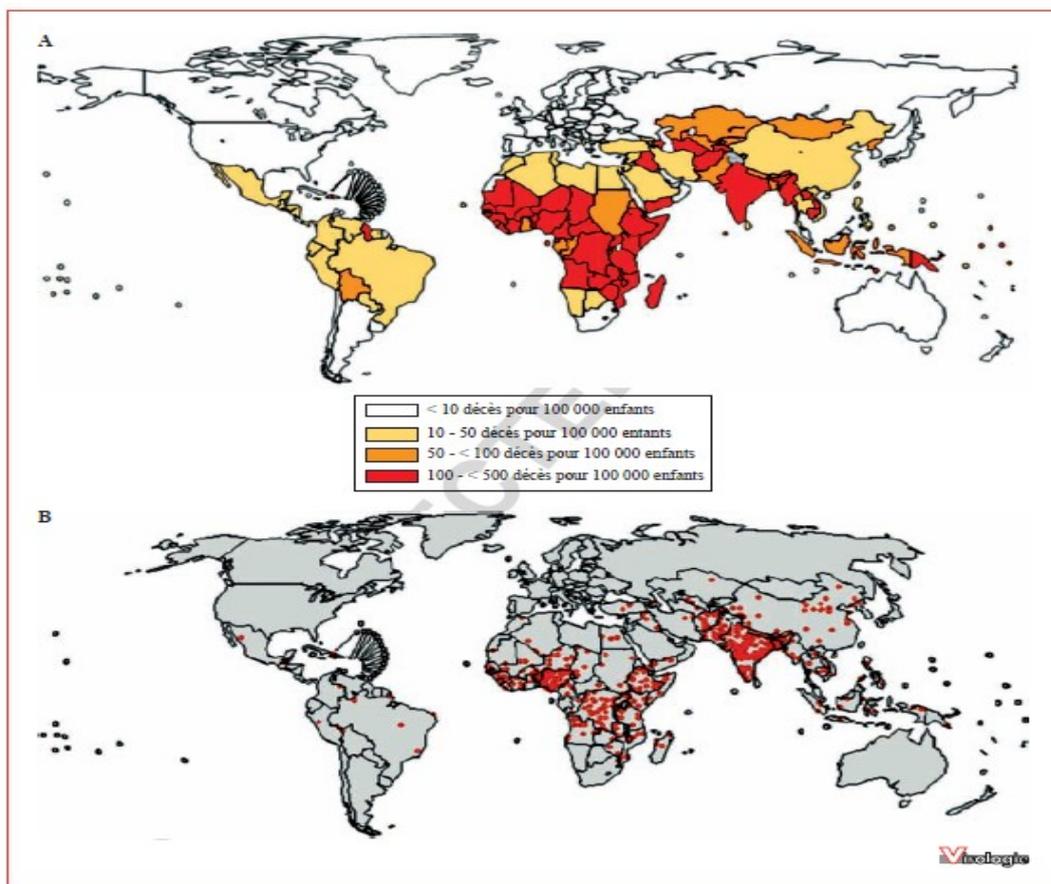


Figure 24. A. Estimation de la distribution des décès dus au rotavirus (RV) en 2004 chez les enfants de moins de cinq ans. B. Mortalité annuelle par pays associée au RV chez les enfants de moins de cinq ans, chaque point représente mille décès par an (d'après Parashar *et al.* 2009[410]).

Les VLP sont des particules de type protéines recombinantes sous-unitaires ayant une structure semblable au virus sauvage, mais dépourvues de matériel génétique (**Figure 25**). Elles constituent donc un système de délivrance de l'antigène très prometteur. La production de telles particules se fait à l'aide de cultures de cellules d'insectes grâce à des vecteurs dérivés de baculovirus. Cette technique permet de se passer de l'agent infectieux lors du développement, de la production et de l'administration de ces vaccins. Elle permet également une fabrication plus rapide que celles des vaccins classiques, ce qui est un avantage majeur afin de pallier à une éventuelle pandémie virale [411]. Ces pseudo-particules virales sont des particules stables qui peuvent être administrées par voie parentérale (Istrate et al., 2008) ou muqueuse [412, 413]. Leur utilisation nécessite l'emploi d'adjuvants et, afin de conférer une protection, plusieurs administrations sont nécessaires. Cette stratégie vaccinale a malheureusement un coût élevé. Le premier vaccin de type VLP à être commercialisé était le vaccin contre le virus de l'hépatite B (HBV). A l'heure actuelle, deux vaccins injectables, le CERVARIX® et le GARDASIL®, dirigés contre les papillomavirus dans le cadre de la prévention des cancers du col de l'utérus, utilisent cette technique et sont commercialisés.

Concernant les VLP de RV, leur administration par voie orale est inefficace, probablement à cause de leur destruction dans l'estomac [414]. Par contre, l'administration de ces particules par voie intra-nasale chez la souris a été tentée [412]. L'administration de VLP comportant les protéines virales VP2 (protéine majoritaire du core) et VP6 (protéine de la couche intermédiaire, fortement antigénique et immunogénique) (VLP-2/6), en présence d'adjuvant d'immunisation muqueuse tel que la CT ou la LT et leurs mutants non toxiques, induit des anticorps sériques et fécaux (IgA et IgG) [394, 412, 415] et confère une protection hétérotypique contre différents sérotypes viraux [412, 416]. Par ailleurs, Parez *et al.* ont proposé, sur la base d'études réalisées avec d'autres pathogènes, la voie intra-rectale comme stratégie de vaccination muqueuse [12]. Ainsi, l'administration intra-rectale de VLP, en présence d'adjuvant d'immunisation muqueuse, induit une réponse anticorps sérique et fécale, et confère une protection contre l'infection virale [12].

Au-delà de leur intérêt vaccinal contre le rotavirus, ces VLP peuvent être utilisées comme vecteurs d'autres antigènes et elles représentent en outre un outil intéressant pour étudier

les réponses immunitaires B et T induites par des antigènes particulaires, qui plus est nanoparticulaires, au niveau des différentes muqueuses.

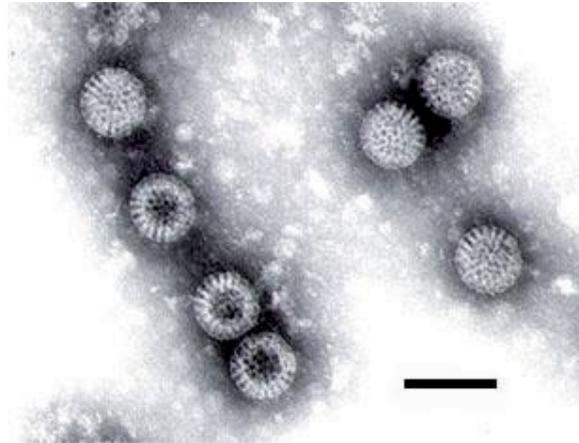


Figure 25 : Particules de rotavirus observées au microscope électronique (d'après Estes, 2001[417]) Aspect de particules de rotavirus observées au microscope électronique.

I.2. Objectifs de l'étude

Une étude précédente a permis de montrer que lors d'une première immunisation chez la souris par voie intranasale ou intrarectale avec des VLP-2/6 (VLP-2/6 comprenant les protéines VP2 et VP6 du rotavirus) en présence de la LT-R192G, une expansion massive de lymphocyte B spécifiques était observée dans différents tissus lymphoïdes en fonction de la voie d'immunisation. La majorité des lymphocytes B induits exprimaient le marqueur CD5, marqueur des lymphocytes B-1a potentiellement auto-réactifs [418, 419]. De façon inattendue et malgré une réponse anticorps secondaire forte, l'expansion massive observée lors de la première immunisation n'était pas été retrouvée lors du rappel [419, 420]. A l'opposé, en immunisant des souris avec des VLP-2/6 seules en l'absence d'adjuvant, une réponse anticorps très faible était observée associée à une expansion des lymphocytes B très hétérogène et sans diminution lors du rappel. De plus, après immunisation intranasale un profil de cytokines incomplet comportant de l'IFN γ et de l'IL-10 sans IL-2 ni IL-4 était observé et la présence de LT ou de CT lors de l'immunisation permettait de compléter ce profil [421].

Ces observations laissaient supposer une régulation négative par des lymphocytes T régulateurs des réponses immunitaires lors de la primo-immunisation avec les VLP seules ou encore lors du rappel en présence de l'adjuvant.

Ainsi dans cette étude nous avons voulu étudier l'effet de la LT-R192G sur les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ après immunisation intrarectale avec les VPL-2/6 en présence ou en l'absence d'adjuvant. Des souris non immunisées ont aussi été incluses dans cette étude afin de voir l'effet de l'antigène et l'adjuvant lors d'un premier contact sur ces lymphocytes. Les cellules T CD4+CD25+Foxp3+ et Foxp3- de différents organes lymphoïdes ont été analysées après restimulation *in vitro* avec l'antigène seul, l'adjuvant seul ou les deux. Les cellules T CD4+CD25+, Foxp3+ et Foxp3-, ont été quantifiées par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs CD4, CD25 et Foxp3, après 2 et 4 jours de culture et l'IL-2 a été dosée dans les surnageants par une technique ELISA.

II. Discussion

Dans des travaux précédents, l'équipe avait étudié la réponse B spécifique des VLP-2/6 suite à une et deux immunisations IN ou IR en présence ou non de la LT-R192G [418-420]. Lors d'une première immunisation IR ou IN en présence de l'adjuvant, une réponse B massive avait été mise en évidence. Lors d'une seconde immunisation, malgré une réponse anticorps secondaire classique, une expansion moindre des lymphocytes B a été observée [420]. De plus, il s'avère que les lymphocytes B analysés expriment fortement CD5, ce sont des lymphocytes B1-a, non conventionnels, et potentiellement auto-réactifs. Nous avons supposé que des populations lymphocytaires à activité régulatrice notamment les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ pouvaient être impliquées, afin de limiter cette expansion et éviter des réponses auto-réactives. Les Tregs peuvent en effet être induits lors de la première vaccination et ainsi moduler l'intensité de la réponse secondaire [306, 307]. Par ailleurs, en immunisant des souris avec des VLP-2/6 seules, une réponse anticorps très faible était observée, associée à une expansion des lymphocytes B très hétérogène et inchangée lors du rappel. De plus, après immunisation intranasale, un profil de cytokines incomplet comportant de l'IFN γ et de l'IL-10 sans IL-2 ni IL-4 était observé et la présence de LT ou de CT lors de l'immunisation permettait de compléter ce profil [394]. Nous avons alors fait l'hypothèse que les VLP seules induisaient des lymphocytes T régulateurs capables de supprimer les réponses lors de la primo-vaccination.

Pour vérifier ces deux hypothèses, nous avons immunisé des souris avec des VLP-2/6 en présence ou en l'absence de LT-R192G. Après sacrifice, les Tregs naturels et les Tregs induits de phénotype CD4+CD25+Foxp3+ ont été analysés après culture *in vitro* de cellules de rate, de GM et de GL en présence de VLP-2/6, de LT-R192G ou des deux. Les cellules CD4+CD25+Foxp3- (pour la réponse cellulaire T auxiliaire) ont également été analysées. Les résultats étant similaires dans tous les tissus lymphoïdes analysés, nous avons alors fait le choix de travailler sur les GM, le nombre de lymphocytes y étant plus important.

Chez les souris non immunisées ou immunisées avec les VLP-2/6 seules, la stimulation avec les VLP-2/6 n'induit aucune activation des cellules T CD4+CD25+Foxp3- ou Foxp3+. Ceci se traduit par une absence de modification de l'expression de CD25 et de Foxp3 ainsi que du pourcentage des cellules et corrèle avec l'absence de production d'IL-2.

Par contre, chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence d'adjuvant, la restimulation avec l'antigène induit une activation des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3-spécifiques (augmentation d'expression de CD25 et du pourcentage des cellules). De plus, les VLP-2/6 induisent des Tregs spécifiques de l'antigène ce qui se traduit par une augmentation du pourcentage de ces cellules ainsi que de l'expression de CD25 et de Foxp3. Contrairement aux souris témoins et aux souris immunisées avec les VLP-2/6 seules, une forte production d'IL-2 est observée. Ces résultats montrent que la LT-R192G est indispensable pour la mise en place d'une réponse T mémoire Th1 spécifique des VLP-2/6. Ils confirment en outre l'importance de l'IL-2 dans l'activation des lymphocytes T CD4 régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ et donc dans la boucle d'auto-régulation associée à l'activation par l'antigène [196].

La stimulation par la LT-R192G seule induit une diminution des Tregs chez les souris non immunisées, accompagnée d'une diminution de l'expression de CD25. Le même effet est observé chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 seules. Cette diminution des Tregs est corrélée avec l'augmentation du pourcentage des cellules CD4+CD25+Foxp3-. La LT-R192G induirait donc une perte d'expression de Foxp3 sur les cellules CD4+CD25+Foxp3+ qui deviennent ainsi Foxp3-. Cette perte d'expression de Foxp3 s'expliquerait par l'absence d'IL-2 dans le milieu de culture [198]. En conclusion l'adjuvant induit la mort des Tregs naturels qui pourrait se faire par un mécanisme d'apoptose. En effet, les adjuvants de la famille de la toxine du choléra sont connus pour induire une apoptose des lymphocytes T CD8+ et CD4+ [422, 423]. La LT-R192G en diminuant les Tregs lors d'une première immunisation pourrait permettre une mise en place d'une réponse immunitaire forte et efficace vis-à-vis de l'antigène co-administré. Ceci pourrait être en corrélation avec l'expansion massive des lymphocytes B observée lors d'une première immunisation.

Chez la souris immunisée avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G, la restimulation avec la LT-R192G induit une faible production d'IL-2 ainsi qu'un maintien des Tregs et de l'expression de CD25 à J4. Ce maintien des Tregs pourrait être dû à la présence d'IL-2 qui est essentielle à la survie des Tregs naturels et induits CD4+CD25+Foxp3+ [203]. Contrairement aux souris non immunisées ou immunisées avec les VLP-2/6 seules, nous observons également une forte augmentation de l'expression de Foxp3 à J2 et J4 après restimulation avec la LT-R192G. Cette augmentation de l'expression de Foxp3 est corrélée avec la production d'IL-2, en effet l'IL-2 est nécessaire à l'expression soutenue de Foxp3 et de CD25 dans les Tregs CD4+CD25+Foxp3+ et améliore leur fonction suppressive, au moins

in vitro [161, 163, 202]. L'activation des Tregs est également due à l'engagement du TCR, ici la LT-R192G se comportant comme un antigène induit, une réponse mémoire Treg spécifique de l'adjuvant, fait intéressant, car de tels effets des toxines de la famille de la toxine du choléra en tant qu'antigène n'ont jamais été rapportés.

En résumé ces résultats montrent que la LT-R192G induit des Tregs spécifiques de l'antigène et de l'adjuvant durant une première immunisation et ces Tregs peuvent être activés lors d'une restimulation *in vitro*. Ces résultats peuvent être corrélés avec ce qui se passe *in vivo*. En effet, lors d'un rappel, ces Tregs pourraient être activés et ainsi réguler les réponses immunitaires pour éviter des réponses trop importantes ainsi que des réactions auto-immunes en inhibant les lymphocytes B1-a potentiellement autoréactifs.

La restimulation avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G montre un effet immuno-modulateur de la LT-R192G *in vitro*. En effet la LT-R192G module les réponses T spécifiques CD4+CD25+Foxp3+ et Foxp3- en diminuant le pourcentage des cellules mais également l'expression de CD25 et de Foxp3 par rapport aux puits stimulés avec les VLP-2/6 seules. De même, la production d'IL-2 est diminuée.

Les VLP seules n'induisent pas de Tregs CD4+CD25+Foxp3+ ce qui est en accord avec l'absence de production d'IL-2 et d'activation des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3-. D'autres lymphocytes T régulateurs pourraient être induits lors de la primo-immunisation avec les VLP seules, notamment les Tr1. Le dosage de l'IL-10 représente une approche pour la détection de ces cellules.

Lors de cette étude nous avons observé de façon assez surprenante une diminution des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ lors d'un premier contact avec la LT-R192G (souris non immunisées). Cette diminution des Tregs n'a jamais été observée auparavant. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si les autres adjuvants de la famille de la toxine du choléra (LT, LTB, CT et CTB) avaient le même effet sur les Tregs naturels. Les adjuvants de la famille de la toxine du choléra sont connus pour induire la mort des cellules T CD4+ et CD8+ et ceci par un mécanisme d'apoptose [423]. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié l'effet de ces molécules sur les lymphocytes T CD4+CD25+ et -. Il n'est en effet pas possible d'étudier l'apoptose sur les cellules CD4+CD25+Foxp3+ du fait de la fixation

nécessaire pour le marquage de Foxp3 Les résultats obtenus chez les souris immunisées par les VLP-2/6 en présence de LT-R192G montrent que la LT-R192G induit la production d'IL-2 par les cellules T mémoires VLP-2/6 et LT-R192G spécifiques, ces résultats sont en corrélation avec l'effet adjuvant de la LT-R192G, les VLP seules n'ayant aucun effet.

Nous avons ensuite voulu comparer l'effet de la LT-R192G avec ceux des autres molécules, la LT non mutée, la CT, et leurs sous-unités B, LTB et CTB.

Article II:

CHOLERA TOXIN (CT), THERMOLABILE ENTEROTOXIN OF *E. COLI* (LT), ITS B SUBUNIT (LTB) AND LT-R192G, BUT NOT THE B SUBUNIT OF CT (CTB), INDUCE THE DECREASE OF RESTING CD4+CD25+FOXP3+ T CELLS *IN VITRO*

I. INTRODUCTION

Nous avons précédemment montré qu'un contact *in vitro* de cellules de GM de souris non immunisées avec la LT-R192G entraîne une diminution des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (nTregs). Cette diminution pourrait faire suite à l'induction de l'apoptose par la LT-R192G. En effet, il a déjà été rapporté que les adjuvants de la famille de la toxine du choléra peuvent induire l'apoptose des cellules T.

I.1. Mort cellulaire

La mort cellulaire peut se faire par différents mécanismes, soit par apoptose, soit par nécrose ou même plus récemment décrit par autophagie. Il existe des différences morphologiques et biochimiques entre apoptose et nécrose. Le fait qu'une cellule meure par apoptose ou nécrose, est dépendant de la nature du type de signaux de mort, du type tissulaire ainsi que de son stade de développement et de l'environnement physiologique de la cellule [424].

I.1.1 Mort par apoptose

On nomme apoptose (mot d'origine grecque, faisant référence à la chute programmée des feuilles en automne ; *apo* pour désigner l'éloignement et *ptose* pour chute), le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal [425]. L'apoptose, encore appelée mort cellulaire programmée, est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, qui est activée en réponse à divers stimuli. C'est un processus physiologique normal intervenant dans le développement des organismes pluricellulaires, l'homéostasie tissulaire chez l'adulte ainsi qu'au cours de différents processus immunologiques comme la sélection positive/négative des thymocytes, l'élimination des cellules tumorales et infectées ainsi que l'élimination des lymphocytes en surnombre après une réaction immunitaire.

Dans le lymphocyte T, il y a deux voies biochimiques bien définies qui conduisent à l'apoptose, appelées la voie extrinsèque et la voie intrinsèque [426, 427]. La voie extrinsèque fait intervenir les récepteurs de mort de la superfamille des récepteurs du TNF, dont les récepteurs p55 et p75 du TNF, Fas (CD95/Apo1), et les récepteurs de mort (DR)-3, -4, -5 et -6. La fixation de leur ligand ou leur 'clusterization' entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain containing protein) qui s'associe au domaine de mort du récepteur. Ceci entraîne le recrutement de la pro-caspase-8, puis son clivage et son activation. A son tour, elle va cliver et activer plusieurs caspases

effectrices dont la caspase-3 aboutissant à la mort cellulaire. La voie intrinsèque passe par le dommage mitochondrial suite par exemple à la privation de facteurs de croissance. Cela débute par l'activation de molécules pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, comme Bax. Ce dernier semble former des pores dans la membrane de la mitochondrie conduisant à une fuite de cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c en se fixant à Apaf-1 entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-9 qui à son tour active la caspase-3. La voie extrinsèque peut aussi passer par la voie des mitochondries. En effet, la caspase-8 peut couper Bid, celui-ci facilitant l'oligomérisation et l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale.

Parmi les caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques, on peut citer : le rétrécissement cellulaire, un cytoplasme et des organelles plus denses et la condensation chromatinienne suivie d'une fragmentation du noyau. Ces changements morphologiques ainsi que l'activation des voies biochimiques peuvent être étudiées par différentes techniques.

Au début du phénomène apoptotique, les phosphatidylsérines subissent un flip flop à travers la membrane plasmique, de la face interne vers la face externe. Ces phosphatidylsérines peuvent alors fixer l'annexine-V. L'annexine-V est une protéine qui fixe les phospholipides et a une forte affinité pour la phosphatidylsérine, en présence de concentrations physiologiques de calcium. Si l'annexine-V est couplée à un fluorochrome, il est alors possible d'étudier ce phénomène par cytométrie en flux. De plus, en utilisant le 7-AAD, qui pénètre à l'intérieur des cellules mortes, les cellules en apoptose tardive ou en nécrose (Annexin-V⁺/7-AAD⁺) peuvent être différenciées des cellules en apoptose précoce (Annexin-V⁺/7-AAD⁻).

1.1.2 Mort par nécrose

Une alternative à la mort par apoptose est la nécrose. C'est un processus toxique où la cellule meurt d'une manière indépendante de l'énergie cellulaire et est donc considérée comme victime passive.

La nécrose s'accompagne d'un gonflement mitochondrial, une perte rapide de l'intégrité de la membrane plasmique suivie d'une fuite du contenu cellulaire, qui entraîne l'activation du processus inflammatoire. La nécrose peut être induite par de nombreux facteurs intra-et extra-cellulaires, elle peut être initiée par les récepteurs de mort tels que les récepteurs de Fas et du TNF- α , mais aussi *via* les TLR 3 et 4 et suite au dommage de l'ADN.

1.1.3 Induction de l'apoptose des cellules T par les toxines bactériennes

Il est globalement admis que la LT et la CT, ainsi que leurs sous-unités B, entraînent une déplétion des cellules T à la fois *in vivo* et *in vitro*, par un mécanisme d'apoptose avec un effet préférentiel sur les cellules T CD8+ [426]. Cependant, quand une analyse détaillée des études est réalisée, il s'avère qu'entre les études, les protocoles expérimentaux, les souches animales, la source et la dose de toxines ne sont pas les mêmes. De plus certaines études ont étudié l'effet sur les cellules T activées d'autres sur les cellules T au repos. Tous ces paramètres peuvent expliquer que certaines études soient contradictoires. Enfin, il semblerait que les cellules n'ont pas la même sensibilité *in vivo* et *in vitro*, qu'elles soient activées ou au repos. Ces études sont résumées dans les **tableaux 3 et 4**.

1.2. Objectifs

Nous avons donc voulu dans un premier temps étudier l'effet de la LT, de la CT et de leurs sous-unités B sur les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ de souris non immunisées (Tregs naturels) et vérifier qu'elles avaient le même effet que la LT-R192G.

Dans un second temps nous avons voulu vérifier, toujours dans notre modèle, l'effet de ces différentes molécules sur les cellules T CD8+ afin de confirmer l'apoptose préférentielle des cellules T CD8+, précédemment rapportée.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'apoptose des cellules CD4+CD25+ (les cellules CD4+CD25+Foxp3+ représentent 5- 10% des lymphocytes T CD4 et environ 50% à J0 des lymphocytes T CD4+CD25+ chez la souris) et des cellules CD4+CD25- afin de montrer une apoptose préférentielle des cellules T CD4+CD25+.

Pour l'étude de l'apoptose, la technique de marquage à l'annexine-V et au 7-AAD puis analyse par cytométrie en flux a été utilisée.

Souche souris	<i>In vivo/ In vitro</i>	Organes/ Tissus	Cellules au repos ou activées	Toxine/ Sous-unité B	Dose	Agent activateur	Protocole expérimental	Effets	Référence
C57Bl/6	<i>In vitro</i>	Rate	Au repos	CTB, CT List Biological Lab	1 µg/ml		Splénocytes CD3, CD8 et CD4 purifiés Pré-incubation avec CTB pendant une heure, lavage puis culture <u>Etude de l'apoptose</u> : analyse ADN	Apoptose préférentielle des cellules T CD8+ CT pas d'effet	[428]
C57BL/6	<i>In vitro</i>	PP	Activées	CT List Biologic Laboratories rCTB	1-10ng/ml	Anti-CD3	Activation des cellules T CD4+ <u>Etude de l'apoptose</u> : Analyse de l'ADN	CT, mais pas CTB, inhibe la prolifération des cellules T CD4+ activées en induisant l'apoptose	[429]
BALB/c	<i>In vitro</i>	Rate	Au repos/activées	rCT	1 µg/ml	ConA	Cellules T CD4+ et CD8+ purifiées <u>Etude de l'apoptose</u> : Marquage Annexin-V/ iodure de propidium	CT induit l'apoptose des cellules T CD8+ au repos et activées	[371]
BALB/c (H-2d)	<i>Ex vivo/ In vitro</i>	Rate	Activées	rCTB, SBL (Uppsala, Sweden)	30-300ng/ml	KLH ConA	Immunisation sous-cutanée avec KLH avec adjuvant complet de Freund Etude prolifération	rCTB stimule les cellules T CD4+ et CD8+ activées par l'Ag Au dessus de 1µg/ml, elle induit l'apoptose	[430]
NIH?	<i>In vitro</i>	GM	Au repos	rCTB	100nM		<u>Etude de l'apoptose</u> : analyse de l'ADN	CTB induit l'apoptose des cellules T CD8+	[431]

Tableau 3 : Etude de l'effet de la toxine du choléra (CT) et de sa sous-unité B (CTB) sur les lymphocytes T

PP : Plaques de Peyer ; rCTB : CTB recombinante ; KLH: keyhole limper haemocyanin ; ConA : concanavaline A

Souche souris	In vivo/ In vitro	Organes /tissus	Cellules au repos ou activées	Toxine/ sous-unité B	Dose	Agent activateur	Protocole expérimental	Effets	référence
BALB/c	<i>In vitro</i>	GL	activées	rLTB	80µg/ml	rLTB	Souris immunisées par ip avec 30µg rLTB et l'adjuvant complet de Freund Etude de la prolifération	rLTB active les cellules T CD4+ mais déplete les cellules T CD8+	[358]
BALB/c	<i>In vitro</i>	GM	activées	rLTB	40µg/ml	OVA	-Souris immunisées par ip avec 200µg OVA et l'adjuvant incomplet de Freund <u>-Etude de prolifération</u> 100µg/ml OVA avec ou sans 40µg/ml rLTB pendant 5 jours <u>-Etude de l'apoptose</u> à partir de cellules T CD4+ et CD8+ purifiées avec analyse de l'ADN	Apoptose sélective des cellules T CD8+ après 18h	[432]
Plusieurs (entre autres BALB/c et C57BL/6)	<i>In vitro</i>	GM rate	Au repos/ activées	rLTB	10µg/ml	Anti-CD3 H-2-κ	-Cellules T CD4+ et CD8+ purifiées <u>-Etude de prolifération</u> <u>-Etude de l'apoptose :</u> Analyse de l'ADN, Phosphatidylsérine (annexin-V/7-AAD) et intégrité de la membrane	- rLTB inhibe la prolifération polyclonale des cellules T CD4+ et CD8+ de rate -Induction d'apoptose dans les cellules au repos et activées - les cellules activées sont plus résistantes	[433]
BALB/c	<i>In vitro</i>	GM	Au repos	rLTB et mutant (G33D)	30µg/ml		-Cellules T CD4+ et CD8+ purifiées <u>Etude apoptose:</u> Analyse de l'ADN	Apoptose sélective des cellules T CD8+ NF-κB participe à l'induction de l'apoptose en modulant l'expression de c-myc	[377]
BALB/c	<i>In vitro/ In vivo</i>	Thymus Organes lymphoïdes secondaires	Au repos	LT Chiron Vaccines Siena			Injection systémique et muqueuse <u>Etude de l'apoptose</u> Marquage Annexin-V/7-AAD	-Déplétion des thymocytes, principalement les thymocytes CD4+CD8+ SC> IP > Oral > IN -effet des deux sous-unités A et B -effet moins marqué sur les cellules T matures des organes lymphoïdes secondaires <i>-In vitro</i> , apoptose des thymocytes CD4-CD8+ après 24h (1µg/ml LT)	[422]

Tableau 4 : Etude de l'effet de l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* (LT) et de sa sous-unité B (LTB) sur les lymphocytes T

GL : ganglions lymphatiques ; GM : ganglions mésentérique ; OVA : ovalbumine ; ip : intrapéritonéal ; sc : sous-cutanée ; IN : intranasal

II. DISCUSSION

Dans un premier temps, nous avons voulu voir l'effet d'autres adjuvants de la famille de la toxine du choléra sur les lymphocytes Tregs naturels CD4+CD25+Foxp3+ chez des souris non immunisées. Nous avons testé la LT native, la LTB, la CT et la CTB. Toutes, exceptée la CTB, diminuent les Tregs naturels CD4+CD25+Foxp3+ provenant de GM après contact *in vitro*. L'absence d'effet de la CTB nous a dans un premier temps surpris au regard de la littérature. En effet, au même titre que les toxines entières, les sous-unités B, non toxiques, ont été rapportées induire l'apoptose des lymphocytes T *in vitro* [428, 431-433]. Deux hypothèses : (1) la CTB n'a pas d'effet sur les Tregs naturels mais induit l'apoptose des autres lymphocytes T (CD4+ et CD8+); (2) la CTB n'a pas d'effet sur l'ensemble de lymphocytes T, aussi bien les Tregs que les autres populations T CD4+ ou CD8+

Dans un deuxième temps, afin de préciser l'effet des toxines et de leurs sous-unités B sur les lymphocytes T dans notre modèle d'étude *in vitro*, nous avons regardé l'effet de ces molécules sur les lymphocytes, en particulier sur les cellules T CD3+CD8+.

Quand l'ensemble des cellules de GM et de rate sont analysées, la LT, la LTR192G, la CT et dans une moindre mesure la LTB mais pas la CTB entraînent la déplétion de l'ensemble des cellules de GM et de la rate. Plus précisément, cette diminution se fait par un mécanisme d'apoptose.

Nous avons ensuite analysé les cellules T CD3+CD8+ et T CD3+CD8- ainsi que les cellules CD3- CD8-. Comme attendu, la LT, la LT-R192G et la LTB induisent une rapide déplétion des cellules T CD8+ et ceci par induction d'apoptose. La CT induit également une déplétion de ces cellules mais elle est retardée. De plus, contrairement à la LT, la LT-R192G et la LTB, la CT n'entraîne pas de diminution d'expression de CD3 sur ces cellules, observation qui n'a jamais été rapportée dans la littérature. Nous avons aussi noté que la LTB, contrairement à la LT et la LT-R192G activent les lymphocytes CD3-CD8-, probablement les lymphocytes B (augmentation d'expression de CD25 sur les cellules CD4-CD25-), en accord avec la littérature [432]. Ces résultats montrent et confirment des différences entre ces molécules qui en fait sont en accord avec leurs propriétés adjuvantes et immunomodulatrices différentes. Notamment, l'effet de la sous-unité A de la CT semble important dans l'induction de l'apoptose, la CTB n'ayant aucun effet, alors que pour la LT, elle ne semble pas intervenir. De plus l'absence d'effet avec la CTB et un effet de la LTB peut s'expliquer par la fixation à des récepteurs autres que les gangliosides GM1 dans le cas de la LTB.

Il semblerait que ces molécules utilisent plusieurs mécanismes pour induire l'apoptose. Notamment, des études ont montré qu'elles peuvent activer différentes voies, selon qu'ils s'agissent de cellules matures ou immatures [422, 423]. De plus, Salmond et al. (2002) [427] ont montré que la LTB induit l'apoptose des cellules T CD8+ en utilisant une nouvelle voie passant par NF- κ B. Enfin, ils ont montré que des voies de mort cellulaire indépendantes des caspases étaient aussi activées, passant par les mitochondries et faisant intervenir la NO synthase et non Bax [434].

Dans un troisième temps, nous avons voulu voir s'il y avait une apoptose préférentielle des cellules CD4+CD25+ pouvant expliquer la diminution des Tregs naturels observés précédemment. En fait, nous n'avons observé aucune apoptose préférentielle de ces cellules par rapport aux cellules CD4+CD25-. Cette divergence de résultats peut s'expliquer par des méthodes différentes d'analyse. Il faudrait probablement isoler les sous-populations lymphocytaires pour mettre une éventuelle apoptose préférentielle en évidence.

Au vu de ces résultats et aux différences observées, nous avons voulu ensuite étudier quel était l'effet adjuvant de ces molécules dans notre modèle d'immunisation intrarectale avec les VLP-2/6 et le comparer à celui de la LT-R192G, notamment sur l'induction des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ et la sécrétion d'IL-2.

Article III:

ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIN MUTANT (LT-R192G), CHOLERA TOXIN AND ITS B SUBUNIT (CTB) PROMOTE SIMILAR SYSTEMIC AND FECAL ANTIBODY TITERS AS WELL AS TH17 RESPONSE TO ROTAVIRUS 2/6-VLP BUT DIFFERENT CD4+CD25+FOXP3- AND FOXP3+ T CELL RESPONSES

I. Introduction à l'article

Les résultats précédents ont montré que la LT-R192G induisait une réponse T mémoire CD4+CD25+Foxp3- (Th) et CD4+CD25+Foxp3+ (Tregs) spécifique de l'antigène (VLP-2/6) ainsi que la production d'IL-2 [420]. De plus, la LT-R192G induit également des Tregs mémoires CD4+CD25+Foxp3+.

Chez les souris témoins, la LT-R192G entraîne une diminution des Treg CD4+CD25+Foxp3+ (Tregs naturels) après contact *in vitro*, accompagnée d'une diminution de l'expression de CD25 [420].

Les toxines non mutées, LT et CT ainsi que la LTB ont le même effet que la LT-R192G sur les lymphocytes Tregs naturels CD4+CD25+Foxp3+ (Article II). La CTB au contraire n'induit pas la mort de ces cellules *in vitro*. Dans notre modèle, nous avons également montré que ces molécules, à l'exception de la CTB, induisaient également la mort par apoptose des lymphocytes T CD4+CD25+ et CD25- ainsi que des lymphocytes T CD8+ avec des différences selon les molécules, d'intensité et/ou de cinétique (Article II).

Cette étude ainsi que d'autres études montrent que malgré une forte parenté structurale, les effets de ces molécules sur les réponses immunes et notamment sur les lymphocytes T peuvent être différents. Ainsi, la LT-R192G est connue pour induire des réponses immunes mixtes de type Th1/Th2 [318]. Par contre La CT, induirait plutôt une réponse Th2 prédominante [391, 435], bien que certaines études aient montré que la CT pouvait aussi induire une réponse mixte Th1/Th2 [394, 436]. La CT serait également capable d'induire des lymphocytes T régulateurs Tr1 spécifiques de l'antigène [437]. Pour ajouter à la complexité, les sous-unités B dépourvues d'activité enzymatique agissent de façon différente par rapport aux toxines entières. La CTB et la LTB dépourvues de toute toxicité ont des propriétés adjuvantes quand elles sont co-administrées par voie intranasale avec des antigènes hétérologues. Ces sous-unités B, et en particulier la CTB, sont aussi connues pour induire un effet tolérogène vis-à-vis d'antigènes co-administrés. De plus La CTB induit des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ dans un modèle d'allergie quand elle est administrée de façon conjugué à l'ovalbumine [438]. Enfin récemment, il a été montré que la CT pouvait induire des réponses de type Th17 vis-à-vis des antigènes co-administrés, cette réponse serait essentielle à l'effet adjuvant et serait due à la sous-unité B [397, 398, 439]. La LT, comme la CT induit également une réponse Th17 [399]. D'autres études ont montré que l'immunisation intranasale et intrarectale de souris avec la protéine de fusion MBP chimérique (maltose binding protein)-VP6 en présence de LT-R192G induit des cellules T

CD4+ mémoires productrices d'IFN- γ et d'IL-17, les auteurs ont ainsi suggéré qu'au moins une de ces deux cytokines joue un rôle dans le contrôle de la réplication intestinale du rotavirus [349-351].

Enfin, différentes études rapportent des effets différents selon le protocole expérimental, la voie d'immunisation, la dose administrée, la souche animale utilisée et selon que l'étude soit effectuée *in vitro* ou *in vivo*.

Vu les différences observées précédemment chez les souris témoins ainsi que la complexité des effets de ces molécules, nous avons voulu comparer leurs effets dans notre modèle après immunisation intrarectale avec les VLP2/6.

Dans cette étude, l'effet adjuvant de la LT-R192G sur la réponse anticorps ainsi que sur les lymphocytes T CD4+ a été comparé à celui des toxines entières (LT, CT) ainsi qu'à celui des sous-unités B (CTB et LTB). La comparaison entre LT-R192G, CT et CTB fait l'objet de l'article 3. L'étude sur la LTB et la LT est présentée sous forme de résultats complémentaires.

II. Discussion

Dans cette étude nous avons comparé les effets de la LT-R192G avec ceux de la CT et de sa sous-unité B (CTB), d'une part sur la réponse anticorps afin de vérifier l'effet adjuvant, et d'autre part sur la réponse T CD4 mémoire afin de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les molécules.

Pour la réponse anticorps, les souris BALB/c ont été immunisées deux fois avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G, CT ou CTB. Sept jours après la seconde immunisation, les souris ont été sacrifiées, le sang et les selles prélevés puis les IgM, IgG et IgA ont été dosées (réponse secondaire). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G, de CT ou de CTB. Ainsi dans notre modèle, la CTB a un effet adjuvant aussi efficace que la LT-R192G et la CT sur la réponse anticorps. Dans le cas de la LT-R192G et de la CT, cette réponse anticorps est associée à une protection après immunisation intrarectale avec des VLP-8-2/6/7 de rotavirus [12]. Dans cette étude, la CTB n'avait pas été étudiée. D'autres études ont également rapporté que la CTB augmentait les réponses immunes après administration avec des antigènes par voie intra-nasale [321, 362, 363, 440]. Cependant la CTB a également été montrée avoir un faible effet adjuvant voire induire la tolérance à des antigènes coadministrés ou conjugués [372]. Ainsi selon le modèle, la CTB peut avoir des effets différents.

Nous avons ensuite comparé les effets de ces molécules sur les réponses T CD4 mémoires. Après immunisation en présence de l'une de ces molécules, les souris ont été sacrifiées 14 jours après et les cellules de GM mises en culture avec l'antigène, l'adjuvant ou les deux.

Suite à la restimulation avec l'antigène, les résultats obtenus précédemment avec les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G ont été retrouvés : un taux d'IL-2 élevé associé à l'activation des lymphocytes T spécifiques CD4+CD25+Foxp3- (augmentation de l'expression de CD25) et CD4+CD25+Foxp3+ (augmentation de l'expression de CD25 et de Foxp3). Nous avons conclu, sur la base du fait que les VLP seules n'avaient aucun effet, que la LT-R192G utilisée en tant qu'adjuvant permet d'induire des lymphocytes T auxiliaires CD4+CD25+Foxp3- et régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ mémoires spécifiques des VLP-2/6 [420]. Chez les souris immunisées en présence de CT, les VLP induisent une production moindre d'IL-2 ainsi qu'une réponse T auxiliaire mémoire CD4+CD25+Foxp3- moins importante. La différence de production d'IL-2 entre la CT et la LT-R192G est en accord avec des études précédentes montrant que la LT induit une réponse mixte Th1/Th2 [318] alors que la CT oriente plutôt les réponses vers un profil Th2 dominant [391, 435].

Concernant la réponse T régulatrice VLP-2/6 spécifique, une augmentation d'expression de CD25 sur les Tregs CD4+CD25+Foxp3+ est observée, cependant, elle est inférieure à celle induite dans le groupe VLP + LT-R192G. De plus, à la différence du groupe VLP+LT-R192G, la restimulation avec les VLP n'augmente pas l'expression de Foxp3. Ce résultat confirme l'importance de l'IL-2 dans l'activation de ces cellules [441]. En effet, l'IL-2 est essentielle à l'expression de Foxp3 et donc à la fonction suppressive des Treg CD4+CD25+Foxp3+ [441].

Chez les souris immunisées avec les VLP en présence de CTB, la CTB a des effets très différents de ceux de la LT-R192G et de la CT, en effet aucune production d'IL-2 n'est observée, de plus, il n'y a pas d'activation des cellules T CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+. Ainsi, la CTB n'induit pas de lymphocytes T mémoires CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ spécifiques de l'antigène dans notre modèle contrairement à d'autres modèles notamment d'immunisation intragastrique, intranasale ou sublinguale avec un conjugué OVA-CTB [442].

Suite à la restimulation avec l'adjuvant, chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G, une production d'IL-2 est observée en réponse à l'adjuvant, associée à une augmentation d'expression de Foxp3 sur les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ mémoires spécifiques ; nous avons également observé un maintien des Tregs dans le temps. Au contraire, chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de CT, l'adjuvant n'induit pas de production d'IL-2 ce qui est corrélé avec l'absence d'activation des Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (absence d'augmentation de l'expression de CD25 et de Foxp3). De plus, une diminution des Tregs est observée dans le temps. Cette diminution pourrait être due à la mort par apoptose des cellules CD4+CD25+Foxp3+ non activées (Article II) comme observé chez les souris non immunisées. Cependant, la restimulation avec la CT et l'antigène entraîne une diminution des réponses induites par l'antigène seul. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la CT induit d'autres populations de Tregs. Lavelle et al. ont rapporté l'induction de lymphocytes Tr1 par la CT après immunisation sous-cutanée [443]. Ici nous n'avons pas retrouvé d'IL-10 dans les surnageants de culture rendant peu probable cette hypothèse et suggérant un impact de la voie d'administration et/ou de l'antigène sur l'induction de ces cellules. D'autres lymphocytes T régulateurs (Th3 ou CD8 pourraient être impliqués). En conclusion, la CT contrairement à la LT-R192G n'induit pas de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ dans notre modèle.

Chez la souris immunisée avec les VLP en présence de CTB, la CTB n'a aucun effet sur la production d'IL-2 ni sur l'activation des lymphocytes CD4+CD25+Foxp3⁻ ou Foxp3⁺. De plus, les Tregs ne diminuent pas dans le temps comparé au témoin contrairement à la CT.

La restimulation avec l'antigène et la LT-R192G montre un effet immunomodulateur de l'adjuvant. En effet, la LT-R192G diminue l'effet observé dans les puits restimulés avec les VLP seules : diminution de la production d'IL-2, diminution du pourcentage de cellules CD4+CD25+Foxp3⁻ et Foxp3⁺ et de l'expression de CD25. La CT a également un effet immunomodulateur mais moindre que la LT-R192G. D'autres études ont montré que la CT et la LTB inhibent la prolifération polyclonale et l'activation des cellules T CD4⁺ antigène spécifiques. Cet effet pourrait être la conséquence de l'addition des effets des lymphocytes Tregs induits par l'antigène et par l'adjuvant et pourrait *in vivo* permettre d'éviter des réponses T secondaires délétères.

Enfin, contrairement à la LT-R192G et à la CT, la CTB semble avoir l'effet opposé. En effet, la CTB semble augmenter la réponse T CD4+CD25+Foxp3⁻ antigène spécifique et diminuer la réponse CD4+CD25+Foxp3⁺. Ce résultat statistiquement significatif demande à être confirmé, toutefois, il est à noter qu'un effet similaire a également été observé avec la LTB (voir résultats complémentaires)

Le dosage de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-17 pour les trois groupes de souris montre des résultats similaires, une absence complète de production d'IL-4 et 10 et au contraire la production d'IL-17 en réponse à l'antigène. L'absence d'IL-4 et d'IL-10 est en contradiction avec des résultats obtenus précédemment dans notre équipe avec la voie intranasale. Fromantin et al. (2001) montrant que la LT et la CT induisaient la production d'IL-4 et d'IL-10 [394]. La confirmation récente que l'immunisation avec des VLP-2/6 en présence de LT-R192G ou de CT par voie intranasale, au contraire de la voie intra-rectale, induit la production d'IL-10 par les splénocytes après restimulation avec l'antigène confirme que la voie d'immunisation est un facteur déterminant dans la production d'IL-10 (A. Alkadah, résultats non publiés).

Par contre chez toutes les souris y compris les souris immunisées en présence de CTB et au contraire des souris immunisées en présence des VLP seules, nous avons trouvé de l'IL-17 suite à la restimulation avec les VLP-2/6. L'IL-17, seul paramètre commun entre ces trois molécules parmi les paramètres étudiés, pourrait donc être corrélée avec la production d'anticorps et jouer un rôle essentiel dans l'effet adjuvant de ces molécules comme l'ont montré des études récentes [349, 350, 397].

III. Résultats Complémentaires

Dans cette partie nous allons développer les résultats concernant les souris immunisées avec des VLP-2/6 en présence de la LT non mutée ou de sa la sous-unité B (LTB).

➤ Chez les souris immunisées avec VLP-2/ en présence de **LTB**, la LTB comme les autres molécules (LT-R192G, CT et CTB) induit une forte réponse anticorps sérique et fécale ce qui prouve qu'elle a un effet adjuvant sur les réponses B (**Figure 26**). Une étude de l'équipe de Dellagostin a également montré que la LTB possède un effet adjuvant sur la réponse immune humorale en réponse à des antigènes recombinants exprimé dans le BCG [360]. La LTB est également connue pour avoir un effet adjuvant par voie IN (Article II).

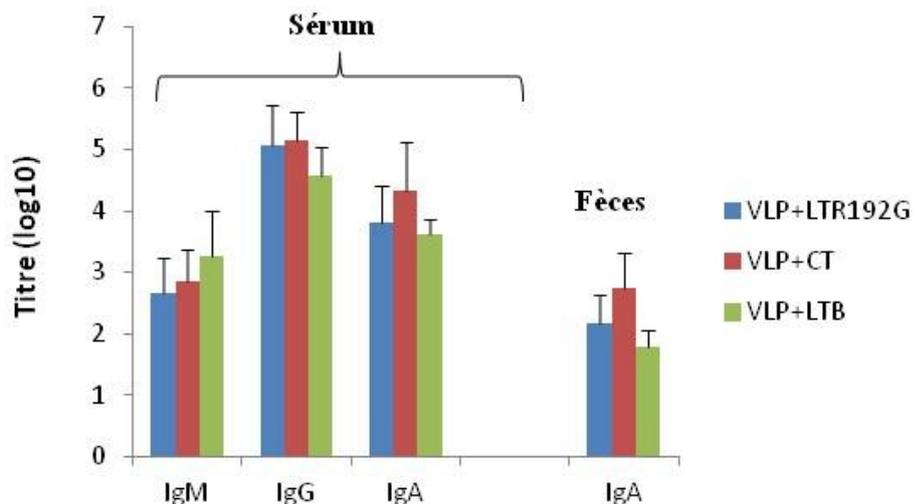


Figure 26 : Etude de la réponse anticorps chez les souris immunisées avec les VLP-2/6 et la LTBl **LT-R192G et la CT.** Les souris ont été immunisées par voie intrarectale avec les VLP-2/6 (10 µg) et l'adjuvant (10 µg) deux fois à 14 jours d'intervalles puis sacrifiées 7 jours après la deuxième immunisation. Les anticorps spécifiques des VLP-2/6 ont été quantifiés dans se sérum et les selles par ELISA.

Après restimulation avec l'antigène aucune production d'IL-2 n'est observée, cependant il y a une augmentation d'expression de CD25 sur les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- (p=0.01) et CD4+CD25+Foxp3+ (p=0.01) (**Figure 27**). Cette augmentation de l'expression de CD25 en l'absence de production d'IL-2 suggère que d'autres cytokines pourraient être impliquées dans la signalisation de CD25 comme l'IL-15 par exemple [444]. Nous n'avons

pas observé d'augmentation d'expression de Foxp3 sur les Tregs, confirmant encore une fois l'importance de l'IL-2 pour l'expression de Foxp3.

De plus, la LTB n'induit pas de production d'IL-4 ni d'IL-10 en réponse à l'antigène, cependant elle induit de l'IL-17. Ces résultats sont en accord avec ceux de Raveney et al. qui ont montré que la LTB inhibait *in vivo* les réponses Th1 et favorisait plutôt les réponses Th17 dans un modèle auto-immun d'uvéorétinite [400].

En conclusion, ces résultats montrent que la LTB induit des lymphocytes T mémoires CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ spécifiques des VLP-2/6 en l'absence d'IL-2

Enfin la restimulation avec la LTB induit contrairement aux autres molécules une augmentation du pourcentage des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- ($p=0.01$) associée à une faible augmentation d'expression de CD25 à J2 ($p=0.015$), avec une diminution des lymphocytes CD4+CD25+Foxp3+ ($p=0.01$) accompagnée d'une diminution de leur expression en CD25 ($p=0.015$) et Foxp3 ($p=0.015$) (Figure 27). L'augmentation des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- pourrait s'expliquer par cette diminution des Tregs CD4+CD25+Foxp3+. En conclusion, la LTB induit des lymphocytes mémoires CD4+CD25+Foxp3- spécifiques mais elle n'induit pas de Tregs spécifiques CD4+CD25+FoxP3+.

La restimulation avec les VLP-2/6 en présence de LTB montre des résultats similaires à ceux de la LTB seule.

Au total, les résultats observés avec la LTB montrent une réponse anticorps similaire mais une réponse CD4 très différente de celle des molécules entières mais également de celle de la CTB, le seul point commun entre toutes ces molécules étant la production d'IL-17.

Cellules T CD4+

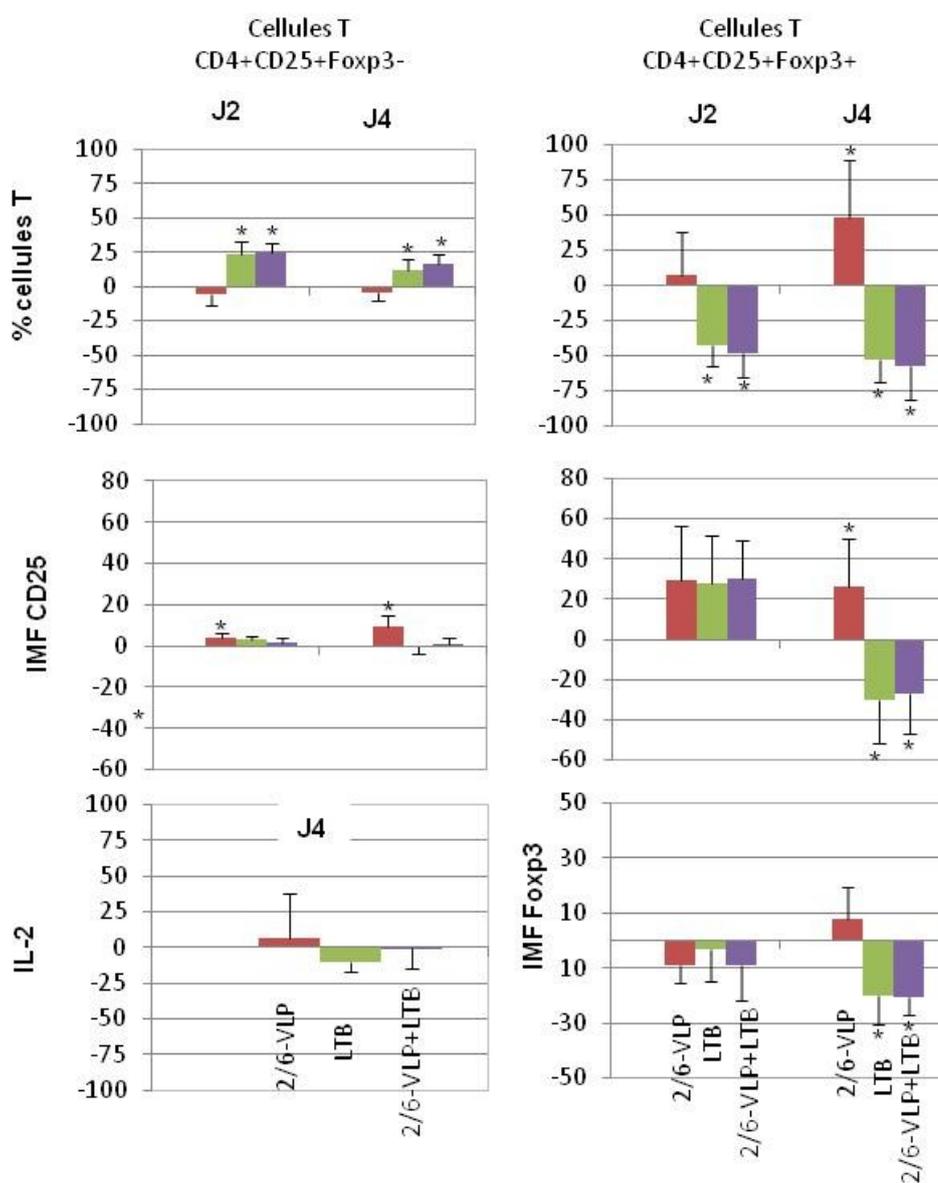
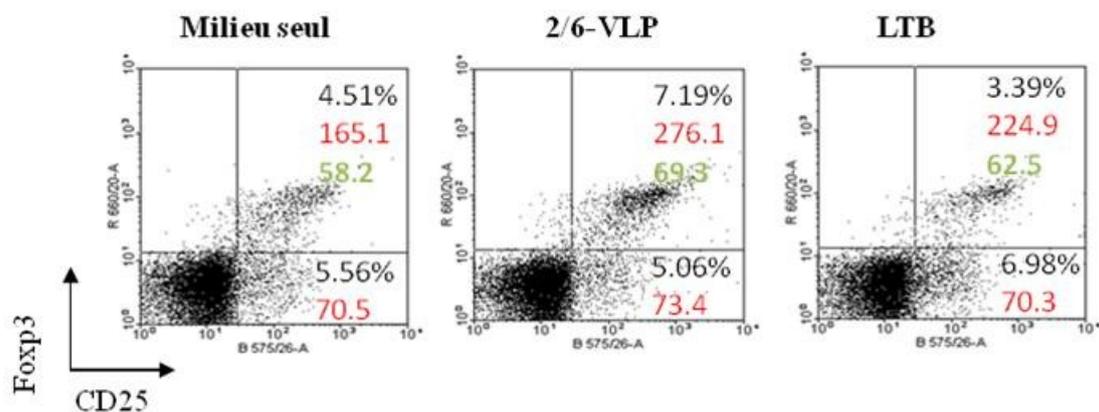


Figure 27: Etude de la réponse T mémoire auxiliaire CD4+CD25+Foxp3- et régulatrice CD4+CD25+Foxp3+ spécifique de l'antigène et de la LTB, après immunisation de souris par voie intrarectale avec les VLP-2/6 et la LTB.

Les souris ont été immunisées par voie intrarectale avec les VLP-2/6 (10 µg) et l'adjuvant (10 µg) puis sacrifiées 14 jours plus tard. Les cellules des GM ont été isolées puis incubées avec l'antigène seul (5 µg/mL), l'adjuvant seul (5 µg/mL) ou les deux. Après deux et quatre jours de culture, le pourcentage des cellules T CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence CD25 et Foxp3 ont été analysés par cytométrie en flux et l'IL-2 dosée par ELISA. Les lymphocytes ont été identifiés en fonction de leur taille-structure puis les cellules T CD4+ par fixation d'un anti-CD4 et enfin les cellules T CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ par fixation d'un anti-CD25 et anti-Foxp3. (A) Dotplots représentatifs d'une souris. Le chiffre en noir correspond au % de cellules, le chiffre en rouge à l'IMF de CD25 et le chiffre en vert à l'IMF de Foxp3 (B) Les histogrammes montrent le % d'augmentation ou de diminution de chaque paramètre en comparaison avec le puits non stimulé (n=6).

➤ Pour les souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de **LT non mutée**, les résultats préliminaires obtenus (2 souris) montrent des similitudes avec la LT-R192G avec cependant une différence. *In vivo*, la LT induit une production d'anticorps sérique et fécale similaire à celle observée avec la LT-R192G, la CT et la CTB. .

Après restimulation avec les VLP-2/6 de cellules de GM de souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence la LT, des résultats similaires à ceux observés précédemment pour les souris immunisées avec VLP-2/6 + LT-R192G ont été retrouvés (**Figure 28**), à savoir un taux d'IL-2 élevé associé à l'activation des lymphocytes T spécifiques CD4+CD25+Foxp3- (augmentation de l'expression de CD25) et CD4+CD25+Foxp3+ (augmentation de l'expression de CD25 et de Foxp3). Comme la LT-R192G, la LT induit également la production d'IL-17 en réponse à l'antigène, mais pas d'IL-4 ni d'IL-10.

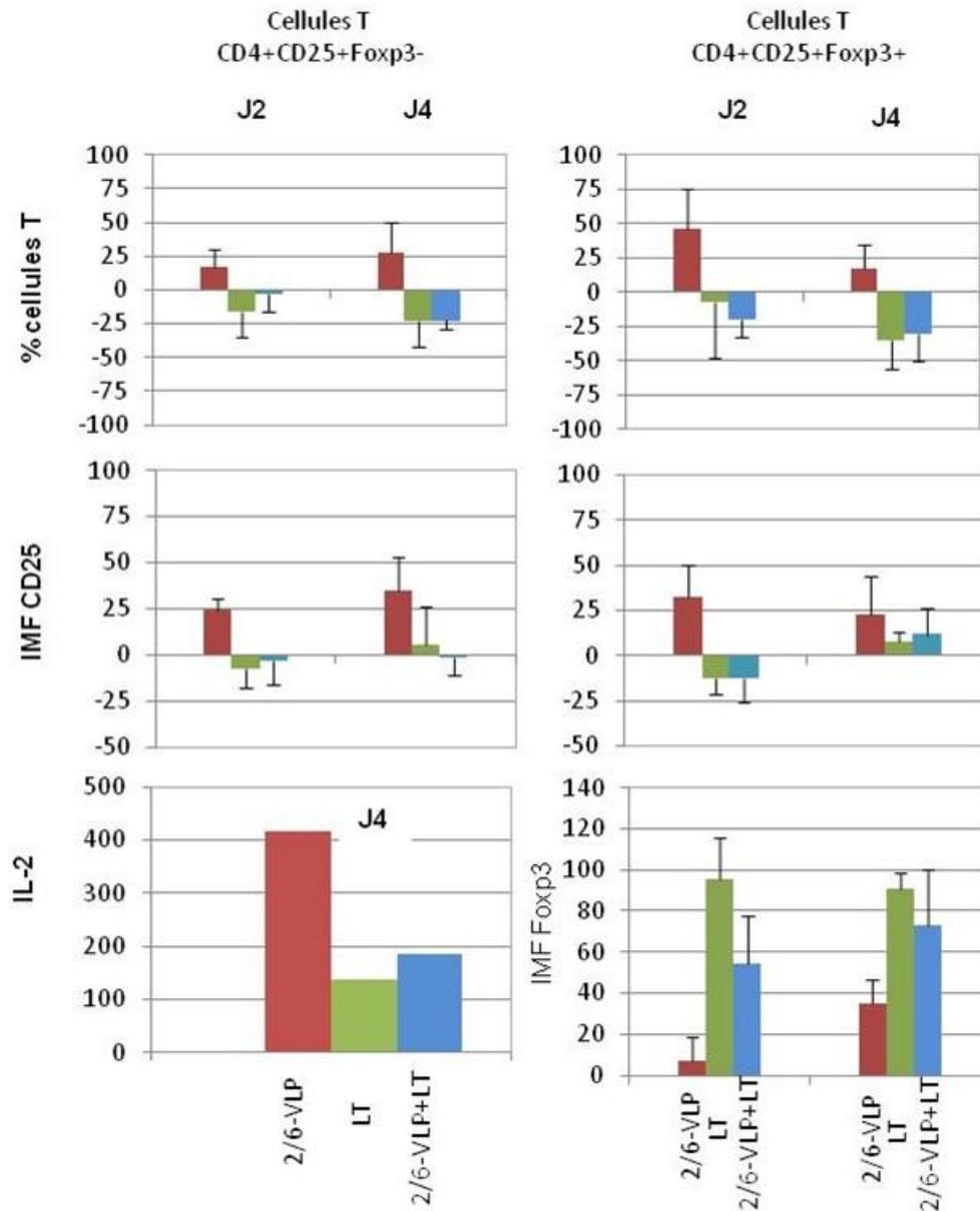


Figure 28 : Etude de la réponse T mémoire CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ spécifique de l'antigène et de l'adjuvant, après immunisation de souris par voie intrarectale avec des VLP-2/6 et la LT.

Les lymphocytes ont été identifiés en fonction de leur taille-structure puis les cellules T CD4+ par fixation d'un anti-CD4 et enfin les cellules T CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ par fixation d'un anti-CD25 et anti-Foxp3. Les histogrammes montrent le % d'augmentation ou de diminution de chaque paramètre en comparaison avec le puits non stimulé (n=2).

Après restimulation avec l'adjuvant, une production d'IL-2 est observée, associée à une forte augmentation d'expression de Foxp3 sur les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ mémoires spécifiques comme chez la souris immunisée avec les VLP-2/6 en présence de LT-R192G (Figure 28). Cependant nous n'avons pas trouvé de maintien des Tregs dans le temps comme c'est le cas avec la LT-R192G mais plutôt une diminution de cette population.

Cette diminution des Tregs pourrait être due à un mécanisme d'apoptose comme chez les souris non immunisées (cellules T au repos). Ce phénomène pourrait être la conséquence de l'activité enzymatique de la LT. En effet l'accumulation de l'AMPc intracellulaire rompt l'homéostasie intracellulaire ce qui peut entraîner la mort [422]. L'équipe de Mérino a également montré que la LT pouvait induire la mort par apoptose des lymphocytes matures et immatures *in vivo* par des mécanismes impliquant à la fois des signaux intrinsèques (voies Fas/FasL) et extrinsèques (glucocorticoïdes) [422, 423]. Ainsi, la CT et la LT induisent la mort des lymphocytes CD4+CD25+Foxp3+ au repos mais également des lymphocytes T activés, à la différence de la LT-R192G. Cependant la LT comme la LT-R192G, à la différence de la CT augmente l'expression de Foxp3. Toutefois, ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de souris.

DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES

I. DISCUSSION GENERALE

Le but de cette thèse était d'étudier l'effet de différents adjuvants de la famille de la toxine du choléra (LT et CT ainsi que le mutant LT-R192G et les sous-unités B non toxiques de ces toxines) sur les lymphocytes T CD4, dans un modèle murin d'immunisation intrarectale avec des pseudoparticules virales de rotavirus (VLP-2/6). En effet, malgré de nombreuses études, le mécanisme d'action de ces molécules reste mal connu et, même si elles sont très proches au niveau structure, des effets différents ont été rapportés. De plus, des différences ont également été rapportées selon la voie d'administration, la dose et le contexte *in vitro* ou *in vivo* des analyses.

L'intérêt de notre étude est d'avoir comparé les effets de ces molécules sur les réponses immunes dans un même modèle (Table 5).

Ainsi, chez les souris non immunisées, nous avons montré que ces adjuvants, à l'exception de la CTB, aussi bien les molécules entières (LT, LT-R192G et CT) que la sous-unité B de la LT, la LTB, diminuent les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+. En étudiant le mécanisme de mort cellulaire, nous avons trouvé que ces mêmes molécules induisaient la mort par apoptose des cellules T CD8+ comme cela a été rapporté dans la littérature [358, 427] ainsi que celle des cellules CD4+CD25+ et CD4+CD25-. La CTB, elle, n'a pas effet. La mort induite par ces toxines pourrait se faire par une voie caspase dépendante mais également *via* les récepteurs de mort suite à la fixation du ligand (Fas/FasL).

Chez les souris immunisées, toutes les molécules étudiées induisent une même réponse anticorps sérique et fécale. Aucune différence n'a été notée entre les molécules entières connues pour leur fort pouvoir adjuvant et les sous-unités B qui, elles, ont été rapportées avoir un faible effet adjuvant et même un effet tolérogène dans certaines études. Notre étude montre un même pouvoir adjuvant en termes de réponse anticorps dans le modèle d'immunisation intrarectale avec des VLP-2/6 de rotavirus.

Concernant la réponse mémoire T CD4 spécifique de l'antigène, la LT et son mutant, la LT-R192G permettent l'induction d'une réponse T mémoire CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ spécifique des VLP-2/6 avec une forte production d'IL-2, ainsi que la production d'IL-17 mais pas d'IL-4, ni IL-10. La LT et la LT-R192G semblent agir de la même façon, sauf que la toxine entière diminue les Tregs dans le temps ce qui pourrait être dû à son activité ADP-ribosyl transférase, le mutant LT-R192G ayant une très faible activité enzymatique résiduelle [318].

La LTB, contrairement à la LT et à la LT-R192G, ne permet pas l'induction d'IL-2 mais par contre, permet l'induction de lymphocytes T mémoires CD4+CD25+Foxp3⁻ et Foxp3⁺ spécifiques de l'antigène associée à une augmentation de CD25. Ce résultat suggère que, soit de très faibles taux d'IL-2 sont produits et consommés, soit une autre cytokine est impliquée [444]. Par contre, la LTB ne permet pas l'augmentation de Foxp3 sur les lymphocytes Tregs, en accord avec l'absence d'IL-2 dans le milieu. De plus, comme la LT, et à la différence du mutant LT-R192G, elle diminue les Tregs. Ce résultat est en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle cette diminution serait liée à l'activité enzymatique.

La CT, comparée à la LT et au mutant LT-R192G induit une production d'IL-2 moins importante, corrélée à une activation moins importante des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3⁻ et Foxp3⁺ et à l'absence d'augmentation d'expression de Foxp3.

La CT induit également la production d'IL-17 mais pas d'IL-4 et IL-10 en réponse à l'Ag, comme la LT, la LT-R192G et la LTB. Enfin, la CT, contrairement à la LT, n'induit pas de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3⁺ spécifiques de l'adjuvant, d'autres sous-populations de Tregs pourraient être impliquées.

Enfin, nous avons trouvé que la CTB, contrairement à la CT, n'a aucun effet sur les réponses étudiées à l'exception de la production d'IL-17. Ses effets sur la réponse T CD4 ne sont donc pas superposables à ceux de la sous-unité B de la LT comme cela a déjà été suggéré précédemment [442]. Ces différences pourraient être la conséquence de la liaison différente aux récepteurs cellulaires, la CTB se liant surtout aux gangliosides GM1, la LTB pouvant se lier à d'autres récepteurs.

Par contre, la CTB induit de l'IL-17 ainsi qu'une réponse anticorps similaire à la CT ce qui suggère l'importance de l'IL-17 dans l'effet adjuvant et confirme des résultats récents [349, 350, 397].

En conclusion, suite à notre étude nous pouvons dire que ces molécules ont un mécanisme d'action très complexe et des effets sur les réponses T CD4 mémoires (spécifiques de l'antigène et de l'adjuvant) différents. Cependant, elles ont un même pouvoir adjuvant sur les réponses immunes humérales ainsi que sur la production d'IL-17 en réponse aux VLP-2/6, suggérant le rôle majeur de cette cytokine dans le mécanisme d'action de l'effet adjuvant de ces molécules et confirmant ainsi des résultats récents. En outre, nous avons vu que la LT, la LT-R192G et la CT permettent la production d'IL-2 et l'activation de lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3⁻ mémoires spécifiques de l'antigène tout en permettant la

mise en place d'une régulation médiée par les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ (boucle d'autorégulation), qui pourrait jouer un rôle majeur lors d'une réponse secondaire afin d'éviter les réactions inflammatoires ou auto-immunes délétères.

II. PERSPECTIVES

Suite à notre étude, un certain nombre de points restent à élucider. Il est nécessaire notamment d'étudier l'effet de ces molécules sur d'autres populations de lymphocytes T régulateurs comme les Tr1 ou les Th3 mais également des Tregs CD8+. En effet, nous avons montré que la CT, la LTB et la CTB, contrairement aux autres toxines, n'induisent pas de Tregs CD4+CD25+Foxp3+, ainsi elles pourraient induire d'autres Tregs.

Il serait intéressant par ailleurs de reprendre les expériences d'immunisation par voie intranasale. D'ailleurs, ce travail est en cours (thèse d'A. Alkadah en cours au laboratoire). En effet, la voie d'immunisation semble un élément important dans l'orientation des réponses. La voie intranasale est une voie très efficace dans l'induction de réponses muqueuses et les résultats récents montrent que la restimulation de cellules de rate ou de ganglions cervicaux provenant de souris immunisées avec les VLP-2/6 en présence de CT ou de LT-R192G induit de l'IL-10 ce qui n'est pas le cas de la voie intrarectale.

Enfin, étant données les différences observées entre ces molécules, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation des cellules T CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules. Ainsi, la voie des MAP kinases pourra être étudiée. Deux approches sont à envisager : l'étude de l'effet d'inhibiteurs pharmacologiques des MAP kinases sur les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ et le marquage des formes phosphorylées des MAPKs (formes activées) par des anticorps spécifiques suivi de l'analyse des lymphocytes T par cytométrie en flux.

A. Effet des molécules sur les cellules T au repos (Souris non immunisée)								
		LT	LT-R192G	LTB	CT	CTB		
Apoptose	CD8+	+++	+++	+++	++	-		
	CD4+CD25-	++	++	++	++	-		
	CD4+CD25+	++	++	++	++	-		
	CD4+CD25+Foxp3+*	++	++	++	++	-		
B. Effet des molécules sur les réponses T CD4+ mémoires (Souris immunisée avec antigène et adjuvant)								
		VLP+LT	VLP+LT-R192G	VLP+LTB	VLP+CT	VLP+CTB		
Réponse à l'antigène VLP-2/6	Réponse Anticorps	IgM (serum)	++	++	++	++	++	
		IgA (serum)	+++	+++	+++	+++	+++	
		IgG (serum)	+++	+++	+++	+++	+++	
		IgA (selles)	++	++	++	++	++	
	Réponse mémoire T CD4+	CD4+CD25+Foxp3-	%	↑	↑	-	-	-
			MFI CD25	↑↑	↑↑	↑	↑	-
		CD4+CD25+Foxp3+	%	↑	↑	↑	↑	-
			MFI CD25	↑	↑↑	↑	↑	-
			MFI Foxp3	↑	↑	-	-	-
	Cytokines	IL-2	++	+++	-	+	-	
		IL-10	-	-	-	-	-	

		IL-4		-	-	-	-	-
		IL-17		++	++	++	++	++
Réponse à l'adjuvant	Réponse T mémoire CD4+	CD4+CD25+Foxp3-	%	↓	-	↑↑	-	-
			MFI CD25	-	↓	↑	-	-
		CD4+CD25+Foxp3+	%	↓	↓ et ↔	↓↓↓	↓↓	-
			MFI CD25	↓ et ↔	↓ et ↔	↓↓	↓↓	-
			MFI Foxp3	↑↑↑	↑↑↑	↓↓	-	-
		Cytokines	IL-2		+	++	-	-
	IL-10		-	-	-	-	-	
	IL-4		-	-	-	-	-	
	IL-17		-	-	-	-	-	

Tableau 5 : Récapitulatif des différentes molécules étudiées et leurs effets sur la mort cellulaire des lymphocytes T au repos (A) les réponses T CD4 mémoires (B) (+++) Forte réponse, (++) réponse moyenne ; (+) faible réponse (↑) augmentation, (↓) diminution, (↔) maintien (dans le temps J4/J2) ; (-) pas d'effet ; (LT : lymphocytes T) ; * : apoptose de ces cellules non étudiées

Les résultats obtenus avec la LT sont des résultats préliminaires avec 2 souris

CONCLUSION

Le but de cette thèse était d'étudier l'effet de différents adjuvants de la famille de la toxine du choléra (LT et CT ainsi que le mutant LT-R192G et les sous-unités B non toxiques de ces toxines) sur les lymphocytes T CD4, dans un modèle d'immunisation intrarectale avec des pseudoparticules virales de rotavirus (VLP-2/6). En effet, malgré de nombreuses études, le mécanisme d'action de ces molécules reste mal connu et, même si elles sont très proches au niveau structure, des effets différents ont été rapportés. De plus, des différences ont également été rapportées selon la voie d'administration, la dose et le contexte *in vitro* ou *in vivo* des analyses.

Chez les souris non immunisées, nous avons montré que ces adjuvants, à l'exception de la CTB, tant les molécules entières (LT, LT-R192G et CT) que la sous-unité B de la LT, LTB, diminuent les lymphocytes T régulateurs naturels CD4+CD25+Foxp3+. La mise en évidence de l'induction de la mort par apoptose des lymphocytes T CD8 et CD4+CD25+ et CD25- par la LT, la LT-R192G, la LTB et la CT mais pas la CTB, suggère un effet similaire de ces molécules sur les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+.

Chez les souris immunisées, toutes les molécules étudiées induisent une même réponse anticorps sérique et fécale spécifique des VLP, qu'il s'agisse des molécules entières connues pour leur fort pouvoir adjuvant ou des sous-unités B qui, elles, ont été rapportées avoir un faible effet adjuvant et même un effet tolérogène dans certaines études .

Concernant la réponse mémoire T CD4 spécifique de l'antigène, la LT et son mutant, la LT-R192G ainsi que la CT permettent l'induction d'une réponse mémoire CD4+CD25+Foxp3- et CD4+CD25+Foxp3+ spécifique des VLP-2/6 associée à la production d'IL-2 et d'IL-17 mais pas d'IL-4, ni d'IL-10. La CT, comparée à la LT et au mutant LT-R192G induit une production d'IL-2 moins importante, corrélée à une activation moins importante des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ et à l'absence d'augmentation d'expression de Foxp3, ceci contrairement à la LT et à la LT-R192G, confirmant ainsi le rôle majeur de l'IL-2 pour l'expression de Foxp3 par les lymphocytes Tregs.

Les sous-unités B, elles, ont en commun la production d'IL-17 et l'absence de production d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-10. Toutefois la LTB, contrairement à la CTB permet l'induction de lymphocytes mémoires CD4+CD25+Foxp3- et Foxp3+ spécifiques de l'antigène associée à une augmentation de CD25.

En conclusion, ces molécules ont un mécanisme d'action très complexe et des effets sur les réponses mémoires T CD4 mémoires différents. Cependant, elles ont un même pouvoir adjuvant sur les réponses immunes humorales ainsi que sur la production d'IL-17 en réponse aux VLP-2/6, suggérant le rôle majeur de cette cytokine dans le mécanisme d'action de l'effet adjuvant de ces molécules et confirmant ainsi des résultats récents.

En outre, la LT, la LT-R192G et la CT permettent la production d'IL-2 et l'activation de lymphocytes CD4+CD25+Foxp3- mémoires spécifiques de l'antigène tout en permettant la mise en place d'une régulation médiée par les lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ (boucle d'autorégulation), qui pourraient jouer un rôle majeur lors d'une réponse secondaire, afin d'éviter les réactions inflammatoires ou auto-immunes délétères.

L'étude d'autres sous-populations de lymphocytes T régulateurs CD4+ ou CD8 permettra de compléter ces résultats. Par ailleurs, l'influence de la voie d'administration doit être précisée. Enfin, l'étude de la signalisation induite par ces molécules dans les sous-populations lymphocytaires sera utile pour mieux comprendre les événements précoces impliqués dans l'orientation des réponses T CD4.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brandtzaeg, P., et al., *Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1**(1): p. 31-7.
2. McDermott, M.R. and J. Bienenstock, *Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues*. *J Immunol*, 1979. **122**(5): p. 1892-8.
3. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. *Br J Nutr*, 1998. **80** **Suppl 1**: p. S147-71.
4. Staats, H.F., W.G. Nichols, and T.J. Palker, *Mucosal immunity to HIV-1: systemic and vaginal antibody responses after intranasal immunization with the HIV-1 C4/V3 peptide T1SP10 MN(A)*. *J Immunol*, 1996. **157**(1): p. 462-72.
5. Mowatt, L., G. Shun-Shin, and N. Price, *Ethnic differences in the demand incidence of retinal detachments in two districts in the West Midlands*. *Eye (Lond)*, 2003. **17**(1): p. 63-70.
6. Sansonetti, P.J., et al., *Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation*. *Immunity*, 2000. **12**(5): p. 581-90.
7. de Peyer, R., A. Frangos, and W. Schnyder, *[Indications and results of endoscopic retrograde cholangio-pancreatography (ERCP) and percutaneous transhepatic cholangiography (author's transl)]*. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 1977. **66**(40): p. 1384-6.
8. Kraehenbuhl, J.P. and M.R. Neutra, *Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces*. *Physiol Rev*, 1992. **72**(4): p. 853-79.
9. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2271-8.
10. Coombes, J.L. and F. Powrie, *Dendritic cells in intestinal immune regulation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(6): p. 435-46.
11. Jang, M.H., et al., *CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes*. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 803-10.
12. Perez, N., et al., *Rectal immunization with rotavirus virus-like particles induces systemic and mucosal humoral immune responses and protects mice against rotavirus infection*. *J Virol*, 2006. **80**(4): p. 1752-61.
13. Owen, R.L., *M cells as portals of entry for HIV*. *Pathobiology*, 1998. **66**(3-4): p. 141-4.
14. Aragona, F., D. Cannata, and P. Barone, *[Study of etiopathogenetic questions of dietetic cirrhosis in rats; considerations on histogenesis of cirrhotic process; experimental research]*. *Arch Ital Anat Istol Patol*, 1950. **23**(6): p. 483-507.
15. Maric, I., et al., *Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine*. *J Immunol*, 1996. **156**(4): p. 1408-14.
16. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells, loaded with recombinant bacteria expressing tumor antigens, induce a protective tumor-specific response*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(3 Suppl): p. 865s-870s.
17. Nagler-Anderson, C., et al., *Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(3): p. 120-2.
18. Neutra, M.R. and J.P. Kraehenbuhl, *M cell-mediated antigen transport and monoclonal IgA antibodies for mucosal immune protection*. *Adv Exp Med Biol*, 1992. **327**: p. 143-50.
19. Lee, A.Y., et al., *Dendritic cells in colonic patches and iliac lymph nodes are essential in mucosal IgA induction following intrarectal administration via CCR7 interaction*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 1127-37.
20. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the dendritic cell myth*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 5829-35.
21. Godebu, E., et al., *Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type 1 diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells*. *J*

- Immunol, 2008. **181**(3): p. 1798-805.
22. Jensen, P.E., *Recent advances in antigen processing and presentation.* Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1041-8.
 23. Dalloul, A., *CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells.* Autoimmun Rev, 2009. **8**(4): p. 349-53.
 24. Wolf, S.A., et al., *Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state.* J Neuroimmunol, 2002. **133**(1-2): p. 72-80.
 25. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.* Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
 26. Tsitoura, D.C., et al., *Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens.* Int Immunol, 2002. **14**(6): p. 659-67.
 27. Wei, B., et al., *Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2010-5.
 28. Hokama, A., et al., *Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 681-93.
 29. Macpherson, A.J., et al., *The immune geography of IgA induction and function.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 11-22.
 30. Hornquist, C.E., et al., *Paradoxical IgA immunity in CD4-deficient mice. Lack of cholera toxin-specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation.* J Immunol, 1995. **155**(6): p. 2877-87.
 31. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The biology of intestinal immunoglobulin A responses.* Immunity, 2008. **28**(6): p. 740-50.
 32. Gonnella, P.A., et al., *In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice.* J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4708-18.
 33. Cerutti, A., *Immunology. IgA changes the rules of memory.* Science. **328**(5986): p. 1646-7.
 34. Mora, J.R., et al., *Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells.* Science, 2006. **314**(5802): p. 1157-60.
 35. Tezuka, H., et al., *Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells.* Nature, 2007. **448**(7156): p. 929-33.
 36. Brandtzaeg, P., et al., *The B-cell system of human mucosae and exocrine glands.* Immunol Rev, 1999. **171**: p. 45-87.
 37. Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen, *Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties.* Immunol Rev, 2005. **206**: p. 32-63.
 38. Bouvet, J.P. and V.A. Fischetti, *Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier.* Infect Immun, 1999. **67**(6): p. 2687-91.
 39. Porcelli, S., et al., *Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8-alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain.* J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 1-16.
 40. Treiner, E., et al., *Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionarily conserved T cell subset.* Microbes Infect, 2005. **7**(3): p. 552-9.
 41. Treiner, E. and O. Lantz, *CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): p. 519-26.
 42. Bendelac, A., *CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes.* Science, 1995. **269**(5221): p. 185-6.
 43. Eberl, M. and H. Jomaa, *A genetic basis for human gammadelta T-cell reactivity towards microbial pathogens.* Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 407-9.
 44. Wallace, M., et al., *Functional gamma delta T-lymphocyte defect associated with human immunodeficiency virus infections.* Mol Med, 1997. **3**(1): p. 60-71.
 45. Bas, M., et al., *Gamma-delta T-cells in patients with squamous cell*

- carcinoma of the head and neck*. Oral Oncol, 2006. **42**(7): p. 691-7.
46. Meraviglia, S., et al., *gammadelta T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Dev Immunol. **2011**: p. 587315.
 47. Robijn, R.J., et al., *Intestinal T lymphocytes*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1995. **212**: p. 23-33.
 48. Kunisawa, J. and H. Kiyono, *A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(12): p. 1308-21.
 49. Franco, M.A. and H.B. Greenberg, *Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7800-6.
 50. Anjuere, F. and C. Czerkinsky, *[Mucosal immunity and vaccine development]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(4): p. 371-8.
 51. Simmons, C.P., et al., *Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1106-13.
 52. Beagley, K.W. and A.J. Husband, *Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function*. Crit Rev Immunol, 1998. **18**(3): p. 237-54.
 53. Ke, Y., et al., *Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3610-8.
 54. Saurer, L. and C. Mueller, *T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract*. Allergy, 2009. **64**(4): p. 505-19.
 55. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
 56. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
 57. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
 58. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
 59. Hippen, K.L., et al., *Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity*. Sci Transl Med, 2011. **3**(83): p. 83ra41.
 60. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
 61. Nathan, C.F., et al., *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity*. J Exp Med, 1983. **158**(3): p. 670-89.
 62. Karupiah, G., et al., *Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase*. Science, 1993. **261**(5127): p. 1445-8.
 63. Snapper, J.R., et al., *Effects of platelet depletion on the unanesthetized sheep's pulmonary response to endotoxemia*. J Clin Invest, 1984. **74**(5): p. 1782-91.
 64. Fang, T.C., et al., *Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 100-10.
 65. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
 66. Chang, S.H. and C. Dong, *A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses*. Cell Res, 2007. **17**(5): p. 435-40.
 67. Romagnani, S., *Lymphokine production by human T cells in disease states*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 227-57.

68. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
69. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo, *Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **293**: p. 303-26.
70. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
71. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 652-7.
72. Venkatraman, L., et al., *Steady States and dynamics of urokinase-mediated plasmin activation in silico and in vitro*. Biophys J, 2011. **101**(8): p. 1825-34.
73. Bhowmick, T., et al., *Effect of flow on endothelial endocytosis of nanocarriers targeted to ICAM-1*. J Control Release, 2011.
74. Hsu, J., et al., *Enhanced delivery of alpha-glucosidase for Pompe disease by ICAM-1-targeted nanocarriers: comparative performance of a strategy for three distinct lysosomal storage disorders*. Nanomedicine, 2011.
75. Giri, A., et al., *Polymer hydrogel from carboxymethyl guar gum and carbon nanotube for sustained trans-dermal release of diclofenac sodium*. Int J Biol Macromol, 2011. **49**(5): p. 885-93.
76. Bhowmick, P.P., et al., *gcpA (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by Salmonella enterica serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium*. Microb Pathog, 2011. **50**(2): p. 114-22.
77. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
78. Rogers, P.R. and M. Croft, *Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1205-13.
79. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, *Differential activation of murine TH1 and TH2 clones*. Res Immunol, 1991. **142**(1): p. 19-23.
80. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Regulation of T cell immunity by dendritic cells*. Cell, 2001. **106**(3): p. 263-6.
81. Shevach, E.M., et al., *Control of autoimmunity by regulatory T cells*. Adv Exp Med Biol, 2001. **490**: p. 21-32.
82. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
83. Yoshimoto, T., et al., *LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta+ T cells*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1483-92.
84. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
85. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
86. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
87. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
88. Hwang, E.S., et al., *T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3*. Science, 2005. **307**(5708): p. 430-3.
89. Djuretic, I.M., et al., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
90. Usui, T., et al., *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 755-66.

91. Huang, S., et al., *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1742-5.
92. Dalton, D.K., et al., *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1739-42.
93. Dubin, A., P. Mak, and J. Travis, *Evidence for the presence of different alpha-1-proteinase inhibitor genes products in mouse plasma*. Acta Biochim Pol, 1996. **43**(3): p. 475-9.
94. Newport, M.J., et al., *A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection*. N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1941-9.
95. Jouanguy, E., et al., *Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection*. N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1956-61.
96. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft, *A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1350-8.
97. Mowen, K.A. and L.H. Glimcher, *Signaling pathways in Th2 development*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 203-22.
98. Annacker, O., et al., *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3008-18.
99. Weiss, D.L. and M.A. Brown, *Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression*. Immunol Rev, 2001. **179**: p. 35-47.
100. Brunner, T., C.H. Heusser, and C.A. Dahinden, *Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 605-11.
101. Stetson, D.B., et al., *Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1069-76.
102. Kingsley, C.I., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1080-6.
103. Sokol, C.L., et al., *Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response*. Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 713-20.
104. Perrigoue, J.G., et al., *IL-31-IL-31R interactions limit the magnitude of Th2 cytokine-dependent immunity and inflammation following intestinal helminth infection*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6088-94.
105. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 627-30.
106. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
107. Liotta, F., et al., *Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 1000-5 e8.
108. Amsen, D., et al., *Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells*. Cell, 2004. **117**(4): p. 515-26.
109. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3880-5.
110. Veldhoen, M. and B. Stockinger, *TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 358-61.
111. Bettelli, E., et al., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2393-402.
112. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.

113. Li, H.Y., et al., *Dihydropyrrlopyrazole transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain inhibitors: a novel benzimidazole series with selectivity versus transforming growth factor-beta type II receptor kinase and mixed lineage kinase-7*. J Med Chem, 2006. **49**(6): p. 2138-42.
114. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
115. Travis, M.A., et al., *Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 361-5.
116. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
117. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
118. Dario, L.S., et al., *Chromatin remodeling agents for cancer therapy*. Rev Recent Clin Trials, 2008. **3**(3): p. 192-203.
119. Mand, C., et al., *[Treatment management of a multiply injured patient with HIV infection]*. Unfallchirurg, 2007. **110**(11): p. 964-7.
120. Yang, J., et al., *Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1396-408.
121. Fantini, M.C., et al., *IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3155-63.
122. Yi, T., et al., *Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease*. Blood, 2008. **112**(5): p. 2101-10.
123. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.
124. Szabo, S.J., et al., *Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 817-24.
125. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 171-81.
126. Bluestone, J.A., *CTLA-4Ig is finally making it: a personal perspective*. Am J Transplant, 2005. **5**(3): p. 423-4.
127. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
128. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 454-67.
129. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.
130. Wei, J., et al., *Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(46): p. 18169-74.
131. Lakkis, F.G., et al., *Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue*. Nat Med, 2000. **6**(6): p. 686-8.
132. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
133. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): p. 455-8.
134. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.

135. Choi, A.H., et al., *Protection of mice against rotavirus challenge following intradermal DNA immunization by Biojector needle-free injection*. Vaccine, 2007. **25**(16): p. 3215-8.
136. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
137. Wells, A.D., et al., *T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2432-43.
138. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
139. Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold, *Concepts of activated T cell death*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(1): p. 52-64.
140. Ausubel, L.J., et al., *Functional tolerance is maintained despite proliferation of CD4 T cells after encounter with tissue-derived antigen*. Dev Immunol, 2002. **9**(3): p. 173-6.
141. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Degeneracy of the immune response to sheep red cells. Thymic dependency*. Immunology, 1972. **23**(3): p. 335-42.
142. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: history and perspective*. Methods Mol Biol. **707**: p. 3-17.
143. Moller, D.R., et al., *Bias toward use of a specific T cell receptor beta-chain variable region in a subgroup of individuals with sarcoidosis*. J Clin Invest, 1988. **82**(4): p. 1183-91.
144. Czerkinsky, C. and J. Holmgren, *Topical immunization strategies*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(6): p. 545-55.
145. Kronenberg, M., et al., *Three T cell hybridomas do not contain detectable heavy chain variable gene transcripts*. J Exp Med, 1983. **158**(1): p. 210-27.
146. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
147. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
148. Sakakura, T. and Y. Nishizuka, *Effect of thymectomy on mammary tumorigenesis, noduligenesis, and mammogenesis in the mouse*. Gann, 1967. **58**(5): p. 441-50.
149. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. Science, 1969. **166**(906): p. 753-5.
150. Penhale, W.J., et al., *Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats*. Clin Exp Immunol, 1973. **15**(2): p. 225-36.
151. Penhale, W.J., et al., *Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells*. Clin Exp Immunol, 1976. **25**(1): p. 6-16.
152. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, *Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer*. J Exp Med, 1982. **156**(6): p. 1565-76.
153. Berland, R. and H.H. Wortis, *Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 253-300.
154. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 72-87.
155. Powrie, F. and D. Mason, *Subsets of rat CD4+ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **159**: p. 79-96.
156. Powrie, F. and D. Mason, *OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease*

- with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med*, 1990. **172**(6): p. 1701-8.
157. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. *Int Immunol*, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
 158. Morrissey, P.J., et al., *CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 237-44.
 159. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. *J Exp Med*, 2004. **199**(7): p. 971-9.
 160. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. *J Exp Med*, 2001. **193**(11): p. 1303-10.
 161. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
 162. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 267-77.
 163. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 195-201.
 164. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 92-9.
 165. Wing, K., et al., *CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses*. *Immunology*, 2005. **115**(4): p. 516-25.
 166. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. *Trends Mol Med*, 2007. **13**(3): p. 108-16.
 167. Kajiura, F., et al., *NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2067-75.
 168. Miyara, M., et al., *Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8392-400.
 169. Ochs, H.D., S.F. Ziegler, and T.R. Torgerson, *FOXP3 acts as a rheostat of the immune response*. *Immunol Rev*, 2005. **203**: p. 156-64.
 170. Chatila, T.A., *Role of regulatory T cells in human diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(5): p. 949-59; quiz 960.
 171. Higgins, S.C., et al., *TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 7980-9.
 172. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. *Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 28-50.
 173. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
 174. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 295-302.
 175. Fu, S., et al., *CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(1): p. 65-78.
 176. Lehmann, J., et al., *Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 13031-6.
 177. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. *Immunity*, 2002. **16**(2): p. 311-23.

178. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
179. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
180. Campbell, D.J. and S.F. Ziegler, *FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(4): p. 305-10.
181. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. *Nat Rev Immunol*. **10**(7): p. 490-500.
182. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
183. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
184. Yamaguchi, T., et al., *Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 145-59.
185. Loser, K., et al., *In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity*. *Gene Ther*, 2005. **12**(17): p. 1294-304.
186. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 68-73.
187. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
188. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1713-22.
189. Hara, J., et al., *Primary alveolar hypoventilation syndrome complicated with antiphospholipid syndrome*. *Intern Med*, 2005. **44**(9): p. 987-9.
190. Jaeckel, E., H. von Boehmer, and M.P. Manns, *Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(2): p. 306-10.
191. Wu, P., et al., *Reduced function of CD4+25+ regulatory T cell fraction in silicosis patients*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2006. **19**(2): p. 357-68.
192. Hickman, S.P., et al., *Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(4): p. 2186-94.
193. Kleinewietfeld, M., et al., *CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2877-86.
194. Zhang, L. and Y. Zhao, *The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road*. *J Cell Physiol*, 2007. **211**(3): p. 590-7.
195. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(9): p. 665-74.
196. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
197. Caudy, A.A., et al., *CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(2): p. 482-7.
198. Antony, P.A., et al., *Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo*. *J Immunol*, 2006. **176**(9): p. 5255-66.
199. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(1): p. 280-90.

200. Yao, Z., et al., *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4368-75.
201. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 723-35.
202. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
203. Burchill, M.A., et al., *Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis*. Immunol Lett, 2007. **114**(1): p. 1-8.
204. Cosmi, L., et al., *Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4107-14.
205. Blood, A., et al., *Epstein-Barr virus-mediated protection against etoposide-induced apoptosis in BJA-B B cell lymphoma cells: role of Bcl-2 and caspase proteins*. Arch Virol, 2004. **149**(2): p. 289-302.
206. Hawrylowicz, C.M., *Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1459-63.
207. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 256-71.
208. Roncarolo, M.G. and M. Battaglia, *Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 585-98.
209. Borthwick, N.J., et al., *Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis*. Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 1005-13.
210. Sasada, T., et al., *Involvement of the TCR Cbeta FG loop in thymic selection and T cell function*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1419-31.
211. Zou, Y.R., et al., *Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage*. Nat Genet, 2001. **29**(3): p. 332-6.
212. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
213. Higuchi, M., et al., *Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5564-70.
214. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
215. Lu, L., et al., *Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-beta and retinoic acid*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15150.
216. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other*. Trends Immunol, 2008. **29**(9): p. 429-35.
217. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
218. Park, H.B., et al., *Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1203-13.
219. Bernard, F., A. Romano, and B. Granel, *[Regulatory T cells and systemic autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, primary Sjogren's syndrome]*. Rev Med Interne, 2010. **31**(2): p. 116-27.
220. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-81.

221. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
222. Selvaraj, R.K. and T.L. Geiger, *Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 2830-8.
223. Semple, K., et al., *Efficient and selective prevention of GVHD by antigen-specific induced Tregs via linked-suppression in mice*. Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(3): p. 309-18.
224. Kang, S.G., et al., *Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3724-33.
225. Golovina, T.N., et al., *Retinoic acid and rapamycin differentially affect and synergistically promote the ex vivo expansion of natural human T regulatory cells*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15868.
226. Mold, J.E., et al., *Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1562-5.
227. Tran, D.Q., H. Ramsey, and E.M. Shevach, *Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2983-90.
228. Hippen, K.L., et al., *Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance*. Semin Immunol, 2011.
229. Hippen, K.L., et al., *Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease*. Am J Transplant, 2011. **11**(6): p. 1148-57.
230. Apostolou, I. and H. von Boehmer, *In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1401-8.
231. Wohlfert, E. and Y. Belkaid, *Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 707-15.
232. Barnard, J.A., G.J. Warwick, and L.I. Gold, *Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon*. Gastroenterology, 1993. **105**(1): p. 67-73.
233. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 287-96.
234. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
235. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
236. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. Science, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
237. Mucida, D., et al., *Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1923-33.
238. Denning, T.L., et al., *Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1086-94.
239. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
240. Curotto de Lafaille, M.A., et al., *Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 114-26.
241. Curiel, T.J., *Regulatory T cells and treatment of cancer*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 241-6.

242. Bacchetta, R., et al., *Host-reactive CD4+ and CD8+ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN-gamma and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4.* J Immunol, 1990. **144**(3): p. 902-8.
243. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.* J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5986-93.
244. Levings, M.K., et al., *Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells.* Blood, 2005. **105**(3): p. 1162-9.
245. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
246. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.* Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
247. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations.* J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6323-7.
248. Bhowmick, S., et al., *Antigen-specific splenic CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated via the eye, suppress experimental autoimmune encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase.* Int Immunol, 2011. **23**(2): p. 119-28.
249. Fujiwara, D., et al., *Small intestine CD11c+ CD8+ T cells suppress CD4+ T cell-induced immune colitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(6): p. G939-47.
250. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells.* J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
251. Steinbrink, K., et al., *Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells.* Blood, 1999. **93**(5): p. 1634-42.
252. Korn, T., et al., *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties.* Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 362-71.
253. Battaglia, M., et al., *Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells.* Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1571-80.
254. Rakoff-Nahoum, S., L. Hao, and R. Medzhitov, *Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis.* Immunity, 2006. **25**(2): p. 319-29.
255. Batten, M., et al., *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells.* Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 929-36.
256. Fitzgerald, D.C., et al., *Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3268-75.
257. Samson, M., et al., *[T(H)17 lymphocytes: induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapy].* Rev Med Interne, 2011. **32**(5): p. 292-301.
258. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.* J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
259. Godfrey, W.R., et al., *In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures.* Blood, 2004. **104**(2): p. 453-61.
260. Game, D.S., M.P. Hernandez-Fuentes, and R.I. Lechler, *Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro.* Am J Transplant, 2005. **5**(3): p. 454-64.
261. Mempel, T.R., et al., *Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation.* Immunity, 2006. **25**(1): p. 129-41.

262. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
263. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4516-20.
264. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
265. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
266. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
267. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
268. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
269. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
270. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
271. Janssens, W., et al., *CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4604-12.
272. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-44.
273. Piccirillo, C.A., et al., *CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 237-46.
274. McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton, *Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3025-32.
275. Uhlig, H.H., et al., *Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5852-60.
276. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
277. Peled, A., et al., *Evaluation of immune memory of human lymphocytes engrafted in SCID mice*. Immunobiology, 1999. **201**(1): p. 145-50.
278. Kryczek, I., et al., *Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 40-4.
279. Groux, H., et al., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3188-93.
280. Yamaguchi, Y., et al., *Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow*. Stem Cells, 1997. **15**(2): p. 144-53.
281. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
282. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
283. Briskin, M., et al., *Induction of kappa transcription by interferon-gamma without activation of NF-kappa B*. Science, 1988. **242**(4881): p. 1036-7.
284. Petit-Koskas, E., et al., *Inhibition of the proliferative response of human B lymphocytes to B cell growth factor*

- by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 1988. **18**(1): p. 111-6.
285. Chen, M.L., et al., *Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(2): p. 419-24.
286. Fahlen, L., et al., *T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(5): p. 737-46.
287. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation*. *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 579-91.
288. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 629-44.
289. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
290. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
291. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
292. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(4): p. 271-83.
293. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
294. Bluestone, J.A., *Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic?* *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(4): p. 343-9.
295. Luhder, F., et al., *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes*. *J Exp Med*, 1998. **187**(3): p. 427-32.
296. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(10): p. 762-74.
297. Mellor, A.L., et al., *Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase*. *Int Immunol*, 2004. **16**(10): p. 1391-401.
298. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
299. Zhang, D., et al., *TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice*. *Nat Med*, 2000. **6**(5): p. 556-63.
300. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
301. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(11): p. 841-55.
302. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 353-60.
303. Lundgren, A., et al., *Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals*. *Infect Immun*, 2003. **71**(4): p. 1755-62.
304. Kullberg, M.C., et al., *Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis*. *J Exp Med*, 2002. **196**(4): p. 505-15.
305. Moore, A.C., et al., *Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance*. *J Immunol*, 2005. **175**(11): p. 7264-73.
306. Strober, W., *Downstream effector functions of T-cell activation*. *J*

- Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **40**
Suppl 1: p. S26.
307. Joosten, S.A. and T.H. Ottenhoff, *Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 760-70.
308. McGhee, J.R., et al., *New perspectives in mucosal immunity with emphasis on vaccine development*. Semin Hematol, 1993. **30**(4 Suppl 4): p. 3-12; discussion 13-5.
309. Kunkel, E.J., D.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity*. Microcirculation, 2003. **10**(3-4): p. 313-23.
310. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
311. Kunkel, E.J., et al., *CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells*. J Clin Invest, 2003. **111**(7): p. 1001-10.
312. Holmgren, J., et al., *Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA*. Immunol Lett, 2005. **97**(2): p. 181-8.
313. Johansson, E.L., et al., *Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans*. Infect Immun, 2001. **69**(12): p. 7481-6.
314. Czerkinsky, C. and J. Holmgren, *Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting Immunity to the Right Tissues*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010.
315. Salkowski, C.A., G.R. Detore, and S.N. Vogel, *Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages*. Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3239-47.
316. Davis, H.L., et al., *CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 870-6.
317. McCluskie, M.J. and H.L. Davis, *CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4463-6.
318. Freytag, L.C. and J.D. Clements, *Mucosal adjuvants*. Vaccine, 2005. **23**(15): p. 1804-13.
319. Lencer, W.I., et al., *Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL*. J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 951-62.
320. Connell, T.D. and R.K. Holmes, *Mutational analysis of the ganglioside-binding activity of the type II Escherichia coli heat-labile enterotoxin LT-IIb*. Mol Microbiol, 1995. **16**(1): p. 21-31.
321. Rappuoli, R., et al., *Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins*. Immunol Today, 1999. **20**(11): p. 493-500.
322. Odumosu, O., et al., *Suppression of dendritic cell activation by diabetes autoantigens linked to the cholera toxin B subunit*. Immunobiology, 2011. **216**(4): p. 447-56.
323. Lonnroth, I. and J. Holmgren, *Subunit structure of cholera toxin*. J Gen Microbiol, 1973. **76**(2): p. 417-27.
324. Sattler, J. and H. Wiegandt, *Studies of the subunit structure of cholera toxin*. Eur J Biochem, 1975. **57**(1): p. 309-16.
325. Sixma, T.K., et al., *Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin*. J Mol Biol, 1993. **230**(3): p. 890-918.
326. Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerkinsky, *Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems*. Vaccine, 1993. **11**(12): p. 1179-84.
327. Holmgren, J. and I. Lonnroth, *Oligomeric structure of cholera toxin: characteristics of the H and L subunits*. J Gen Microbiol, 1975. **86**(1): p. 49-65.

328. Bublin, M., et al., *Use of a genetic cholera toxin B subunit/allergen fusion molecule as mucosal delivery system with immunosuppressive activity against Th2 immune responses*. *Vaccine*, 2007. **25**(50): p. 8395-404.
329. Holmgren, J. and L. Lindholm, *Cholera toxin, ganglioside receptors and the immune response*. *Immunol Commun*, 1976. **5**(9): p. 737-56.
330. Van Heyningen, V., H. Koprowski, and C.M. Croce, *Assignment of the genes for mitochondrial malate dehydrogenase and for SV40 T-antigen to human chromosome 7*. *Cytogenet Cell Genet*, 1976. **16**(1-5): p. 244-6.
331. Holmgren, J., J.E. Mansson, and L. Svennerholm, *Tissue receptor for cholera exotoxin: structural requirements of G11 ganglioside in toxin binding and inactivation*. *Med Biol*, 1974. **52**(4): p. 229-33.
332. Sixma, T.K., et al., *Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. coli*. *Nature*, 1991. **351**(6325): p. 371-7.
333. Schengrund, C.L. and N.J. Ringler, *Binding of Vibrio cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(22): p. 13233-7.
334. Fukuta, S., et al., *Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb*. *Infect Immun*, 1988. **56**(7): p. 1748-53.
335. Lencer, W.I. and D. Saslowsky, *Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1746**(3): p. 314-21.
336. Sonnino, S., et al., *New chemical trends in ganglioside research*. *Chem Phys Lipids*, 1986. **42**(1-3): p. 3-26.
337. Levery, S.B., *Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics*. *Methods Enzymol*, 2005. **405**: p. 300-69.
338. Kniep, B., et al., *Association of the GPI-anchored leucocyte surface glycoproteins with ganglioside GM3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **203**(2): p. 1069-75.
339. Nohara, K., et al., *A novel disialoganglioside in rat spleen lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(21): p. 14982-6.
340. Yohe, H.C., et al., *Structural characterization of the disialogangliosides of murine peritoneal macrophages*. *Glycobiology*, 1997. **7**(8): p. 1215-27.
341. Salmond, R.J., J.A. Luross, and N.A. Williams, *Immune modulation by the cholera-like enterotoxins*. *Expert Rev Mol Med*, 2002. **4**(21): p. 1-16.
342. Lencer, W.I., et al., *Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(22): p. 10094-8.
343. Pizza, M., et al., *Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants*. *Vaccine*, 2001. **19**(17-19): p. 2534-41.
344. Kende, M., et al., *Enhancement of intranasal vaccination with recombinant chain A ricin vaccine (rRV) in mice by the mucosal adjuvants LTK63 and LTR72*. *Vaccine*, 2007. **25**(16): p. 3219-27.
345. Peppoloni, S., et al., *Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines*. *Expert Rev Vaccines*, 2003. **2**(2): p. 285-93.
346. Beignon, A.S., et al., *The LTR72 mutant of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli enhances the ability of peptide antigens to elicit CD4(+) T cells and secrete gamma interferon after coapplication onto bare skin*. *Infect Immun*, 2002. **70**(6): p. 3012-9.
347. Sanchez, J. and J. Holmgren, *Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(9): p. 1347-60.
348. Dickinson, B.L. and J.D. Clements, *Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity*.

- Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1617-23.
349. McNeal, M.M., et al., *Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge*. Vaccine, 2007. **25**(33): p. 6224-31.
350. VanCott, J.L., et al., *Mice develop effective but delayed protective immune responses when immunized as neonates either intranasally with nonliving VP6/LT(R192G) or orally with live rhesus rotavirus vaccine candidates*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4949-61.
351. Smiley, K.L., et al., *Association of gamma interferon and interleukin-17 production in intestinal CD4+ T cells with protection against rotavirus shedding in mice intranasally immunized with VP6 and the adjuvant LT(R192G)*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3740-8.
352. Agren, L.C., et al., *Adjuvanticity of the cholera toxin A1-based gene fusion protein, CTA1-DD, is critically dependent on the ADP-ribosyltransferase and Ig-binding activity*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2432-40.
353. Eliasson, D.G., et al., *A novel non-toxic combined CTA1-DD and ISCOMS adjuvant vector for effective mucosal immunization against influenza virus*. Vaccine, 2011. **29**(23): p. 3951-61.
354. Lycke, N. and M. Bemark, *Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(6): p. 556-66.
355. Fang, Y., et al., *Mast cells contribute to the mucosal adjuvant effect of CTA1-DD after IgG-complex formation*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2935-41.
356. Cunningham, K.A., et al., *CTA1-DD is an effective adjuvant for targeting anti-chlamydial immunity to the murine genital mucosa*. J Reprod Immunol, 2009. **81**(1): p. 34-8.
357. Sundling, C., et al., *CTA1-DD adjuvant promotes strong immunity against human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins following mucosal immunization*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 12): p. 2954-64.
358. Nashar, T.O., et al., *Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 226-30.
359. Williams, N.A., T.R. Hirst, and T.O. Nashar, *Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 95-101.
360. da Silva Ramos Rocha, A., et al., *B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination*. Can J Microbiol, 2008. **54**(8): p. 677-86.
361. Kim, H.J., et al., *Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus*. Arch Pharm Res, 2007. **30**(3): p. 366-71.
362. Isaka, M., et al., *Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine*. Vaccine, 2004. **22**(23-24): p. 3061-8.
363. Wu, H.Y. and M.W. Russell, *Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant*. Vaccine, 1998. **16**(2-3): p. 286-92.
364. Aspod, C. and C. Thivolet, *Nasal administration of CTB-insulin induces active tolerance against autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(2): p. 204-11.

365. George Chandy, A., et al., *Oral tolerance induction by mucosal administration of cholera toxin B-coupled antigen involves T-cell proliferation in vivo and is not affected by depletion of CD25+ T cells.* Immunology, 2006. **118**(3): p. 311-20.
366. Bergerot, I., et al., *A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4610-4.
367. Liang, S., et al., *Mapping of a microbial protein domain involved in binding and activation of the TLR2/TLR1 heterodimer.* J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2978-85.
368. Cox, E., et al., *Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa.* Vet Res, 2006. **37**(3): p. 511-39.
369. da Hora, V.P., et al., *Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants.* Vaccine, 2011. **29**(8): p. 1538-44.
370. Connell, T.D., *Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins.* Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 821-34.
371. Arce, S., et al., *Differential binding of Escherichia coli enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells.* Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2718-27.
372. Sun, J.B., C. Czerkinsky, and J. Holmgren, *Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit.* Scand J Immunol. **71**(1): p. 1-11.
373. Anosova, N.G., et al., *Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 59-67.
374. Gagliardi, M.C., et al., *Effects of the adjuvant cholera toxin on dendritic cells: stimulatory and inhibitory signals that result in the amplification of immune responses.* Int J Med Microbiol, 2002. **291**(6-7): p. 571-5.
375. Hajishengallis, G., et al., *Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections.* J Dent Res, 2005. **84**(12): p. 1104-16.
376. Shreedhar, V.K., B.L. Kelsall, and M.R. Neutra, *Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches.* Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 504-9.
377. Soriani, M., N.A. Williams, and T.R. Hirst, *Escherichia coli enterotoxin B subunit triggers apoptosis of CD8(+) T cells by activating transcription factor c-myc.* Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4923-30.
378. Kagnoff, M.F. and L. Eckmann, *Epithelial cells as sensors for microbial infection.* J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 6-10.
379. Lopes, L.M., et al., *Inhibition of T-cell response by Escherichia coli heat-labile enterotoxin-treated epithelial cells.* Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6891-5.
380. Neutra, M.R., N.J. Mantis, and J.P. Kraehenbuhl, *Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues.* Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1004-9.
381. Brereton, C.F., et al., *Escherichia coli heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production.* J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5896-906.
382. Gagliardi, M.C., et al., *Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming.* Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2394-403.
383. Lycke, N., et al., *The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens.* Scand J Immunol, 1991. **33**(6): p. 691-8.
384. Anastassiou, E.D., et al., *Effects of cholera toxin on human B cells.*

- Cholera toxin induces B cell surface DR expression while it inhibits anti-mu antibody-induced cell proliferation.* J Immunol, 1990. **145**(8): p. 2375-80.
385. Arce, S., et al., *In vitro induction of immunoglobulin A (IgA)- and IgM-secreting plasma blasts by cholera toxin depends on T-cell help and is mediated by CD154 up-regulation and inhibition of gamma interferon synthesis.* Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1413-23.
386. Schnitzler, A.C., J.M. Burke, and L.M. Wetzler, *Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells.* Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 3150-9.
387. Negri, D.R., et al., *Cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin, but not their nontoxic counterparts, improve the antigen-presenting cell function of human B lymphocytes.* Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 1924-35.
388. Veglia, F., et al., *Cholera toxin impairs the differentiation of monocytes into dendritic cells, inducing professional antigen-presenting myeloid cells.* Infect Immun, 2011. **79**(3): p. 1300-10.
389. Cong, Y., A.O. Oliver, and C.O. Elson, *Effects of cholera toxin on macrophage production of co-stimulatory cytokines.* Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 64-71.
390. Takahashi, I., et al., *Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of Escherichia coli labile enterotoxin.* J Infect Dis, 1996. **173**(3): p. 627-35.
391. Marinaro, M., et al., *Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4.* J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4621-9.
392. Xu-Amano, J., et al., *Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin.* Vaccine, 1994. **12**(10): p. 903-11.
393. Schaffeler, M.P., J.S. Brokenshire, and D.P. Snider, *Detection of precursor Th cells in mesenteric lymph nodes after oral immunization with protein antigen and cholera toxin.* Int Immunol, 1997. **9**(10): p. 1555-62.
394. Fromantin, C., et al., *Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response.* J Virol, 2001. **75**(22): p. 11010-6.
395. Ryan, E.T., et al., *In vivo expression and immunoadjuvancy of a mutant of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli in vaccine and vector strains of Vibrio cholerae.* Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1694-701.
396. Plant, A., et al., *The B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin abrogates oral tolerance, promoting predominantly Th2-type immune responses.* Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 3186-95.
397. Lee, J.B., et al., *Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens.* PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5190.
398. Meza-Sanchez, D., et al., *Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic beta subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs.* Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 2894-904.
399. Brereton, C.F., et al., *Escherichia coli heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production.* J Immunol. **186**(10): p. 5896-906.
400. Raveney, B.J., et al., *The B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin inhibits Th1 but not Th17 cell responses in established experimental autoimmune uveoretinitis.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(9): p. 4008-17.
401. Sun, J.B., et al., *B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8278-87.
402. Sun, J.B., C. Czerkinsky, and J. Holmgren, *Sublingual 'oral tolerance'*

- induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates regulatory T cells that induce apoptosis and depletion of effector T cells.* Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 278-86.
403. Wang, J., et al., *Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4036-45.
404. Bishop, R.F., et al., *Letter: Evidence for viral gastroenteritis.* N Engl J Med, 1973. **289**(20): p. 1096-7.
405. Parashar, U.D., J.P. Alexander, and R.I. Glass, *Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).* MMWR Recomm Rep, 2006. **55**(RR-12): p. 1-13.
406. de Zoysa, I. and R.G. Feachem, *Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization.* Bull World Health Organ, 1985. **63**(3): p. 569-83.
407. Kohli, E. and Huet, F., *Les vaccins contre les rotavirus*, 2011. xx(x): pxxx-xx.
408. Glass, R.I., et al., *Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges.* Lancet, 2006. **368**(9532): p. 323-32.
409. Parashar, U.D. and R.I. Glass, *Public health. Progress toward rotavirus vaccines.* Science, 2006. **312**(5775): p. 851-2.
410. Parashar, U.D., et al., *Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004.* J Infect Dis, 2009. **200** Suppl 1: p. S9-S15.
411. Bright, R.A., et al., *Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle.* PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1501.
412. O'Neal, C.M., et al., *Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity.* J Virol, 1997. **71**(11): p. 8707-17.
413. Parez, N., et al., *The VP6 protein of rotavirus interacts with a large fraction of human naive B cells via surface immunoglobulins.* J Virol, 2004. **78**(22): p. 12489-96.
414. Blutt, S.E., et al., *Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs).* Vaccine, 2006. **24**(8): p. 1170-9.
415. O'Neal, C.M., et al., *Rotavirus 2/6 viruslike particles administered intranasally with cholera toxin, Escherichia coli heat-labile toxin (LT), and LT-R192G induce protection from rotavirus challenge.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 3390-3.
416. Schwartz-Cornil, I., et al., *Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins.* J Virol, 2002. **76**(16): p. 8110-7.
417. Estes, M.K., et al., *Virus-like particle vaccines for mucosal immunization.* Adv Exp Med Biol, 1997. **412**: p. 387-95.
418. Ogier, A., et al., *Distribution and phenotype of murine rotavirus-specific B cells induced by intranasal immunization with 2/6 virus-like particles.* Eur J Immunol, 2005. **35**(7): p. 2122-30.
419. Di Martino, C., et al., *Distribution and phenotype of rotavirus-specific B cells induced during the antigen-driven primary response to 2/6 virus-like particles administered by the intrarectal and the intranasal routes.* J Leukoc Biol, 2007. **82**(4): p. 821-8.
420. Thiam, F., et al., *Unexpected Modulation of Recall B and T Cell Responses after Immunization with Rotavirus-like Particles in the Presence of LT-R192G.* Toxins J, 2010. **2**: p. 2007-2027.
421. Bon, F., et al., *G and P genotyping of rotavirus strains circulating in france over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies.* The AZAY Group. J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1681-3.
422. Tamayo, E., et al., *The Escherichia coli heat-labile enterotoxin induces*

- apoptosis of immature lymphocytes in vivo via a glucocorticoid-dependent pathway. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(12): p. 3505-15.
423. Tamayo, E., et al., *Involvement of the intrinsic and extrinsic cell-death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the Escherichia coli heat-labile enterotoxin*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(2): p. 439-46.
424. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
425. Collins, R.J., et al., *Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis*. *Int J Radiat Biol*, 1992. **61**(4): p. 451-3.
426. Forster, T.H., et al., *Beta-radiation from tracer doses of ³²P induces massive apoptosis in a Burkitt's lymphoma cell line*. *Int J Radiat Biol*, 1992. **61**(3): p. 365-7.
427. Salmond, R.J., et al., *CD8+ T cell apoptosis induced by Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit occurs via a novel pathway involving NF-kappaB-dependent caspase activation*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(6): p. 1737-47.
428. Yankelevich, B., et al., *Differential induction of programmed cell death in CD8+ and CD4+ T cells by the B subunit of cholera toxin*. *Cell Immunol*, 1996. **168**(2): p. 229-34.
429. Yamamoto, M., et al., *Direct effects on antigen-presenting cells and T lymphocytes explain the adjuvanticity of a nontoxic cholera toxin mutant*. *J Immunol*, 1999. **162**(12): p. 7015-21.
430. Wang, M., S. Bregenholt, and J.S. Petersen, *The cholera toxin B subunit directly costimulates antigen-primed CD4+ T cells ex vivo*. *Scand J Immunol*, 2003. **58**(3): p. 342-9.
431. Aman, A.T., et al., *A mutant cholera toxin B subunit that binds GM1-ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8536-41.
432. Nashar, T.O., N.A. Williams, and T.R. Hirst, *Cross-linking of cell surface ganglioside GM1 induces the selective apoptosis of mature CD8+ T lymphocytes*. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 731-6.
433. Truitt, R.L., et al., *Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin*. *Infect Immun*, 1998. **66**(4): p. 1299-308.
434. Salmond, R.J., et al., *The B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin induces both caspase-dependent and -independent cell death pathways in CD8+ T cells*. *Infect Immun*, 2004. **72**(10): p. 5850-7.
435. Xu-Amano, J., et al., *Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues*. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1309-20.
436. Anjuere, F., et al., *Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1586-92.
437. Lavelle, E.C., et al., *Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(5): p. 756-63.
438. Sun, J.B., et al., *Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3+CD25+ and Foxp3-CD25-CD4+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 7634-44.
439. Datta, S.K., et al., *Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(23): p. 10638-43.
440. Zhang, P., et al., *Role of CD80 and CD86 in host immune responses to the recombinant hemagglutinin domain of Porphyromonas gingivalis gingipain and in the adjuvanticity of cholera toxin B and monophosphoryl lipid A*. *Vaccine*, 2007. **25**(33): p. 6201-10.
441. Jung, Y.J. and J.Y. Seoh, *Feedback loop of immune regulation by CD4+CD25+*

- Treg*. Immunobiology, 2009. **214**(4): p. 291-302.
442. Basset, C., et al., *Cholera-Like Enterotoxins and Regulatory T cells*, 2010. 2: p. 1774-95.
443. Lavelle, E.C., et al., *Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2384-92.
444. Doms, H., et al., *Quiescence-inducing and antiapoptotic activities of IL-15 enhance secondary CD4+ T cell responsiveness to antigen*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2141-50.