



HAL
open science

Étude des interactions ostéoimmunologiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Agathe Boucoiran

► **To cite this version:**

Agathe Boucoiran. Étude des interactions ostéoimmunologiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT: 2016AZUR4064 . tel-01440300

HAL Id: tel-01440300

<https://theses.hal.science/tel-01440300>

Submitted on 19 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé – ED85

Thèse présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE

De l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Spécialité : Immunologie et Microbiologie

Etude des interactions ostéoimmunologiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Présentée et soutenue par :

Agathe BOUCOIRAN

Le 29 Septembre 2016

MEMBRES DU JURY

Dr Jacques NUNES

Président du Jury

Dr Pascale LOUIS-PLENCE

Rapporteur

Dr Frédéric BLANCHARD

Rapporteur

Dr Abdelilah WAKKACH

Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jacques Nunès d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie les docteurs Pascale Louis-Plence et Frédéric Blanchard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier le Dr Abdelilah Wakkach pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et qui m'a accompagné depuis maintenant 4 ans. Abdel, tu m'as énormément appris au cours de ces années. Tu es une personne entière qui est toujours là si on a la moindre question, le moindre problème. Merci

Je remercie aussi les Dr Claudine Blin et Matthieu Rouleau d'avoir été là pour m'aider et me conseiller au cours de ces 3 années de thèse.

Parmi les personnes à ne pas oublier, Nourhène, tu as été là pour moi. Toujours prête à m'écouter, me soutenir que ce soit pendant les expériences ou pendant des moments plus personnels. Merci beaucoup, tu es une personne à connaître.

Lidia, désolée ces remerciements seront en Français. Merci pour ton soutien, ton écoute et tes conseils depuis ton arrivée au laboratoire.

Majlinda, on ne s'est côtoyées qu'un an, mais tu as su prendre une place dans ma vie. Merci

Je tiens à remercier le Dr Jacques Barhanin pour avoir accepté comme étudiante au sein de son laboratoire.

Merci à tous les étudiants pour les « discussions », les quelques sorties et bien sur leur présence.

A ma famille,

Ces remerciements ne permettent pas d'exprimer le quart de ce je ressens pour vous. Vous m'avez tous permis d'avancer en étant là à chaque moment de cette aventure que fut ma thèse.

Papa et Maman, c'est grâce à vous que j'ai pu arriver à cette étape. Vous avez été là dans les bons et les mauvais moments, toujours là pour me remonter. Je ne sais pas comment vous remercier, mais j'espère que ces quelques lignes suffiront à vous le faire comprendre.

Damien, mon amour, tu as réussi à me supporter pendant ces trois années, quel miracle !!! Tu es tout, mon confident, mon ami, mon support dans les bons et les mauvais moments. Il n'y a pas de mots pour te dire merci d'avoir été là pendant toutes ces années.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: La Lymphopoïèse T CD4+ dans le thymus	12
Figure 2: Activation et inhibition du lymphocyte T CD4.....	15
Figure 3: Différenciation des cellules mémoires	19
Figure 4: Différenciation des cellules T CD4+ naïves.....	27
Figure 5: Plasticité des cellules T CD4+	29
Figure 6: Différenciation ostéoblastique et adipocytaire	37
Figure 7: La différenciation des ostéoclastes	41
Figure 8: Remodelage osseux dans des conditions physiologiques.....	42
Figure 9: Hématopoïèse	47
Figure 10: Les niches des cellules souches hématopoïétiques	53
Figure 11: Remodelage osseux dans des conditions pathogéniques.....	59
Figure 12: Les ostéoclastes cellules au centre de l'inflammation	112

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	4
INTRODUCTION.....	8
I. Le système immunitaire.....	8
A. Le système inné et adaptatif.....	8
B. Développement et activation des lymphocytes T CD4	9
1. Lymphopoïèse T CD4	9
a) La sélection positive	10
b) La sélection négative.....	11
2. Activation des lymphocytes T CD4+	13
3. Les cellules T CD4+ mémoires humaines et murines.....	15
a) Caractéristiques des cellules CD4+ mémoires.....	16
b) Les cellules CD4+ mémoires circulantes.....	17
c) Les cellules CD4+ mémoires résidentes	19
d) Les lymphocytes T CD4+ mémoires dans la moelle osseuse.....	21
4. Les cellules T CD4+ effectrices.....	23
a) Les cellules Th1.....	23
b) Les cellules Th2.....	24
c) Les cellules Th17.....	24
d) Les cellules T CD4+ régulateurs	25
e) Plasticité des cellules CD4+ effectrices	28
i. Différenciation entre les cellules Treg et Th17	28
ii. Plasticité entre les cellules Th1 et Th17.....	28
II. Os et Hématopoïèse	30
A. Le tissu osseux	30
1. Les cellules mésenchymateuses	30
2. Les ostéoblastes	32
3. Les ostéocytes	35
4. Les adipocytes	35
5. Les ostéoclastes.....	38
a) Origines des ostéoclastes.....	38
b) Fonctions et formation des ostéoclastes	38
c) Les différents ostéoclastes	41
6. Les cellules souches hématopoïétiques	42
B. L'hématopoïèse	45
1. La différenciation lymphoïde.....	45
2. La différenciation myéloïde.....	46
3. Ostéoclastes et cellules souches hématopoïétiques	48
4. Rôle du système endocrinien	49
III. Ostéoimmunologie	50
A. Interaction entre le système osseux et le système immunitaire	50
1. Le système RANK-L/OPG	50
2. Régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques.....	52

a)	Les cellules stromales mésenchymateuses	52
b)	Les ostéoclastes.....	53
c)	Les ostéoblastes	54
d)	Les lymphocytes T CD4+ et les cellules souches hématopoïétiques.....	54
e)	Les agents mobilisateurs des cellules souches hématopoïétiques	55
3.	Interaction entre les cellules osseuses et les cellules T CD4+	55
B.	Maladies inflammatoires chroniques et système osseux	57
1.	Les maladies inflammatoires chroniques	57
2.	Cellules T CD4+ mémoires pathogéniques dans la moelle osseuse	59
3.	Traitement de la perte osseuse pathogénique.....	60
IV.	La maladie de Crohn : modèle d'étude de l'ostéoimmunologie	62
A.	Description de la maladie	62
B.	Les causes de la maladie	63
1.	Les causes immunitaires.....	63
a)	La réponse Th1	63
b)	La réponse Th17	63
2.	Les causes génétiques de la maladie.....	64
3.	Les causes environnementales.....	65
C.	La perte osseuse lors de la maladie de Crohn.....	66
D.	Les modèles murins de la maladie de Crohn	68
1.	Souris IL10ko.....	68
2.	Transfert de lymphocytes T chez la souris immunodéficiente Rag1ko	68
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	70
	RÉSULTATS	71
I.	Identification et caractérisation d'une population T CD4+ ostéoclastogénique liant la perte osseuse et l'inflammation intestinale	71
A.	Introduction	71
B.	Résultats	73
C.	Conclusion et Perspectives	74
II.	Osteoclast activity participates to HSC skewing toward myeloid differentiation and exacerbates inflammation in Inflammatory Bowel disease (IBD)	87
A.	Introduction	88
B.	Experimental procedures:.....	90
C.	Results.....	92
D.	Discussion	102
	DISCUSSION.....	104
I.	Rôle des cellules CD4+ Th17 dans la maladie inflammatoire chronique de l'intestin.....	104
A.	Mécanismes d'action des cellules Th17.....	104
B.	Maintien des cellules Th17 dans la moelle osseuse.....	106
II.	Ostéoclastes et inflammation	107
A.	L'activité des ostéoclastes et la mobilisation des HSCs	108

B. Interaction des ostéoclastes avec les cellules T CD4+ 109

BIBLIOGRAPHIE113

INTRODUCTION

I. Le système immunitaire

A. Le système inné et adaptatif

Le système immunitaire est composé de l'ensemble des cellules permettant de répondre à des signaux de danger au sein de l'organisme. Ces signaux peuvent résulter de la présence de pathogènes, virus ou alors de cellules cancéreuses. Il existe deux types de réponses immunitaires ; la réponse innée et la réponse adaptative. Ces deux types de réponses vont se coordonner afin d'éliminer le danger le plus efficacement possible.

La réponse immunitaire innée est permise grâce à l'action des cellules du système inné. Les macrophages et neutrophiles vont phagocytter les pathogènes et produire des cytokines inflammatoires permettant de réguler la défense immunitaire (Aderem et al 1999). Les pathogènes vont être dégradés par un mécanisme de phagocytose et les produits de digestion vont être exposés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, permettant l'activation du système immunitaire adaptatif. Le challenge des cellules immunitaires innées est de faire la distinction entre les antigènes dangereux pour l'organisme et les bactéries de la flore intestinale. Cette distinction est possible grâce à la présence d'un motif de reconnaissance de pathogène PAMP (pathogen-associated molecular pattern) qui va interagir avec le récepteur PRR (pattern-recognition receptor) présent sur les cellules phagocytaires (Aderem et al 2000). La reconnaissance du PAMP avec les PRR permet deux types de réponses ; celle induisant la phagocytose du pathogène et celle induisant la production de cytokines telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'Interleukine-1 β (IL-1 β) (Medzhitov et al 1997) par les cellules phagocytaires. Ces cytokines inflammatoires ont différents rôles ; le premier est d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins aux leucocytes présents dans la circulation. Le deuxième rôle est d'induire un recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles et d'augmenter leur activité de phagocytose.

Suite à cette réaction innée, une réponse adaptative spécifique va être mise en place. Elle fait intervenir les cellules T (CD4+ et CD8+) et B. Cette réponse adaptative est possible grâce à l'interaction entre les cellules T CD4+ et les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques. Les cellules T CD4+ vont alors produire des cytokines permettant l'augmentation de l'activité des cellules du système immunitaire inné, tels que les macrophages. De plus, les cellules T CD4+ participent aussi à l'activation des cellules B et à leur différenciation en cellules productrices des immunoglobulines. Les immunoglobulines permettent ainsi une activation du système du complément et la lyse des pathogènes. Elles permettent une meilleure reconnaissance du pathogène par les cellules phagocytaires. Les cellules du système immunitaire adaptatif sont responsables de la mémoire immunitaire qui

va induire une réponse plus rapide et spécifique en cas de rencontre *de novo* avec un pathogène.

Les systèmes immunitaires (inné et adaptatif) interagissent afin de permettre une élimination durable des pathogènes et autres signaux de danger. Les études sur le système adaptatif ont mis en avant le rôle central des cellules T CD4+ dans la mise en place de cette réponse.

B. Développement et activation des lymphocytes T CD4

La réponse adaptative est permise grâce aux cellules T CD4+ qui ont un rôle de chef d'orchestre de la réponse immunitaire. Les cellules T CD4+ ont une réponse spécifique vis-à-vis d'un antigène permettant la mise en place d'une réponse ciblée et rapide. Dans cette partie, nous allons donc développer la génération et le mode d'action des cellules T CD4+.

La réponse des cellules T CD4+ est permise grâce à la présence, à la surface du lymphocyte T, d'un récepteur reconnaissant un seul antigène. Ce récepteur est généré grâce à des réarrangements génétiques aléatoires des gènes du T – Cell Receptor (TCR) (Muljo et al 2000). Ces réarrangements alléliques permettent, en théorie, la génération d'une infinité de TCR et la reconnaissance d'autant d'antigènes.

1. Lymphopoïèse T CD4

Les cellules T CD4+ proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) au sein de la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs multipotents (MPP) qui donnent naissance aux progéniteurs lymphoïdes (CLP) à l'origine des cellules pro-T. Ces dernières migrent alors dans le thymus afin de finir leur maturation pour donner des cellules T CD4+ fonctionnelles. Au contraire des cellules T CD4+ matures, les cellules pro-T n'expriment pas de TCR à leur surface. Ce n'est qu'au cours de leur développement que les cellules CD4+ se mettent à exprimer le récepteur. La formation du TCR est dépendante de réarrangements génétiques (Cobb et al 2006). Ainsi, la formation du TCR est permise grâce à l'action d'une recombinaison portée par les protéines Rag1 et Rag2. L'absence d'une ou l'autre de ces protéines conduit à une absence de lymphocyte T mature et à une immunodéficience des individus (Schatz et al 1992). Les protéines Rag1 et Rag2 agissent au niveau des séquences VDJ (Variable Diversity and Join) qui représentent différents loci des gènes VDJ et permettent grâce à leur réorganisation l'expression de différents TCR. De part et d'autres des différents loci, des séquences RSS (recombination sequences signals) sont des séquences reconnues par les protéines Rag et permettent la réorganisation des séquences. Des études ont mis en évidence que ce

réarrangement est permis grâce à une accessibilité différente des séquences. Selon les étapes de développement, les séquences sont hyperméthylées empêchant une accessibilité des séquences RSS par les protéines Rag et donc la réorganisation des séquences (Hrisavgi et al 2013).

La migration des cellules pro-T dans le thymus s'effectue dès le 11^{ème} jour de gestation chez la souris et la 8^{ème}/9^{ème} semaine de développement embryonnaire chez l'homme. Lorsque les cellules migrent dans le thymus, elles n'expriment aucuns des marqueurs connus pour les cellules matures à savoir, le CD3, le CD4 et le CD8. Ces cellules sont alors caractérisées comme double négative (DN). Pendant la phase précoce de développement, les cellules se mettent à exprimer les marqueurs ckit, CD44 et CD25 permettant la prolifération et le maintien des cellules dans le thymus. Cette phase de prolifération est suivie d'une diminution de l'expression du marqueur cKit inhibant l'expression du CD44. Les cellules vont ainsi débiter le ré-arrangement de leur TCR en exprimant la chaîne β du récepteur. L'absence du gène rag1 induit un blocage de la différenciation thymique au stade DN (Ezine et al 1994). La chaîne β réarrangée va s'associer au récepteur CD3 pour former le pré-TCR. L'expression de ce pré-TCR va conduire à l'expression des molécules CD4 et CD8 par les cellules permettant de définir les populations doubles positives (DP). Les cellules doubles positives vont proliférer et réarranger la chaîne α du TCR. Le réarrangement de la chaîne α est suivi d'une perte de l'expression des marqueurs précoces de développement à savoir le CD44 et le CD25. Ces cellules vont ensuite exprimer sélectivement le marqueur CD4 ou CD8.

Au cours de leur formation, les cellules CD4 vont subir deux sélections qui vont induire l'élimination de près de 95% des cellules et permettre la formation de cellules matures. Cette sélection se fait seulement en présence d'antigènes du soi.

a) La sélection positive

Lorsque les cellules T CD4+ ont réarrangé leur TCR $\alpha\beta$ potentiellement fonctionnel, une sélection thymique se met en place. Ainsi, la première sélection thymique consiste en une sélection dite « positive ». Elle fait intervenir une interaction entre les cellules épithéliales corticales du thymus et les thymocytes néoformés. Cette sélection consiste à maintenir les cellules CD4+ et CD8+ dont le TCR a une bonne affinité pour le CMH présent sur les cellules épithéliales. Les cellules dont le TCR ne reconnaissant pas de CMH couplé à l'antigène vont être éliminées par apoptose. Cette sélection permet l'élimination de 95% des cellules et une restriction du CMH à l'individu induisant ainsi une meilleure protection de l'individu.

b) La sélection négative

La deuxième sélection thymique ou sélection négative va tendre à éliminer les cellules ayant une reconnaissance des molécules du soi ou ayant une réaction trop importante du TCR vis-à-vis du CMH. Lors de cette sélection, les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques et les macrophages, provenant de la moelle osseuse vont interagir avec les cellules T CD4+. Les cellules dendritiques présentes à la jonction cortico-médullaire captent les antigènes et les présentent via le CMH aux cellules doubles positives. De plus, les cellules dendritiques peuvent exprimer la protéine AIRE (Auto-Immune-Regulator-Element) permettant l'expression d'antigènes tissu-spécific (TSA) par ces dernières. L'expression des différents TSA induit la reconnaissance d'une multitude de néo-antigène et ainsi diminuer la probabilité de développer des maladies auto-immunes (Anderson et al 2016).

Ces différentes sélections thymiques permettent la différenciation des cellules doubles positives en cellules CD4+ et CD8+ du fait de la reconnaissance spécifique des CMH de type I (par les cellules CD8+) ou de type II (par les cellules T CD4+).

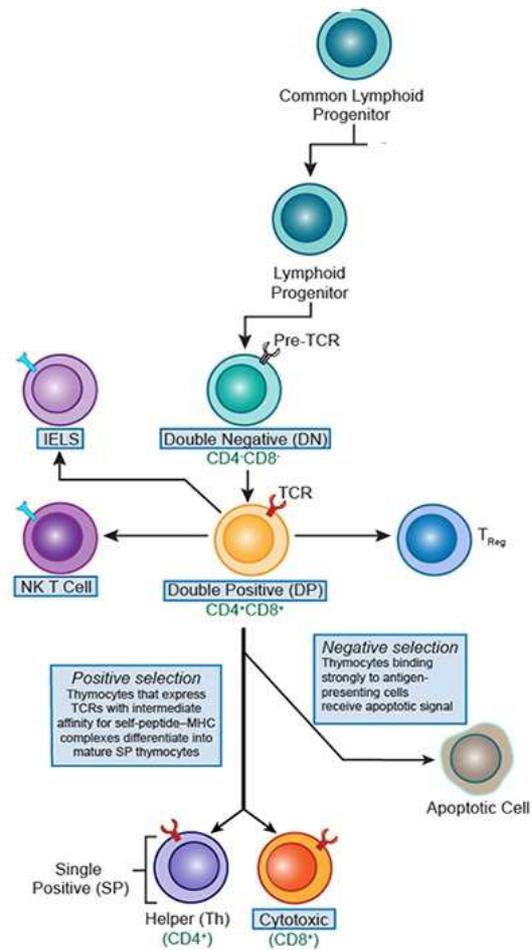


Figure 1: La Lymphopoïèse T CD4+ dans le thymus

Les cellules T CD4+ sont issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Ces cellules vont se différencier en précurseurs lymphoïdes communs qui donneront ensuite les cellules pro-T qui vont migrer dans le thymus afin de finir leur maturation. Cette maturation va passer par différents stades de développement et par la sélection de cellules CD4+ matures capables de mettre en place des réponses immunitaires (d'après Weerkamp et al 2006).

Une fois formées, les cellules CD4 et CD8 vont sortir du thymus, migrer dans l'ensemble de l'organisme et arriver au niveau des ganglions lymphoïdes où elles vont être activées en présence de leur antigène cible.

2. *Activation des lymphocytes T CD4+*

L'activation des cellules T et leur différenciation en cellules effectrices sont dépendantes de 2 signaux. Ces signaux sont transmis lors de l'interaction des cellules présentatrices d'antigènes avec les cellules T CD4+.

Les cellules présentatrices d'antigènes sont des cellules capables de capter, de dégrader des antigènes et de présenter leurs peptides immunogènes aux lymphocytes T CD4+. Ces cellules regroupent des cellules du système immunitaire inné telles que les neutrophiles et les macrophages, mais aussi des cellules du système adaptatif telles que les cellules dendritiques (Banchereau et Steinman 1998 ; Sato et al 2006). Ces cellules vont transmettre les 2 signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD4+.

Le premier signal d'activation se fait suite à l'interaction entre le TCR et le complexe majeur d'histocompatibilité couplé à l'antigène, porté par la cellule présentatrice d'antigènes. Cependant, la liaison de ces deux complexes n'est pas suffisante pour induire un signal intracellulaire. La transduction du signal est permise lorsque ces deux acteurs interagissent avec un complexe CD3 composé de 6 protéines transmembranaires. De plus, les protéines CD4 vont fixer le complexe et permettre ainsi la mise en place du signal 1 d'activation. Ce signal se traduit par une phosphorylation des protéines du complexe CD3 et la transduction du signal jusqu'au noyau.

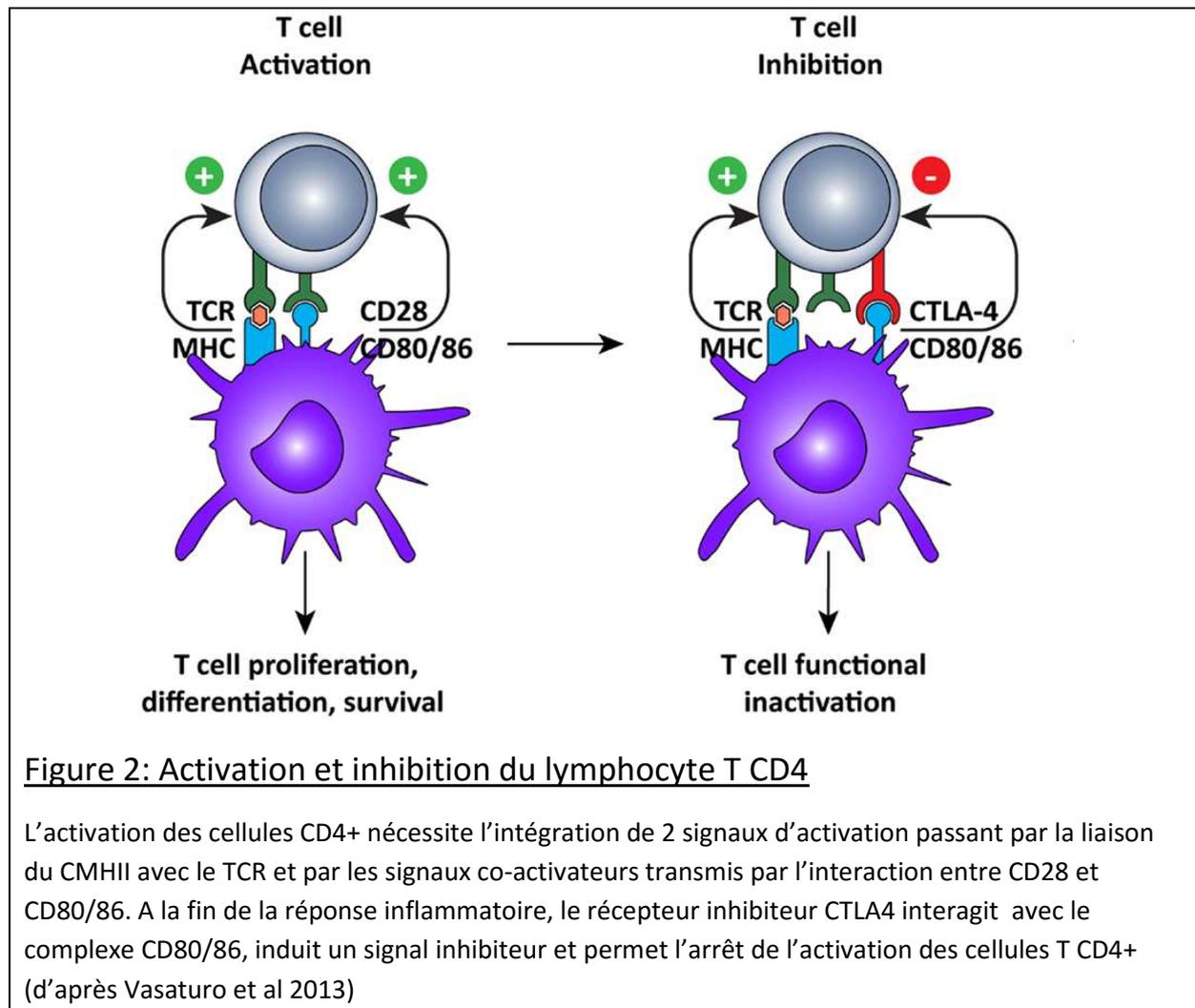
Le deuxième signal d'activation sert à amplifier la réponse émise suite au signal 1. En absence de signal 2, les cellules sont conduites vers une voie apoptotique. Cependant, en cas de réponse retardée du signal 2, les cellules sont orientées vers une voie tolérogénique. Le 2^{ème} signal d'activation est permis grâce à des protéines de co-stimulation présentes sur la cellule présentatrice d'antigène. Ces co-stimulateurs de la famille B7 (CD80/CD86) interagissent avec leur récepteur CD28 présent sur la membrane des lymphocytes T CD4+. Ces deux signaux induisent une prolifération des cellules, l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 et la production d'IL-2 par les cellules T. L'interleukine 2 permet la survie des cellules et leur orientation vers un profil effecteur. En absence d'IL-2, les cellules ne peuvent pas s'activer et devenir des cellules effectrices ou mémoires. L'orientation des cellules vers les différentes voies effectrices est dépendante de l'antigène et de l'environnement de la cellule. Ainsi, les autres cytokines inflammatoires et tolérogéniques (TNF α , IL-6,...) présentes dans l'environnement cellulaire vont orienter les cellules vers les différentes voies effectrices décrites (Alegre et al 2001).

La fin de la phase inflammatoire se traduit par une diminution de l'activité et du nombre des cellules immunitaires. Le retour à l'homéostasie est dépendant de molécules inhibitrices

appartenant à la famille B7, notamment la molécule CTLA4. La protéine CTLA4 va être exprimée par les cellules T et va se lier aux protéines CD80/CD86. Cette interaction induit un signal inhibiteur au sein des cellules T effectrices et les conduit vers une voie apoptotique (Alegre et al 2001). Les seules cellules maintenues à la fin de la réponse immunitaire sont les cellules mémoires. Leur mécanisme de maintien est encore en cours d'étude mais des travaux ont montré que ces cellules sont retrouvées au sein de la moelle osseuse dans des niches protectrices (Tokoyoda et al 2009).

L'activation des cellules T grâce à leur interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes est le mécanisme d'activation majeur décrit à ce jour. Cependant, les travaux de Mercier et al (2009) ont montré que l'activation des cellules T CD4+ humaines s'accompagne d'une surexpression des molécules Toll-like receptor 1 et 2 (TLR1/2). Ces cellules activées mémoires acquièrent ainsi la capacité de répondre aux antigènes extracellulaires. L'activation des cellules T CD4+ via le TLR induit l'expression du facteur de transcription NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires. Il existe différents TLR permettant ainsi de répondre à différents antigènes circulants.

Quelques soit le type d'activation, il aboutit à la naissance de cellules effectrices mais aussi mémoires. Une fois le pathogène éliminé, les cellules mémoires vont être maintenues et permettent le maintien d'une protection durable et à long terme. Les cellules mémoires sont nécessaires à la réponse immunitaire.



3. Les cellules T CD4+ mémoires humaines et murines

Les cellules mémoires sont garantes de l'immunité à long terme. Ces cellules vont être maintenues pendant des années au sein des tissus et des organes lymphoïdes secondaires afin de permettre une réponse plus rapide et spécifique en cas de rencontre *de novo* avec un antigène connu.

Chez l'Homme, il est possible de définir 3 phases immunologiques au cours de la vie de l'individu ; la génération de la mémoire, l'homéostasie et l'immuno-sénescence. A la naissance de l'individu, les cellules mémoires ne sont pas encore formées et seules des cellules CD4+ naïves ont été décrites. Jusqu'à la fin de l'adolescence, la probabilité de rencontrer des antigènes augmente et s'associe à la génération de cellules mémoires. Cette phase d'expansion est ensuite suivie par une phase d'homéostasie où un équilibre se crée entre le nombre de cellules mémoires et naïves produites. Au cours de cette phase immunologique, le nombre de cellules mémoires atteint un plateau. Dès l'âge de 15 ans, il y

a une involution du thymus d'abord rapide puis plus lentement à partir de 30 ans. Cette involution s'accompagne d'une diminution de la production de cellules naïves et une perte de l'équilibre entre cellules naïves et mémoires entraînant une augmentation de la proportion des cellules mémoires. De plus, cette phase de sénescence est associée à une augmentation du risque de rencontrer des antigènes et donc de produire des cellules mémoires accentuant aussi le déséquilibre. Ainsi, à partir de l'âge de 70 ans environ, le nombre de cellules mémoires atteint son maximum.

Au contraire des cellules naïves qui circulent dans l'intégralité de l'individu, les cellules mémoires sont retrouvées principalement au sein des tissus (Ganusov et al 2007). Il est ainsi possible de distinguer 2 types de cellules mémoires; les cellules circulantes et les cellules résidentes. Alors que les cellules mémoires représentent les cellules majoritaires dans les tissus, que ce soit les muqueuses, l'intestin ou la moelle osseuse, les cellules mémoires circulantes représentent environ 2% des cellules T du corps.

En fonction de la localisation des cellules mémoires, il est possible de définir différentes populations. Ainsi, certaines cellules ont été décrites comme circulantes car capables de passer depuis les tissus jusque dans la circulation sanguine. D'un autre côté, certaines cellules sont retenues au sein des tissus afin de permettre une protection durable, rapide et in situ. Toutes les cellules mémoires partagent certaines caractéristiques. En effet, bien qu'il existe une dichotomie entre les cellules mémoires circulantes et résidentes, les cellules mémoires partagent toutes des caractéristiques communes.

a) Caractéristiques des cellules CD4+ mémoires

Au contraire des cellules effectrices éliminées après la fin de la réponse inflammatoire, les cellules CD4+ mémoires sont maintenues dans l'organisme.

Les cellules CD4+ mémoires ont été décrites comme ayant une augmentation du niveau d'expression des intégrines $\beta 1$ (CD29, CD49e et CD49d), $\beta 2$ ainsi que des molécules CD2, CD44, CD58. L'expression de ces molécules d'adhésions permet l'entrée des cellules mémoires au niveau des sites inflammatoires.

La différence entre les cellules naïves et les cellules mémoires se fait à deux niveaux. Tout d'abord, l'activation des cellules mémoires se fait plus rapidement que celle des cellules naïves. Ces cellules mémoires sont moins dépendantes que les cellules naïves de la présence des signaux de co-stimulation (Curtsinger et al 1998). En effet, des niveaux de concentrations inférieures d'antigènes permettent l'activation des cellules mémoires. De plus, l'activation des cellules mémoires est suivie par l'acquisition par ces cellules d'un profil effecteur de façon plus précoce que les cellules naïves.

Au contraire des cellules naïves qui ne peuvent circuler qu'entre les différents organes lymphoïdes, les cellules mémoires ont une capacité d'extravasation vers les tissus non lymphoïdes tels que la peau, le poumon ou encore l'intestin (Revue Berard et al 2002).

Enfin, bien que les cellules mémoires aient de nombreuses caractéristiques communes, il est possible de définir différentes populations mémoires au sein des cellules circulantes et résidentes.

b) Les cellules CD4+ mémoires circulantes

Au cours des 20 dernières années, il a été décrit deux types de cellules CD4+ mémoires ; les cellules effectrices mémoires et les cellules centrales mémoires. Ces cellules se distinguent par la présence ou l'absence du récepteur de chimiokines CCR7 et de la L-selectin CD62L (Sallusto et al 1999).

Ainsi, les cellules CCR7+ CD62L+ sont décrites comme des cellules centrales mémoires (CM) alors que les cellules CCR7- CD62L- sont des cellules effectrices mémoires (EM). Les cellules centrales mémoires, du fait de l'expression de ces molécules de surface, peuvent migrer au sein des organes lymphoïdes. En effet, le marqueur CD62L se lie aux molécules d'adressage présentes sur les vaisseaux sanguins et initie les 1^{ères} étapes d'adhésion des cellules T CD4+ aux vaisseaux. Le récepteur CCR7 va quant à lui contrôler la réponse aux chimiokines et l'entrée des cellules dans les vaisseaux sanguins (Revue Berard et al 2002). Les cellules centrales mémoires ont une plus grande capacité de prolifération que les cellules naïves, elles peuvent redonner des cellules effectrices en présence de facteurs de différenciation. Au contraire, les cellules effectrices mémoires ne peuvent pas migrer dans les tissus lymphoïdes mais répondent plus rapidement aux signaux d'activation afin de donner des cellules effectrices que ce soit les cellules effectrices ou centrales mémoires. Ces cellules permettent une réponse rapide et spécifique face aux pathogènes (Pepper et al 2011 ; Muller et al 2013). Ces cellules mémoires peuvent ainsi migrer dans l'ensemble de l'organisme afin de répondre rapidement en cas de rencontre avec un antigène et jouent un rôle dans l'immunosurveillance.

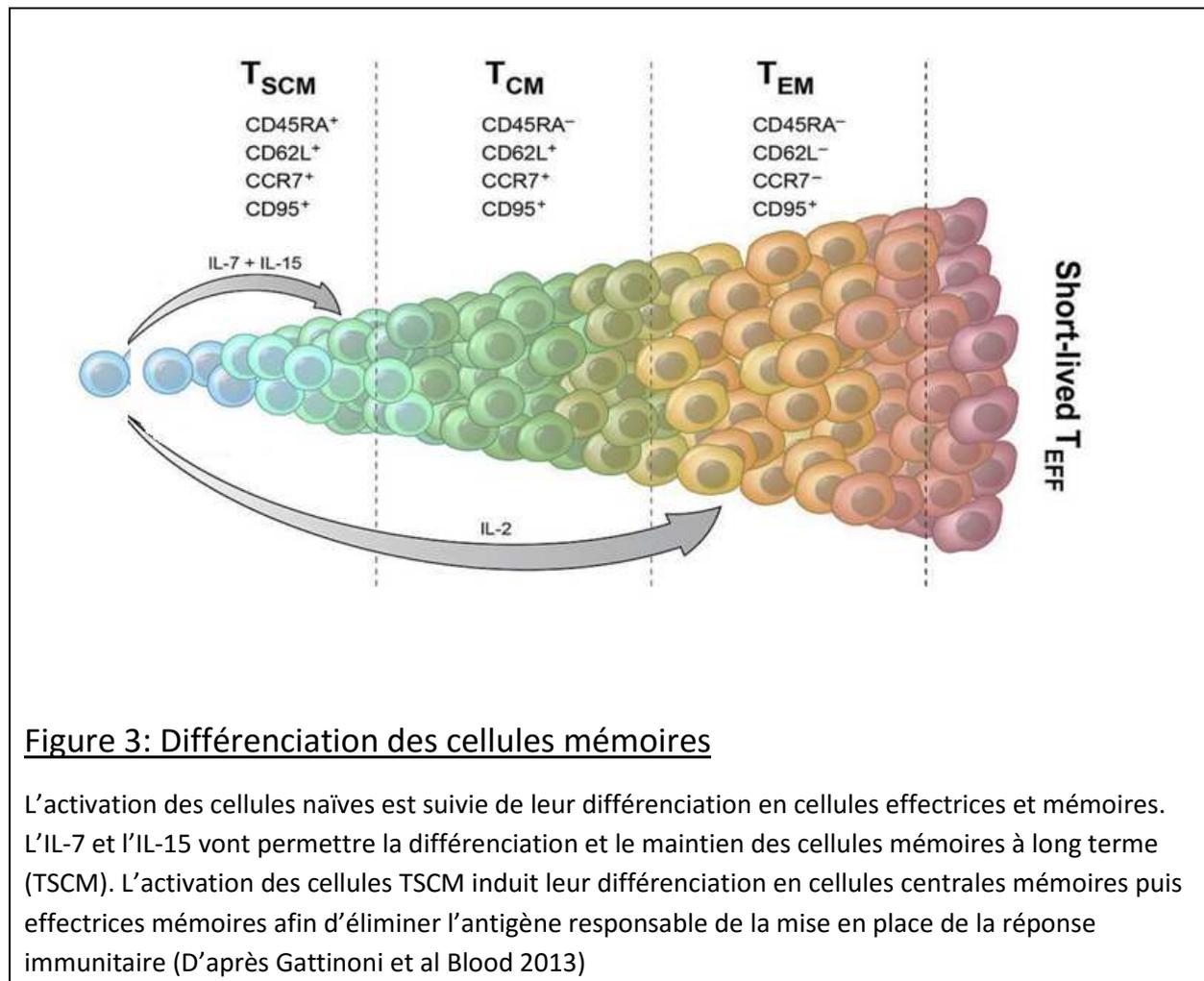
L'interaction des cellules mémoires avec les molécules d'adhésion permet l'entrée des cellules au sein des différents tissus de l'organisme. De plus, des gradients de chimiokines (molécule d'attraction) permettent une bonne orientation des cellules vers les organes cibles. Il est ainsi possible de distinguer différents types de cellules CD4+ mémoires en fonction de leur site inflammatoire.

Au cours des 10 dernières années, une nouvelle classe de cellules mémoires circulantes a été décrite. Les cellules TSCM « stem cell memory » ont été tout d'abord décrites parmi les cellules CD8+. Les cellules T SCM ont un phénotype mixte entre celui des cellules naïves et des cellules mémoires. En effet, ces cellules expriment à la fois le CD45RA, permettant de décrire les cellules naïves, mais aussi le CD95 et CXCR3 (marqueurs des cellules

activées/mémoires). L'analyse transcriptomique de ces cellules a mis en avant, qu'elles ont la signature des cellules activées. De plus, l'étude *in vivo* de ces cellules a montré qu'elles sont capables de se différencier rapidement en cellules effectrices (Gattinoni et al 2011). Les cellules T SCM, tout comme les cellules T CM, peuvent migrer dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles redonnent des cellules centrales et effectrices mémoires *in vivo* et *in vitro*. Les TSCM sont caractérisées de cellules « long lived cells » car étant les cellules les plus stables *in vivo*, elles sont retrouvées de nombreuses années après la première rencontre avec l'antigène. Les études sur les cellules CD4+ TSCM ont mis en évidence que ces cellules peuvent servir de mémoire à long terme. En effet, dans les cas de HIV, les cellules CD4+ TSCM infectées pourraient participer à la persistance de la maladie (Buzon et al 2014).

Les études sur les cellules mémoires ont mis en avant que ces cellules sont centrales dans la réponse immunitaire. Les études sur les cellules CD4+ et CD8+ ont montré que la moelle osseuse représente un organe cible dans le maintien des cellules mémoires. Ainsi, 80% des cellules T de la moelle osseuse sont des cellules mémoires (Lugli et al 2013). La moelle osseuse est ainsi devenue centrale dans l'étude de la mémoire systémique à long terme.

Comme nous l'avons déjà évoqué, les cellules mémoires sont maintenues principalement au sein des tissus. Dernièrement, une nouvelle classe de cellule mémoires a été décrite ; les cellules résidentes mémoires.



c) Les cellules CD4+ mémoires résidentes

Les sites d'entrées des pathogènes tels que la peau, les muqueuses ou encore les poumons contiennent une majorité de cellules mémoires résidentes (TRM). Comme leur nom l'indique, ces cellules ne migrent pas dans la circulation mais restent dans le tissu afin d'y assurer une protection *in situ*. Les cellules TRM, tout comme les cellules circulantes mémoires peuvent redonner des cellules effectrices capables de lutter contre les pathogènes. Au sein des tissus, les CD4+ TRM représentent la population la plus abondante des cellules mémoires. Leur activité de senseur de pathogènes permet une protection efficace. Ces cellules sont maintenues dans des microenvironnements particuliers communément appelés niches qui vont les protéger pendant des années.

Malgré leur abondance dans les tissus, il est difficile d'isoler ces cellules dans les tissus. En effet, en absence de challenge, ces cellules sont dans un état quiescent et sont donc insensibles aux traitements visant à les éliminer, tels que les traitements anti-

inflammatoires. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques, le maintien de ces cellules participe à l'exacerbation de la maladie et à sa durée. Ainsi, l'étude de ces cellules et leur caractérisation phénotypique permettent une meilleure compréhension de l'immunité.

Comme pour les cellules circulantes, la plupart des études sur les cellules résidentes se sont faites sur les cellules T CD8+. Les premières analyses sur les cellules de la peau ou des poumons ont montré que ces cellules résidentes sont caractérisées par la présence du marqueur CD69. Ce marqueur a longtemps été défini comme un marqueur d'activation précoce des cellules qui va être exprimé à la membrane suite à l'interaction du MHCII et du TCR (Ziegler et al 1994). Cette protéine va permettre l'expression de l'IL-2R α et la prolifération des cellules T CD4+ activées. Cependant, depuis quelques années, la fonction cette protéine a été élargie et semble être impliquée dans la régulation de la mobilisation des cellules mémoires. Ainsi, les premières études sur cette protéine ont montré que l'expression constitutive de ce marqueur induit une accumulation des thymocytes dans le thymus (Feng et al 2002). Bien que le ligand de cette protéine transmembranaire reste encore indéterminé, cette protéine semble agir en interaction avec la sphingosine-1-phosphate. Le blocage de l'interaction entre la sphingosine-1-phosphate et son récepteur, que ce soit dans des modèles murins ou par des procédés pharmacologiques, conduit à l'absence de migration des cellules T à partir du thymus ou des organes lymphoïdes (Matloubian et al 2004). De plus, les phénotypes des souris déficientes en CD69 et S1P étant identiques ont permis d'appréhender l'interaction entre les 2 protéines. Ainsi, les études sur la régulation de la mobilisation des cellules T ont mis en en avant que la protéine CD69 va avoir un effet antagoniste sur le récepteur S1Pr1 et bloquer la sortie des cellules T vers la circulation sanguine (Shiow et al 2006 ; Schenkel et al 2014). De plus, les études sur les cellules mémoires ont montré que le marqueur CD69 est exprimé par les cellules des différents tissus et permet notamment de définir les cellules mémoires CD4 et CD8 résidents à long terme dans la moelle osseuse (Shinoda et al 2012 ; Alp et al 2015 ; Skon et al 2013).

Au sein des tissus, tels que le colon ou la peau, l'expression de l'intégrine $\alpha E\beta 7$ (CD103) va permettre de définir les cellules résidentes mémoires. Cette intégrine induit l'interaction entre les cellules résidentes mémoires avec l'épithélium des tissus. Au niveau intestinal, cette intégrine interagit avec l'E-cadhérine présente sur les cellules épithéliales intestinales (Casey et al 2012). Il est connu depuis de nombreuses années que l'expression du CD103 par les cellules activées est dépendante du TGF β (Robinson et al 2001). Des études récentes ont montré que le TGF β était important pour le maintien des cellules TRM dans l'intestin en induisant l'expression de CD103 par les cellules T (Zhang et al 2013).

Ainsi, les cellules résidentes mémoires sont donc définies par l'expression coordonnée de ces 2 marqueurs ; le CD69 et le CD103 (Mackay et al 2013 ; Mackay et al 2015 ; Masopust et al 2013). Ces cellules mémoires bien que partageant certaines caractéristiques avec les cellules mémoires circulantes possèdent un profil transcriptomique unique (Mackay et al 2013). Les populations résidentes mémoires vont aussi permettre une réponse *in situ* des

cellules. Leur étude permet une meilleure compréhension de la protection immunitaire mise en place suite à l'immunisation d'un individu.

Bien que certains marqueurs semblent nécessaires dans le maintien des cellules mémoires dans les tissus, les mécanismes précis de leur rétention ne sont pas encore totalement élucidés. Ainsi, la présence de facteurs impliqués dans la surexpression de CD69 et le CD103 peuvent favoriser la rétention de ces cellules dans les tissus cibles. De plus, les propriétés intrinsèques des tissus vont participer à ce phénomène de rétention. En fonction des tissus cibles, les cellules mémoires vont exprimer différents récepteurs aux chimiokines (CCR1 et CCR10 pour la peau ; CCR6 pour les poumons, CXCR4 pour la moelle osseuse) permettant un maintien à plus ou moins long terme dans les tissus. Le mécanisme par lequel les cellules T CD4+ vont devenir des cellules mémoires résidentes dans les tissus reste à ce jour encore indéterminé. Les différentes études mettent en avant un rôle central de ces cellules dans la protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes.

d) Les lymphocytes T CD4+ mémoires dans la moelle osseuse

La moelle osseuse est un organe central dans la mise en place de la réponse immunitaire. Tout d'abord, du fait de son rôle en tant que siège de l'hématopoïèse, la moelle osseuse va être associée au système immunitaire. Parmi les cellules hématopoïétiques différenciées, les cellules T et B sont les seules cellules décrites comme ayant le potentiel de revenir dans la moelle osseuse et d'y être maintenues une fois activées.

Les observations cliniques dans les cas de transfert de moelle osseuse ont montré que les patients transférés possédaient la protection immunitaire des patients donneurs. Ainsi, les 1^{ers} travaux ont montré que lors des transferts de moelle osseuse le greffon est composée de cellules immunitaires B et T permettant la protection des receveurs (Rosendahl et al 1985 and Gottlieb et al 1990). Ces premières observations ont conduit à l'étude des cellules mémoires présentes dans la moelle osseuse. Les premiers travaux sur les cellules T se sont faits sur les cellules CD8+ cytotoxiques. Lors de l'infection des souris avec le virus LCMV, il est observé une production de cellules CD8+ cytotoxiques qui éliminent le virus en environ 2 semaines. Les études de Slifka et al (1998) ont montré que les CTL spécifiques du virus étaient retrouvées dans la moelle osseuse des souris infectées plus de 300 jours après la fin de l'infection. Ensuite, les études de Price (1999) sur les cellules CD4+ mémoires, ont confirmé la localisation préférentielle de ces cellules dans la moelle osseuse. Ces cellules sont retrouvées après l'exposition des souris à un antigène mais aussi chez des souris contrôles. En effet, ces cellules mémoires sont produites grâce à la rencontre entre les cellules naïves et un antigène circulant, pouvant notamment provenir d'une source alimentaire. Les cellules sont générées en périphérie et migrent ensuite dans la moelle osseuse.

Dans des conditions normales, les cellules T CD3⁺ représentent entre 2 et 3% des cellules de la moelle osseuse. Tout d'abord, l'étude du profil membranaire des cellules a montré que ces cellules expriment le facteur CD44. De plus, les travaux de Walunas et al (1995) ont montré que le marqueur Ly6C permettait de définir les populations T CD8⁺ activées/mémoires. Cependant, les cellules CD8⁺ ne sont pas les seules à être définies par l'expression de ce marqueur. En effet, en 2009, les travaux de Tokoyoda ont montré que les cellules CD4⁺ mémoires, présentes à long terme chez la souris, sont associées à l'expression du marqueur Ly6C. Le marqueur Ly6C est un phospho-inositol qui participe à l'interaction entre les différentes cellules immunitaires. Contrairement au marqueur CD44 qui ne permet pas de différencier les cellules mémoires entre elles, le Ly6C permet quant à lui de décrire une population mémoire maintenue pendant des mois dans la moelle osseuse. En effet, les cellules effectrices sont associées à une diminution de l'expression du marqueur Ly6C chez les cellules CD4⁺. Ainsi, les cellules CD4⁺ Ly6C^{lo} sont présentes dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions alors que les cellules mémoires sont plutôt dans les tissus et la moelle osseuse (Marshall et al 2011). De plus en plus d'études ont décrit le marqueur Ly6C comme celui des cellules mémoires bien que son rôle n'ait pas encore été déterminé. Cependant, des études montrent que ce marqueur est associé à une augmentation du marqueur LFA1 au niveau membranaire permettant une plus grande interaction cellulaire avec son ligand ICAM-1 (Jaakkola et al 2003). De plus, les études de Hänninen et al (2011) ont montré que le marqueur LFA-1 est principalement exprimé par les cellules TCM et participerait à leur migration dans les organes lymphoïdes. Il est possible qu'il participe au maintien des cellules dans la moelle osseuse.

Le marqueur Ly6C n'est pas le seul marqueur des cellules mémoires dans la moelle osseuse. Ainsi, le marqueur CD69 jusque-là décrit comme marqueur des cellules résidentes mémoires dans les tissus participerait aussi à définir les cellules mémoires dans la moelle osseuse. En effet, les études de Shinoda et al (2012) ont montré que les cellules CD69⁺ Ly6C⁺ sont maintenues dans la moelle osseuse, des années après la fin de la réaction immunitaire. Ces cellules sont retrouvées à proximité des cellules stromales mésenchymateuses. Le marqueur CD69 va participer à l'adhésion des cellules T CD4⁺ avec les cellules stromales mésenchymateuses. Les travaux de Tokoyoda et Shinoda ont défini que les cellules T CD4⁺ étaient retrouvées à proximité des cellules mésenchymateuses productrices de l'IL-7 et exprimant VCAM1. L'intégrine VCAM1 a un rôle essentiel dans le maintien des cellules mémoires. En effet, l'ablation conditionnelle de l'intégrine VCAM 1 dans les cellules endothéliales est associée à une diminution du nombre de cellules T CD4⁺ dans la moelle osseuse (Koni et al 2001).

Les cellules mémoires dans la moelle osseuse composent la majorité des cellules T CD4⁺ dans la moelle osseuse. Elles forment une population hétérogène composée de cellules centrales et effectrices mémoires (Geerman et al 2016). Bien que ces cellules soient retrouvées dans la moelle osseuse, les mécanismes de maintien des cellules mémoires restent encore à déterminer.

Les études montrent que les cellules mésenchymateuses participent au maintien des cellules T CD4+. Ces cellules mésenchymateuses vont agir en produisant des cytokines de survie mais aussi des intégrines permettant le maintien des cellules. En effet, l'IL-7 produit par les cellules mésenchymateuses est nécessaire pour la survie des cellules CD4+ mémoires (Li et al 2003). L'expression du récepteur de l'IL-7, ainsi que la présence de cette cytokine permet la transition des cellules effectrices vers un profil mémoire. De plus, cette cytokine est impliquée dans le maintien des cellules en inhibant l'apoptose des cellules (McDonald et al 2015). L'IL-7 participe aussi au métabolisme des cellules mémoires en stimulant l'entrée du glycérol dans les cellules et permet ainsi un apport énergétique pour les cellules mémoires (Cui et al 2015). La chimiokine CXCL12 a une place centrale dans la régulation des cellules hématopoïétiques. Des études ont mis en avant que les cellules T expriment le récepteur à cette chimiokine. De plus, l'inhibition de l'expression de cette chimiokine par les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes induit une diminution de la proportion des cellules T CD4+ dans la moelle osseuse (Ding et al 2012). Dans des conditions pathologiques, les cellules mémoires sont elles aussi retrouvées au niveau de la moelle osseuse. Les mécanismes impliquant le maintien des cellules CD4+ mémoires pathogéniques (capables d'induire la maladie lorsqu'elles sont transférées dans une souris contrôle), semblent partager des caractéristiques communes avec des cellules CD4+ mémoires non pathogéniques. Ainsi, les travaux de Nemoto et al 2012, ont montré que l'IL-7 produit par les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse va notamment participer à la survie de ces cellules dans la moelle osseuse.

De nombreuses pistes ont été explorées afin de définir la ou les niches des cellules mémoires dans la moelle osseuse. Les travaux actuels ne permettent pas de déterminer si ces cellules peuvent être caractérisées comme des cellules résidentes et surtout par quel mécanisme ces cellules sont maintenues dans la moelle osseuse (Revue Di rosa et al 2016).

4. Les cellules T CD4+ effectrices

Les cellules CD4+ sont les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules vont pouvoir activer les cellules T CD8+ cytotoxiques et induire la production d'anticorps par les cellules B. Ces différents types de réponses sont dépendants de la polarisation des cellules CD4+.

a) Les cellules Th1

Les cellules Th1 ont été les premières cellules inflammatoires décrites. Les cellules Th1 participent à la plupart de maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde. Elles sont caractérisées grâce à leur sécrétion de deux cytokines majeurs dans la réponse inflammatoire ; le TNF α et l'Interféron gamma (IFN γ). Ces cytokines

inflammatoires vont participer aux dégradations tissulaires au niveau du site inflammatoire, comme la barrière intestinale dans la maladie de Crohn (Parronchi et al 1997).

La différenciation des cellules naïves en cellules Th1 se fait en présence d'interleukine 12 (IL-12) et d'IFN γ qui vont induire l'expression des facteurs STAT4 et STAT1 respectivement. Le facteur de transcription STAT1 induit l'expression du gène maître Tbet qui à son tour permet l'expression de l'IFN γ . Le facteur de transcription STAT4 permet l'expression à la membrane du récepteur à l'IL-12. L'expression d'IFN γ par les cellules T CD4+ participe à l'activation des cellules T CD8+ cytotoxique et des macrophages présents au niveau du site inflammatoire. Le TNF α est, tout comme l'IFN γ , une cytokine inflammatoire. Cette cytokine participe à l'interaction entre le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, le TNF α induit l'activation des macrophages en augmentant leur capacité de phagocytose et leur prolifération au niveau du site inflammatoire. Les cellules Th1 permettent la destruction des pathogènes intracellulaires. Ainsi, elles vont augmenter l'activité des macrophages et des neutrophiles afin d'éliminer efficacement les pathogènes. De plus, elles vont aussi permettre la sécrétion d'immunoglobuline G par les cellules B (Gasper et al 2014).

Outre la réponse contre les pathogènes intracellulaires, ces cellules sont aussi impliquées dans le développement des maladies auto-immunes.

b) Les cellules Th2

Les cellules CD4+ Th2 sont induites par l'IL-4. La fixation de cette cytokine induit l'expression du facteur de transcription STAT6 permettant l'expression du gène maître Gata 3. Ces cellules Th2 ont été décrites dans des maladies allergiques telles que l'asthme mais aussi dans le cas de la recto-colite hémorragique (Zheng et al 1997). Ces cellules effectrices se reconnaissent par leur production d'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Ces cellules vont avoir deux effets ; le premier de par l'action de ces cytokines IL-4, IL5 et IL-13 va induire le recrutement et la maturation des éosinophiles et l'élimination des pathogènes. Le deuxième rôle des cellules T TH2 est l'activation des cellules B et notamment leur induction d'immunoglobuline E. Ces IgE vont activer les mastocytes et les éosinophiles permettant de lutter contre les antigènes.

c) Les cellules Th17

Les cellules Th17 forment une population effectrice inflammatoire décrite très récemment. Ces cellules produisent, tout comme les cellules Th1, du TNF α . Cependant, ces cellules sont décrites par leur capacité à produire de l'IL-17 (Aarvak et al 1999 ; Harrington et al 2006). La différenciation des cellules Th17 dépend de la présence d'IL-6 et de TGF β (Stockinger et al

2007). L'IL-6 et le TGF β induisent l'expression de STAT3 qui participe à l'activation des gènes maîtres des cellules Th17 (RoRyt et RoRyc) induisant la production d'IL-17 par les cellules (Korn et al 2007). Ces cellules ont été décrites dans les maladies auto-immunes mais aussi dans la lutte contre les pathogènes et les mycoses. Les cellules Th17 participent à la lutte contre les pathogènes extracellulaires en produisant de l'IL-17. L'IL-17 produit par ces cellules va permettre la mobilisation et la génération *de novo* de neutrophiles, participant ainsi à l'inflammation. Les populations Th17 ainsi produites vont avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'organisme.

Les cellules Th17 ont été décrites majoritairement dans les maladies auto-immunes ainsi que les maladies inflammatoires chroniques. Les cellules Th17 peuvent avoir un effet dit pathogénique, lorsqu'elles sont responsables de maladie, soit de non-pathogéniques, quand elles protègent le corps vis-à-vis des pathogènes. Ainsi, les études de Lee et al (2012) ont montré qu'en absence d'IL-23 les cellules Th17 produites sont non-pathogéniques et n'induisent pas de maladie. L'IL-23 va participer au maintien des cellules Th17 et à leur pathogénicité des cellules en induisant la sécrétion de TGF β 3. Le rôle de l'IL-23 dans ce phénotype a été démontré grâce à l'étude d'anticorps bloquant. Ainsi, l'inhibition de la signalisation de l'IL-23 induit une diminution des signes cliniques de la maladie ainsi que du nombre de cellules Th17 (Geremia et al 2011).

Bien que certains travaux aient montré le rôle de ces cellules dans la mise en place des maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn (Feng et al 2011), leurs effets sont toujours controversés. Ainsi, les études ont montré que l'ablation de ces cellules ou le blocage de leurs effets ne permettent pas d'inhiber la réponse inflammatoire (Hueber et al 2012).

De plus, les travaux de Gaublotte et Wang en 2015 ont mis en avant que les cellules Th17 pathogéniques et non pathogéniques ont des signatures moléculaires très différentes. Ainsi, l'expression différentielle de nombreux marqueurs et notamment du CD5L va participer à la pathogénicité des cellules dans un contexte inflammatoire.

d) Les cellules T CD4+ régulateurs

Afin de permettre des réponses inflammatoires coordonnées, il est nécessaire de réguler ces réponses. Afin de stopper la réponse établie par les cellules CD4+ effectrices « inflammatoires », il existe des cellules dites régulatrices. Ces cellules ont été décrites pour la première fois par les travaux Sakaguchi et al (2000) qui ont ainsi montré que l'absence de cellule régulatrice induisait la mise en place de maladie auto-immune chez les animaux. Il a été décrit deux types de lymphocytes T régulateurs ; les cellules dites « naturelles » et les cellules dites « induites » (iTreg). Les cellules naturelles comprennent les cellules produites *in vivo* que ce soit dans le thymus (tTreg) ainsi qu'en périphérie (pTreg). Les cellules iTreg caractérisent les cellules régulatrices différenciées *in vitro*. La différenciation des cellules

naïves en cellules régulatrices se fait en présence de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β et l'IL-10. Le TGF β permet d'induire l'expression du gène maître « FoxP3 ». (Fontenot et al 2003). Les cellules régulatrices sont décrites comme exprimant le facteur FoxP3 mais aussi des niveaux importants de CD25 (IL-2R α). L'action régulatrice de ces cellules permet de limiter les réponses inflammatoires excessives. Ainsi, les cellules Treg préviennent la mise en place de réponse auto-immune vis-à-vis des antigènes du soi mais elles permettent aussi la mise en place des réponses tolérogéniques tel que la tolérance foeto-maternelle ou encore contre les bactéries commensales de la flore intestinale (Dembic et al 2008 ; Sakaguchi et al 1995). Les cellules induites visent à arrêter la réaction immunitaire, limiter la réponse des cellules T effectrices comme dans le cas des réponses asthmatiques ou inflammatoires (Huang et al 2013).

Bien que les cellules nTreg et iTreg aient toutes la capacité d'arrêter les réponses inflammatoires, il est possible de distinguer ces populations grâce à différents marqueurs. Les marqueurs Helios et Neuropilin1 sont des marqueurs spécifiques des cellules nTreg (Akimova et al 2011 ; Bruder et al 2004). De plus, au contraire des cellules tTreg qui peuvent se différencier en cellules Th17 en présence de grandes quantités de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-23), les cellules pTreg maintiennent leur phénotype régulateur (Zheng et al 2008). Une partie des cellules pTreg proviennent de la différenciation des cellules effectrices en présence de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β ou l'IL-10 (Wakkach et al 2003). Une partie de ces cellules pTreg peut être caractérisée grâce à l'expression du marqueur CD49b (Vicente et al 2016). Ces cellules CD49b+ produisent de grandes quantités d'IL-10 et IL-4.

Que ce soit les cellules naturelles ou induites, les cellules régulatrices ont été décrites comme ayant différents mécanismes d'action. Ainsi, ces cellules vont agir grâce à des interactions cellules/cellules mais aussi par un effet autocrine. La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et de TGF β induisent une augmentation de l'expression d'indoleamine-2, 3-dioxygénase (IDO) par les cellules dendritiques ce qui inhibe la réponse des différentes cellules T effectrices (Yan et al 2010). Outre les cytokines anti-inflammatoires, les cellules régulatrices produisent des enzymes (perforines et granzymes) qui perforent les cellules activées et permettent d'arrêter la réaction immunitaire. En parallèle de cet effet paracrine, les cellules T CD4+ régulatrices vont arrêter la réponse immunitaire grâce à des contacts cellulaires. Lors de ces mécanismes, la protéine inhibitrice CTLA-4 va jouer un rôle central dans l'interruption de la réponse inflammatoire. En effet, la protéine CTLA4 interrompt le signal activateur et permet ainsi une diminution de la réponse inflammatoire (Sakaguchi et al 2009).

Ces cellules régulatrices vont permettre de limiter la réponse inflammatoire lorsque les antigènes sont éliminés mais elles vont aussi limiter la mise en place de maladies auto-immunes. Ainsi, dans les cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, ces cellules T régulatrices inhibent la mise en place de la maladie dans des modèles murins (Powrie et al

1994). Des études récentes ont démontré la présence de cellules CD4+ régulatrices fonctionnelles au sein du tractus digestif des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'absence d'effet régulateur de ces cellules au cours de la maladie reste encore à être déterminée et permettrait de lutter efficacement contre le développement de la maladie.

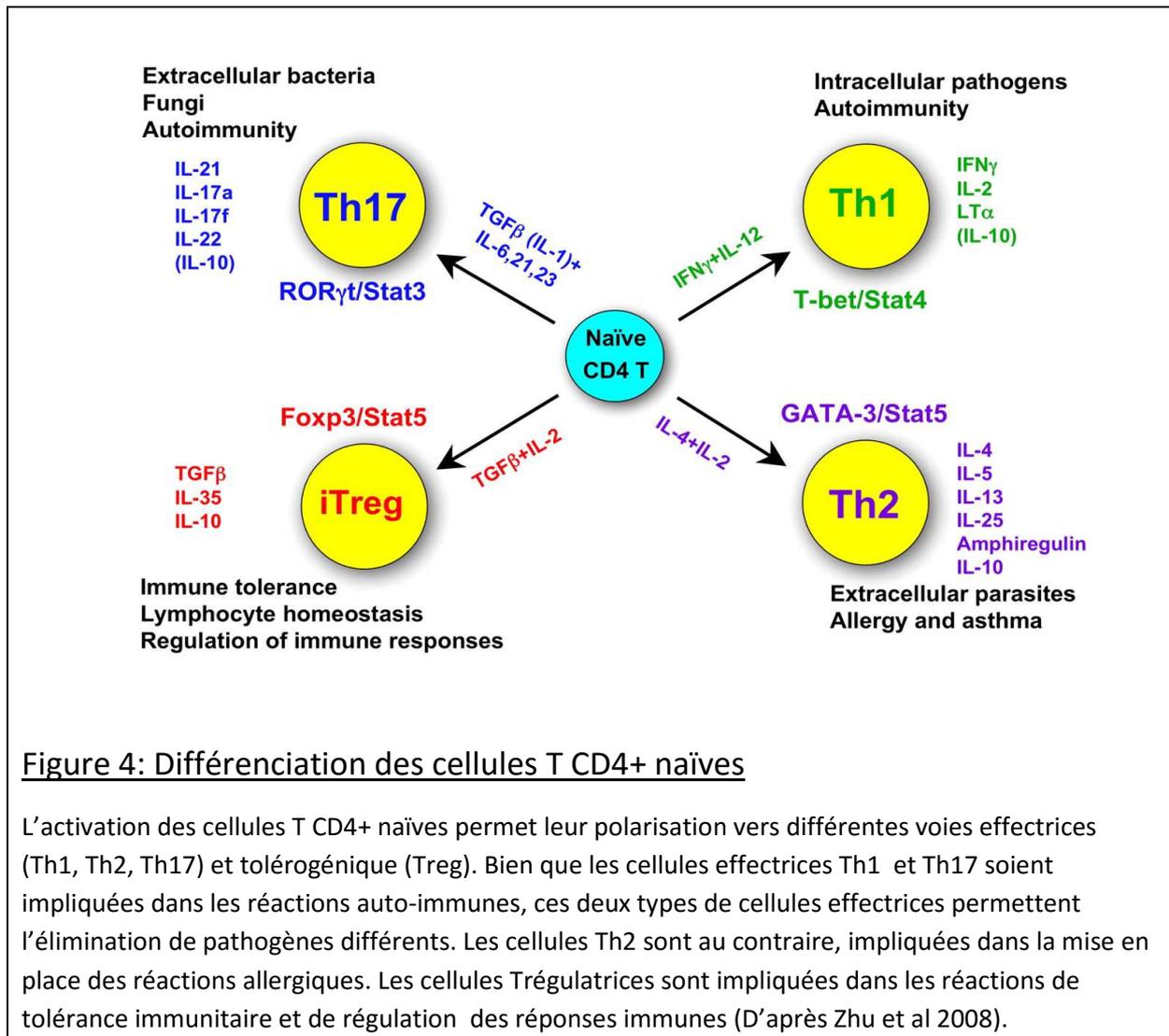


Figure 4: Différenciation des cellules T CD4+ naïves

L'activation des cellules T CD4+ naïves permet leur polarisation vers différentes voies effectrices (Th1, Th2, Th17) et tolérogénique (Treg). Bien que les cellules effectrices Th1 et Th17 soient impliquées dans les réactions auto-immunes, ces deux types de cellules effectrices permettent l'élimination de pathogènes différents. Les cellules Th2 sont au contraire, impliquées dans la mise en place des réactions allergiques. Les cellules Trégulatrices sont impliquées dans les réactions de tolérance immunitaire et de régulation des réponses immunes (D'après Zhu et al 2008).

e) Plasticité des cellules CD4+ effectrices

La large gamme de cellules T CD4+ effectrices montre la grande capacité de différenciation des cellules CD4+ naïves. Dans des conditions physiologiques, l'activation des cellules T CD4+ induit la production de cellules Th1, Th2, Th17 ou alors Régulatrices. Cependant, le profil de ces cellules n'est pas figé dans leur profil inflammatoire ou tolérogénique.

i. *Différenciation entre les cellules Treg et Th17*

La différenciation des cellules Régulatrices et des cellules effectrices Th17 est possible grâce à la présence de TGF β (Betelli et al 2006). Les travaux d'Esposito et al (2010) ont montré que de grande quantité d'IL-6 permet la différenciation des cellules Régulatrices FoxP3+ CD25^{low} en cellules Th17 (FoxP3+ RoR γ t+). De façon intéressante, ces cellules produisent de l'IL-17 et de l'IL-10 et participent à l'inflammation intestinale. Cependant, l'IL-6 n'est pas la seule cytokine inflammatoire permettant la plasticité des cellules Treg et l'IL-1 et l'IL-23 participent fortement à la différenciation des cellules Th17 en Treg (Wang et al 2014).

Les cytokines ne sont pas les seuls éléments qui participent à la différenciation de cellules T CD4+. Ainsi, certains métabolites vont avoir un rôle de co-facteur. Au niveau intestinal, la vitamine A et ses métabolites vont agir au niveau des cellules T CD4+. Parmi les métabolites de la vitamine A, l'acide rétinoïque va induire une inhibition de la différenciation des cellules Th17 et favoriser la différenciation des cellules régulatrices (Xiao et al 2008). Ainsi, des taux importants d'acide rétinoïque vont participer au blocage de la différenciation des cellules naïves vers un profil Th17 (Mucida et al 2007). Ces travaux ont montré que l'acide rétinoïque bloque la signalisation induite par l'IL-6.

ii. *Plasticité entre les cellules Th1 et Th17*

En présence de fortes concentrations de TGF β , les cellules Th1 peuvent se différencier en cellules Th17. Cette cytokine permet l'expression des gènes RoR γ T et Runx1 chez les cellules Th1 induisant leur différenciation en cellules Th17. L'activation de ces gènes induit l'expression d'IL-17 par les cellules (Lee et al 2015).

Outre le TGF β , la présence d'IL-23 participe au maintien des cellules Th17. L'IL-12 et l'IL-23 vont induire la production de cellules TNF α IL-17+ IFN γ + qui forment une population des plus agressives dans ces maladies (Esposito et al 2010; Harbour et al 2015). En effet, l'interaction de l'IL-23 avec son récepteur permet l'activation de la voie de signalisation de l'IFN γ induisant la production de cellules « Th1-like ». Tout comme dans la différenciation Th17/Treg, l'acide rétinoïque va aussi participer à l'induction des cellules inflammatoires

Th1. En effet, l'acide rétinoïque va augmenter l'expression d'IL-12 et d'IL23 par les cellules dendritiques favorisant la différenciation des cellules vers un profil Th1.

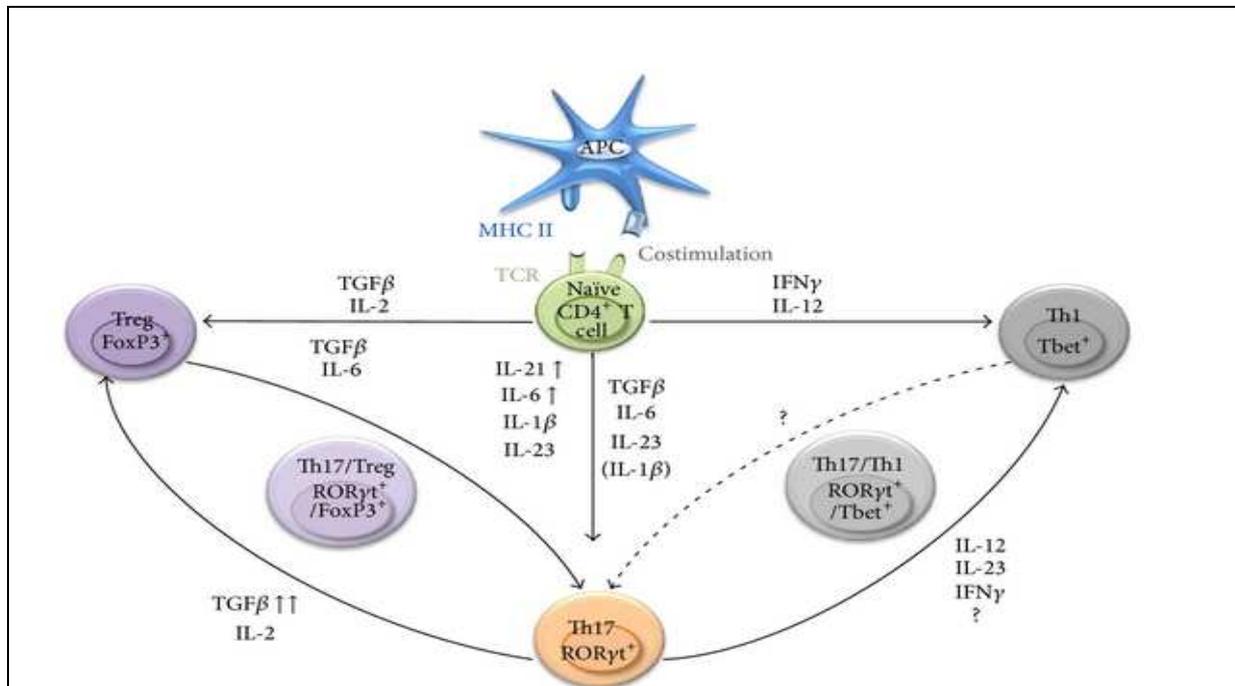


Figure 5: Plasticité des cellules T CD4+

L'activation des cellules CD4+ aboutie à la polarisation des cellules vers des profils effecteurs (th1 et Th17) et tolérogéniques. Les cellules Th17 sont à un carrefour entre les polarisations Th1 et Treg. En effet, la présence d'IL12, d'IL-23 et d'IFNγ permet la plasticité des cellules Th17 vers un profil Th1. Au contraire, la présence de cytokines anti-inflammatoires (TGFβ) induit la différenciation des cellules Th17 vers un profil régulateur (D'après Alizahed et al 2013).

II. Os et Hématopoïèse

Le tissu osseux est constitué de cellules piégées dans une matrice extracellulaire composée majoritairement de collagène de type I et de protéoglycanes. Cette matrice est rendue rigide lors du processus de minéralisation durant lequel des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite sont réalisés. Ce tissu a différents rôles ; tout d'abord il s'agit du centre de l'hématopoïèse permettant le développement des cellules de l'immunité innée et adaptative. D'autre part, l'os est le réservoir des différents minéraux. L'os a aussi un rôle de protection de la moelle osseuse et de l'hématopoïèse. Les différentes cellules du tissu osseux vont permettre une régulation fine de l'hématopoïèse que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

A. Le tissu osseux

Le volume osseux permettant une bonne architecture osseuse est sous le contrôle d'une balance entre la formation osseuse due à l'activité des ostéoblastes et la résorption osseuse due aux ostéoclastes. Le remodelage osseux permet le renouvellement de la totalité du squelette tous les 10 ans. Le tissu osseux est composé de 4 types de cellules ; les ostéoblastes, les cellules bordantes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes vont former l'os alors que les ostéoclastes vont résorber l'os.

Les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes ont une origine mésodermique. La différenciation des cellules mésenchymateuses va donner naissance aux chondrocytes mais aussi aux adipocytes qui vont former le stroma médullaire.

1. *Les cellules mésenchymateuses*

Les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) sont issues de la différenciation du mésoderme embryonnaire. Ces cellules participent à la formation de la corticale de l'os mais aussi au stroma de la moelle osseuse. Les cellules MSCs représentent 0.1 % des cellules de la moelle osseuse et sont à l'origine des ostéoblastes, des chondrocytes et adipocytes qui vont former la structure osseuse (Dmitriev et al 2012). Les cellules MSCs peuvent être isolées à partir d'un nombre réduit de tissus à savoir la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical et le tissu adipeux.

L'ISCT (international society for cellular therapy) a défini une série de critères permettant d'uniformiser la caractérisation des MSCs. Ainsi, les MSCs peuvent adhérer sur les boîtes de

culture, expriment simultanément les marqueurs CD73, CD105 et CD90 et n'expriment pas les marqueurs de lignage CD45, CD34, CD11b, CD19 et HLA-DR. La capacité des MSCs à donner les adipocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes est centrale dans leur caractérisation (Dominici et al 2006). Cependant, ces propriétés ont été définies suite à l'étude *in vitro* des cellules car du fait de leur faible représentation leur étude *in vivo* n'est pas possible. Bien que l'étude *in vitro* soit nécessaire, les MSCs ne sont maintenues que durant un nombre limité de passages. En effet, les études *in vitro* des cellules MSCs ont mis en évidence une dérive de ces cellules, accompagnée de la perte de leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Les MSCs participent à la régulation de la masse osseuse en étant les précurseurs des ostéoblastes, des chondrocytes (à l'origine du cartilage) et des adipocytes. Au cours du temps, il y a une inversion du rapport ostéoblastes/adipocytes en faveur des adipocytes. Ce changement de ratio participe à la perte osseuse observée chez les personnes âgées.

Cependant, malgré des caractéristiques communes, les cellules MSCs possèdent des capacités propres à leur tissu d'origine, ainsi que l'expression différentielle de protéines de surface. Il est ainsi possible de définir différents sous-types de MSCs en fonction de la présence ou absence de récepteurs de surface ou d'intégrines. Ces différentes MSCs interviennent dans la régulation, le maintien et la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). En effet, les MSCs ont été décrites comme participant notamment à la niche des cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse.

Parmi les caractéristiques communément admises pour les MSCs, leur activité immunosuppressive est une des plus importantes. Les MSCs produisent des cytokines inhibitrices de la réponse inflammatoire telles que l'IL-10 ou le TGF β et expriment des cofacteurs inhibiteurs de la différenciation des cellules T CD4+. Ainsi, les molécules CTLA4, centrales dans la régulation de l'activité des cellules T sont exprimées à la surface des cellules mésenchymateuses. Toutes ces propriétés ont conduit à la mise en place d'essais cliniques sur les cellules stromales mésenchymateuses afin d'étudier leur rôle immunosuppressif *in vivo*. Ainsi, lors de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin, les essais cliniques ont montré que ces cellules permettent d'inhiber la mise en place de la maladie ou du moins de freiner son développement. De plus, leurs potentiels d'auto-renouvellement et de multipotence sont des cibles intéressantes dans l'étude de la réparation tissulaire. Ces cellules sont aussi utilisées pour leur capacité immunosuppressive dans l'étude des rejets de greffe dans les cas de réaction du greffon contre l'hôte (Ribeiro et al, 2013). Ces fonctions ont été décrites comme importantes pour la régulation de la niche des HSCs.

De plus, les MSCs expriment à leur surface des molécules de liaison telles que le CD44 et des intégrines qui permettent leur interaction avec les cellules souches hématopoïétiques. Outre leur action sur les cellules hématopoïétiques, les MSCs vont participer à la régulation des cellules T CD4+. En effet, elles vont produire des cytokines nécessaires à leur survie et à leur

maintien dans la moelle osseuse, à savoir de l'IL-7 et de l'IL-15 (Nemoto et al 2012). Bien que de plus en plus de travaux démontrent leur action, le rôle exact des MSCs dans le maintien des cellules T dans la moelle osseuse n'est pas encore déterminé.

2. Les ostéoblastes

Le tissu osseux est sous le contrôle d'une balance entre deux mécanismes, la formation osseuse et la résorption osseuse (Harada et al 2003). La formation osseuse se fait grâce à l'activité des ostéoblastes. Ces cellules vont participer à la formation des deux parties de l'os, à savoir l'os compact et l'os spongieux. L'os compact ou cortical forme 80% du tissu et l'os spongieux ou trabéculaire représente les 20% restant. L'os spongieux est retrouvé au niveau des épiphyses des os longs alors que l'os compact est localisé tout autour de l'os. Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) calcifiée. Cette matrice extracellulaire est un mélange entre une phase organique et minérale. La formation de cette structure minérale est sous le contrôle de l'action des ostéoblastes.

Il est possible de définir deux catégories d'os ; les os plats et les os longs.

Les os plats se forment par ossification endoconjonctive ; mécanisme par lequel la matrice conjonctive est envahie par les cellules stromales mésenchymateuses qui se différencient *in situ* en ostéoblastes qui vont alors former la matrice osseuse. Les ostéoblastes ainsi formés vont minéraliser la matrice et former ainsi une structure solide.

Les os longs quant à eux se forment par ossification endochondrale. L'ossification endochondrale est un mécanisme par lequel la matrice cartilagineuse de l'os va être remplacée par de la matrice osseuse. La première étape de la formation des os longs consiste à former une ébauche cartilagineuse hyaline ayant la forme de l'os, le tout entouré de périchondre. La partie centrale du périchondre se différencie en périoste qui est alors envahit par les cellules MSCs qui se différencient en chondrocytes. Les chondrocytes forment des structures cartilagineuses. Les chondrocytes vont s'hypertrophier, la paroi entre les cellules se rompt et il y a la formation d'une cavité médullaire primitive. La cavité médullaire primitive est envahie par des vaisseaux sanguins. Cette vascularisation est suivie par la différenciation des MSCs en ostéoblastes. Les ostéoblastes vont reformer de l'os le long des travées osseuses résorbées par les ostéoclastes. Les ostéoblastes vont ensuite minéraliser la matrice pour former le tissu osseux rigide. Cette minéralisation va permettre le maintien de l'architecture corticale. En ce qui concerne la minéralisation des zones épiphysaires, deux autres centres de formation se créent et permettent la création de l'os spongieux. Au niveau des os longs, le remodelage osseux est le plus important au niveau de la zone de croissance des os. Au cours de la vie, cette zone de croissance diminue jusqu'à ce que toute la zone cartilagineuse soit minéralisée.

Les deux mécanismes d'ossification sont sous le contrôle des cellules formatrices de l'os que sont les ostéoblastes. On peut distinguer 2 étapes au cours de la différenciation ostéoblastique ; tout d'abord la formation des pré-ostéoblastes à partir des cellules stromales mésenchymateuses puis leur différenciation en ostéoblastes matures. La différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de 2 facteurs de transcriptions ; Runx2 et Osterix.

Runx2 est le facteur de transcription majeur impliqué dans la formation osseuse (Ducy et al 1997). Il appartient à la famille des facteurs de transcription Runt exprimés par les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs). L'expression du marqueur Runx2 est nécessaire et suffisant afin d'induire la différenciation des MSCs en ostéoblastes matures (Yang et al 2002 ; Komori et al 2006). Le facteur Runx2 va agir sur les 2 étapes de la différenciation ostéoblastique. Tout d'abord son expression permet la différenciation des MSC en pré-OBL puis permet la maturation des pré-OBL en ostéoblastes. En effet, les études ont montré la présence de séquence de reconnaissance pour Runx2 sur les promoteurs des gènes d'activité des ostéoblastes tels que le collagène 1, l'ostéopontine et l'ostéocalcine. Bien qu'important pour induire l'expression de ces gènes, ce facteur de transcription n'est pas nécessaire au maintien du phénotype ostéoblastique. En effet, lors de la maturation des ostéoblastes on observe une diminution de l'expression du facteur Runx2 (Maruyama et al 2007).

Afin de finir leur différenciation en ostéoblastes matures, les pré-ostéoblastes vont exprimer le facteur de transcription osterix. Osterix ou SP7 est un facteur de transcription spécifique à la différenciation ostéoblastique. Les travaux de Nakashima et al (2002) ont montré que l'absence d'osterix chez la souris induisait une absence de différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et la présence d'un squelette cartilagineux chez les animaux. Le facteur de transcription osterix est exprimé sous le contrôle du facteur Runx2 (Yoshida et al 2012). En effet, l'absence d'osterix ne modifie pas les taux d'expression de Runx2 chez la souris alors que l'absence de Runx2 induit une absence de l'expression d'osterix. Le facteur de transcription osterix induit l'expression des différentes protéines nécessaires à la formation de la matrice osseuse. En effet, l'expression d'osterix va permettre la production des protéines impliquées dans la formation osseuse à savoir le collagène I, la phosphatase alcaline et la sialoprotéine osseuse.

L'expression des deux facteurs de transcription, Runx2 et osterix, est sous le contrôle de différentes hormones (stéroïdiennes et parathyroïdiennes), de facteurs de différenciation comme les Bone Morphogenic Protein (BMP) et de vitamines (vitamine D). L'étude du facteur Runx2 a mis en avant le rôle central de l'hormone parathyroïdienne (PTH) dans la régulation de ce facteur. Cette hormone va induire une phosphorylation de Runx2 permettant ainsi sa translocation dans le noyau et donc son activité de facteur de transcription. De plus, la PTH va inhiber la dégradation de Runx2 par le protéasome

(Krishnan et al 2003 ; Bellido et al 2003 ; Wang et al 2007) et permettre le maintien de l'activité de Runx2.

Les BMPs appartiennent à la superfamille des Transforming Growth Factor (TGF). Ils sont piégés dans la matrice extracellulaire lors de la formation osseuse et sont libérés lors de la résorption osseuse. Chez l'homme, il existe plus de 20 homodimères ou hétérodimères de ligands des BMPs. Ces BMPs peuvent se subdiviser en 4 familles en fonction de leur homologie de séquence, leur structure et leur fonction. Ainsi, les BMP2, 4 et 7 sont les protéines impliquées dans la régulation du remodelage osseux (Cheng et al 2003). Le BMP2 agit au niveau des cellules mésenchymateuses et induit leur différenciation vers la voie ostéoblastique. Au niveau des cellules pré-ostéoblastiques ce facteur permet la différenciation des cellules en ostéoblastes en induisant l'expression des facteurs de transcription Runx2 et Osterix.

Lors de la formation osseuse, les ostéoblastes vont avoir une double action. Ils permettent la formation de la matrice extra-cellulaire et sa minéralisation osseuse au cours de la croissance. Le tissu osseux, de par sa minéralisation, va permettre le maintien de la force du squelette. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les ostéoblastes vont sécréter du collagène et des protéoglycans qui participent à la formation de la matrice extracellulaire. La minéralisation de la matrice osseuse se fait grâce à des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite sur le collagène de la matrice. Lors de ce phénomène, les ostéoblastes expriment la phosphatase alcaline qui clive les organophosphates de la matrice. La phosphatase alcaline est exprimée au niveau de la membrane des cellules mais est aussi sécrétée dans l'environnement ce qui va permettre une augmentation de l'activité de formation osseuse des ostéoblastes. Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline est un marqueur de l'activité ostéoblastique. L'os constitue ainsi le réservoir des minéraux nécessaires au bon fonctionnement du corps ainsi que des différents facteurs de croissance (Zhang et al 2003 ; Calvi et al 2003). L'action de remodelage osseux va notamment intervenir dans la régulation de l'homéostasie calcique.

Outre leur rôle dans la formation osseuse, les ostéoblastes participent à la régulation du remodelage osseux. En effet, les ostéoblastes régulent la différenciation des cellules responsables de la résorption osseuse ; les ostéoclastes. Ainsi, les ostéoblastes vont produire des facteurs solubles induisant (MCSF, RANKL) ou réprimant (ostéoprogérine) la différenciation des ostéoclastes (Takahashi et al 1988). Afin d'induire la résorption osseuse, les ostéoblastes vont produire du RANK-L (Receptor Activator for Nuclear Factor k B Ligand) et de Macrophage Colony-stimulating Factor (MCSF) provoquant la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes. Lorsqu'il faut réprimer l'ostéoclastogénèse, les ostéoblastes vont produire une autre cytokine ; de l'ostéoprogérine (OPG) (Lacey et al 1998) décrite comme inhibitrice de la formation des ostéoclastes.

3. *Les ostéocytes*

Les ostéocytes proviennent de la différenciation des ostéoblastes. Lorsque les ostéoblastes s'entourent de matrice osseuse et qu'ils restent bloquer dans la matrice, ils sont considérés comme des ostéocytes. Au sein du tissu osseux, les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes. Ces cellules possèdent de nombreux canaux ioniques, des intégrines et des adhésions cellulaires permettant de répondre aux signaux extérieurs et participent ainsi à la régulation du remodelage osseux (Bonewald et al 2011). Les ostéocytes sont les seules cellules responsables de la mécanotransduction au sein de l'os. En réponse aux signaux mécaniques, les ostéocytes se déforment. Ainsi, les études ont montré que dans les cas de perte osseuse importante, les ostéocytes vont acquérir une forme allongée alors que dans les os de densité normale, ils ont une forme arrondie. Les changements de formes de ces cellules et donc de leur interaction avec la matrice osseuse conduisent ces cellules à produire différentes molécules régulatrices telles que le RANKL et MCSF. Parmi les signaux mécaniques responsables de la régulation osseuse, la gravité est un des signaux les plus importants. Ces signaux vont permettre le maintien de l'architecture osseuse, un remodelage osseux coordonné en fonction des besoins de l'organisme.

Ces cellules sont les principales régulatrices de la masse osseuse en produisant de fortes quantités de RANKL. L'absence de production de RANK-L par les ostéocytes va induire une ostéopérose chez la souris démontrant ainsi leur rôle dans le remodelage osseux (Nakashima et al 2011). Les cytokines inflammatoires vont modifier les niveaux de NO et calcium ce qui va induire des changements conformationnels des ostéocytes. Ces cellules perdent leur capacité de rétrocontrôle et ne peuvent plus produire les cytokines nécessaires à l'inhibition de la résorption osseuse, à savoir l'ostéoprogérine. Les ostéocytes sont les cellules les plus importantes dans la régulation du remodelage osseux notamment dans le cas de maladies telles que l'ostéoporose. L'ostéoporose est associée à une perte de la régulation osseuse par les ostéocytes du fait de la diminution de leur interaction avec la matrice osseuse et les cellules du remodelage osseux (ostéoblastes et ostéoclastes) (Mullender et al 1997). De plus, la diminution des œstrogènes, observée lors de l'ostéoporose, peut être associée à une augmentation de l'apoptose des ostéocytes (Aguirre et al 2006). Les ostéocytes ne pouvant plus activer pour les ostéoblastes, une augmentation de l'activité des ostéoclastes apparaît participant ainsi à une augmentation de la perte osseuse.

4. *Les adipocytes*

Le tissu osseux sert de protection pour le stroma de l'os. Le stroma est le centre de l'hématopoïèse. Bien que les cellules mésenchymateuses aient un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse, les cellules adipocytaires sont les cellules les plus abondantes dans l'os. En effet, le tissu adipeux de la moelle osseuse (MAT) représente environ 70% du

volume de la moelle osseuse des os longs chez l'homme et 10% de la masse totale grasse d'un individu adulte (Fazeli et al 2012).

Les cellules adipocytaires présentes dans la moelle osseuse proviennent de la différenciation de progéniteurs mésenchymateux. Les cellules MSCs se différencient en cellules pré-adipocytes qui donneront ensuite les adipocytes matures. La différenciation adipocytaire est sous le contrôle du facteur de transcription PPAR γ . De façon intéressante, les études ont montré que les différenciations ostéoblastiques et adipocytaires se réprimaient l'une l'autre. Ainsi, l'expression de PPAR γ par les cellules mésenchymateuses va induire la différenciation adipocytaire et réprimer la différenciation ostéoblastique.

Il est possible de distinguer 2 tissus adipeux ; le tissu adipeux constitutif (cMAT) localisé dans la partie distale de l'os et qui confère à l'os sa couleur jaune et le tissu adipeux régulateur (rMAT) qui sert de support à l'hématopoïèse et qui est retrouvé au sein de la pulpe rouge de l'os (Scheller et al 2015). De façon intéressante, il a été observé que le cMAT et le rMAT ont des propriétés intrinsèques différentes. Ainsi, le cMAT est décrit comme ayant une structure et des propriétés proches de celles du tissu adipeux blanc (WAT). Le cMAT est composé d'adipocytes de grandes tailles, uni loculés alors que le rMAT contient des adipocytes uni loculés de taille plus réduite (Fazeli et al 2012).

Le tissu adipeux blanc est un organe endocrine majeur. Le tissu adipeux de la moelle osseuse est nécessaire au métabolisme de l'insuline et du glucose (Scheller et al 2015). Les études ont montré que le tissu adipeux de la moelle osseuse est la source majeure d'adiponectine participant à la régulation du métabolisme du glucose et aussi de la masse grasseuse. Les travaux de Cawthorn et al (2014) ont montré que des phénomènes de restriction calorique sont associés à une augmentation de la sécrétion hormonale par les cellules du tissu adipeux médullaire. De plus, l'adiponectine va aussi participer à l'insulino-résistance observée chez les personnes diabétiques.

Les études ont montré qu'il y a une balance entre la formation osseuse et adipocytaire. Au cours du temps, une fragilité osseuse est observée et associée à une augmentation du risque de développer des fractures. Au cours des maladies inflammatoires, les observations cliniques ont montré une augmentation de la perte osseuse ainsi que de la masse adipocytaire.

Au sein de la moelle osseuse, les adipocytes ont une localisation commune avec les cellules souches hématopoïétiques. Des travaux d'Adler et al (2015) ont montré qu'une augmentation des adipocytes induit la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques.

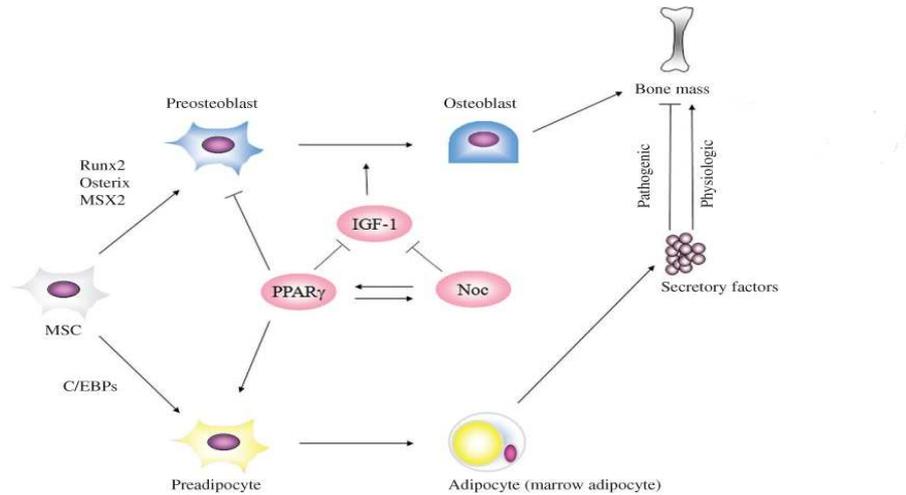


Figure 6: Différenciation ostéoblastique et adipocytaire

La différenciation des cellules stromales mésenchymateuses permet la formation des ostéoblastes et des adipocytes dans la moelle osseuse. La différenciation ostéoblastique est dépendante de l'expression des facteurs de transcription Runx2 et osterix. La différenciation adipocytaire dépend de l'expression de PPAR γ . L'expression de PPAR γ par les cellules MSCs bloque la différenciation des cellules vers la voie ostéoblastique en inhibant l'expression des facteurs Runx2/osterix et IGF-1 (d'après Kawai et al 2013).

5. Les ostéoclastes

a) Origines des ostéoclastes

La résorption osseuse est permise grâce à l'activité des ostéoclastes. Les ostéoclastes (OCL) sont des cellules géantes, multinucléées (plus de 3 noyaux) issues de la fusion de progéniteurs hématopoïétiques.

Les ostéoclastes ont tout d'abord été décrits comme provenant de la fusion des monocytes. Les monocytes sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Il a été décrit différents types de monocytes grâce à l'expression de marqueurs membranaires. Ainsi, les travaux de Passlick et al (1989) ont caractérisé chez l'Homme la présence de deux populations de monocytes. Il est possible de distinguer ces deux populations grâce à l'expression des marqueurs membranaires CD14 et CD16. Ainsi, il existe des monocytes résidents (CD14^{hi} CD16⁻) et des monocytes inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) qui sont recrutés lors des réponses inflammatoires. Chez la souris, les populations monocytaires se différencient grâce à l'expression des récepteurs aux chimiokines présents à leur surface (CCR2, CX3CR1) (Geissman et al 2003). Ainsi, les cellules CCR2⁺ migrent au niveau des sites inflammatoires en présence de leur ligand MCP1. Les différentes cellules monocytaires sont capables de se différencier en ostéoclastes en présence de MCSF et de RANKL (Boyle et al 2003).

En présence de GM-CSF et d'IL-4, les monocytes sont capables de se différencier en cellules dendritiques *in vitro* (Geissman et al 2003). Les cellules dendritiques ont été décrites dans travaux de Rivollier et al (2004) comme des précurseurs des ostéoclastes, *in vitro*. En effet, cette étude a montré qu'en présence des cytokines inflammatoires ou encore de RANKL/MCSF les cellules dendritiques peuvent donner des ostéoclastes. En conditions inflammatoires, les cellules dendritiques sont à l'origine des ostéoclastes (Alnaeeli et al 2006). Les travaux de mon équipe ont démontré que le transfert de cellules dendritiques chez des souris ostéopérotiques permettait de restaurer la résorption osseuse grâce à la différenciation *in vivo* des cellules dendritiques en ostéoclastes. Cette différenciation est possible en présence de fortes concentrations de RANKL dans la moelle osseuse et la présence de lymphocytes T CD4⁺ (Wakkach et al 2008).

b) Fonctions et formation des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules capables de résorber la matrice osseuse. Ils expriment des marqueurs spécifiques ; à savoir le récepteur à la calcitonine (CTR), la cathepsine K, l'intégrine α V β 3 ainsi que le marqueur TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) (Boyle et al 2003). Afin d'effectuer leur action de résorption, les ostéoclastes

migrent le long de la surface osseuse avant de s'ancrer à la matrice osseuse. Au niveau de la zone à résorber, il y a un remodelage du cytosquelette de l'ostéoclaste avec la formation d'une zone de scellement hermétique formée d'un anneau d'actine. L'interaction entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse se fait grâce à des intégrines qui contiennent dans leur portion extracellulaire des domaines de reconnaissance spécifiques composés des acides aminés RGD (Arginine-glycine-aspartate). L'activité de ces protéines est dépendante de l'activité calcique (Ruoslahti et al 1987). L'ostéopontine, le collagène I et la sialoprotéine osseuse contiennent des motifs de reconnaissance aux domaines RGD et servent de protéines d'ancrage aux ostéoclastes à la surface de l'os (Horton et al 1989). Cette liaison va induire une polarisation de la cellule et la formation d'une lacune de résorption au niveau de laquelle les ostéoclastes vont dégrader l'os. La résorption osseuse se fait grâce à l'expression au niveau de la membrane de la cellule d'une H⁺-vATPase qui va acidifier la lacune de résorption. L'acidification de l'environnement va induire une activation des enzymes de dégradation que sont la cathepsine K et la TRAP (Li et al 1999 ; Zhao et al 2007). Cette résorption osseuse va permettre la libération des facteurs de croissance ainsi que des minéraux piégés dans la matrice et nécessaires à l'homéostasie osseuse. Cette résorption va notamment libérer du TGFβ et des BMPs qui vont induire un recrutement des ostéoblastes et leur activation afin de reformer de la matrice osseuse.

La différenciation des ostéoclastes est sous le contrôle de facteurs solubles sécrétés par les cellules de la moelle osseuse et notamment les ostéoblastes. En effet, que ce soit dans des conditions physiologiques ou inflammatoires, les ostéoblastes vont sécréter du MCSF et du RANK-L induisant l'ostéoclastogénèse.

Le MCSF permet la survie et la prolifération des macrophages et monocytes dans la moelle osseuse. Cette cytokine est produite par les ostéoblastes et les ostéocytes et se lie à son récepteur présent sur la membrane des précurseurs des ostéoclastes. La liaison du MCSF à son récepteur va permettre l'expression du récepteur RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes permettant ainsi la formation des ostéoclastes. Les souris déficientes en cette cytokine ou son récepteur, présentent une ostéopétrose importante du fait de l'absence de monocytes (Dai et al 2002).

Le RANK-L est une protéine qui existe sous deux formes ; transmembranaire ou sécrétée. Cette protéine appartient à la super famille du TNF et permet la fusion des précurseurs des ostéoclastes. Le RANK-L sécrété va se lier à son récepteur RANK présent sur la membrane des monocytes. La reconnaissance du complexe RANK-L/RANK va induire une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de facteur de transcription notamment de la voie de signalisation NFκB et du facteur de transcription NFATc1. Ce facteur de transcription permet l'expression des protéines nécessaires à l'activité des ostéoclastes telles que la cathepsine K ou encore le MMP9. Le RANKL est une cytokine nécessaire à la formation des ostéoclastes. En effet, les études ont montré que l'ablation des gènes codant pour les protéines RANK ou de RANKL chez la souris s'accompagne d'une ostéopétrose de la souris due à une absence de

différenciation ostéoclastique (Kong et al 1999). De plus, la cytokine RANKL participe à la survie des cellules dendritiques in vitro et in vivo (Walsh et al 2003 ; Wakkach et al 2008). La cytokine RANK-L est produite par les ostéoblastes, les cellules lymphoïdes mais aussi par les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse qui participent ainsi à l'ostéoclastogénèse.

La résorption osseuse est soumise à un contrôle hormonal mais aussi par des facteurs circulants tels que les cytokines. Les cytokines inflammatoires vont notamment induire une augmentation de la quantité de RANK-L et donc une augmentation de l'activité ostéoclastique (Rivollier et al 2004). De façon intéressante, la vitamine D et les hormones parathyroïdiennes sont centrales dans la régulation du métabolisme calcique. L'activité des ostéoclastes va permettre la régulation de cette homéostasie. Lorsque les taux de calcium sont faibles, la PTH va induire une augmentation de la résorption osseuse, s'accompagnant d'une augmentation de la réabsorption intestinale et une diminution de l'excrétion rénale. Cela va induire une augmentation des taux calciques. Ainsi, lorsque les taux de calcium sériques deviennent trop importants un mécanisme opposé, faisant intervenir la calcitonine (hormone thyroïdienne) va induire une augmentation de l'activité des ostéoblastes et un feedback de l'activité rénale et intestinale. Cette régulation calcique permet d'illustrer le rôle central de l'homéostasie osseuse.

Il est important de savoir qu'il existe aussi des mécanismes de rétrocontrôle afin de limiter la différenciation des ostéoclastes. Afin d'inhiber la formation des ostéoclastes, les ostéoblastes produisent une protéine soluble ayant une structure analogue à celle du récepteur au RANK-L, l'ostéoprogérine (Simonet et al 1997). L'ostéoprogérine va se lier au RANKL à la surface des ostéoblastes et ainsi empêcher la liaison avec le récepteur RANK. La présence d'OPG va inhiber la formation des ostéoclastes mais aussi en inhibant leur fonction de résorption osseuse. Cette protéine est un inhibiteur naturel de l'activité des ostéoclastes. Les souris déficientes en ostéoprogérine présentent ainsi une ostéoporose importante (Stolina et al 2009). Ces résultats montrent que le nombre et l'activité des ostéoclastes dépendent du rapport RANK-L/OPG. Un rapport favorable pour le RANK-L va induire une augmentation du nombre d'ostéoclastes.

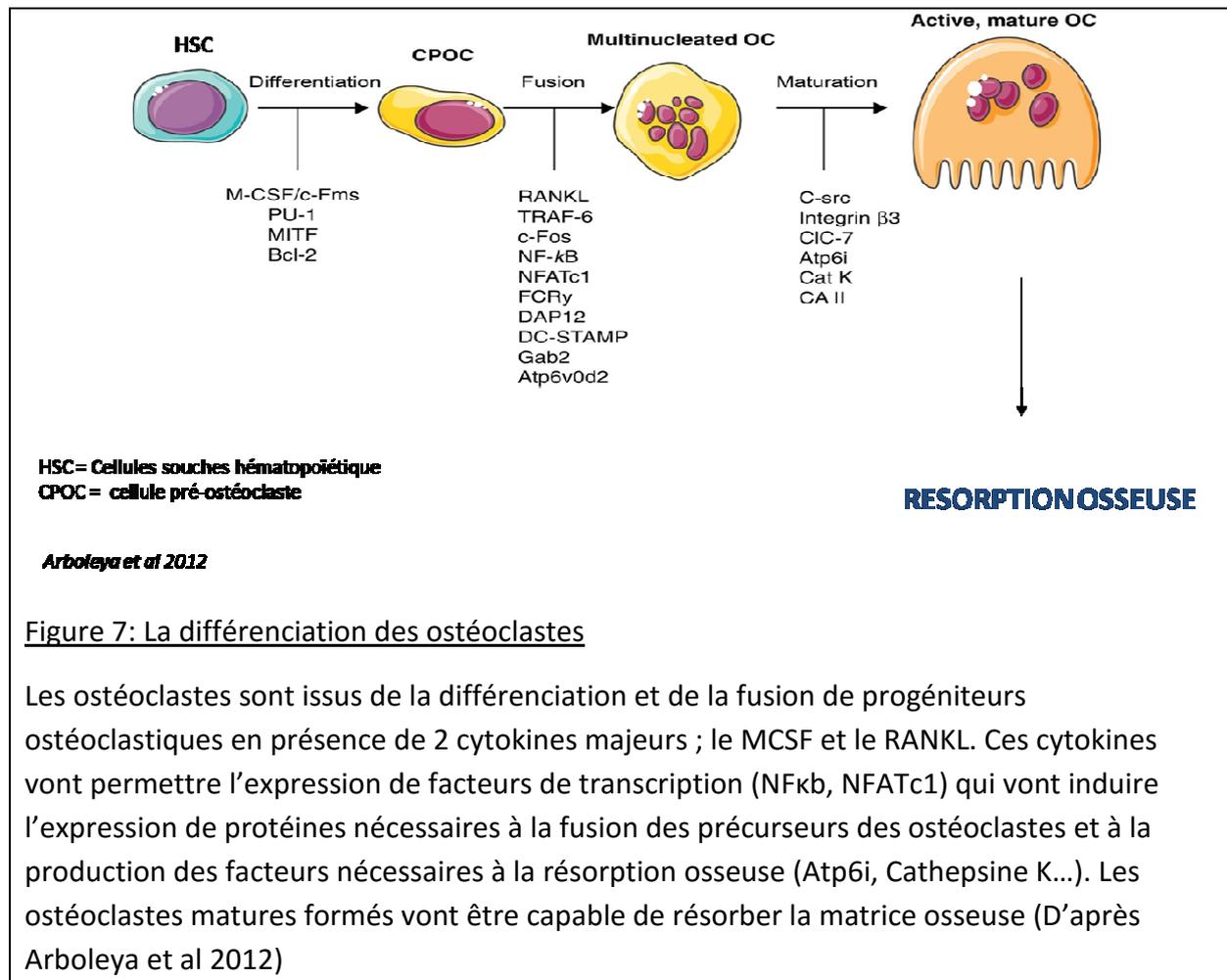


Figure 7: La différenciation des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont issus de la différenciation et de la fusion de progéniteurs ostéoclastiques en présence de 2 cytokines majeurs ; le MCSF et le RANKL. Ces cytokines vont permettre l'expression de facteurs de transcription (NFκb, NFATc1) qui vont induire l'expression de protéines nécessaires à la fusion des précurseurs des ostéoclastes et à la production des facteurs nécessaires à la résorption osseuse (Atp6i, Cathepsine K...). Les ostéoclastes matures formés vont être capable de résorber la matrice osseuse (D'après Arboleya et al 2012)

c) Les différents ostéoclastes

Outre leur fonction de résorption osseuse, les ostéoclastes ont aussi été décrits comme des cellules présentatrices d'antigènes (Wu et al 2008). En effet, les ostéoclastes expriment à leur surface les complexes majeurs d'histocompatibilité ainsi que les molécules de co-stimulation de la famille B7 permettant l'activation des cellules CD4+ et CD8+ (Ibàñez et al 2016). De plus, les travaux de Grassi et al (2011) ont montré que les ostéoclastes ont la capacité de bloquer la différenciation des cellules T CD8+ *in vitro*. Ainsi, nous avons pu montrer que dans un contexte inflammatoire tel que la maladie inflammatoire de l'intestin, les ostéoclastes induisent la différenciation des cellules T en cellules inflammatoires (Ibàñez et al 2016). Dans un contexte non inflammatoire, les ostéoclastes induisent la différenciation des cellules T CD4+ et CD8+ en cellules régulatrices, FoxP3+ (Kiesel et al 2009 ; Ibàñez et al 2016). Ces travaux ont permis de mettre en avant le rôle des ostéoclastes en tant que cellules présentatrices d'antigènes. L'inflammation associant un changement dans l'origine des ostéoclastes, nous avons étudié la capacité des ostéoclastes provenant des monocytes ou des cellules dendritiques dans la différenciation des cellules T. De plus, nous avons pu

montrer que les ostéoclastes inflammatoires expriment le marqueur CX3CR1 in vitro et in vivo. In vivo, nous avons montré que les ostéoclastes CX3CR1 sont retrouvés au niveau du site inflammatoire et participeraient à la perte osseuse pathologique. Le rôle de ce marqueur dans la différenciation des ostéoclastes ou dans leur action pro-inflammatoires est toujours en cours d'étude et reste encore à déterminer.

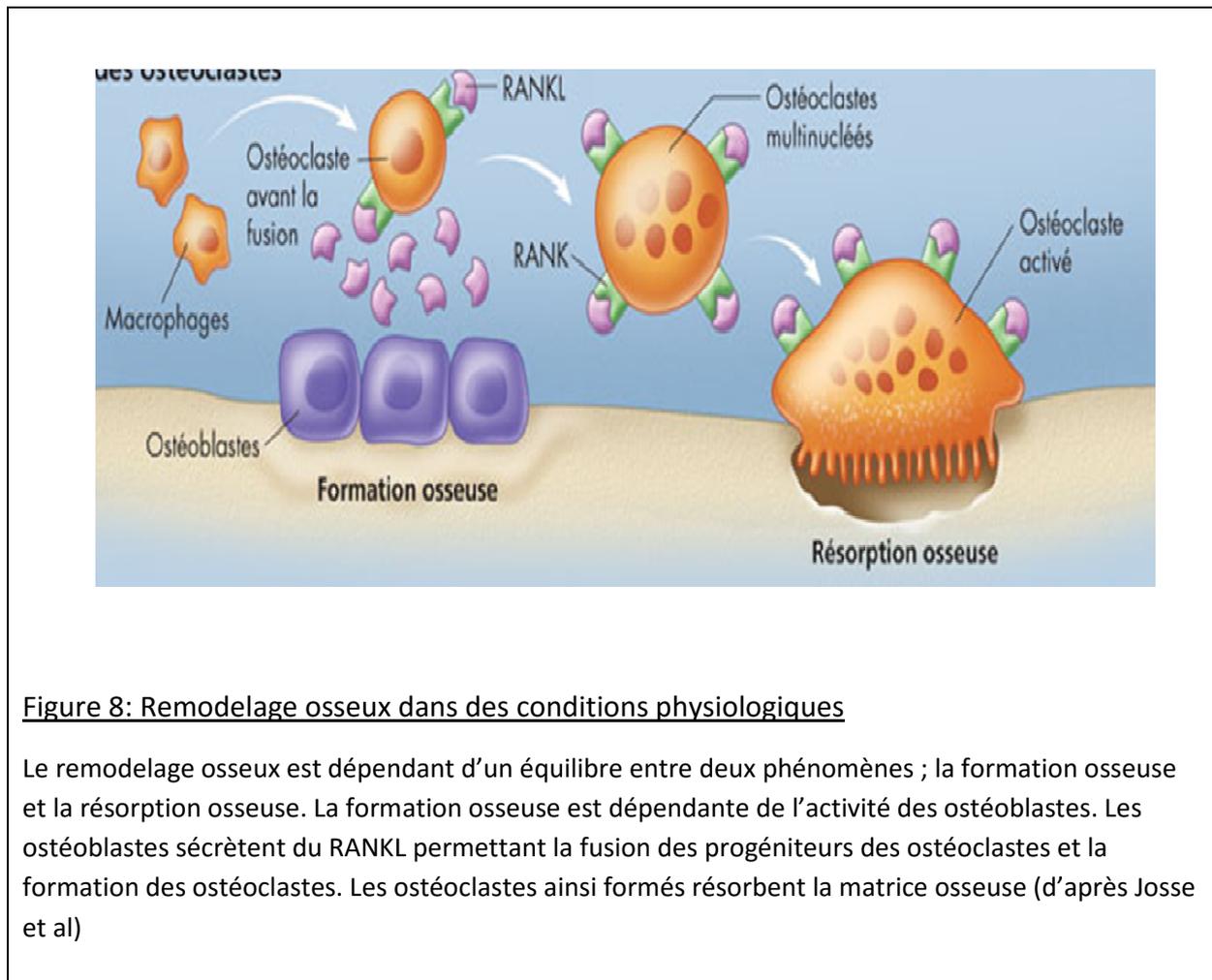


Figure 8: Remodelage osseux dans des conditions physiologiques

Le remodelage osseux est dépendant d'un équilibre entre deux phénomènes ; la formation osseuse et la résorption osseuse. La formation osseuse est dépendante de l'activité des ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent du RANKL permettant la fusion des progéniteurs des ostéoclastes et la formation des ostéoclastes. Les ostéoclastes ainsi formés résorbent la matrice osseuse (d'après Josse et al)

6. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines présentes dans l'organisme. Ainsi, ces cellules participent à la régulation de l'immunité en étant à l'origine des cellules myéloïdes et lymphoïdes.

Chez la souris, les cellules souches hématopoïétiques apparaissent dès le jour 7.5 de développement dans le sac vitellin. Ces cellules vont former l'hématopoïèse dite primitive qui va donner naissance aux macrophages, mégacaryocytes et les cellules érythroïdes

primitives. Ce n'est seulement qu'au jour 8/9 qu'il y a apparition des premières cellules hématopoïétiques dans le sac vitellin et l'apparition de l'hématopoïèse dite définitive (Aguila et al 2005). Cette hématopoïèse définitive est associée à la production des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les cellules hématopoïétiques vont ensuite migrer dans la région formant l'aorte/les gonades/ le mésonéphros ou aorte dorsale. Durant la vie embryonnaire, les cellules souches hématopoïétiques vont coloniser le foie fœtal où elles resteront jusqu'à ce que des cavités médullaires apparaissent dans la moelle osseuse. En effet, l'absence de remodelage osseux et de cavités médullaires va empêcher la colonisation de la moelle par les cellules souches hématopoïétiques conduisant à des défauts de l'hématopoïèse (Blin-Wakkach et al 2012).

La génération de cellules souches hématopoïétiques est sous le contrôle de l'expression du facteur de transcription Runx1 (Wang et al 2006). L'absence du facteur Runx1, durant l'embryogénèse, conduit à une létalité de l'animal du fait de l'absence d'hématopoïèse définitive et une hémorragie dans le système nerveux central des animaux. Runx1 est un facteur de transcription appartenant à la famille Runt tout comme Runx2, important pour le développement ostéoblastique. Runx1 se fixe sur des séquences consensus présentes sur les promoteurs des gènes du récepteur au MCSF et GMCSF, important dans le développement de l'hématopoïèse (Zhang et al 1994 ; Takahashi et al 1995). L'expression de Runx1 n'est pas continue au cours du développement hématopoïétique. Au début du développement, il va permettre l'induction de la différenciation vers la voie hématopoïétique au détriment de la voie endothéliale. Chez l'adulte, l'expression de ce facteur induit la sortie de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques, une prolifération et leur différenciation vers la voie myéloïde.

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules pluripotentes, précurseurs des différentes cellules sanguines et capables d'auto-renouvellement. Ces cellules sont caractérisées par une combinaison de marqueurs à savoir, une absence des marqueurs de lignage (Ter119, B220, CD3, CD48, Gr1) mais expriment les marqueurs Sca1 et cKit (récepteur au stem cell factor), CD34+, CD150+, CD48- (SLAM). Les cellules souches hématopoïétiques forment une population rare dans la moelle osseuse mais sont enrichies de la population Lin- Sca1+ cKit+. Les cellules LSK représentent 0.5% des cellules de la moelle osseuse mais sont les cellules centrales dans l'hématopoïèse. Une dérégulation dans les proportions des cellules HSCs dans la moelle osseuse est synonyme de dérèglement du système hématopoïétique.

Ces cellules souches hématopoïétiques permettent grâce à leur seule action un remplacement de l'intégralité du système hématopoïétique lorsqu'elles sont transférées chez un individu irradié, comme dans le cas des transferts de moelle osseuse. Cependant, ces cellules forment un groupe hétérogène composé de cellules ayant une importante capacité d'auto-renouvellement (LT-HSC) et d'autres dont la capacité est plus restreinte (ST-HSC) (Wilson et al 2006). De plus, au sein de la moelle osseuse, 60% des cellules HSC sont

maintenues dans un état quiescent, protégé des signaux extérieurs. En cas de réponse immunitaire avec une nécessité de produire des cellules du système inflammatoire, les HSCs vont recevoir des signaux activateurs induisant la différenciation des cellules. Les cellules HSCs portent, à leur surface, différents récepteurs aux cytokines qui vont permettre le contrôle de cette réponse. Ainsi, l'IFN γ va permettre l'activation des cellules et leur différenciation en cellules myéloïdes (Griseri et al 2012). De plus, le TNF α va inhiber l'activité des cellules souches hématopoïétiques via les récepteurs TNFR1 et 2 présents à leur surface (Pronk et al 2011).

Outre les cytokines, les cellules souches hématopoïétiques sont sensibles à l'action de différentes chimiokines. Tout d'abord, afin de migrer dans la moelle osseuse, les HSCs expriment le récepteur CXCR4. L'interaction de ce récepteur avec son ligand CXCL12 (SDF1) induit le recrutement et la rétention des cellules dans la moelle osseuse. CXCL12 est produit par les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les cellules mésenchymateuses. Cette chimiokine régule l'adhésion, la survie et la quiescence des cellules dans la moelle osseuse. L'inflammation est associée à une augmentation des taux de CXCL12 sérique et une mobilisation des HSCs. Cette chimiokine est centrale dans la régulation des HSCs (Fukuda et al 2002).

Le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse se fait grâce à leur interaction avec les cellules stromales mésenchymateuses. Le couple VLA4/VCAM a été décrit comme participant à cette rétention. VLA4 (Very late antigen 1 ou intégrine $\alpha 4\alpha 1$) est présente sur la majorité des cellules hématopoïétiques. Son interaction avec l'intégrine VCAM1 présente sur certains types de cellules mésenchymateuses va permettre la rétention des cellules dans la moelle osseuse. Les études ont montré que l'absence de cette interaction par l'injection anti-VLA4 ou anti-VCAM se traduit par une diminution de la migration des cellules dans la moelle osseuse ainsi que de leur maintien (Frenette et al 1998 ; Vermeulen et al 1998).

Bien que maintenu à un état quiescent, les signaux de danger tels que les signaux inflammatoires induisent une prolifération des cellules souches hématopoïétiques et leur différenciation vers les voies myéloïdes et lymphoïdes. Ces signaux inflammatoires peuvent être de nature chimique tel que la présence ou l'absence de cytokines ou chimiokines. Les cytokines inflammatoires telles que le TNF α vont induire une activation des cellules hématopoïétiques et leur différenciation en cellules lymphoïdes. De plus, Les signaux de stress vont induire la mise en place d'une hématopoïèse d'urgence se traduisant par une mobilisation et différenciation des cellules. Lors de ce phénomène, les signaux β -adrénergique vont induire une diminution de la sécrétion de CXCL12 par les cellules stromales, permettant la mise en place d'un gradient de chimiokines en faveur de la circulation sanguine (Mendez-Ferrer et al 2010). Tous ces mécanismes mettent en avant le rôle des cellules mésenchymateuses et de l'environnement médullaire en général dans l'organisation et le contrôle des cellules souches hématopoïétiques.

B. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse définit l'ensemble des mécanismes mis en place afin de produire les cellules sanguines. Au cours du développement, il existe deux types d'hématopoïèse ; la primitive et la définitive. L'hématopoïèse primitive va permettre de donner les macrophages et les cellules précurseurs des cellules hématopoïétiques et endothéliales. L'hématopoïèse définitive va quant à elle permettre de donner naissance à l'ensemble des cellules sanguines matures.

L'hématopoïèse est contrôlée par une balance de signaux mécaniques, cellulaire et solubles. Les premières étapes de l'hématopoïèse consistent à diriger la différenciation vers la voie lymphoïde ou myéloïde.

1. *La différenciation lymphoïde*

La différenciation lymphoïde va permettre la production des cellules T, B et NK. L'expression du récepteur de l'IL-7 par les cellules souches hématopoïétiques va permettre de définir les Common Lymphoid Progenitor (CLP) qui seront à l'origine des cellules lymphoïdes. Ce récepteur n'est cependant pas suffisant pour définir la population de CLP dans la moelle osseuse. Ainsi, l'expression de la fms-like tyrosine kinase 3 (flt3), récepteur à activité tyrosine kinase, et son interaction avec son ligand (flt3-L) est apparue comme nécessaire pour induire la différenciation des HSCs vers la voie lymphoïde au détriment de la voie myéloïde (Sitnicka et al 2002). En effet, les souris déficientes en Flt3 présentent une diminution du nombre de CLP et de progéniteurs B (McKenna et al, 2000). Flt3L est produit par les cellules stromales de la moelle osseuse. Une fois orientée vers la différenciation lymphoïde, les cellules vont pouvoir se différencier en cellules B, T ou NK. Outre des facteurs solubles, il est apparu rapidement que des désordres dans l'organisation de la moelle osseuse sont associés à une perte de la lymphopoïèse. Ainsi, l'absence de collagène X important dans l'ossification endochondrale est associée à une perte de la lymphopoïèse T et B (Sweeney et al 2008). La lymphopoïèse B est sous le contrôle du facteur Pax-5. Ce facteur de transcription va induire l'expression du marqueur CD19 et inhiber la différenciation des cellules vers la voie lymphoïde T. Les cellules progéniteurs B vont ensuite finir leur maturation dans la moelle osseuse afin d'aboutir à la production de cellules B matures. La voie de différenciation T est quant à elle sous le contrôle de la voie de signalisation Notch. Cette signalisation va inhiber l'expression du facteur de transcription Runx1, nécessaire pour le maintien du profil T (Wang et al 2006). L'inhibition de ce facteur de transcription permet la différenciation des cellules en progéniteurs T. Ces cellules vont ensuite migrer dans le thymus afin de finir leur maturation.

La différenciation des cellules lymphoïdes T et B se fait à proximité de l'os, dans la région dite endostéale. L'absence de production de CXCL12 par les ostéoblastes induit une diminution du nombre de progéniteurs lymphoïdes dans la moelle osseuse (Ding et al 2013). Ces travaux démontrent une répartition spatiale de la différenciation des cellules lymphoïdes et myéloïdes dans la moelle osseuse. La chimiokine CXCL12 joue un rôle dans cette différenciation, soit directement, soit en permettant le maintien des cellules progénitrices dans la moelle osseuse.

2. *La différenciation myéloïde*

Les cellules myéloïdes sont les cellules les plus abondantes dans la moelle osseuse. La différenciation myéloïde est sous le contrôle de GM-CSF et de MCSF. La présence de ces cytokines va permettre d'orienter les MP en CMP (Common myeloid progenitor). Les CMP vont se différencier en différents précurseurs pour donner naissance aux cellules du système sanguin. Les CMP se différencieront en (Granulocyte/Macrophage Progenitor) GMP ou Megakaryocyte–erythroid progenitor cell (MEP) (Kondo et al 2010 ; Akashi et al 2000). Cette deuxième phase de différenciation fait intervenir d'autres cytokines telles que le TNF α et le TGF β .

Les cellules productrices de CXCL12 semblent importantes pour la différenciation des cellules myéloïde. En effet, l'inhibition de la sécrétion de CXCL12 par les cellules mésenchymateuses induit une diminution de la différenciation myéloïde (Morrison et Scadden 2014). Au contraire de la différenciation lymphoïde qui semble avoir une localisation proche de la corticale de l'os, la différenciation myéloïde n'a pas été décrite comme ayant une localisation précise. Une fois différenciées, les cellules myéloïdes migrent dans l'ensemble de l'organisme afin de participer à la défense immunitaire.

Parmi les cellules myéloïdes produites, les neutrophiles et les monocytes sont présentes en majorité dans la moelle osseuse. En effet, ces cellules représentent plus de 50% des cellules myéloïdes et sont maintenues grâce à la présence du récepteur CXCR4 à leurs membranes. Les études ont montré que les états inflammatoires induisent une dérégulation de l'hématopoïèse en favorisant la différenciation vers un profil myéloïde. En effet, la présence de TNF α , d'IFN γ vont induire une augmentation de la myélopoïèse (Griseri et al 2013).

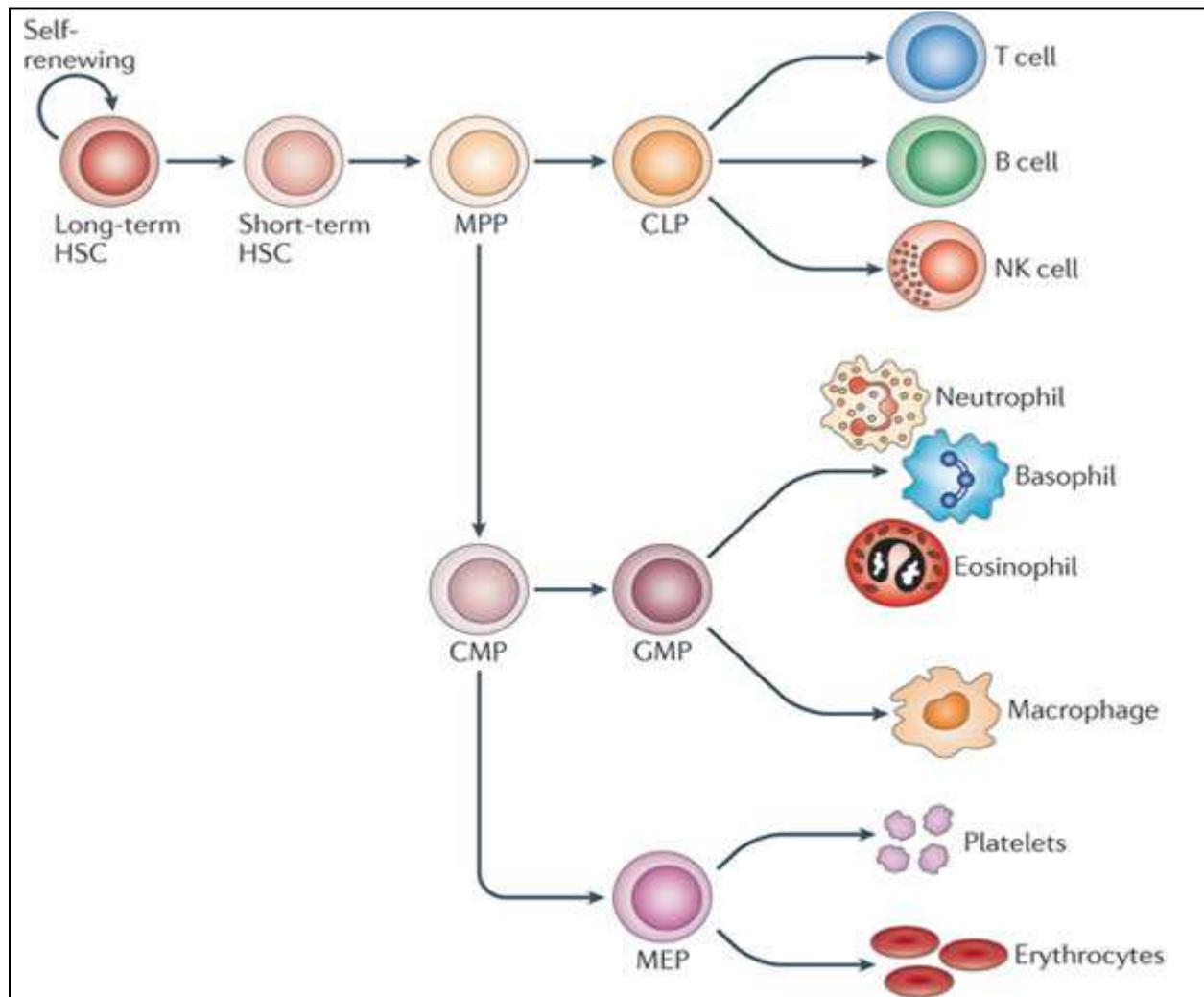


Figure 9: Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus par lequel l'organisme va pouvoir renouveler l'ensemble des cellules sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques vont se différencier en cellules progéniteurs commune pour les voies myéloïdes et lymphoïdes (MPP). Ces progéniteurs se différencient précurseurs des voies myéloïdes (CMP) ou lymphoïdes (CLP). Les CMP se différencient dans toutes les cellules de la voie myéloïde alors que les CLP permettent la formation des cellules T/B et NK. (D'après King et al 2011).

3. *Ostéoclastes et cellules souches hématopoïétiques*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, un environnement médullaire particulier est nécessaire à la mise en place de l'hématopoïèse. Des modifications dans la masse osseuse que ce soit un gain ou une perte induisent une dérégulation de l'hématopoïèse. Tout d'abord, il est important de noter que l'absence de remodelage osseux et d'ossification endochondrale se traduit par une absence de la migration des HSCs vers la moelle osseuse. Les cellules vont rester dans la rate et il va être observé une hématopoïèse extra médullaire (Chan et al 2009). Ces travaux ont démontré le rôle des cellules médullaires dans la régulation de l'hématopoïèse. Les cellules médullaires forment un micro-environnement particulier appelé niche permettant le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Les cellules médullaires vont avoir une double action ; le support des HSCs et l'intégration des signaux extérieurs afin de réguler les cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, les modèles murins mimant une dérégulation du remodelage osseux tel que les souris ostéopétrotiques ou au contraire présentant une ostéopénie importante sont associées à des désordres hématopoïétiques. Chez les souris ostéopétrotiques *oc/oc* présentant une perte de l'activité des ostéoclastes, il est apparu que les souris présentaient une absence d'hématopoïèse médullaire (Mansour et al 2012). De manière opposée, les patients présentant une perte osseuse importante ont une prolifération accrue des cellules HSCs ainsi qu'une augmentation de l'hématopoïèse avec une différenciation importante des cellules vers la voie myéloïde (Griseri et al 2015). L'architecture osseuse semble donc nécessaire afin de maintenir une hématopoïèse médullaire.

Afin de permettre une bonne architecture osseuse, les cellules osseuses vont intégrer différents signaux extérieurs. La gravité est nécessaire à une bonne organisation des travées osseuses et donc un remodelage osseux réussi. L'absence d'organisation médullaire conduit à un remodelage anarchique se traduisant notamment par une ostéopénie et une perte osseuse. Chez les personnes atteintes, on observe une augmentation de la différenciation des HSCs vers la voie myéloïde (neutrophiles et monocytes) au détriment de la voie lymphoïde (Zayzafoon et al 2005).

Les désordres de l'hématopoïèse peuvent apparaître à différentes étapes du développement. Ils peuvent être associés à un dérèglement hormonal, à des désordres inflammatoires comme des maladies mais aussi à des causes environnementales. De manière générale, ces désordres vont conduire à une augmentation de l'hématopoïèse et à la migration des cellules hors de la moelle osseuse.

Ces données ont conduit à analyser le rôle des cellules médullaires dans la régulation des niches des cellules souches hématopoïétiques.

4. *Rôle du système endocrinien*

Les hormones ont un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse. Les observations cliniques ont depuis longtemps associé une dérégulation thyroïdienne et des problèmes hématopoïétiques. Les hormones thyroïdiennes, seules composantes biologiques contenant de l'iode, tiennent une place centrale dans le métabolisme cellulaire de tous les organes (Grymula et al 2007).

Les hormones de croissance vont participer à la régulation de la lymphopoïèse T. Cette hormone va réguler l'hématopoïèse en induisant la prolifération et la différenciation des HSCs (Hanley et al 2005).

III. Ostéoimmunologie

La moelle osseuse est devenue un organe central dans l'étude de la mémoire immunitaire. Cet organe supporte des fonctions immunologiques en agissant comme un organe lymphoïde primaire dans le cas du développement lymphoïde. Les études sur les souris déficientes en RANKL ont montré qu'elles développent une ostéopétrose, une absence de dents ainsi que des défauts de développement lymphocytaire. Ces problèmes de développement lymphocytaire sont dus à des défauts d'organisation thymique et ganglionnaire (Kong et al 1999). Ces travaux ont été les premiers à montrer le lien entre les cellules osseuses et le système immunitaire et ont fait émerger une nouvelle discipline ; l'ostéoimmunologie.

A. Interaction entre le système osseux et le système immunitaire

Comme nous l'avons présenté précédemment, le tissu osseux est un organe en perpétuel renouvellement. L'architecture osseuse est sous le contrôle d'une balance entre formation et résorption osseuse. Il est apparu rapidement que, dans les cas des maladies inflammatoires, une perte de cette balance en faveur de la résorption osseuse est un symptôme majeur. Cette perte osseuse pathologique a été liée à la présence de cellules T CD4+ inflammatoires. Ainsi, les études sur l'arthrite rhumatoïde ont décrit la présence d'une population inflammatoire associée à l'activation des ostéoclastes et à la perte osseuse (Kong et al 1999).

L'interaction entre les cellules T et les cellules osseuses passe par la présence de facteurs solubles mais aussi par des interactions cellulaires.

1. Le système RANK-L/OPG

Le couple RANK-L/OPG est central dans l'interaction entre les cellules osseuses et les cellules immunitaires. Les différents signaux permettant une élévation de la production de RANKL par les cellules stromales ou par les ostéoblastes vont induire une augmentation du nombre d'ostéoclastes et par conséquent une augmentation de l'activité de résorption.

Le RANKL ne va pas seulement agir sur l'activité ostéoclastique, mais va aussi participer à l'activité des cellules T CD4+. En effet, le RANKL va moduler la réponse immunitaire via son effet sur les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques expriment constitutivement le récepteur RANK. L'interaction de RANKL/RANK va induire une augmentation de la survie des cellules dendritiques en inhibant le facteur pro-apoptotique BCL-XL via la signalisation NFκB.

La survie des cellules dendritiques passe par l'expression de CD40. Le récepteur CD40 est une molécule co-stimulatrice qui permet l'activation des cellules T CD4+. De plus, l'activation des cellules T CD4+ s'accompagne de la production de RANKL par ces derniers (Horwood et al 1999). Les cellules T CD4+ vont ainsi participer à la régulation de la résorption osseuse. Au cours de l'inflammation, une augmentation des taux de RANKL dans la moelle osseuse est observée et va participer à une augmentation de la différenciation ostéoclastique.

La fixation du RANK-L sur son récepteur induit des cascades de signalisation se traduisant par l'activation de la voie NF κ B (Jimi et al 2005). Ce facteur de transcription gère l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation immunitaire et inflammatoire. L'induction de l'expression de NF κ B va permettre l'expression des cytokines pro-inflammatoires (tel que l'IL-1 β et le TNF α) mais aussi les molécules d'adhésion (VCAM-1 ; ICAM-1) impliquées dans l'interaction des cellules immunitaires avec leur environnement.

Ce facteur de transcription NF κ B a aussi été associé à l'ostéoclastogénèse. Dans les modèles d'arthrite, une élévation des niveaux des taux de NF κ B dans la synovie est synonyme de maladie. De plus, l'inhibition de l'expression de ce facteur de transcription est associée à une diminution de la différenciation des ostéoclastes (Li et al 2002). Lorsque les cellules T CD4+ sont inactives, le facteur NF κ B est maintenu dans le cytoplasme. L'activation des cellules T CD4+ va induire une translocation du facteur dans le noyau et l'activation des gènes de l'inflammation. La signalisation NF κ B est centrale dans la régulation des réponses développementales et immunologiques. Des dérégulations de cette voie conduisent à la mise en place de maladies telles que le cancer ou encore les maladies inflammatoires chroniques. Il existe deux types de voies d'activation. La voie canonique fait intervenir les protéines p50 et p65 alors que la non-canonique passe par le couple p100/RelB. L'activation des voies de transcription impliquées dans l'inflammation et dans la différenciation des ostéoclastes est sous le contrôle de la canonique de NF κ B.

De façon étonnante, les patients atteints de perte osseuse présentent une élévation des taux d'OPG ainsi que des cytokines anti-ostéoclastogéniques. Cette augmentation semble intervenir en tant qu'élément de compensation de la perte osseuse ou alors a pour but de la limiter (Franchimont et al 2004 ; Takayanagi et al 2000).

L'activation des cellules dendritiques par la présence de pathogènes via les TLR conduit à une élévation de la concentration de RANKL. Tout comme les cellules dendritiques, les ostéoclastes expriment les TLR. L'interaction entre les TLR et les pathogènes au niveau des ostéoclastes va inhiber leur différenciation (Takami et al 2002). De plus, l'activité des TLR sur les ostéoblastes va induire une augmentation de la production de RANKL et TNF α par ces derniers contribuant à une augmentation de la formation des ostéoclastes et donc à la résorption osseuse (Hayashi et al 2003).

Le couple RANK/RANKL va agir au niveau du système immunitaire sur les cellules T et les cellules dendritiques. Cependant, le système osseux et notamment les

ostéoblastes/ostéoclastes sont les principales cibles du couple RANK/RANKL. Les différentes études ont ainsi présenté le rôle des cellules T sur l'activité des ostéoclastes et inversement. Cependant, il est important de noter que l'activité des ostéoclastes va tout d'abord agir sur les cellules précurseurs des cellules immunitaires, à savoir les cellules souches hématopoïétiques.

2. *Régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules souches hématopoïétiques sont maintenues dans un équilibre entre cellules activées et cellules quiescentes dans la moelle osseuse. Afin de permettre leur survie, les cellules sont maintenues dans des microenvironnements protecteurs ou niches. Ces niches sont composées d'une population hétérogène de cellules comprenant notamment des cellules mésenchymateuses.

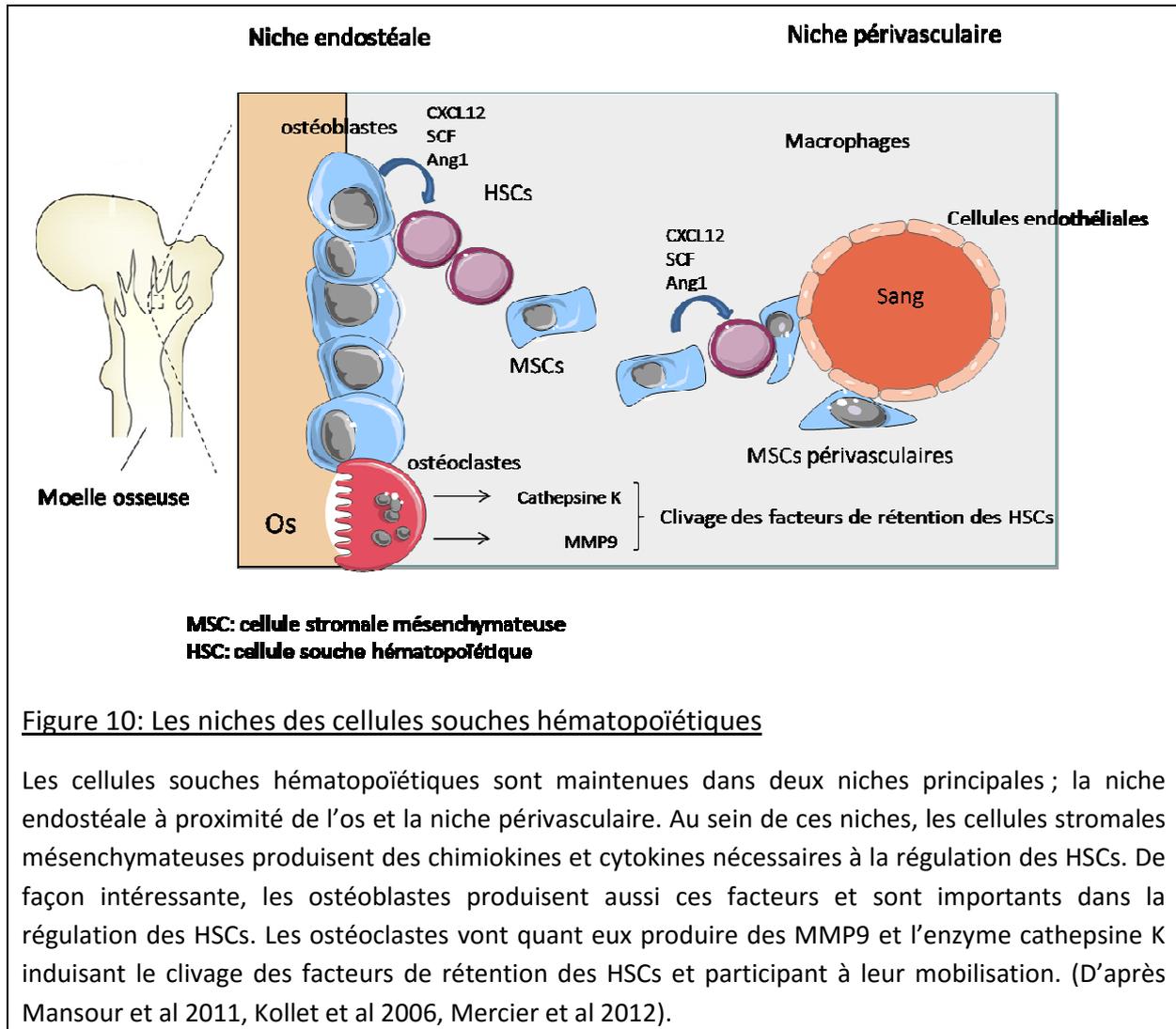
a) *Les cellules stromales mésenchymateuses*

Au sein de la moelle osseuse, les cellules mésenchymateuses vont être centrales dans la niche des cellules HSCs. Il a été décrit 2 niches principales : la niche endostéale et la niche périvasculaire. Pendant de nombreuses années, la niche endostéale a été décrite comme la niche permettant le maintien des cellules quiescentes à long terme. La niche endostéale, proche de l'os, est composée des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules souches mésenchymateuses CD45- Sca1- CD51+ (Lévesque et al 2010).

Ces cellules permettent le maintien des cellules dans un état indifférencié. Le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse est dépendant de CXCL12. Parmi les cellules mésenchymateuses, une petite population de cellules réticulaires produit de grandes quantités de CXCL12 (CAR cells : CXCL12 abundant reticular cells) et est nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques (Sugiyama et al 2006,2012). Les cellules CAR permettent le maintien des cellules souches hématopoïétiques les plus quiescentes et avec le potentiel de différenciation le plus important (Omatsu et al 2010). La déplétion spécifique de ces cellules conduit à une diminution des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Scadden et al 2012). Outre les cellules CAR, les cellules Nestin+ participent à l'organisation de la niche. Ces cellules interagissent avec les fibres nerveuses et permettent l'intégration de ces signaux au niveau médullaire (Mendez-ferrer et al 2010). Décrites comme des cellules Sca1+ CD140+ CD51+ elles sont situées à proximité des vaisseaux sanguins (Ding et al 2012). Les cellules CAR et Nestin+ participent à l'organisation de la niche dite périvasculaire. Cette niche a longtemps été considérée comme la niche des cellules HSC activées (Morikawa et al 2009). Cependant, depuis quelques années, cette niche est décrite comme la seule niche des cellules souches hématopoïétiques avec des extensions vers la partie corticale de l'os (Morrisson and Scadden 2013). Les cellules mésenchymateuses vont agir en tant que précurseur des cellules osseuses mais aussi vont avoir une action

propre au niveau des cellules HSCs permettant ainsi un bon fonctionnement de l'hématopoïèse.

Outre leur sécrétion de chimiokines et cytokines, les cellules mésenchymateuses expriment à leur surface des intégrines telles que l'ostéopontine qui va participer à l'interaction des HSCs avec leur niche.



b) Les ostéoclastes

D'autres cellules participent à la régulation des niches des HSCs. Ainsi, les études faites sur les modèles ostéopétrose ou d'ostéopénie ont montré que l'activité des ostéoclastes est associée à une mobilisation des HSCs (Blin et al 2012). De plus, l'absence d'activité ostéoclastique telle que dans les modèles d'ostéoprétrose est associée à une dérégulation de l'hématopoïèse médullaire qui est absente et relocalisée partiellement au niveau splénique (Kollet et al 2006). De plus, certaines maladies inflammatoires sont associées à

une perte osseuse importante. Dans ces modèles tels que les souris injectées au RANK-L, on observe une perte osseuse importante associée à une augmentation du nombre et de l'activité ostéoclastique. Chez ces souris, l'hématopoïèse est dérégulée. Ainsi, on observe aussi une augmentation de cellule précurseur des ostéoclastes tels que les monocytes. Ce phénotype peut être lié soit à une augmentation du recrutement des monocytes dans la moelle osseuse, soit à une augmentation de la mobilisation et différenciation des HSCs. Lors de la dégradation de la matrice osseuse, les ostéoclastes produisent des enzymes comme la cathepsine K qui dégradent le CXCL12 et participent ainsi à la mobilisation des cellules hématopoïétiques (Kollet et al 2006). Ces enzymes dégradent les molécules de liaison des cellules souches hématopoïétiques avec les cellules mésenchymateuses telles que l'ostéopontine.

Cependant, bien que participant à la régulation des cellules souches, les études ont montré que les ostéoclastes n'étaient pas indispensable pour induire la mobilisation des HSCs en présence de G-CSF (Miyamoto et al 2011).

c) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes participent aussi à la structure de la niche hématopoïétique. Ces cellules sont, avec les ostéocytes, les principaux producteurs de CXCL12. L'ablation spécifique des ostéoblastes est associée à une diminution de la cellularité médullaire ainsi qu'un arrêt de l'hématopoïèse médullaire (Visnjic et al 2004). Ces cellules semblent donc nécessaires afin de maintenir une intégrité médullaire. De plus, dans ces modèles murins, il est apparu rapidement que l'ablation de ces cellules conduit à une diminution du pool de LT-HSC et une augmentation de ST-HSC. Ces travaux ont mis en avant le rôle des ostéoblastes dans la régulation de la quiescence et de l'auto-renouvellement des HSCs dans la moelle osseuse (Calvi et al 2003).

d) Les lymphocytes T CD4+ et les cellules souches hématopoïétiques

Les différentes cellules formant l'architecture de la moelle osseuse interviennent à différents niveaux dans la régulation de la niche des HSCs. Cependant, d'autres cellules présentes au sein de la moelle osseuse participent à la régulation de ces niches. Les cellules T régulatrices sont présentes dans la moelle osseuse et vont participer à la régulation de la réponse inflammatoire. Les études ont montré que l'ablation des cellules Treg dans la moelle osseuse est associée à une augmentation de la prolifération des cellules HSCs. De plus, la présence de cellules Treg bloque la différenciation des cellules HSCs en cellules lymphoïdes ou myéloïdes (Pedroza-Pacheto et al 2016). Ces cellules vont donc permettre le maintien des HSCs dans un stade quiescent, incapable de répondre aux stimuli externes.

Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les cellules Th1 et Th17 vont être associées à une augmentation de la mobilisation et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules T CD4+ inflammatoires vont avoir deux types d'action au niveau des cellules souches hématopoïétiques. Tout d'abord, une action directe via leur sécrétion de cytokines IFN γ par les cellules T CD4+ induit une mobilisation des HSCs et leur différenciation vers la voie myéloïdes (Griseri et al 2012). De plus, les cellules Th17 inflammatoires produisent du GM-CSF qui induit la différenciation des HSCs en éosinophiles responsables des dommages cellulaires observés lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Griseri et al 2015).

e) Les agents mobilisateurs des cellules souches hématopoïétiques

Le G-CSF induit une mobilisation des HSCs en interrompant la signalisation CXCL12/CXCR4 au niveau des HSCs à différents niveaux. Cette cytokine induit une diminution de l'expression de CXCR4 par les HSCs induisant une diminution de l'interaction des cellules avec leur environnement (Levesque et al 2003). De plus, cette cytokine induit une diminution de la production de CXCL12 par les ostéoblastes et bloque leur activité (Semerad et al 2005). Le traitement au G-CSF va favoriser le développement d'un microenvironnement protéolytique avec la présence de « neutrophil serine proteases » qui vont cliver le CXCL12 de la moelle osseuse. Le G-CSF agit sur la concentration médullaire sans varier la concentration sérique. Tous ces effets vont conduire à une mobilisation des cellules HSCs vers la circulation sanguine (Levesque et al 2002). Outre cette cytokine, des agents synthétiques ont été développés tels que l'AMD-3100. L'AMD-3100 est un antagoniste du récepteur CXCR4. Cet agent interrompt la liaison entre le CXCL12 médullaire et son récepteur induisant ainsi une mobilisation des cellules vers la circulation sanguine.

Les signaux de danger passent par une intégration des signaux adrénérgiques au niveau des cellules souches hématopoïétiques mais aussi au niveau des cellules stromales mésenchymateuses. En réponse à ces signaux, les cellules MSCs diminuent leur sécrétion de CXCL12 ce qui va induire une mobilisation des HSCs (Mendez-Ferrer et al 2010). Au niveau des cellules souches hématopoïétiques, les cellules vont répondre à différents types de signaux. Ainsi, l'intégration des signaux beta1 et béta-2 adrénérgique permet une sortie de la quiescence des cellules et leur mobilisation.

3. *Interaction entre les cellules osseuses et les cellules T CD4+.*

La moelle osseuse est le réservoir des cellules hématopoïétiques que ce soit les cellules souches mais aussi leurs produits de différenciation, à savoir notamment les lymphocytes T

CD4+ mémoires. Au sein de la moelle osseuse, les cellules T CD4+ mémoires pathogéniques et non-pathogéniques vont être maintenues pendant des années (Nemoto et al 2007).

Mon équipe et d'autres avons montré les interactions entre les cellules osseuses et les cellules T CD4+ dans la moelle osseuse (Ibàñez et al 2016 ; Rivollier et al 2004). Le rôle des cellules osseuses dans la niche des cellules T CD4+ n'est cependant pas établi. Il est cependant important de noter que les cellules T CD4+ sécrètent des cytokines qui vont agir les cellules osseuses (ostéoclastes et ostéoblastes).

Les premières études sur les cytokines inflammatoires ont montré le rôle de l'IL-1 β . Cette cytokine considérée comme ostéolytique du fait de son potentiel sur la résorption osseuse participe à la résorption osseuse *in vivo* en augmentant l'ostéoclastogénèse. Il a ensuite été démontré que le TNF α et la plupart des cytokines de la superfamille du TNF α vont elles aussi participer à la différenciation des ostéoclastes (Suda et al 1999 ; Boyle et al 2003). De plus, ces cytokines agissent sur les ostéoblastes. L'IL-1 et le TNF α inhibent la synthèse de collagène par les ostéoblastes et bloquent ainsi l'activité de formation osseuse (Stashenko et al 1987 ; Centrella et al 1988). Le TNF α va agir tant sur les ostéoblastes que sur les ostéoclastes. Cette cytokine participe à la formation des ostéoclastes et induit l'apoptose des ostéoblastes ce qui participe à la perte de la balance osseuse (Jilka et al 1998). Ces cytokines n'induisent pas la différenciation des ostéoclastes par leur seule expression *in vivo*. Ces facteurs solubles vont agir au niveau des cellules mésenchymateuses et des ostéoblastes afin de permettre leur production du RANK-L, cytokine centrale dans l'ostéoclastogénèse. Cependant, tous les lymphocytes T CD4+ ne vont pas participer à la perte osseuse. Les cellules Th1, pourtant responsables de nombreuses maladies inflammatoires n'ont pas été décrites comme responsable de la perte osseuse. Ces cellules produisent deux cytokines l'IFN γ et l'IL-12 dont l'effet anti-ostéoclastogénique a été démontré. Des travaux *in vitro* sur les cellules inflammatoires ont montré que les cellules TH17 participent à la perte osseuse médullaire en produisant du RANK-L (Sato et al 2006), induisant ainsi l'augmentation de la différenciation des ostéoclastes. Certaines cytokines n'ont pas une action définie sur la perte osseuse. Ainsi le TGF β peut avoir un effet pro ou anti-ostéoclastogénique selon les taux d'expression. Cette cytokine est nécessaire pour la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules régulatrices et effectrices (Th17). Du fait de cette dualité, cette cytokine est associée à des profils lymphocytaires différents et donc son association avec les autres cytokines est capitale pour son effet. Les cellules T effectrices inflammatoires ne sont pas les seules impliquées dans la régulation de la masse osseuse. Ainsi les cellules régulatrices produisent des cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 ou le TGF β , qui ont été décrites comme inhibant l'ostéoclastogénèse. Les cellules régulatrices vont de plus, inhiber la différenciation des ostéoclastes grâce à des contacts cellules/cellules avec les précurseurs des ostéoclastes. Cette inhibition passe par la signalisation CTLA-4 qui va complètement abolir la différenciation ostéoclastique *in vitro* (Zaiss et al 2007).

B. Maladies inflammatoires chroniques et système osseux

1. Les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques se caractérisent par une activation maintenue du système immunitaire. Cette activation continue peut induire des dommages cellulaires au niveau du site inflammatoire mais aussi à un niveau systémique. Ainsi, la perte osseuse pathogénique est un symptôme majeur des maladies inflammatoires chroniques. Il est possible de discerner différentes maladies inflammatoires. Tout d'abord les maladies inflammatoires où la perte osseuse est une conséquence locale (Kong et al 1999) et d'autres où cette perte correspond à une réponse systémique et où le site inflammatoire se trouve à distance des structures osseuses (Tilg et al 2008 ; Wakkach et al 2008).

La polyarthrite rhumatoïde est l'affection rhumatoïde la plus répandue parmi les maladies rhumatoïdes. Elle correspond à une réaction inflammatoire au niveau des articulations et est associée à une perte osseuse importante à proximité. L'inflammation au cours de cette maladie se situe au niveau des membranes synoviales. Lors de la maladie on observe une sécrétion excessive de liquide synovial associée à un épaissement de la membrane synoviale. L'inflammation conduit à des gonflements des articulations, des douleurs mais aussi à la libération d'enzymes délétères pour l'os. La plupart des études sur l'interaction de l'os avec le système immunitaire ont été faites dans le contexte de l'arthrite rhumatoïde. Dans cette maladie, bien que le site inflammatoire soit localisé à proximité des articulations au niveau de la synovie, il s'agit d'une maladie inflammatoire systémique. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire caractérisée par la présence de cellules T CD4+ Th17. Une des conséquences majeure de la maladie est une perte osseuse observée dans ces maladies est dépendante de la population lymphocytaire Th17 productrice d'IL-17. En effet, cette cytokine inflammatoire va induire une augmentation de la différenciation ostéoclastique au niveau de la moelle osseuse.

La synovie des patients arthritiques est riche en cytokines inflammatoires (TNF α et IL1) et induisant la différenciation des ostéoclastes. Ces différents éléments conduisent à l'augmentation de la différenciation des ostéoclastes au niveau de l'os et à une perte osseuse. De façon intéressante, il a été démontré la présence de cellules CD4+ RANKL+ dans la synovie des patients (Kotake et al 2001). Ces cellules vont participer à la perte osseuse en favorisant la balance RANKL/OPG en faveur de la sécrétion de RANKL.

Les maladies rhumatoïdes ne sont pas les seules maladies se caractérisant par une atteinte osseuse. Ainsi, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques telles que le lupus, le diabète ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin présentent dans une certaine mesure une perte osseuse. Ces maladies systémiques se caractérisent par une inflammation systémique dont le site inflammatoire est localisé à distance du tissu

osseux. Le lupus érythémateux se caractérise par une perte de la tolérance des cellules T et B envers les antigènes su soi. Un des symptômes de cette maladie est, comme dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, une infiltration de la synovie par les cellules inflammatoires et un épaissement de la membrane synoviale (Kalla et al 1993). Cette maladie est due à des concentrations importantes d'IFN α qui participent à la pathogénicité de la maladie. Cependant, cette cytokine a été décrite comme inhibitrice de la différenciation ostéoclastogénique en bloquant la différenciation des monocytes. Cette cytokine pourrait expliquer le phénotype réduit de perte osseuse observée chez les patients atteints de lupus. La perte osseuse observée pourrait donc être une conséquence de l'inflammation généralisée des patients et à la présence d'autres cytokines inflammatoires ayant un potentiel ostéoclastogénique (Bultink et al 2005).

Contrairement au lupus et à l'arthrite rhumatoïde, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) ne présentent pas une inflammation de la synovie. Ces patients présentent quand même une perte osseuse importante qui peut conduire à une ostéoporose dans les cas les plus graves. Il a été observé une augmentation des taux des cytokines pro-ostéoclastogéniques dans le sang des patients atteints (Turk et al 2009). De plus, des études sur les modèles murins de la maladie ont mis en avant que les cellules T pathogéniques CD4 $^{+}$ responsables de l'inflammation intestinale étaient maintenues dans la moelle osseuse (Nemoto et al 2009). Une rémission de la maladie est souvent associée à une augmentation de la densité osseuse (Reffitt et al 2003).

Tous ces travaux ont permis de mettre en évidence une interaction importante entre les cellules T CD4 $^{+}$ et la perte osseuse observée lors des maladies inflammatoires.

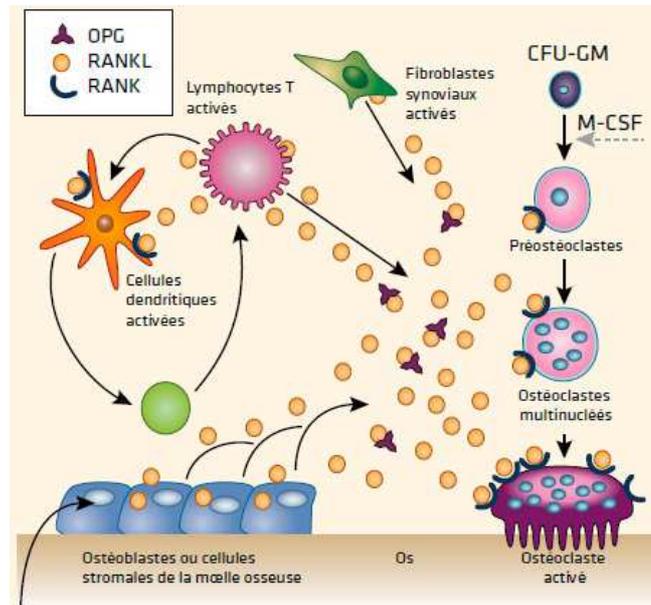


Figure 11: Remodelage osseux dans des conditions pathogéniques

Dans des conditions pathologiques, on observe une augmentation de la production de RANKL par les ostéoblastes, les cellules T CD4+ activés et les cellules MSCs. L'augmentation des concentrations de RANKL permettent une formation accrue d'ostéoclastes. Les ostéoclastes formés accélèrent la résorption osseuse et participent à la perte osseuse observée lors des maladies inflammatoires chroniques.

2. Cellules T CD4+ mémoires pathogéniques dans la moelle osseuse

Les cellules T représentent environ 3% des cellules de la moelle osseuse. Les études sur les cellules T ont montré que la majorité des cellules CD4+ présentes dans la moelle sont des cellules activées voire mémoires. Les travaux de Nemoto et al (2012) ont montré que la production d'IL-7 par les MSCs de la moelle osseuse permet le maintien des cellules T pathogéniques dans la moelle osseuse.

La présence d'IL7 va permettre l'activation des cellules T CD4+ et des macrophages (Van Roon et al 2005) ainsi que la production des cytokines inflammatoires. L'IL-7 va aggraver les symptômes des maladies inflammatoires en induisant la sécrétion de RANKL par ces cellules mésenchymateuses mais va aussi induire la fusion et différenciation des macrophages (Chen et al 2013). De plus, la présence d'IL-7 va permettre la survie à long terme des cellules mémoires CD8+ dans la moelle osseuse (Cui et al 2015).

L'interaction des cellules T avec la matrice extracellulaire va fournir des signaux activateurs permettant leur production d'IL-17. Cette interaction est possible grâce à la multitude de récepteurs de la matrice présents sur les cellules T CD4+. Ainsi, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ va permettre sa liaison à la matrice et son activation. Cette intégrine va interagir avec l'IL7R et participer à l'activation de cellules pathogéniques et à la perte osseuse observée lors de l'arthrite (El Azreq et al 2015).

Depuis quelques années, les cellules Th17 ont été montrées comme centrales dans la perte osseuse. De plus en plus d'études ont démontré la plasticité des cellules Treg vers un profil inflammatoire Th17. Ainsi, les cellules FoxP3+ CD25- peuvent se redifférencier en cellules Th17 lorsqu'elles sont stimulées par des cytokines inflammatoires. La plasticité de ces cellules va participer à une augmentation de la perte osseuse observée lors de l'arthrite. Cependant, le rôle de l'IL-17 ne peut pas être associée avec certitude avec la maladie inflammatoire et à la perte osseuse (Pacifi et al 2016).

Afin de lutter contre les symptômes différents traitements ont été mis en place afin de bloquer les cellules T mais aussi la perte osseuse.

3. Traitement de la perte osseuse pathogénique

La perte osseuse pathologique est un vrai problème de santé publique. En effet, elle induit une élévation du risque de fractures mais aussi l'altération des conditions de vie. Afin de limiter la perte osseuse, différents traitements ont été développés.

Les traitements ont ciblé les cellules responsables de la perte osseuse à savoir les ostéoclastes. Les premiers traitements ont été développés dans les années 1980 et sont basés sur l'utilisation de petites molécules, analogues non hydrolysables de PPI ; les bisphosphonates (Gertz et al 1993). Ces molécules vont se lier aux cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse et vont bloquer la résorption osseuse. Elles vont avoir différents niveaux d'actions ; moléculaires, cellulaires et enfin métabolique (Breuil et al 2002). Une fois fixés à la matrice osseuse, les bisphosphonates vont être ingérés par les ostéoclastes lors de la résorption osseuse. Il existe différentes générations de bisphosphonates. Les bisphosphonates de première génération (ex clodronate), les non-amino bisphosphonate, sont de petites molécules qui sont incorporées dans les molécules d'ATP néo-formés. Ces molécules n'ont pas la capacité d'être hydrolysé et vont s'accumuler dans les ostéoclastes induisant l'apoptose des cellules en interrompant les processus cellulaires dépendant des concentrations d'ATP (Russel et al 2008). Les bisphosphonates de deuxième et troisième génération sont composés d'un noyau azoté et sont caractérisés comme amino-bisphosphonates. Ces molécules au contraire des bisphosphonates de première génération n'induisent pas l'apoptose des ostéoclastes. En effet, une fois internalisée, ces molécules vont inhiber l'enzyme farnesyl pyrophosphate synthase, enzyme nécessaire à la prénylation

des petites protéines G (Kavanagh et al 2006). L'absence de prénylation de ces protéines va induire une absence de remodelage du cytosquelette et donc une absence de formation de la zone de scellement. Ainsi, les ostéoclastes perdent leur capacité à se fixer à la matrice osseuse et par conséquent à la résorber (Sato et al 1990). De plus, les bloqueurs de troisième génération, notamment l'acide zolédronique, ont été décrits comme agissant sur le recrutement et la fusion des précurseurs des ostéoclastes (Wolf et al 2006). Ainsi, les études *in vitro* de ces molécules ont montré une inhibition de la prénylation des petites protéines G chez les monocytes, induisant une absence de fusion de ces cellules. En effet, cette étude a montré qu'en présence d'acide zolédronique, il y a une augmentation de la proportion des cellules avec des marqueurs de cellules naïves.

De plus, outre l'effet direct des bisphosphonates sur les ostéoclastes et leur précurseurs, ces drogues induisent la sécrétion d'OPG par les ostéoblastes, et bloquent leur sécrétion de RANKL (Colucci et al 1996). Au niveau systémique, les bisphosphonates vont modifier les taux de calcium sériques. Cette élévation des concentrations calciques induit la sécrétion de calcitonine afin d'inhiber la résorption osseuse. Un des effets secondaires du traitement à long terme des bisphosphonates est une ostéonécrose correspondant à une nécrose de l'os suite à une infection en général. Le lien entre les traitements aux bisphosphonates et cette maladie reste encore sujet à controverse mais serait lié à des problèmes de vascularisation des os suite aux traitements. Cette ostéonécrose se caractérise par l'absence d'ostéoblastes associée à une augmentation du nombre de cellules inflammatoires T CD4+.

Malgré les effets secondaires liés à l'utilisation des bisphosphonates, ces molécules restent le meilleur traitement afin de lutter contre la perte osseuse. En effet, d'autres traitements ont été mis en place afin de bloquer l'activité des ostéoclastes mais s'accompagnent de nombreux effets secondaires. Ainsi, la calcitonine, hormone sécrétée par la glande thyroïde, a été utilisée depuis quelques années comme traitement de la perte osseuse. Cette hormone va inhiber l'expression du récepteur RANK à la surface et va ainsi diminuer la fusion et différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes. Cette hormone va agir tant sur les précurseurs des ostéoclastes que sur les ostéoclastes matures (Tian et al 2015). Cependant, les injections de calcitonine s'accompagnent de nombreux effets secondaires et sont par conséquent peu utilisées en thérapeutique.

IV. La maladie de Crohn : modèle d'étude de l'ostéoimmunologie

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) sont des affections pouvant toucher l'intégralité du tractus digestif. Il existe deux maladies majeures ; la recto-colite ne touchant que le colon et la maladie de Crohn (MC) qui peut se développer sur l'intégralité du tube digestif. Ces maladies associent une inflammation systémique due à l'activité des cellules T CD4+ et une perte osseuse importante. Ces maladies représentent ainsi un bon modèle d'étude de l'ostéoimmunologie. Dans cette partie, ma discussion se portera sur la maladie de Crohn.

A. Description de la maladie

La maladie de Crohn a été décrite pour la première fois par le Dr B Crohn en 1932. Elle appartient au groupe des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et se caractérise par une inflammation du tube digestif. Contrairement à la recto-colite hémorragique où l'inflammation se concentre au niveau du colon, la maladie de Crohn peut affecter l'ensemble du tractus digestif depuis la bouche jusqu'à l'anus. Il a été décrit 5 types de maladie de Crohn selon la zone affectée ; l'iléocolites, l'iléite, gastroduodéal, jéjunolite et la colite granulomateuse. L'iléocolite est la forme la plus courante de la maladie de Crohn, et affecte environ 40% des patients. Quelque soit la zone affectée, les symptômes de la maladie sont les mêmes, à savoir des douleurs abdominales, des crampes, de la diarrhée, une perte de l'appétit et du poids.

La maladie est en général détectée chez le jeune adulte entre 15 et 35 ans. Elle affecte les hommes et les femmes avec la même incidence. Cette maladie se déclare dans les pays industrialisés avec une incidence de 4-5 pour 100 000 habitants (chiffre AFA 2015) et affecte environ 120 000 personnes en France. Cette maladie évolue par poussées alternant des phases de crises suivies par des phases asymptomatiques.

La plupart des symptômes observés dans lors de la maladie de Crohn sont dus à un dérèglement du système immunitaire. Ainsi, cette maladie est associée à une augmentation des populations Th1 et Th17 au sein de l'intestin. Ces cellules vont induire de nombreux dommages intestinaux et vont libérer des cytokines inflammatoires induisant la mise en place d'une réponse systémique de l'individu.

De nos jours, cette maladie n'a pas de traitement définitif. Il existe des traitements afin de limiter les symptômes de la maladie. Tout d'abord, les anti-inflammatoires tels que les corticoïdes qui s'accompagnent cependant de nombreux effets secondaires (hypertension, ostéoporose...). La deuxième phase de traitement consiste à l'administration d'immunosuppresseurs tels que les anti-TNF qui bloquent les réponses du système immunitaire adaptatif (Ramos de Mattos et al 2015). Ces traitements s'accompagnent d'autres médicaments qui vont chercher à limiter les autres symptômes comme les anti-

diarrhéiques. On peut dissocier deux types de traitements ; le traitement de poussées qui va permettre de remettre le tube digestif au repos pendant la poussée et le traitement d'entretien qui va chercher à limiter le plus possible l'apparition des poussées.

Outre les traitements médicamenteux, les patients sont soumis à un régime alimentaire strict afin de limiter l'apparition des signes de la maladie. Dans les cas les plus graves de la maladie, des traitements chirurgicaux peuvent être mis en place afin d'exciser les parties intestinales lésées.

Bien que touchant une proportion importante de la population, les causes de la maladie ne sont toujours pas élucidées.

B. Les causes de la maladie

La maladie de Crohn est une maladie multifactorielle associant une part génétique et une part environnementale.

1. Les causes immunitaires

La maladie de Crohn est sous le contrôle des réponses immunitaires. Les études ont ainsi montré que les cellules CD4+ vont diriger la réponse immunitaire au sein de l'organisme. Au cours de cette maladie, les cellules T CD4+ vont avoir un rôle central dans l'organisation des réponses inflammatoires. Ces cellules vont produire les différentes cytokines responsables des dégâts cellulaires et vont aussi participer à l'activation des cellules du système inné.

a) La réponse Th1

La maladie de Crohn a été décrite pendant des années comme une maladie ayant une composante Th1. En effet, les premières études de la maladie ont décrit la présence d'une population T CD4+ IFN γ + prédominante dans la lamina propria des souris malades (Powrie et al 1994). De plus, les anticorps bloquant l'IFN γ ou l'injection de cellules Tbet ko vont empêcher le développement de la maladie chez les souris (Powrie et al 1994). Les cellules Th1 ainsi produites vont participer à l'inflammation intestinale grâce à leur production d'IFN γ qui permet l'activation des neutrophiles induisant ainsi des dommages intestinaux.

b) La réponse Th17

Les cellules Th17 ont été décrites récemment pour leur implication dans le développement de la maladie de Crohn. Ces études ont montré que cette population est nécessaire au

développement de la maladie. Ainsi, les travaux ont montré la présence de cellules Ror γ ⁺ dans la lamina propria de patients et de souris atteints de la maladie de Crohn. L'IL-23 produit par les cellules T CD4⁺ participe à la production des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-17 responsables des signes cliniques de la maladie et de la survie des cellules Th17 (Ahern et al 2010). La découverte de la cytokine IL-23 a partiellement remis en question le rôle des cellules Th1 dans la maladie. En effet, l'IL-23 va interagir avec son récepteur et va participer à la différenciation des cellules Th17. Cette cytokine est composée de deux sous unités, la protéine p19 et la protéine p40. De façon intéressante, l'IL-12 partage dans sa structure la protéine p40 avec l'IL-23. De plus, le blocage de la signalisation via la protéine p40 ou p19 inhibe le développement de la maladie alors que le blocage de la signalisation de l'IL-12 n'induit pas un arrêt de la maladie (Murphy et al 2003). La production d'IL-23 est associée à la pathogénie des cellules Th17 et est devenue une cible intéressante dans la lutte contre cette maladie. L'IL-23 permet une plasticité des cellules Th17 vers un profil similaire à celui des cellules CD4⁺ Th1, en produisant de l'IFN γ .

Cependant, aucune étude n'a pu mettre en avant le rôle essentiel de la cytokine IL-17 dans le développement ou le maintien de la maladie. De plus, l'inhibition de la signalisation de l'IL-17 ne permet pas d'inhiber le développement de la maladie (Fuss et al 2011 ; Hueber et al 2012). Tous ces résultats laissent supposer une interaction entre les cellules Th1 et Th17 afin de permettre la mise en place de la maladie.

2. Les causes génétiques de la maladie

La part génétique de la maladie a été mise en évidence rapidement du fait de l'apparition de nouveaux patients au sein de familles dites à risque, c'est-à-dire possédant déjà un ou plusieurs membres atteints. D'autre part, des études sur des jumeaux monozygotes ont montré une similitude de symptômes entre les deux patients, ainsi que l'augmentation par 800 du risque d'apparition de la maladie chez un membre du couple si l'autre partenaire est atteint (Kaser et al 2010). De plus, les études ont montré que la maladie de Crohn peut résulter de la mutation d'un seul gène comme dans le cas le modèle murin de la maladie déficient pour l'Interleukine 10 (Kuhn et al 1993).

Des études GWAS ont montré l'existence de gènes de susceptibilités chez les patients. Les premières études ont montré que des mutations de gènes dans la voie NOD (impliqués dans la réponse immunitaire innée) sont associées avec une augmentation de la susceptibilité d'apparition de la maladie (Zhang et al 2009). D'autres études ont pu montrer que les mutations dans les gènes impliqués dans la différenciation des cellules T CD4⁺ (locus IL23) ou encore dans la réponse innée induisent une augmentation de la susceptibilité d'apparition de la maladie.

La répartition mondiale des patients a montré que les pays industrialisés et notamment certaines ethnies avaient une plus grande susceptibilité de développer la maladie. Ces résultats ne nous permettent pas d'exclure une part environnementale dans le développement de la maladie.

3. *Les causes environnementales*

La relation entre la flore bactérienne et la maladie de Crohn est complexe. En condition physiologique, la flore bactérienne est composée de plus de 400 espèces bactériennes réparties en deux grandes familles. Ces bactéries tapissent la paroi de l'intestin et du colon et participent à la régulation de la réponse immunitaire. La flore bactérienne est régulée par différents facteurs qui permettent la bonne santé de l'individu. Ainsi, certaines bactéries commensales vont avoir un effet favorable pour l'individu alors que certains participent à l'induction de la maladie. Ainsi, des études ont montré qu'une dysbiose et notamment une augmentation de certaines populations bactériennes telles que *Helicobacter pylori* sont des facteurs favorisant la mise en place de la maladie de Crohn (McCoy et al 2015 ; Omenetti et al 2015).

De plus, les études de Dianda (1997) ont montré que l'absence de flore bactérienne chez les souris rend impossible d'induire la mise en place et le maintien de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Ainsi, le transfert d'une flore bactérienne chez ces souris permet la mise en place d'une réponse immunitaire et la mise en place de la maladie.

C. La perte osseuse lors de la maladie de Crohn

Les observations cliniques de la maladie de Crohn ont très précocement associé la perte osseuse comme étant un des symptômes majeurs de la maladie. Ainsi, les travaux de Compston (1987) ont mis en évidence que les patients atteints présentaient une susceptibilité plus importante de développer des fractures et des atteintes vertébrales. De nos jours, l'ostéopénie voir l'ostéoporose dans les cas les plus sévères atteint une prévalence pouvant aller jusqu'à 57,6% des patients. Les études ont montré que la perte osseuse lors de la maladie de Crohn provenait d'un dérèglement du remodelage osseux en faveur d'une augmentation de l'activité des ostéoclastes (Oostlander et al 2012).

Les premières études sur la perte osseuse dans la maladie de Crohn ont montré que les traitements corticoïdes affectaient la masse osseuse en diminuant l'activité des ostéoblastes et en bloquant la réabsorption du calcium dans l'os (Reid et al 1990). De plus, ces traitements agissent sur la balance osseuse en induisant la production de la cytokine centrale dans la régulation osseuse ; le RANKL. En effet, les observations cliniques ont rapidement démontré une augmentation de RANKL dans les premiers jours suivant le début du traitement aux corticoïdes. De façon intéressante, ce taux semble revenir à des taux correspondant à ceux d'un patient sain dans les mois qui suivent le traitement. Cependant, une élévation du taux d'OPG proportionnelle à la perte osseuse est observée chez les patients, telle une mise en place d'un mécanisme de compensation afin de limiter la perte osseuse. Cependant, cette réponse n'est pas suffisante pour empêcher le développement des symptômes (Moschen et al 2005).

Les observations cliniques ont associé ostéoporose et un certain nombre de facteurs de risques. Ainsi avant d'incriminer la part inflammatoire, d'autres facteurs de susceptibilité ont été développés regroupant à la fois des facteurs environnementaux tel que le tabac ou les traitements corticoïdes à des causes plus intrinsèques tel que l'âge, le sexe ou encore une susceptibilité génétique. Il est rapidement apparu que bien que ces facteurs puissent participer au développement de la perte osseuse, la principale cause de la maladie est d'origine inflammatoire. Des études récentes ont mis en avant un lien possible entre l'inflammation et la perte osseuse. En effet, les traitements anti-inflammatoires tels que les anti-TNF sont associés certes à une diminution de l'inflammation systémique mais de façon intéressante à une diminution de la perte osseuse. Des mesures de densité osseuse de patients traitées ou non aux anti-TNF ont démontré une perte osseuse plus importante chez les patients exempts de traitements (Manara et al 2015).

Les cellules T CD4+ sont responsables de l'inflammation observée lors de la maladie de Crohn. Les études ont montré que ces cellules CD4+ inflammatoires produisaient du RANKL participant ainsi à la différenciation des ostéoclastes (Kong et al 1999). De plus, notre équipe a montré que, *in vivo*, les cellules T CD4+ induisaient la différenciation des cellules dendritiques en ostéoclastes (Wakkach et al 2008). Les études d'El-Azreq et al (2015) ont

montré que des injections répétées d'IL-7 induisaient une augmentation du nombre de cellules T CD4+ TH17 dans la moelle osseuse. En effet, l'IL-7 ayant été décrite comme une cytokine nécessaire au maintien des cellules CD4+ dans la moelle osseuse, des taux élevés de cette cytokine contribue à un maintien de cette population dans la moelle osseuse. La production de cette cytokine par les cellules stromales mésenchymateuses permet de maintenir la population T CD4+ pathogénique dans la moelle osseuse et contribue à la perpétuité de la maladie (Watanabe et al 2012). Cette population semble participer à la perte osseuse observée chez les souris injectées.

De plus, mon équipe a montré que dans des conditions inflammatoires, les cytokines inflammatoires, et notamment l'IL-17, participent à la différenciation d'ostéoclastes inflammatoires (Ibàñez et al 2016).

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire dont la composante Th1 est centrale. Bien que de nombreuses études aient montré que l'IFN γ avait un effet anti-ostéoclastogénique, les travaux de Gao et al (2007) ont démontré le rôle des cellules Th1 dans la perte osseuse. Ainsi, ces cellules vont participer à l'augmentation de la présentation antigénique favorisant la production de RANKL et donc la différenciation des ostéoclastes. De plus, le blocage des cellules Th1 n'inhibe pas le développement de la perte osseuse.

De plus en plus de preuves expérimentales ont montré que bloquer l'inflammation intestinale permet la diminution de la perte osseuse. Ainsi, les travaux de Reffitt et al (2006) ont montré que les patients en rémission présentaient une augmentation de leur masse osseuse. De plus, les traitements inflammatoires ont des effets positifs sur la rémission de la perte osseuse (Franchimont et al 2004). Bien que de nombreuses études décrivent les cellules Th17 comme participant à la perte osseuse, des travaux récents ont montrés que l'utilisation d'anticorps anti-IL-17 n'induisait pas une amélioration des symptômes.

De nombreux travaux ont montré le lien entre la perte osseuse et les cellules T CD4+ dans l'inflammation. Cependant, aucune étude n'a permis de définir avec précision la nature des cellules CD4+ pathogéniques responsables de la perte osseuse et leur lien avec l'inflammation intestinale.

D. Les modèles murins de la maladie de Crohn

Afin d'étudier les mécanismes physiologiques et cellulaires impliqués dans la maladie de Crohn, des modèles murins ont été mis en place. On peut distinguer les modèles où la maladie est due à l'injection de substances toxiques de ceux dont la maladie est sous le contrôle de cellules immunitaires. Les différents modèles d'études regroupent les principaux symptômes de la maladie à savoir une inflammation intestinale d'origine inflammatoire ainsi qu'une perte osseuse caractérisée.

1. *Souris IL10ko*

Les cellules régulatrices sont connues depuis de nombreuses années comme étant impliquées dans la régulation des réponses inflammatoires en agissant notamment sur les cellules T et les macrophages. La mise au point de souris déficiente en IL10 (Kuhn et al 1993) a mis en évidence le rôle des cellules régulatrices dans le contrôle de la réponse inflammatoire intestinale. Ces souris développent spontanément une inflammation du colon associée à une perte de poids en 3 à 6 mois. Ces souris présentent une absence de cellules régulatrices fonctionnelles et une augmentation de l'inflammation associée à des taux importants de cytokines inflammatoires. De plus, ces souris présentent des pertes osseuses au niveau de la zone alvéolaire de l'os (Al-Rasheed et al 2004). Chez ces souris, les lymphocytes T CD4+ inflammatoires ont un profil Th1 et les traitements anti-inflammatoires (anti-TNF α) sont capables de limiter la progression de la maladie (Scheinin et al 2003). De plus, l'apparition d'une colite chez ces souris est associée à une perte osseuse due à une diminution de l'os cortical les rendant ainsi ostéopéniques.

2. *Transfert de lymphocytes T chez la souris immunodéficiente Rag1ko*

Afin de mieux contrôler l'apparition de la maladie, le modèle de transfert des cellules T CD4+ naïves chez les souris immunodéficientes a été mis en place. Ce modèle, comme le modèle IL10 ko, associe une inflammation intestinale dépendante de la présence de cellules CD4+ avec une perte osseuse des os longs.

Ce modèle de transfert a été développé en 1993. Ce modèle consiste à l'injection de cellules CD4+ naïves (CD45RB high) chez des souris immunodéficientes SCID pour Severe combined Immunodeficiency (Morrissety et al 1993). Ces souris développent ensuite une sévère colite au bout de 5 semaines environ, associée à la plupart des signes de la maladie à savoir une perte de poids et une inflammation intestinale. De nos jours, le modèle a évolué pour

consister à l'injection de cellules CD4+ naïves dans des souris immunodéficientes Rag1ko ou Rag2ko (Byrne et al 2005). Comme dans le cas du modèle de souris IL-10ko, cette maladie se développe du fait de l'absence de cellules régulatrices. En effet, la co-injection de cellules naïves avec des cellules régulatrices se traduit par une absence de développement de la maladie (Asseman et al 2000).

Ces modèles d'étude ont permis de mettre en avant le rôle des cellules Th1 et TH17 dans le développement de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. L'implication de ces cellules dans la perte osseuse observée lors de la maladie reste encore à déterminer.

Objectifs du travail de thèse

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des affections immunologiques associant une dérégulation immunologique et une perte osseuse pathogénique. La moelle osseuse est un organe lymphoïde central dans la réponse immunitaire. Tout d'abord, c'est au sein de la moelle osseuse que sont produites les cellules du système immunitaire. De plus, la moelle osseuse est un organe de réserve des cellules CD4+ mémoires. Les cellules CD4+ mémoires régulent et coordonnent la réponse immunitaire. Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre le lien entre l'inflammation systémique et la perte osseuse observée lors des maladies inflammatoires chroniques. En effet, j'ai cherché à déterminer la ou les cellules CD4+ responsables de la perte osseuse observée lors de la maladie. De plus, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'augmentation de l'activité des ostéoclastes sur le système immunitaire.

Les cellules CD4+ mémoires sont les cellules orchestrant la réponse immunitaire. Ces cellules sont retrouvées dans la moelle osseuse tout au long de la maladie et permettent aux maintiens des signes cliniques de la maladie. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation d'une population mémoire CD4+ Th17TNF α + présente dans la moelle osseuse de souris malades, permettant de lier les systèmes immunitaires et osseux.

La perte osseuse observée lors de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin est due à une augmentation de l'activité des cellules résorbant l'os, les ostéoclastes. L'activité de ces cellules participe à la régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques dans des conditions physiologiques. Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules progénitrices de l'ensemble des cellules sanguines (lymphoïdes et myéloïdes). Lors de la maladie inflammatoire, on observe une augmentation de l'inflammation systémique corrélée avec une augmentation des cellules inflammatoires. Ainsi, lors de la deuxième partie de ma thèse je me suis intéressée à l'effet de l'activité du système osseux sur l'inflammation lors de la maladie de Crohn. Nous avons ainsi pu montrer l'effet de l'activité des ostéoclastes sur la niche des cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules inflammatoires.

Résultats

I. Identification et caractérisation d'une population T CD4+ ostéoclastogénique liant la perte osseuse et l'inflammation intestinale

A. Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des affections inflammatoires dont l'une des conséquences cliniques observées est une perte osseuse. Dans ces maladies, les observations cliniques ont montré que près de 40% des patients présentent une perte osseuse pouvant conduire à une ostéoporose dans les cas les plus graves (Tigl and al 2008, Ootlanders and al 2012).

La perte osseuse observée dans ces maladies provient d'une augmentation de la différenciation et de l'activité des cellules responsables de la résorption osseuse ; les ostéoclastes. Ces cellules sont issues de la fusion des cellules myéloïdes ; monocytes et cellules dendritiques (Boyle et al 2003 ; Rivollier et al 2004). La différenciation des ostéoclastes est dépendante de la présence de deux cytokines majeures ; le RANKL et le MCSF. Ces cytokines sont produites par les cellules mésenchymateuses mais aussi par les ostéoblastes (Calvi et al 2003 ; Simonet et al 1997). Les études ont montré que les cellules mésenchymateuses ne sont pas les seules responsables de l'activité ostéoclastique. Ainsi, le système immunitaire est un acteur majeur dans cette différenciation. En effet, la présence de cellules immunitaires et leur interaction avec les cellules osseuses participent à la régulation du remodelage osseux.

Le lien entre les cellules osseuses et les cellules immunitaires a été mis en avant grâce à l'utilisation de souris déficientes en RANKL (Kong et al 1999). Cette étude a montré que ces souris déficientes en RANKL présentent une ostéopétrose ainsi qu'une lymphopénie due à l'absence du développement des ganglions périphériques. De plus, les travaux de Kotake (2001), dans des modèles d'arthrite rhumatoïde, ont décrit une population T CD4+ inflammatoire produisant du RANKL, présente dans la synovie des patients. L'ensemble de ces travaux a mis en évidence une interaction entre les cellules immunitaires CD4+ et la perte osseuse pathogénique. Les études de Sato et al (2006) ont montré le rôle inducteur de la différenciation des ostéoclastes des cellules Th17 différenciées *in vitro*. Cette étude a montré qu'au contraire des cellules Th1 et TH2 produites *in vitro*, les cellules Th17 pouvaient induire la différenciation des monocytes en ostéoclastes. Enfin, les travaux de Wakkach et al (2008) ont démontré le rôle des cellules T CD4+ dans la différenciation des cellules dendritiques en ostéoclastes *in vivo*. Cependant, aucune étude n'a pu montrer l'interaction entre la perte osseuse et les cellules immunitaires dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Le but de notre travail a été de déterminer la nature des cellules CD4+ participant à la perte osseuse observée lors de ces maladies.

B. Résultats

Description et caractérisation d'une population T osteoclastogénique dans la moelle osseuse

Afin de répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser deux modèles murins des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; la souris IL10^{-/-} et la souris Rag1^{-/-} transférée avec des cellules CD4⁺ naïves. Ces souris associent à la fois une inflammation intestinale et une perte osseuse (Kuhn et al 1993 ; Byrne et al 2005).

Au contraire des souris contrôles, les souris IL10^{-/-} malades présentent une perte osseuse importante. Cette perte osseuse est associée à la présence d'une population T CD4⁺ ostéoclastogénique c'est-à-dire ayant la capacité d'induire la différenciation des monocytes en ostéoclastes (Fig 1).

La découverte de cette population nous a conduits à étudier le phénotype de ces cellules CD4⁺. Nous avons caractérisé ces cellules comme étant une population T CD4⁺ Th17 TNF α ⁺, absente chez les souris contrôles. L'étude du profil transcriptomique des cellules CD4⁺ IL17⁺ de la moelle osseuse a confirmé le profil inflammatoire de ces cellules. De façon intéressante, cette analyse transcriptomique a montré que les cellules Th17⁺ de la moelle osseuse produisent aussi du RANKL la cytokine nécessaire à la différenciation des ostéoclastes.

Etude des mécanismes d'action des cellules T Th17 TNF α +IFN γ -

La maladie inflammatoire chronique de l'intestin est associée à une augmentation de la production d'IL-7 par les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse. Nous avons montré que l'IL-7 produit par ces cellules permet le maintien du profil Th17 des cellules CD4⁺.

D'autre part, nous avons montré que ces cellules TH17 induisent la sécrétion des chimiokines nécessaires au recrutement des progéniteurs des ostéoclastes (MIP1 α /MCP1) par les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse. De plus, les cellules Th17 participent à la production de RANKL par les ostéoblastes exacerbant la différenciation des ostéoclastes.

Description d'une population Th17 TNF α chez l'homme

Nous avons décrit une population CD4⁺ Th17 TNF α présente dans le sang des patients atteints de la maladie de Crohn. Nous avons montré que ces cellules ont les mêmes caractéristiques que les cellules murines, à savoir la capacité d'induire la différenciation des ostéoclastes à partir des monocytes. Ces cellules induisent la production de MCP1 et MIP1 α par les cellules mésenchymateuses afin de recruter les monocytes.

C. Conclusion et Perspectives

Nos travaux ont permis de définir, pour la première fois, une population cellulaire inflammatoire Th17 TNF α + IFN γ - participant à la perte osseuse lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans des modèles murins et chez l'Homme.

Ces cellules Th17 TNF α + IFN γ -, présentes dans la moelle osseuse induisent la différenciation des ostéoclastes en produisant du RANKL, cytokine nécessaire à la différenciation des ostéoclastes.

Au cours de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin, la présence de cellules Th17 est associée à la pathogénicité de la maladie (Powrie et al 1994 ; Duhon et al 2013). Ces cellules Th17 pathogéniques sont produites en présence d'IL23. L'IL23 permet l'expression d'IFN γ + par les cellules vont être retrouvées au niveau de la lamina propria des souris (McGovern et al 2007 ; Geremia et al 2011). Notre étude a confirmé la présence de cette population Th17 IFN γ + dans la lamina propria des souris malades participant à l'inflammation intestinale. De façon intéressante, nous avons mis en évidence que les cellules CD4+ présentes au niveau de la moelle osseuse ne produisent pas d'IFN γ et produisent de l'IL17. L'IL-17 est la cytokine inflammatoire dont le potentiel ostéoclastogénique est le plus décrit (Shen et al 2005 ; Van Bezooijen et al 2002). Nous avons mis en évidence un changement de phénotype entre les cellules Th17 de la moelle osseuse et celles présentes au niveau du site inflammatoire. Cependant, l'origine de ce changement n'est pas déterminée. Il est possible qu'il y ait un recrutement spécifique des cellules Th17 IFN γ - dans la moelle osseuse, que l'environnement cellulaire participe à une perte de l'expression de cette cytokine, mais il est aussi possible que les cellules IFN γ + ne soient pas maintenues dans la moelle osseuse. L'étude des récepteurs de chimiokines présents sur les cellules Th17 IFN γ + et IFN γ permettrait de comprendre la différence de localisation des cellules. Il est important de noter que les cellules IL-17+ présentes dans la moelle osseuse expriment des taux importants de CXCR4. Ce récepteur de chimiokine va permettre l'interaction des cellules avec le CXCL12. Le couple CXCR4/CXCL12 est central dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques (Pélus et al 2002). Ces chimiokines pourraient participer au recrutement des cellules cd4+ dans la moelle osseuse.

La cytokine IL-7 a été décrite depuis quelques années comme participant à la survie des cellules CD4+. Ainsi, les travaux de Takahara et al (2013) ont montré que cette cytokine permet le maintien de ces cellules CD4+ pathogéniques *in vitro*. De plus, les travaux de Nemoto et al (2009) ont montré que l'intestin n'est pas le réservoir des cellules pathogéniques responsables du maintien à long terme de la maladie. En effet, la moelle osseuse sert de réservoir pour les cellules mémoires et l'IL-7 est apparu comme la cytokine permettant la survie de ces cellules CD4+ (Nemoto et al 2007 ; 2013). Nos résultats quant au rôle de l'IL-7 dans la survie des cellules CD4+ Th17 dans la moelle osseuse sont en accord avec les résultats précédemment publiés. Le maintien du profil Th17 en présence d'IL-7

laisse supposer un rôle pathogénique à long terme de cette population lymphocytaire CD4+ Th17 TNF α +. Cependant, la propriété de mémoire à long terme de cette population n'a pas été démontrée bien que l'étude des marqueurs des cellules CD4+ Th17 TNF α + présentes dans la moelle osseuse montre une surexpression du récepteur de l'IL-7. Nous avons aussi démontré que ces cellules Th17 de la moelle osseuse n'expriment pas le marqueur Ly6C décrit comme le marqueur des cellules mémoires à long terme dans la moelle osseuse (Tokoyoda et al 2009).

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à une accumulation des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse. Nous avons montré que les cellules T CD4+ induisent l'expression de chimiokines MIP1 α MCP1 par les cellules stromales mésenchymateuses participant ainsi au recrutement des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse. Ces cellules myéloïdes vont se différencier en ostéoclastes exacerbant la perte osseuse observée lors de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. De plus, les travaux de Griseri et al (2012) ont montré que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à une dérégulation de la différenciation hématopoïétique en faveur de la voie myéloïde. La présence de taux important d'IL-7 participe de plus, à la différenciation des cellules myéloïdes (Aiello et al 2007). Dans les conditions de stress, les ostéoclastes ont été décrits comme participant à la régulation des cellules souches hématopoïétiques en rompant les interactions des cellules hématopoïétiques avec leur niche (Kollet et al 2006). L'augmentation de l'activité ostéoclastique lors de la maladie chronique inflammatoire de l'intestin pourrait exacerber la maladie en permettant notamment la prolifération des cellules souches hématopoïétiques.

Enfin, nous avons mis en évidence la présence d'une population Th17 dans le sang de patients atteints de la maladie de Crohn. Nous avons pu montrer la présence de cellules Th17 CCR6 dans le sang des patients atteints de la maladie. Ces cellules sont capables d'induire la différenciation des monocytes en ostéoclastes. De plus, le marqueur CCR6 a été décrit comme permettant la migration des cellules dans l'intestin (Pène et al 2007 ; Paulissen et al 2015). Ces cellules pourraient donc avoir une double fonction ; participer à l'inflammation intestinale mais aussi à l'exacerbation de la maladie en induisant la perte osseuse.

L'ensemble de ces travaux ont mis en évidence le lien entre l'inflammation intestinale et la perte osseuse. Nous avons ainsi pu démontrer que des cellules Th17 TNF α produites lors de la maladie migrent dans la moelle osseuse où elles induisent le recrutement des cellules myéloïdes inflammatoires et leur différenciation en ostéoclastes. Il reste cependant certains éléments à décrypter. Tout d'abord, l'élucidation des mécanismes de recrutement et de maintien des cellules T dans la moelle osseuse permettraient la mise au point de mécanismes de mobilisation de ces cellules et leur élimination. De plus, les cellules T pathogéniques sont maintenues à long terme dans la moelle osseuse. L'étude des cellules T CD4+ présentes dans l'IBD laisse supposer que ces cellules ont un phénotype effecteur. Il

serait intéressant de déterminer d'autres marqueurs afin de caractériser les cellules mémoires à maintenues à long terme dans la moelle osseuse, responsables de la maladie. Les cellules CD4+ de la moelle osseuse seraient donc une population cible dans la lutte contre la maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

ORIGINAL ARTICLE

Bone marrow Th17 TNF α cells induce osteoclast differentiation, and link bone destruction to IBD

Thomas Ciucci,^{1,2} Lidia Ibáñez,^{1,2} Agathe Boucoiran,^{1,2} Eléonore Birgy-Barelli,^{1,2} Jérôme Pène,^{3,4} Grazia Abou-Ezzi,^{1,2} Nadia Arab,⁵ Matthieu Rouleau,^{1,2} Xavier Hébuterne,^{2,5} Hans Yssel,^{3,4} Claudine Blin-Wakkach,^{1,2} Abdelilah Wakkach^{1,2}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306947>).

¹CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de médecine, 28 avenue de Valombrose, Nice, France

²Université Nice Sophia Antipolis, parc Valrose, Nice, France

³Inserm, U844, Hôpital saint Eloi, Montpellier, France

⁴Université Montpellier 1, 5 bd Henri IV 34967, Montpellier, France

⁵Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, service de gastro-entérologie et nutrition, Nice, France

Correspondence to

Dr Abdelilah Wakkach, CNRS, UMR 7370, LP2M, Faculté de médecine, 28 avenue de valombrose, Nice 06107, cedex 2, France; wakkach@unice.fr

LI and AB contributed equally.

Received 8 February 2014

Revised 10 September 2014

Accepted 12 September 2014

To cite: Ciucci T, Ibáñez L, Boucoiran A, et al. *Gut* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/gutjnl-2014-306947

ABSTRACT

Objective Under both physiological and pathological conditions, bone volume is determined by the rate of bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts. Excessive bone loss is a common complication of human IBD whose mechanisms are not yet completely understood. Despite the role of activated CD4⁺ T cells in inflammatory bone loss, the nature of the T cell subsets involved in this process *in vivo* remains unknown. The aim of the present study was to identify the CD4⁺ T cell subsets involved in the process of osteoclastogenesis *in vivo*, as well as their mechanism of action.

Design CD4⁺ T cells were studied in IL10^{-/-} mice and Rag1^{-/-} mice adoptively transferred with naive CD4⁺CD45RB^{high} T cells, representing two well-characterised animal models of IBD and in patients with Crohn's disease. They were phenotypically and functionally characterised by flow cytometric and gene expression analysis, as well as in *in vitro* cocultures with osteoclast precursors.

Results In mice, we identified bone marrow (BM) CD4⁺ T cells producing interleukin (IL)-17 and tumour necrosis factor (TNF)- α as an osteoclastogenic T cell subset referred to as Th17 TNF- α ⁺ cells. During chronic inflammation, these cells migrate to the BM where they survive in an IL-7-dependent manner and where they promote the recruitment of inflammatory monocytes, the main osteoclast progenitors. A population equivalent to the Th17 TNF- α ⁺ cells was also detected in patients with Crohn's disease.

Conclusions Our results highlight the osteoclastogenic function of the Th17 TNF- α ⁺ cells that contribute to bone loss *in vivo* in IBD.

INTRODUCTION

Inflammation is a module of host defence immune responses against pathogens or danger signals. Persistence of these responses results in chronic inflammatory diseases that are often associated with bone destruction even when the inflammatory site is not the bone, as in IBD or Crohn's disease (CD).¹⁻³ Indeed, bone loss has been reported in more than 40% of patients with IBD and remains a major extraintestinal cause of morbidity leading to an impaired quality of life and productivity.² The prevalence of osteopenia and osteoporosis in patients with IBD ranges from 22%–77% to

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Patients with IBD have an increased risk for bone loss and fractures.
- Th1 and Th17 cells are involved in the pathogenesis of IBD.
- *In vitro*, Th17 cells are able to increase the differentiation of osteoclasts induced by exogenous receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANK-L) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF).
- We have previously reported that CD4⁺ T cells contribute to the differentiation of osteoclasts *in vivo* in an osteoprotective mouse model.

What are the new findings?

- The identification of bone marrow (BM) CD4⁺ T cells producing interleukin (IL)-17 and tumour necrosis factor (TNF)- α , but not interferon- γ , as osteoclastogenic T cells, as demonstrated by their capacity to induce osteoclast differentiation without addition of exogenous RANK-L and M-CSF, in two well-characterised models of IBD.
- Th17 TNF- α ⁺ cells induce the expression of osteoclastogenic factors by BM mesenchymal stromal cells and the recruitment of inflammatory monocytes that are osteoclast precursor cells in the BM.
- IL-7 is essential for the survival of osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells in the BM.
- The presence of an equivalent Th17 TNF- α ⁺ population in patients with Crohn's disease.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- The present study highlights that the BM Th17 TNF- α ⁺ population corresponds to an osteoclastogenesis-inducer population that maintains a vicious circle linking inflammation and bone destruction. These cells, therefore, represent a potential target for innovative immunotherapeutic strategies against chronic intestinal inflammation and bone loss.
- Because bone loss is associated with the pathology of other chronic inflammatory diseases, these results may also have broader implications.

Inflammatory bowel disease

17%–41%, respectively, depending on the populations, location or study design.^{4,5}

Osteoclasts (OCL) are multinucleated cells from the monocyte/macrophage lineage that degrade bone matrix and dynamically remodel the skeleton.⁶ Bone remodelling is a highly regulated process involving complex interactions between bone-forming osteoblasts (OBL) and bone-resorbing OCLs. These interactions require cell–cell contact, production of cytokines and the generation of coupling factors during bone resorption.⁷ A precise regulation of this process is a prerequisite for normal bone homeostasis and an imbalance is often linked to metabolic bone diseases in humans, such as osteoporosis and inflammatory bone loss. The generation of OCLs is supported by OBLs that produce macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANK-L), the two essential signals for OCL differentiation from myeloid cells, such as inflammatory monocytes, macrophages or dendritic cells.^{8,9} It has become clear that systemic inflammation induces high levels of circulating inflammatory immune cells that can interact with bone cells through multiple pathways and that, in turn, synergise to cause severe bone destruction, independently of other possible causes such as vitamin D and calcium deficiency, or steroid treatment.¹⁰ However, the immunological link between chronic intestinal inflammation and bone destruction is still poorly understood.

Among these immune cells, activated CD4⁺ T cells have been involved in bone destruction associated with chronic inflammation.¹¹ We have shown that presence of CD4⁺ T cells contributes to the differentiation of OCL *in vivo* in the pathological osteopetrotic *oc/oc* model of mice that are defective in OCL resorptive function.⁹

In vitro differentiated CD4⁺ Th1 and Th2 cells have been shown to inhibit osteoclast formation through their canonical production of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-4, respectively.¹² By contrast, *in vitro* differentiated Th17 cells act as an osteoclastogenic helper T cell subset resulting from their production of IL-17.¹² IL-17 was associated with increased osteoclastogenesis in chronic inflammation. IL-17 is abundant in rheumatoid arthritis synovial fluid and stimulate osteoclastogenesis by inducing RANK-L expression on OBLs.¹³ IL-17-deficient mice are resistant to bone destruction induced by lipopolysaccharide.¹² Otherwise, Oostlander *et al*³ suggested a particular role for IL-17 in osteoclastogenesis in patients with CD. However, despite the implication of CD4⁺ T cells in inflammatory bone loss, the nature of the T cell subsets involved in this process and how they act *in vivo* remains unknown.

The aim of the present study was to identify and characterise such osteoclastogenic Th cells responsible for bone destruction during chronic intestinal inflammation using two well-characterised models of IBD with bone destruction, as well as blood from patients with CD. The results revealed that CD4⁺ T cells producing IL-17- and tumour necrosis factor (TNF)- α - but not IFN- γ , are able to recruit osteoclast progenitor cells to the bone marrow (BM) and to induce osteoclastogenesis, and to link chronic inflammation and bone destruction thereby maintaining this vicious circle in IBD.

MATERIALS AND METHODS

Mice

BALB/c IL10^{-/-} and C57BL/6 IL10^{-/-} mice were obtained from the Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal (CDTA, Orléans, France). Clinical signs of IBD were determined by weight loss, hunching and diarrhoea which was generally observed in about 60% of mice,

both male and female, irrespective of their genetic background, 4 months after birth, at which time the animals were sacrificed and analysed. For each experiment, three groups of mice without (IL-10^{-/-}) or with clinical signs of IBD (IBD IL-10^{-/-}), as well as control wild-type (WT) mice, consisting of five to six animals each, were studied.

C57BL/6 Rag1^{-/-} mice were obtained from Charles River laboratories (Wilmington, USA). WT BALB/c and C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Mice were bred and maintained in the animal facility of the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (Nice, France) in accordance with the general guidelines of the Direction des Services Vétérinaires.

Lymphocytes isolation

CD4⁺ T cells were isolated from the spleen, mesenteric lymph nodes (MLN) and BM as previously described,¹⁴ using the negative selection Kit CD4⁺ according to manufacturer's protocol (Life technologies, St Aubain, France).

CD4⁺ IL-17 and TNF- α -producing cells referred to as Th17 TNF- α ⁺ cells, were enriched from BM of IBD IL-10^{-/-} mice using above mentioned kit (Life technologies, St Aubain, France) and stimulated for 2 h with phorbol myristate acetate (PMA) (10 ng/mL) and ionomycin (1 μ g/mL). CD4⁺ T cells secreting IL-17 were enriched with IL-17-secreting assay according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Paris, France) and sorted using FACSAria flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont le Claix, France).

Patients and human T cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from freshly collected, heparinised peripheral blood of healthy voluntary donors and patients with CD (Department of gastroenterology, CHU of Nice, France) by centrifugation over Ficoll-Hypaque. The protocol was approved by the local ethics committee of the Hospital Center of Nice University, and all 15 patients and 10 control subjects who were included in this study provided a signed informed consent.

PBMC were stained with a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 monoclonal antibody (mAb) and a phycoerythrin-conjugated anti-CCR6 mAb and CCR6⁺ and CCR6⁻ T cells were purified using a FACSAria cell sorter that were cloned by limiting dilution and selected T cell clones were used in subsequent experiments. Cloning and culture procedure, as well as characterisation of the T cell clones, based on their cytokine production profile have been described previously.¹⁵

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm SD. The level of statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Dunnett's t test for the experiments with the 3 groups and Student t test for the two experimental groups. p Values <0.05 were considered significant.

Supplementary material

Protocols for adoptive transfer experiment, *in vitro* Th17 TNF- α ⁺ differentiation, *in vitro* OCL differentiation and real-time quantitative PCR are provided in online supplemental materials.

RESULTS

Only IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice with chronic intestinal inflammation develop bone destruction

IL-10^{-/-} mice gradually develop a chronic intestinal inflammation that shares histopathological features with IBD in humans.

They also develop severe bone destruction with age as previously described.¹⁶ In agreement with this notion, microscanner analysis showed a bone destruction and a dramatic decrease in trabecular thickness, trabecular number, bone surface density and in the trabecular bone volume per tissue volume only in IBD IL-10^{-/-} mice, as compared with healthy IL-10^{-/-} and control mice (figure 1A, B). No significant differences in the incidence of these parameters were observed between healthy IL-10^{-/-} and WT mice, indicating that bone destruction in IL-10^{-/-} mice is dependent on the development of intestinal inflammation rather than on the mere absence of IL-10. Similar results were obtained irrespective of the genetic background (C57BL/6 or BALB/c) or the sex of the IL-10^{-/-} mice (data not shown).

To analyse the ability of BM CD4⁺ T cells to induce OCL differentiation, CD4⁺ T cells were isolated from the BM of IBD

IL-10^{-/-}, healthy IL-10^{-/-} or control mice and their osteoclastogenic effect was tested *in vitro* in coculture with WT monocytes (OCL precursors) and with WT OBLs generated from mouse calvaria, as well as in coculture with the mouse osteoclastic cell line RAW264.7. The formation of OCLs was evidenced by the presence of multinucleated cells (≥ 3 nuclei) expressing the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), a common marker of OCLs.

As shown in figure 1C, after 8 days of coculture, only BM CD4⁺ T cells from IBD IL-10^{-/-} mice, but not those from healthy IL-10^{-/-} or WT mice, were able to induce OCL formation in both monocyte and RAW264.7 cell differentiation models. It is of note that the induction of OCL differentiation by this population of CD4⁺ T cells did not require addition of RANK-L and M-CSF. These results suggested the presence of an osteoclastogenic CD4⁺ T cell population in the BM of IBD

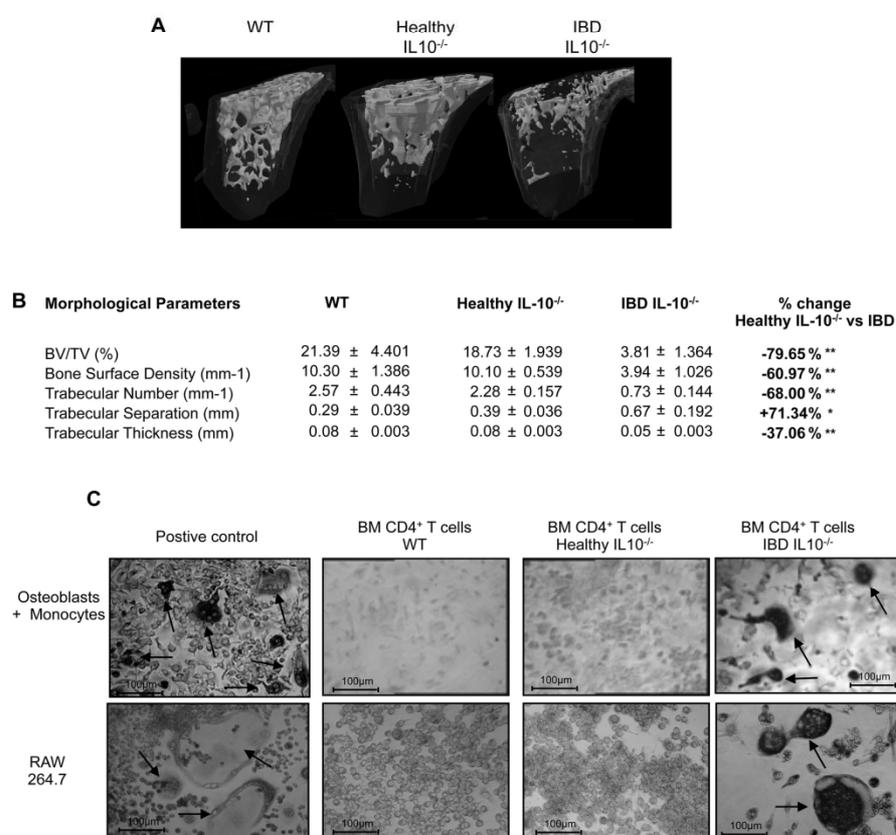


Figure 1 Bone marrow (BM) CD4⁺ T cells induce osteoclast (OCL) differentiation leading to osteopenia, in interleukin (IL)-10^{-/-} mice with IBD. (A) Longitudinal and cross-sectional μ Ct reconstruction of the distal femur of IL-10^{-/-} mice afflicted with IBD (IBD IL-10^{-/-}), IL-10^{-/-} mice that had not yet developed IBD (healthy IL-10^{-/-}) and control littermates (WT, wild type). (B) Morphological analysis by μ Ct of the femur from WT, healthy IL-10^{-/-}, and IBD IL-10^{-/-} mice. Trabecular indices were computed from μ Ct scans. BV/TV: trabecular bone volume per tissue volume. The data are presented as the mean \pm SD of 6 mice per group. One-way analysis of variance followed by a Dunnett's test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus healthy IL-10^{-/-}). (C) Purified BM CD4⁺ T cells were added to WT monocytes cocultured with WT osteoblasts generated from mouse calvaria, or to the mouse osteoclastic cell line RAW264.7 in the presence of phytohaemagglutinin (1 μ g/mL) during 8 days. Multinucleated cells (OCLs) were analysed for their tartrate-resistant acid phosphatase activity. Coculture of osteoblasts and WT monocytes in the presence of 10⁻⁸ M VitD3 and 10⁻⁸ M dexametasone, or RAW264.7 cells treated with 50 ng/mL receptor activator of nuclear factor κ B ligand served as a positive control. A representative result of three independent experiments with 5 mice per group and with similar results is shown.

Inflammatory bowel disease

IL-10^{-/-} mice that might be involved in increased OCL differentiation *in vivo*.

Accumulation of Th17 TNF- α ⁺ cells in the BM of IL-10^{-/-} mice with IBD

To determine the nature of this potentially osteoclastogenic CD4⁺ Th cell subset present in IBD IL-10^{-/-} mice, CD4⁺ T cells were isolated from the spleen, MLN, lamina propria (LP) and BM of control, healthy IL-10^{-/-} or IBD IL-10^{-/-} mice, and their cytokine production profile was determined by intracellular cytokine analysis by flow cytometry. This analysis revealed in IBD IL-10^{-/-}, but not healthy IL-10^{-/-} and WT mice, the emergence of a CD4⁺ T cell population, expressing

IL-17A and TNF- α (figure 2A, B). Although a significant fraction of these CD4⁺ T cells isolated from the LP, MLN and spleen from IBD IL-10^{-/-} mice also produced IFN- γ , production of this cytokine by BM Th17 TNF- α ⁺ cells was undetectable (figure 2C). In subsequent experiments, BM Th17 TNF- α ⁺ cells of IBD IL-10^{-/-} mice were enriched using IL-17 secreting assay to further analyse their phenotype. We have shown that about 26% of the Th17 TNF- α ⁺ cells, but none of the CD4⁺IL-17⁻ T cells expressed the membrane-bound form of RANK-L (mRANK-L) (figure 2D). Additionally, quantitative PCR on the purified cells showed that the Th17 TNF- α ⁺ cells expressed *Il-22*, *Roryt*, *M-csf*, *Ccr6* and *Cxcr4* at much higher levels than CD4⁺IL-17⁻ cells, whereas, in contrast, these latter

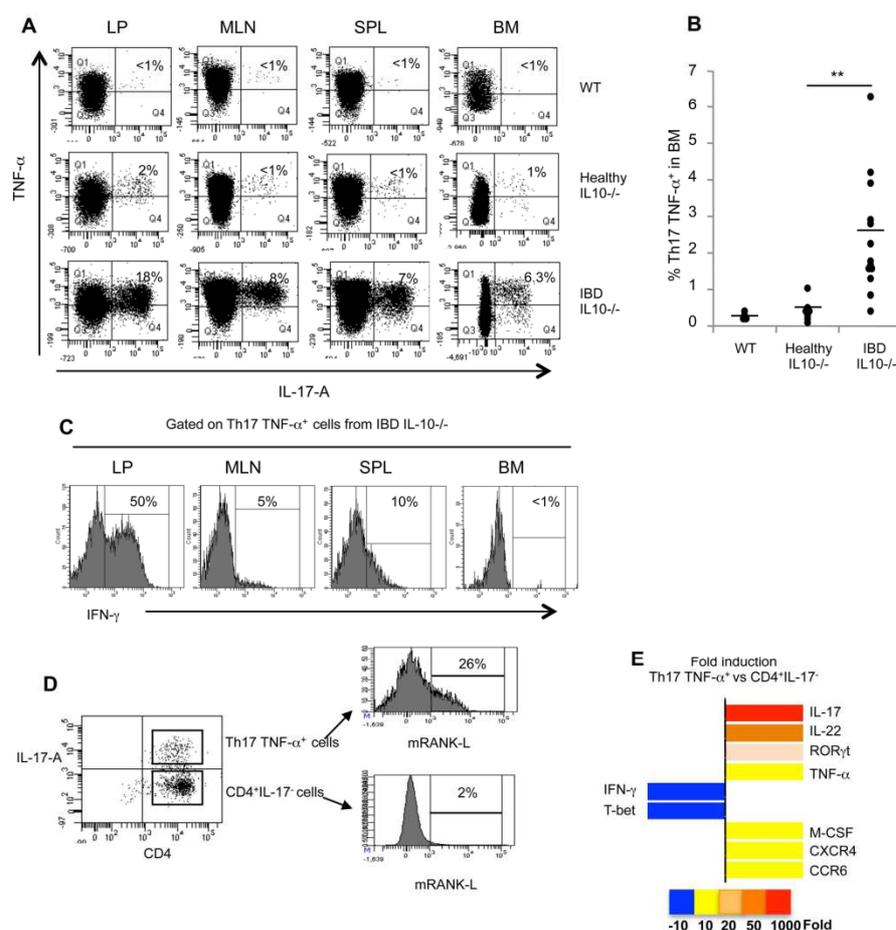


Figure 2 Characterisation of bone marrow (BM) CD4⁺ T cells from IBD interleukin (IL)-10^{-/-} mice. (A) Analysis of cytokine expression of CD4⁺ T cells from lamina propria (LP), mesenteric lymph nodes (MLN), spleen (SPL) and BM of wild type (WT), healthy IL-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice was assessed by intracellular flow cytometry after *in vitro* restimulation with phorbol myristate acetate and ionomycin. (B) Frequency of Th17 tumour necrosis factor (TNF)- α ⁺ cells in the BM of WT, healthy IL-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice. One-way analysis of variance followed by a Dunnett's test (***p*<0.01 versus healthy IL-10^{-/-}). (C) Intracytoplasmic interferon (IFN)- γ staining on Th17 TNF- α ⁺ cells from IBD IL-10^{-/-} mice. The experiment was repeated more than 3 times with similar results. (D) FACS analysis of membrane-bound receptor activator of nuclear factor κ B ligand (mRANK-L) on sorted BM Th17 TNF- α ⁺ cells from IBD IL-10^{-/-} mice after enrichment with IL-17-secreting assay. (E) Gene expression of *Il-17*, *Il-22*, *Tnfa*, *Ifn γ* , *M-csf*, *Roryt*, *T-bet*, *Ccr6* and *Cxcr4* was analysed by quantitative PCR on sorted Th17 TNF- α ⁺ cells and CD4⁺IL-17⁻ T cells. The data are presented as fold induction of gene expression in Th17 TNF- α ⁺ cells versus CD4⁺IL-17⁻ T cells. Data are representative of three independent experiments.

cells strongly expressed *T-bet* and *IFN- γ* (figure 2E). Collectively, these results confirmed that the Th17 TNF- α ⁺ cells are related to the Th17 cell population. Because of their selective expression of M-CSF and mRANK-L, but not IFN- γ described as an inhibitor of OCL differentiation,^{17 18} these cells represent a good candidate for an OCL-inducer Th cell subset.

BM Th17 TNF- α ⁺ cells are potent inducers of OCL differentiation

The osteoclastogenic capacity of BM T cells was tested in the two models of OCL differentiation described above. In both systems, only the Th17 TNF- α ⁺ cells induced the differentiation of multinucleated TRAP⁺ cells (figure 3A) able to resorb mineralised matrix, thus corresponding to true OCLs (figure 3B). These results underlined the osteoclastogenic potential of the Th17 TNF- α ⁺ cells. As expected, osteoprotegerin inhibits OCL differentiation whatever the culture system (figure 3C). In coculture between monocytes, OBLs and Th17 TNF- α ⁺ cells, addition of anti-TNF- α or anti-IL17 neutralising antibodies inhibited OCL differentiation, which is consistent with the known effect of IL-17 and TNF- α on OBL expression of RANK-L (figure 3C). When using coculture of RAW cells and Th17 TNF- α ⁺ cells, addition of anti-IL17 antibodies had only a weak effect on OCL

differentiation, whereas anti-TNF- α was a potent inhibitor of this differentiation (figure 3C). These results indicate that IL-17 has not a major direct effect on OCL precursors.

Additionally, we sought to demonstrate the presence of this population in the well-characterised model of IBD induced by the transfer of naive CD4⁺CD45RB^{high} T cells into syngenic Rag1^{-/-} mice. Intraperitoneal injection of CD45RB^{high} T cells from WT or IL-10^{-/-} mice into Rag1^{-/-} mice induced, after 8 weeks, the development of clinical signs of colitis^{19 20} as well as bone destruction.²¹ Analysis of intracytoplasmic cytokine expression showed that BM Th17 TNF- α ⁺ cells are induced whatever the origin of injected T cells (from IL-10^{-/-} or WT mice) (figure 3D), indicating that the differentiation of these cells *in vivo* is independent from the presence or absence of IL-10. Additionally, these observations further strengthened the link between inflammation, bone destruction and the activity of Th17 TNF- α ⁺ cells.

IL-7 is essential for the survival of osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells

The BM is a preferential site for maintenance of memory T cells.^{22 23} Flow cytometric analysis of BM Th17 TNF- α ⁺ cells from IBD IL-10^{-/-} mice revealed that they are CD44^{hi}CD62L⁻

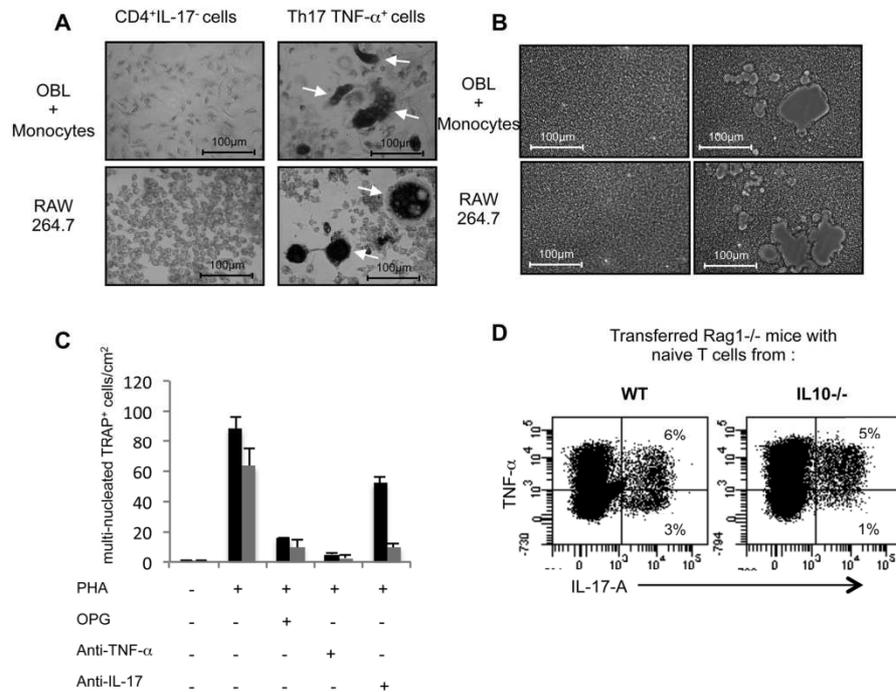


Figure 3 Bone marrow (BM) Th17 tumour necrosis factor (TNF)- α ⁺ cells represent an osteoclastogenic T cell subset. (A) Sorted BM Th17 TNF- α ⁺ cells were cultured with wild type (WT) monocytes and WT osteoblasts (OBL) generated from mouse calvaria, or with RAW264.7 cells in the presence of phytohaemagglutinin (PHA) (1 μ g/mL) for 8 days. Osteoclasts (OCLs) were analysed for their tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. (B) Resorption activity was assessed on a hydroxy-apatite-coated disc for cells cultured as indicated above (C) Enumeration of TRAP-positive multinucleated OCLs. Th17 TNF- α ⁺ cells were added to WT monocytes cocultured with WT OBLs generated from mouse calvaria (gray bar), or to the mouse osteoclastic cell line RAW264.7 in the presence of PHA (1 μ g/mL) (black bar) and in the presence or absence of neutralising anti-IL-17, anti-TNF- α monoclonal antibodies (10 μ g/mL each) or osteoprotegerin (OPG) (100 ng/mL), during 8 days as indicated. (D) Rag1^{-/-} mice were transferred with 4.10⁵ CD4⁺CD45RB^{high} T cells from WT or healthy IL-10^{-/-} donors and sacrificed when recipients developed clinical signs of disease (approximately 8 weeks after transfer). IL-17A and TNF- α expression in BM CD4⁺ T cells was assessed by intracellular flow cytometry after *in vitro* restimulation with phorbol myristate acetate and ionomycin. Data are representative of the results from two independent experiments.

Inflammatory bowel disease

(data not shown) and IL-7R⁺ (figure 4A) but that they do not express Ly6C, a marker of BM dormant memory T cells. These results suggested that the BM Th17 TNF α ⁺ cells correspond to memory cells with an effector phenotype.

To further analyse the role of IL-7 on the survival of the Th17 TNF α ⁺ cells, CD4⁺ T cells isolated from the BM of IBD IL-10^{-/-} mice were treated with IL-7, or IL-2 as negative control. After 7 days of IL-7 treatment, the frequency of the Th17 TNF α ⁺ cells was fourfold increased as compared with treatment with IL-2 (figure 4B). We next explored whether Th17 TNF α ⁺ cells could be generated and expanded *in vitro* in the presence of IL-7. Repeated stimulation and subsequent culture of naive T cells under Th17 cell-polarising conditions in the presence of IL-7 resulted in the generation of a CD4⁺ T cell population consisting of about 60% of Th17 TNF α ⁺ cells (figure 4C). These *in vitro*-generated cells shared the same phenotypical and functional characteristics than those isolated *ex vivo* in that they were IL-7R⁺, but did not produce IFN γ and did not express Ly6C at their cell surface (figure 4D).

Moreover, they were able to induce OCL differentiation from monocytes (figure 4E), as well as from RAW264.7 cells (data not shown). In order to determine whether the survival of osteoclastogenic T cells induced by stromal cells could be mediated by IL-7 *in vivo*, the presence of IL-7 transcripts was determined in BM stromal cells purified as described.²⁴ The results showed an increased expression of IL-7 in purified CD45⁻ Ter119⁻ CD3⁻ CD19⁻ CD31⁻ stromal cells from IBD IL-10^{-/-} mice, as compared with cells from healthy IL-10^{-/-} and control mice (figure 4F). Collectively, these findings suggested that the osteoclastogenic Th17 TNF α ⁺ cell population is likely to reside in the BM of mice with IBD in an IL-7-dependent manner.

Th17 TNF α ⁺ cells promote the recruitment of inflammatory monocytes, OCL precursors, during IBD

The increase in OCL differentiation leading to bone destruction in IBD necessitates a higher recruitment of OCL precursors into

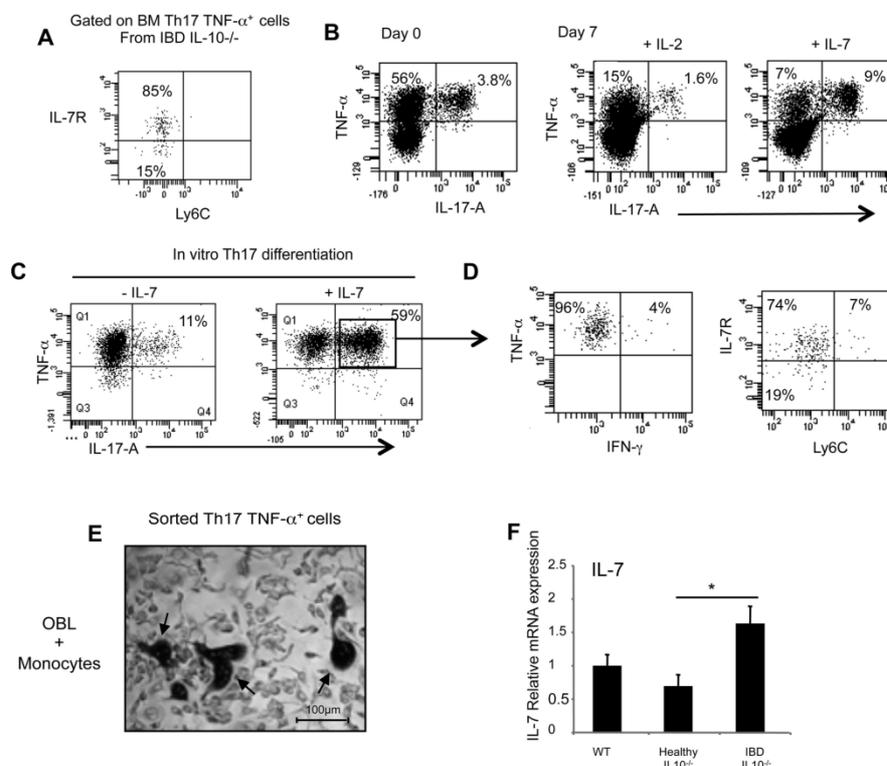


Figure 4 Interleukin (IL)-7 is essential for the osteoclastogenic Th17 tumour necrosis factor (TNF)- α ⁺ cell survival. (A) Phenotypical analysis by flow cytometry of bone marrow (BM) Th17 TNF α ⁺ cells. (B) Intracellular flow cytometry of IL-17A and TNF α in enriched BM CD4⁺ T cells from IBD IL-10^{-/-} mice. T cells were stimulated with CD3/CD28 beads in the presence of IL-2 (2 ng/mL) or IL-7 (10 ng/mL) for 7 days. (C) Representative flow cytometry of IL-17A and TNF α expression after repeated stimulation of naive T cells under Th17 cell-polarising conditions in the presence of IL-7. (D) Intracellular flow cytometry of TNF α and interferon (IFN)- γ and FACS analysis of IL-7 receptor (IL-7R) and Ly6C on purified Th17 TNF α ⁺ cells differentiated *in vitro*. A representative result of three independent experiments. (E) Purified Th17 TNF α ⁺ cells were added to wild type (WT) monocytes co-cultured with WT osteoblasts (OBL) generated from mouse calvaria in the presence of PHA (1 μ g/mL) during 8 days. Multinucleated cells (OCLs) were analysed for their tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. (F) The gene expression of *Il-7* was analysed by quantitative PCR on sorted CD45⁻ Ter119⁻ CD3⁻ CD19⁻ CD31⁻ stromal cells from WT, healthy IL-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice. Data represent pooled results from three independent experiments. One-way analysis of variance followed by a Dunnett's test (**p*<0.05 versus healthy IL-10^{-/-}).

the BM. Thus, OCL differentiation was performed *in vitro* from equal numbers of total BM cells from control, healthy IL-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice.

Enhanced osteoclastogenesis was only obtained with BM cells from IBD IL-10^{-/-} mice, which was consistent with the characteristic bone loss of these animals (figure 5A). Increased

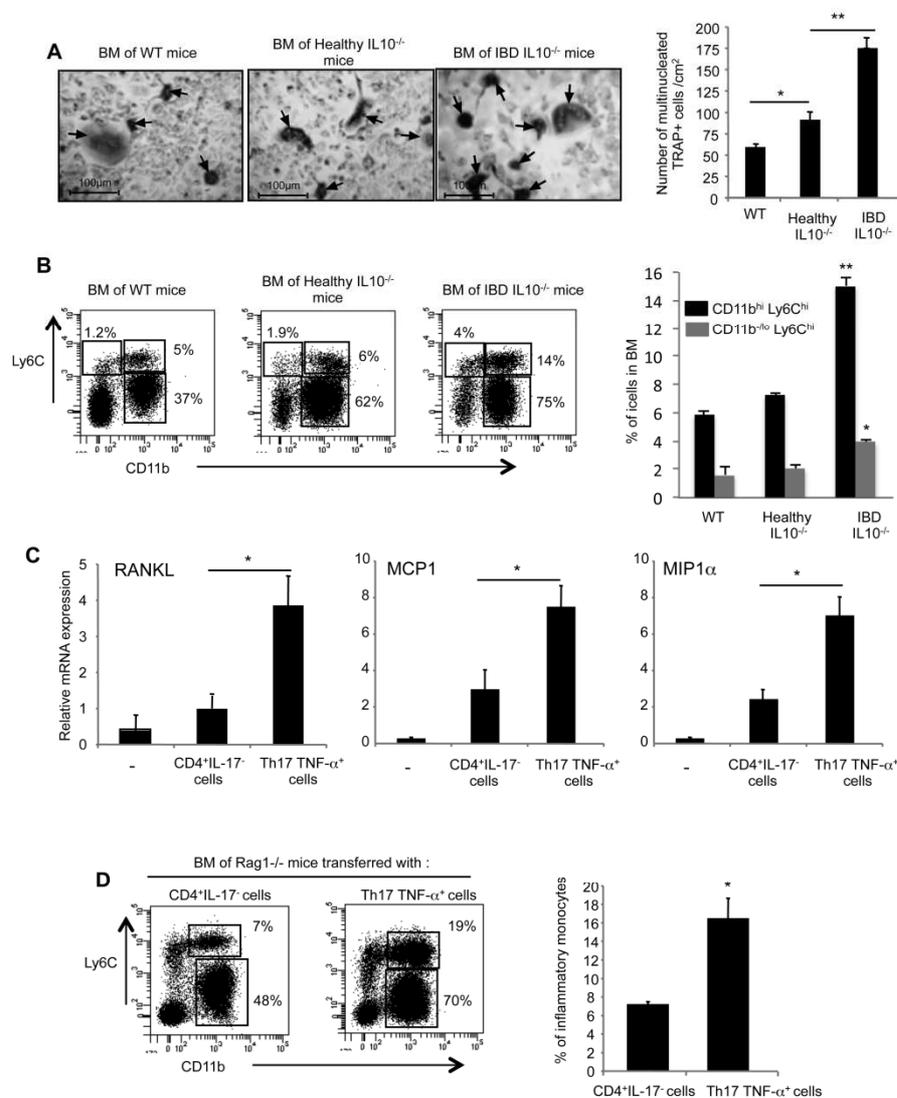


Figure 5 Th17 tumour necrosis factor (TNF)- α ⁺ cells promote a recruitment of inflammatory monocytes, into bone marrow (BM) during IBD. (A) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining of osteoclasts differentiation of total BM cells from wild-type (WT), healthy interleukin (IL)-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's test (*p<0.05 and **p<0.01 versus healthy IL-10^{-/-}). (B) Representative flow cytometry analysis of CD11b^{hi}Ly6C^{hi} and CD11b^{lo}Ly6C^{hi} cells from BM cells of WT, healthy IL-10^{-/-} and IBD IL-10^{-/-} mice, and their frequency. One-way ANOVA followed by a Dunnett's test (*p<0.05 and **p<0.01 versus healthy IL-10^{-/-}). Data represent pooled results from two independent experiments with 5 mice per group. (C) The gene expression of *RANK-L*, *Mcp1* and *Mip1 α* , was analysed by quantitative PCR on sorted WT CD45⁻ Ter119⁻ CD3⁻ CD19⁻ CD31⁻ stromal cells cocultured 2 days with sorted Th17 TNF α ⁺ cells or CD4⁺IL-17⁻ T cells. Data represent pooled results from three independent experiments *p<0.05 was calculated with a Student t test. (D) 10⁶ cells of sorted *in vitro* differentiated Th17 TNF α ⁺ cells or CD4⁺IL-17⁻ T cells were transferred into Rag1^{-/-} mice previously immunised intraperitoneally twice with 50 μ g of ovalbumin protein. Seven days later, flow cytometry analysis of CD11b⁺Ly6C⁺ cells from BM cells of Rag1^{-/-} mice were performed and frequency of these cells are indicated. *p<0.05 was calculated with a Student t test. Data represent pooled results from two independent experiments.

Inflammatory bowel disease

osteoclast differentiation potential in IBD IL-10^{-/-} mice could result from an increased number of precursor cells. Interestingly, flow cytometric analysis of CD11b^{hi}Ly6C^{hi} inflammatory monocytes and CD11b^{lo}Ly6C^{hi} cells (representing OCL precursors recently described by Charles *et al*²⁵) showed that these populations were increased in the BM of IBD IL-10^{-/-} mice, as compared with healthy IL-10^{-/-} and control mice (figure 5B).

BM mesenchymal stromal cells (BM MSC) have been reported to be a major producer of soluble factors, including chemokines. We analysed, therefore, the expression of chemokines known to attract inflammatory monocytes, by purified BM MSCs from control mice and cocultured with sorted Th17 TNF- α ⁺ cells. These stromal cells expressed higher levels of *Mcp1*, *Mip1 α* and *Rank-l* compared with stromal cells in coculture with sorted CD4⁺IL-17⁺ T cells (figure 5C). Confirming the role of Th17 TNF- α ⁺ cells in the recruitment of inflammatory monocytes, adoptive transfer of these cells into Rag1^{-/-} mice significantly increased the percentage of CD11b⁺Ly6C⁺ monocytes in the BM after 7 days (figure 5D). Altogether, these results indicate that the recruitment of CD11b⁺Ly6C⁺ inflammatory monocytes in BM during IBD is associated with the presence of Th17 TNF- α ⁺ cells that induce *Mcp1* and *Mip1 α* expression by BM MSCs.

Identification of Th17 TNF- α ⁺ cells in patients with Crohn's disease

We finally extended our analysis of osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells to human patients affected with CD. Classical human Th17 cells are known to express the CCR6 chemokine receptor.²⁶ Thus, CD4⁺ T cells were purified from PBMCs of healthy subjects and patients with CD according to their CCR6 expression. CCR6⁺ and CCR6⁻ cells were assessed by flow cytometry for their ability to produce IL-17 and TNF- α in response to stimulation with PMA and ionomycin. As shown in figure 6, Th17 TNF- α ⁺ cells are included only in the CCR6⁺ fraction from PBMCs of patients with CD. By contrast, peripheral blood CD4⁺ CCR6⁻ T cells from both healthy subjects and patients with CD were not capable of producing IL-17 (figure 6A,B). To evaluate the osteoclastogenic effect of human Th17 TNF- α ⁺, we have cloned these cells from the peripheral blood of a patient with CD (figure 6C). None of these T cell clones did produce IFN- γ (data not shown). Coculture of three of these clones with RAW264.7 cells resulted in the induction of giant multinucleated TRAP⁺ OCLs (≥ 9 nuclei) (figure 6D). Furthermore, unlike Th1 cells, the Th17 TNF- α ⁺ cell clones induced osteoclast differentiation from allogeneic monocytes (figure 6E).

Similarly, human osteoblasts (hOST) cultured in the presence of supernatants from these T cell clones expressed high levels of *Mcp1* and *Mip1 α* (figure 6F). These results suggested that the human Th17 TNF- α ⁺ cells probably have a similar mechanism of action than the murine equivalent population.

DISCUSSION

The mechanisms linking inflammation with bone destruction are still incompletely understood, in particular, with respect to the role of CD4⁺ T cells. In the present study, we have identified, for the first time, the Th17 TNF- α ⁺ T cells as potent inducers of OCL differentiation in the context of CD in mouse and human. Using two well-characterised models of IBD that develop bone loss, we showed that BM CD4⁺ T cells producing IL-17 and TNF- α , but not IFN- γ , induce OCL differentiation in the absence of exogenous osteoclastogenic factors. These cells are associated with the development of inflammation, have a Th17

gene expression signature, express M-CSF and mRANK-L and have an effector memory phenotype. Therefore, their presence and activity are associated with the development of osteopenia in an inflammatory environment.

Many studies suggest that Th17 cells exhibit flexibility of function and can modify their phenotype, including the acquisition of IFN- γ production, during induction of colitis after adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{hi} T cells into immunodeficient hosts.²⁰ Our results extend these studies by demonstrating, in the lymphoid organs and the intestine of IBD IL-10^{-/-} mice, the presence of IL-17A and IFN- γ producing-CD4⁺ T cells that are absent in WT and healthy IL-10^{-/-} mice. Furthermore, we showed here the emergence Th17 TNF- α ⁺ cells that do not produce IFN- γ in the lymphoid organs, the intestine and mainly the BM of IBD IL-10^{-/-} mice which are prominent compared with WT and healthy IL-10^{-/-} mice. Together, these results underlined the inflammatory nature of the Th17 TNF- α ⁺ cell population in the BM.

A picture emerged from the literature (reviewed²⁷) to define what we believe to be osteoclastogenic T cells: first, osteoclastogenic T cells should not produce a large amount of IFN- γ . Second, they should trigger local inflammation and the production of inflammatory cytokines, including TNF- α , that induce RANK-L expression on mesenchymal stromal cells. Third, they should express RANK-L and might directly participate in increased osteoclastogenesis. Our study indicates that in IBD IL-10^{-/-} mice with advanced bone destruction, the Th17 TNF- α ⁺ cell population represents the long-sought-after osteoclastogenic T cell subset that fulfils all the criteria mentioned above.

In this study, we also identified a potential role of IL-7 in the survival of these osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells. First, we have shown that after 7 days of IL-7 treatment the frequency of Th17 TNF- α ⁺ cells was increased more than fourfold. This cytokine also strongly enriched the differentiation of these cells *in vitro* under Th17 cell polarisation-inducing conditions from naive T cells. These results are consistent with those of Watanabe *et al*, who demonstrated that, in the colitis model induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{hi} T cells into Rag1^{-/-} mice, IL-7 is essential for the persistence of colitogenic memory CD4⁺ T cells in the BM.²² Furthermore, the accumulation of memory CD4⁺ T cells in the BM was decreased significantly in IL-7^{-/-} Rag1^{-/-} mice reconstituted with colitogenic memory CD4⁺ T cells from IBD mice.²² In line with this report, our results show an increased expression of IL-7 in purified BM MSCs from IBD IL-10^{-/-} mice compared with cells from healthy IL-10^{-/-} and control mice, suggesting a role of BM MSCs expressing IL-7 in the maintenance of the Th17 TNF- α ⁺ cells. In this sense, more recently, Nemoto *et al* have demonstrated that BM MSCs are a major source of IL-7 and play a pathological role in IBD by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells in the BM of Rag1^{-/-} mice transferred by naive CD4⁺ T cells.²⁸ Collectively, these findings suggest a role of IL-7 in the survival and maintenance of the osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells.

Our observations in IBD IL-10^{-/-} mice showed that enhanced osteoclastogenesis is associated with the accumulation of CD11b^{hi}Ly6C^{hi} inflammatory monocytes and CD11b^{lo}Ly6C^{hi} cells that have been described as OCL precursors that accumulate in rheumatoid arthritis.²⁵ Interestingly, our mechanistic analysis revealed that, on one hand, the osteoclastogenic Th17 TNF- α ⁺ cells promote a recruitment of inflammatory monocytes representing OCL precursors in the BM during inflammation, suggesting a possible role in osteoclastogenesis.

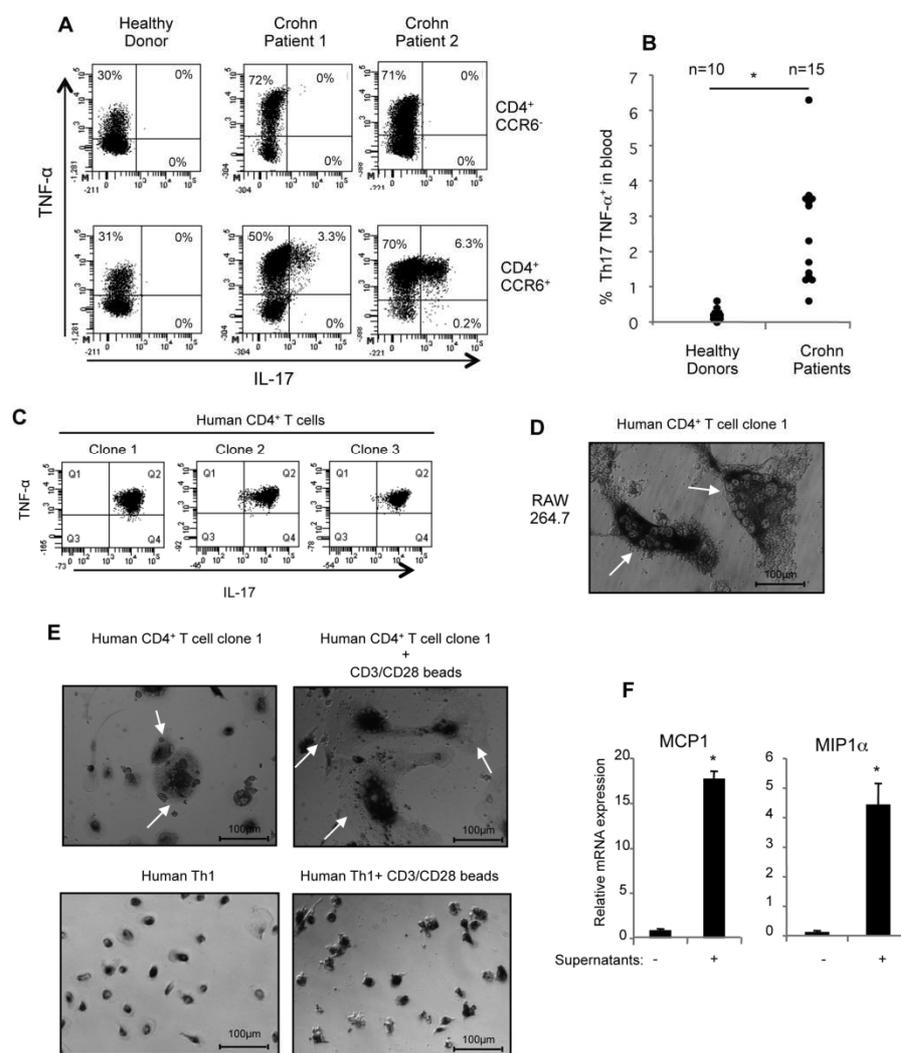


Figure 6 Identification of Th17 tumour necrosis factor (TNF)- α ⁺ T cells in Crohn's disease (CD). (A) Cytokine expression of CD4⁺ T cells from peripheral blood of healthy donor or patients with CD was assessed by intracellular flow cytometry after *in vitro* restimulation with phorbol myristate acetate and ionomycin. (B) Frequency of Th17 TNF α ⁺ CCR6⁺ T cells in peripheral blood from healthy donor or patients with CD. *p<0.05. (C) Intracytoplasmic analysis of CD4⁺ T clones isolated from the peripheral blood of a patient with CD. (D) Human Th17 TNF- α ⁺ T cell clones were cultured with RAW264.7 cells in the presence of phytohaemagglutinin (1 μ g/mL) for 8 days. (E) The same clones were also cultured with allogeneic monocytes in the presence or not of anti-CD3/CD28 beads for 8 days. Th1 cells were used as controls. Osteoclasts were analysed for their tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. Representative TRAP staining of clone 1. Similar results were obtained with the other Th17 TNF- α ⁺ cell clones (n=3). (F) The gene expression of *Mcp1* and *Mip1 α* was analysed by quantitative PCR on primary human osteoblast (hOST) cells cocultured 2 days with supernatants from each T cell clone. Data represent pooled results from two independent experiments *p<0.05 was calculated with a Student t test.

This local recruitment was possible by the increased expression of MCP-1 and MIP1 α by stromal cells. In agreement with this, Powrie's group has shown an excessive accumulation of inflammatory myeloid cells, especially monocytes, in the colon and in the BM of colitic mice.²⁹ Indeed, haematopoietic progenitor cells regulate this myeloid accumulation in the BM during colitis.²⁹ On the other hand, the Th17 TNF α ⁺ cells are able to

induce the expression of osteoclastogenic factors, such as RANK-L, by BM MSCs. Altogether, the homing of Th17 TNF α ⁺ cells in BM allows to establish a vicious circle of bone destruction by inducing the expression of the osteoclastogenic factors and promoting the recruitment of OCL precursors.

In humans, the expression of CCR6 has been tightly associated with Th17.¹⁵ In light of this observation, we have

Inflammatory bowel disease

explored the presence of Th17 TNF α ⁺ cells in the blood of healthy donors and patients with CD. Our results showed an association between the presence of Th17 TNF α ⁺ cells and CD. Furthermore, Th17 TNF α ⁺ cell clones from patients with CD were able to induce OCL differentiation.

Collectively, our study provides the first detailed phenotypical and functional characterisation of the osteoclastogenic Th17 TNF α ⁺ cells linking chronic intestinal inflammation and bone destruction. This subset of osteoclastogenic Th17 TNF α ⁺ cells exists *in vivo* in mice and in humans and can be induced and enriched *in vitro* in the presence of IL-7. We believe that dissecting how and when the Th17 TNF α ⁺ cells migrate into the BM could improve our general understanding of the exacerbation of inflammation in IBD. Finally, our results highlight that BM Th17 TNF α ⁺ cells could be a potential target for innovative immunotherapeutic strategies against chronic intestinal inflammation.

Acknowledgements We thank Dr F Lezot and Dr D Heymann for their help in the μ CT analysis (histomorphometry facility, UMR 957 Medical Faculty, Nantes University, Nantes, France).

Contributors TC researched data, reviewed the manuscript and contributed to discussions, LI and AB performed experiments and analysed data for revisions, EB-B, JP and GAB did experiments and analysed the data. HY and MR contributed to discussions and reviewed the manuscript, NA provided and processed blood from patients, XH contributed to discussions and reviewed the manuscript. CB-W designed the research and reviewed the manuscript. AW designed the research, researched data, wrote and reviewed the manuscript.

Funding This work was supported by grants from the Arthritis Fondation, the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20130326467), the Agence Nationale pour la Recherche and the Société Française de Rhumatologie.

Competing interests None.

Ethics approval The local ethics committee of the Hospital center of Nice University, Nice, France.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Ali T, Lam D, Bronze MS, *et al.* Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Am J Med* 2009;122:599–604.
- Tilg H, Moschen AR, Kaser A, *et al.* Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut* 2008;57:684–94.
- Oostlander AE, Everts V, Schoenmaker T, *et al.* T cell-mediated increased osteoclast formation from peripheral blood as a mechanism for Crohn's disease-associated bone loss. *J Cell Biochem* 2012;113:260–8.
- Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, *et al.* Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:228–33.
- Pollak RD, Karmali F, Eliakim R, *et al.* Femoral neck osteopenia in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1483–90.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.
- Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005;11:76–81.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504–8.
- Wakkach A, Mansour A, Dacquin R, *et al.* Bone marrow microenvironment controls the *in vivo* differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* 2008;112:5074–83.
- Driscoll RH, Meredith SC, Sitrin M, *et al.* Vitamin D deficiency and bone disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1982;83:1252–8.
- Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304–9.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673–82.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345–52.
- Augier S, Ciucci T, Luci C, *et al.* Inflammatory blood monocytes contribute to tumor development and represent a privileged target to improve host immunosurveillance. *J Immunol* 2010;185:7165–73.
- Pène J, Chevalier S, Preisser L, *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 2008;180:7423–30.
- Dresner-Pollak R, Gelb N, Radmilewicz D, *et al.* Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology* 2004;127:792–801.
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600–5.
- Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, *et al.* High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 1997;158:5501–6.
- Wakkach A, Augier S, Breitmayer J-P, *et al.* Characterization of IL-10-secreting T cells derived from regulatory CD4⁺CD25⁺ cells by the TRC7 surface marker. *J Immunol* 2008;180:6054–63.
- Ahem PP, Schiering C, Buonocore S, *et al.* Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 2010;33:279–88.
- Byrne FR, Morony S, Warrington K, *et al.* CD4⁺CD45Rb^{hi} T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut* 2005;54:78–86.
- Nemoto Y, Kanai T, Makita S, *et al.* Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 2007;132:176–89.
- Tokoyoda K, Zehentmeier S, Hegazy AN, *et al.* Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 2009;30:721–30.
- Mansour A, Aringnot A, Mancini SJC, *et al.* Osteoclast activity modulates B-cell development in the bone marrow. *Cell Res* 2011;21:1102–15.
- Charles JF, Hsu L-Y, Niemi EC, *et al.* Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clin Invest* 2012;122:4592–605.
- Ghannam S, Dejou C, Pedretti N, *et al.* CCL20 and β -defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium *in vitro* under flow conditions. *J Immunol* 2011;186:1411–20.
- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292–304.
- Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, *et al.* Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut* 2013;62:1142–52.
- Grisei T, McKenzie BS, Schiering C, *et al.* Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity* 2012;37:1116–29.

II. Osteoclast activity participates to HSC skewing toward myeloid differentiation and exacerbates inflammation in Inflammatory Bowel disease (IBD)

Boucoiran. A^{1,2}, N. Belaïd^{1,2}, L. Ibáñez^{1,2}, M. Topi^{1,2}, M. Rouleau^{1,2}, C. Blin-Wakkach^{1,2} and A. Wakkach^{1,2}.

¹ CNRS, LP2M, UMR 7370, Faculté de Médecine, 28 av de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France

² Université Nice Sophia Antipolis, 06000 Nice, France

Corresponding author : Dr Abdelilah Wakkach, Faculté de Médecine, 28 av de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. E-mail:wakkach@unice.fr

A. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by an inflammation of the gastrointestinal tract. It has been described a dysregulation of the adaptive system with an overproduction of CD4+ T cells, a recruitment and an accumulation of myeloid cells in the intestine (Powrie et al 1994; Niessner et al 1995; Wakkach et al 2008). Chronic inflammatory diseases are associated with a bone loss, even if the inflammatory site is far away from the bone. In Crohn disease or IBD, bone loss is the major extra intestinal symptom associated with an impaired of life quality. Bone loss is due to an imbalance between bone formation and bone resorption with an over activation of the bone resorbing osteoclasts (Teitelbaum et al 2000).

Osteoclasts are multinucleated cells formed by the fusion of myeloid cells (monocytes and dendritic cells) (Boyle et al 2003; Wakkach et al 2008). Osteoclasts are the only cells capable to degrade bone matrix and resorb bone that participate in the bone remodeling (Boyle et al 2003). Bone remodeling is a regulating process implicating osteoclasts but also osteoblasts, the bone forming cells. Bone remodeling is controlled by different mechanisms as cell-cell contact and cytokine production. In normal condition, osteoblasts participate to osteoclast differentiation. Indeed, osteoblasts participate in the formation of osteoclast by secreting the two main cytokines implicated in their differentiation (RANKL and M-CSF). Furthermore, they can block their differentiation producing osteoprotegerin (OPG) that inhibits the OCL formation (Lacey et al 1997). Chronic inflammatory diseases as IBD are associated with an increase of inflammatory cytokines and the presence of a high number of myeloid cells in the bone marrow. We have shown that myeloid cell recruitment depended to the secretion of chemokines by osteoblasts but also by mesenchymal stromal cells (Ciucci et al 2015). However osteoblasts and mesenchymal stromal cells are not the only cells able to induce osteoclast differentiation.

CD4+ T cells have been studied for many years as a potential actor of the bone loss (Kotake et al 2001). *In vitro* studies have shown that Th17 cells participate to osteoclast differentiation (Sato et al 2006). Moreover, arthritis is associated with an increase of RANKL production and the presence of Th17 cells. Recently we have characterized a CD4+ Th17 TNF α + population with osteoclastogenesis capacity present in the bone marrow of IBD mice (Ciucci et al 2015). These cells migrate in the bone marrow where they participate to the recruitment and differentiation of myeloid cells into osteoclasts. This study allows us to link immune and skeletal system.

Myeloid cells are formed from the differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow. Recently, it has been described an increase of hematopoietic stem cell proliferation and differentiation toward myeloid cells in IBD mice (Griseri et al 2012). Monocytes and neutrophils produced in the bone marrow migrate in the intestine where they participate in local inflammation. In normal condition, HSCs are maintained in bone marrow niches in a quiescent state (Mendèz-Ferrer et al 2008). These niches are formed by

the association of mesenchymal stromal cells and hematopoietic cells (Revue Guadalupe et al 2015). HSC niches are highly regulated to prevent an over activation of the hematopoietic system. HSC niches are controlled by bone remodeling activity. My team has demonstrated that impaired of osteoclast activity in osteopetrotic mice is associated with an absence of hematopoietic stem cell in the bone marrow (Mansour et al 2012). Moreover, osteoclast activity allows the secretion of enzymes that degrade endosteum and participate to the mobilization of HSC (Kollet et al 2006) from their niches. However, the link between osteoclast activity and hematopoietic stem cell mobilization during IBD is not clearly understood.

The aim of this study is to characterize the role of osteoclast activity in the proliferation and differentiation of HSCs during IBD. We used the well characterized model of IBD, the Rag1^{-/-} mice transferred with naive CD4⁺ T cells that associate inflammation of the gastro intestinal tract and bone loss. We showed that the use of blockers of osteoclast activity as zoledronic acid and calcitonin is associated with a decrease of gastro intestinal inflammation and a decrease of HSC number and proliferation in the bone marrow. Moreover, OCL's activity participates to an extramedullary hematopoiesis in spleen and gut that exacerbates IBD. This study links IBD and bone destruction and points OCL as an active participant of the symptoms of IBD.

B. Experimental procedures:

Mice

C57Bl/6 Rag1^{-/-} mice were obtained from Jackson Laboratory Lab (Bar Harbor, USA). Mice were bred to the animal facility of the Centre Mediterranean de médecine moléculaire (Nice, France) and in the animal facility of the Medecine Faculty (Nice France) in accordance with the general guidelines of the Direction Des Services Vétérinaires. Animals were maintained 4 per cage in

our animal facility in accordance with the general guidelines of the institute, and approval for their use in this study was obtained from the Institutional Ethic Committee for Laboratory Animals (CIEPAL-Azur).

Antibodies, flow cytometric analysis

Antibodies anti-CD3 (17A2; 145-2C11), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD51 (RMV-7), anti-CD117 (2B8), anti-CD140a (APA5), anti-B220 (RA3-6B2) were purchased from BD Biosciences, anti-CD11b (M1/70), anti-CD16/32 (2.4G2), anti-CD31 (390), anti-CD44 (IM7), anti-CD45.2 (104), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD127 (A7R34), anti-Gr1 (RB6-8C5), anti-Ly6C (HK1.4); anti-Ter119 (Ter119) anti-Ki67 (SOLA15) were purchased from Ebiosciences.

For proliferation analysis, cells were fixed overnight with the Fix/Perm Buffer (Ebiosciences) after the surface staining. Following permeabilization with saponin 1X, ki67 staining was done during 30min at room temperature. Flow cytometry analysis was performed with a FACS Canto II (BD).

Adoptive transfer and induction of the disease

CD4⁺ Naive T cells were isolated according to the manufactured kit (DynaL CD4 isolation kit Life technologies) and 5×10^5 cells were injected intraperitoneally (IP) in immunodeficient Rag1^{-/-} mice. After 5-6 weeks, clinical signs of the disease appeared and mice were killed.

Injection of osteoclast blockers

At day 15 after T cell transfer, Rag1ko mice were injected intraperitoneally twice a week with 2µg/100µl of zoledronic acid (Novartis) until the day of sacrifice. Salmon calcitonin (T3660 Sigma) was injected intraperitoneally 5days/week with 0.5UI/100µl from day 15 after T cell transfer until the sacrifice.

Isolation of leukocytes

Single cell suspensions were isolated from spleen and colon as previously described (Ciucci et al 2015). Bone marrow trabecular and long bone were separated. Bone was crushed and cell were suspended into PBS 1%SVF 2mMEDTA. Bone fragments were digested into Collagenase D/Dnase1 solution (DMEM + 2mg/ml collagenase D + 10µg/ml DNase I) during 1h

at 37°C with agitation. Digested fragments were crushed and cell suspensions were suspended into PBS 1%SVF 2mMEDTA.

Colony forming assay

Splenocytes, colonic cells and blood cells were suspended in methylcellulose medium to quantify clonogenic colony forming units in duplicate culture (MethoCult GF M3434, Stem Cell Technologies). Morphologic analysis of colony formation was performed after 7-10 days of incubation at 37°C using an inverted microscope. CFU-G (granulocyte), M (macrophage), or GM (granulocyte-macrophage) colonies are referred as “CFU-GM.”

In vitro OCL differentiation

For OCL differentiation, femur and tibia marrow cells were flushed and plated in 24-well plate in α -MEM medium supplemented with 5% FCS and 50 ng/ml RANKL and 25ng/ml MCSF. Medium was changed every 4 days. After 2 weeks of culture, cells were collected and labelled.

High resolution μ CT

Fixed femora were scanned with high resolution μ CT following procedures described in Mansour et al 2011.

Histological analysis

Femurs were fixed in 4% PFA (O/N, 4°C), decalcified in 10% EDTA (10 days, 4°C) and embedded in OCT. Bone sections (7 μ m) were treated with an antigen retrieval solution (trypsin 0.05% + calcium chloride 0.1%) for 10 min at 37°C before staining. TRAP Staining was done according to the manufactured kit (Sigma Leukocyte acid phosphatase kit) Samples were analyzed under a fluorescent microscope (Zeiss). Image acquisition was conducted with the ZEN-Pro 2012 software

C. Results

Osteoclast activity exacerbated the clinical signs of IBD.

To investigate the effect of osteoclast activity on the HSC proliferation and differentiation during IBD, we used a well characterized murine model of IBD, the Rag1^{-/-} mice transferred with naïve CD4⁺ T cells that associated bone loss and inflammation of the gastro-intestinal tract (Byrne et al 2005). Rag1^{-/-} mice transferred with naïve CD4⁺ T cells developed inflammation with a splenomegaly, enlargement of mesenteric lymph node and lamina propria T cell infiltration (Powrie and al 1994; Wakkach et al 2008). Interestingly, these mice also developed a bone loss due to an excessive activity of osteoclasts (Ciucci et al 2015). To investigate the role of osteoclast activity on the clinical signs of IBD, we used 2 blockers (zoledronic acid and calcitonin) that have been described from many years in the treatment of osteoporosis. Injections of zoledronic acid or calcitonin are associated with a decrease of clinical signs of the disease. Like this, treated mice have a delay in the apparition of the disease (Fig 1A). IBD mice developed the disease in 35 days with a decrease of more than 15% of the initial weight. Instead mice treated with osteoclast inhibitors did not lose weight and survive more than 45 days after T cell transfer (Fig 1A). Colon photomicrography shown a decrease of inflammation of treated mice compared as IBD mice (Fig1B). Histological bone sections of mice show an absence of trabecular bone in IBD mice and a decrease of bone area in compare to control mice. Blockade of osteoclast activity is associated with an increase of bone trabecular surface compared to IBD mice. Then, mice treated with osteoclast inhibitors shown the presence of trabecular bone that are absent in IBD mice (fig 1C).

Osteoclast activity induced an increase of myeloid cell infiltration in colon and extramedullary hematopoiesis in the spleen

IBD is associated with an enlargement of the gastro intestinal tract and the presence of a large population of myeloid cells, neutrophils, monocytes and eosinophils (Fig2A). Neutrophils and monocytes are the most important populations of myeloid cells corresponding to about 16% of the colon cells. Zoledronic acid injections are associated with a significant decrease of neutrophils and monocytes infiltration in colon (Fig 2A). Calcitonin treatment induces a non-significantly decrease of neutrophils and monocytes in the colon. Eosinophils have been described as cells responsible to epithelial damages observed during IBD. IBD is associated with an increase of eosinophils in colon. However, injections of osteoclast blockers did not induce a significant decrease of eosinophils infiltration (fig 2A). Accumulation of myeloid cells in the colon is due to an extramedullary hematopoiesis in the colon of IBD mice. This increase is associated with the detection of 9 times more of CFU-GM in colon of IBD mice compared to control mice. Blockage of osteoclast activity reduces extramedullary hematopoiesis with a decrease of number of CFU-GM that corresponds to control mice (Fig 2C).

As observed in the colon, IBD is associated with accumulation of myeloid cells in the spleen, in particular eosinophils that was multiplied by 3. Associated with this myeloid accumulation, we observed an increase of LSK number (Fig 2D). Contrary to what observed in the colon, zoledronic acid and calcitonin injections did not block LSK accumulation in the spleen (Fig 2B). Extramedullary hematopoiesis is a sign of bone marrow defect. We hypothesize that osteoclast activity participates to LSK proliferation in the bone marrow or induces a mobilization of these cells from the bone marrow to the colon.

Osteoclast activity participated to the hematopoietic stem cell differentiation toward myeloid cell in the bone marrow

In normal condition, hematopoiesis takes place in the bone marrow. Hematopoietic stem cells represented 0.01% of cell in the bone marrow. Hematopoietic stem cells (HSCs) are the precursors of myeloid and lymphoid cells responsible to inflammation. These cells are characterized by the absence of lineage markers (Lin: CD3 B220 Ter119 Gr1) and the expression of Sca1+ ckit+ and are referred as LSK cells. Osteoclasts are located in the bone marrow where they participated to the bone remodeling. Hematopoietic stem cell niches are regulated partially by bone remodeling (Mansour et al 2012, Kollet et al 2006). Osteoclast activity induces a degradation of endosteal component and has been described as modulator of the HSC niches (Kollet et al 2006). IBD is associated with an increase of osteoclast activity. During IBD, there is a huge increase of LSK cells that represent around 20% of Lin- cells (Fig 3A) in the bone marrow. Blockade of osteoclast activity reverses this phenotype and LSK cell percentage goes back to the one observed in control mice (2% of Lin-cells) (Fig3A). Increase of LSK number is associated with an increase in their proliferation (from 30% in IBD to 15-20% in treated mice) that is blocked after zoledronic acid or calcitonin injection (Fig 1A).

Hematopoietic stem cells can differentiate into multipotent progenitor (MPP) that can give rise to the common myeloid progenitor (CMP) and common lymphoid progenitor (CLP). Common lymphoid progenitors can then differentiate into Granulocyte-monocyte progenitor (GMP) and Megakaryocyte-Erythroid progenitor (MEP). Progenitor cells proportions change with the disease. Then, during IBD, there is a 2-fold increase of GMP in the bone marrow and a slight decrease of MEP. This GMP increase is not observed in the bone marrow of mice injected with zoledronic acid or calcitonin. Treated mice have an increase of MEP cells as compared to IBD mice (40% to 80% of cells) and a decrease of GMP cells. Moreover, ZA mice have a decrease of CMP cells (from 20% to 15%) as compared to IBD mice (Fig3B). However, analysis of CLP cells (Lin- Il7R+ Sca1-cKit+) does not show significant differences between IBD and ZA mice (Fig 3C).

Comparison of trabecular and long bone area osteoclast activity

The bone can be divided in two parts: the trabecular bone (TBA) subject of important bone remodeling and the long bone (LBA). Hematopoietic stem cells are located in the two portions of the bone with a high proportion of cells in the trabecular area. Moreover, trabecular bone has been described as more important to HSC regulation and maintenance of quiescence of HSCs than LBA (Guezguez et al 2016). During IBD, there is a bone loss particularly in the trabecular area. Zoledronic acid is described to be more efficient in the trabecular area as compared to LBA (Quattorchi et al 2016) when administrated in patients. Indeed, ZA injection is associated with an increase of bone volume in TBA but not in the cortical of the bone. As we observed an increase of LSK proliferation and differentiation during IBD associated with a bone loss in trabecular area, we were interested is administration of zoledronic acid has different effect in TBA and LBA.

LSK cell niches are composed to diverse cells as osteoblasts, adipocytes and mesenchymal stromal cells. Mesenchymal stromal cells (CD45⁻ CD31⁻) are the most important cells controlling LSK niche regulation. First of all, we analyzed CD45⁻ CD31⁻ cells proportion during IBD in TBA and LBA. We observed a significant decrease in MSC cells in the TBA and LBA of IBD mice as compared to control mice (Fig 4A). Interestingly, in ZA-treated mice, MSC proportion and number are decreased as compare to IBD mice (from 30% to 20% of cells) (Fig 4A).

Mesenchymal stromal cells are a heterogeneous population. It is possible to discriminate diverse population of cells thanks to the expression of markers Sca1, CD51 and CD140a. Endosteal cells are described as CD45⁻ Sca1⁻ CD51⁺ cells whereas perivascular cells are CD45⁻ Sca1⁺CD140 α ⁺ (Lévesque et al 2002, Morikawa et al 2009). We observed that TBA and LBA cells are mostly composed by Sca1⁻ CD51⁻ CD140⁻ cells (more than 90% of CD45⁻ CD31⁻ cells, data not shown). Analysis of CD45⁻ Sca1⁺ cells showed an increase of these cells in LBA of IBD mice compared as control mice (Fig 4A). However zoledronic acid injections induced a decrease of Sca1⁺ cells in TBA as compared to IBD mice (from 10% to 3%). Perivascular cells (CD45⁻ Sca1⁺ CD140 α ⁺) represented around 60% of TBA CD45⁻ Sca1⁺ cells of control mice, but only 35% of LBA cells (Fig 4A). During IBD, there was a decrease of perivascular cells in the TBA and LBA of mice. Zoledronic acid injection is associated with a significant increase of perivascular cells among CD45⁻ Sca1⁺ cells in the TBA but not in the LBA of mice.

LSK cells in TBA and LBA have been described having different properties. Indeed, LSK cells in the TBA have superior hematopoietic progenitor capacity than cells in the LBA (Guezguez et al 2016). As we observed an increase of LSK proliferation and differentiation during IBD, we analyzed LSK cells from TBA and LBA. We observed an increase of LSK cells in TBA and LBA of IBD mice that is reversed with zoledronic acid treatment in the TBA (Fig 4B). Interestingly, Zoledronic acid injections induced a slight decrease of LSK cells that is not significant in the

LBA. Moreover, analysis of the proliferative capacity of the LSK cells between TBA and LBA did not show significant differences (Data not shown).

Myeloid cell analysis did not revealed any differences between TBA and LBA. We observed an increase of the proportion of neutrophils (from 20% to 30%) and monocytes (from 10% to 40%) in bone marrow of IBD mice as compared to control mice (Fig 4C). Blockade of osteoclast activity is associated with an increase of the percentage of neutrophils in the bone marrow (from 30% to 50%) and a decrease of monocytes as compared to IBD mice (Fig 4C). IBD is associated with an increase of eosinophils differentiation from hematopoietic stem cells (Griseri et al 2015). We observed an increase of the percentage of activated eosinophils (CD11b⁺ Siglec-F^{hi}) in the bone marrow of IBD as compared to control mice. Injections of blockers of the osteoclast activity are associated with a decrease of the proportion of eosinophils (Date not shown).

Fig1: Osteoclast activity exacerbated the clinical signs of IBD.

Colitis was induced by transferred of $0,5 \times 10^5$ CD4+ naive T cells into C57Bl/6.Rag1^{-/-} mice (IBD). Mice were analyzed 5 to 8 weeks after transfer when clinical signs of the disease appeared. Control mice are untransferred Rag1^{-/-} mice (Control). ZA mice are transferred mice injected $2 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ twice a week from day 15. Calcitonin mice are transferred mice injected $0,5 \text{UI}/100 \mu\text{l}$ 5 days per week from day 15 to the end of the experiment.

- A. Survival rate of mice after CD4+ T cells transfer in Rag1^{-/-} mice.
- B. Photography of colon inflammation from control, IBD, IBD+ZA and IBD+ Calcitonin mice (left). Clinical score of the mice calculated by associated score of MLN enlargement, presence of splenomegaly, colon inflammation, loss of weight and diarrhea (0= absence of inflammation, 6: inflammation with splenomegaly, MLN enlargement, colon enlargement and diarrhea, weight loss) (right)
- C. Histological section of bone marrow mice. Osteoclasts are stained by a TRAP+ labeling. B= Bone (left). Measurement of bone trabecular surface (Right).

Data are representative of 3 independent experiments.

Figure2: Osteoclast activity increased infiltration and accumulation of myeloid cells in the colon spleen of IBD mice

- A. Flow cytometry staining of neutrophils (CD11b+ Gr1^{hi}), monocytes (CD11b+ Gr1^{low}) and eosinophils (CD11b+ Siglec-F+, GR1^{low}) from colonic lamina propria leukocytes (Left). Frequencies of myeloid cells (Right). Representative flow cytometry staining of neutrophils, monocytes and eosinophils in the spleen. Frequencies of myeloid cells in the spleen.
- B. Representative Field from photomicrograph of GFU-GM in spleen and colon (Left). Absolute number of CFU-GM among total cells in colon and spleen (right).
- C. Representative flow cytometry staining of LSK cells (Lin⁻ : CD3, Gr1, B220, Ter119; Sca1+ ckit+) and absolute number (millions) in the spleen.

Histograms represented the mean of 3 mice per group \pm SD. Data are representative of those obtained from 3 ou 4 mice per group in one experiment. This experiment was done 3 times independently. Statistical test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$

Figure3: Osteoclast activity induced the proliferation of LSK cells and led their differentiation toward myeloid lineage in the bone marrow

- A. Representative flow cytometry staining of LSK (Lin-: cd3,B220,Ter119,Gr1; Sca1+ cKit+) in the bone marrow (Left) Cells are gated on Lin- SSCLow cells. Absolute number of LSK cells (millions) in the bone marrow. LSK cells proliferation was analyzed by flow cytometry after Ki67 labeling. Proliferative cells are Ki67+ cells. Histograms present the mean \pm SD of at least 3 mice per group.
- B. Myeloid progenitor cells are analyzed by flow cytometry in the bone marrow. Cells are gated on Lin- (CD3, Gr1, Ter119, B220) Sca1- cKit+ (Myeloid progenitor MP) cells. Representative flow cytometry staining of Granulocyte-monocyte progenitor (GMP; CD34+ CD16/32^{hi}), Common-myeloid progenitor (CMP; CD34^{low}CD16/32^{low}) and Megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP; CD34- CD16/32-). Histograms represented frequencies of GMP, CMP and MEP in the bone marrow.
- C. Common Common Lymphoid progenitor (CLP; Sca1- cKit+) analyzed by flow cytometry. Cells are gated on Lin- (cd3, B220, Ter119, Gr1) IL-7R+ . Histograms present the frequencies of CLP.

Histograms present the mean of 3 mice per group \pm SD. Data are representative of those obtained from 3 or 4 mice per group in one experiment. This experiment was done 3 times independently. Statistical test: *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005

Figure4: Osteoclast activity in trabecular and long bone area

- A. Experiment design to study osteoclast activity in trabecular and long bone area of the bone marrow (Left). Representative flow cytometry staining of mesenchymal stromal cells analysis (right)
- B. Frequencies of mesenchymal stromal cells in the bone marrow. Total MSC (CD45- CD31-). Progenitor cells (Sca1+) and endosteal cells (Sca1- CD51+) are gated on CD45- CD31-. Perivascular cells (CD140+) gated on Sca1+ cells. Frequencies of LSK cells in TBA and LBA.
- C. Representative flow cytometry staining of myeloid cells in TBA and LBA (neutrophils (CD11b+ Gr1hi), monocytes (CD11b+ Gr1low)).

Statistical test: *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005

Data are representative of those obtained from 3 or 4 mice per group in one experiment.

Figure 1: Osteoclast activity exacerbated the clinical signs of IBD

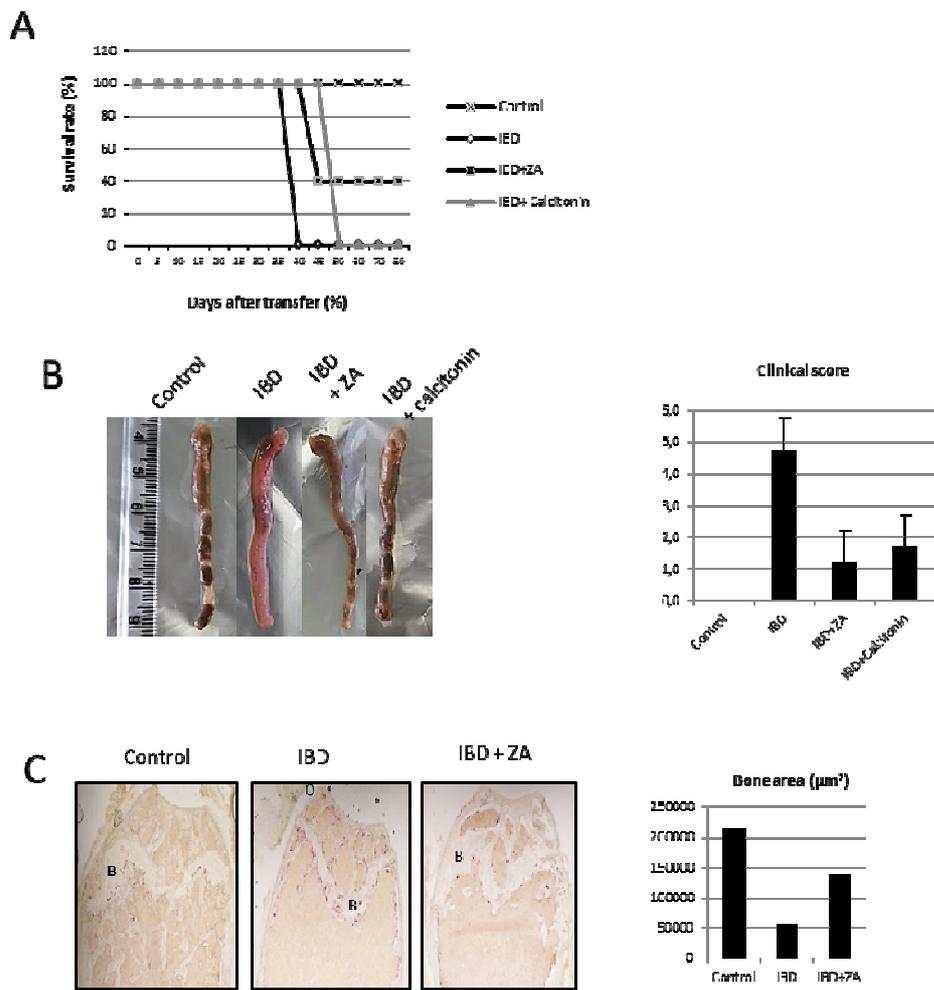
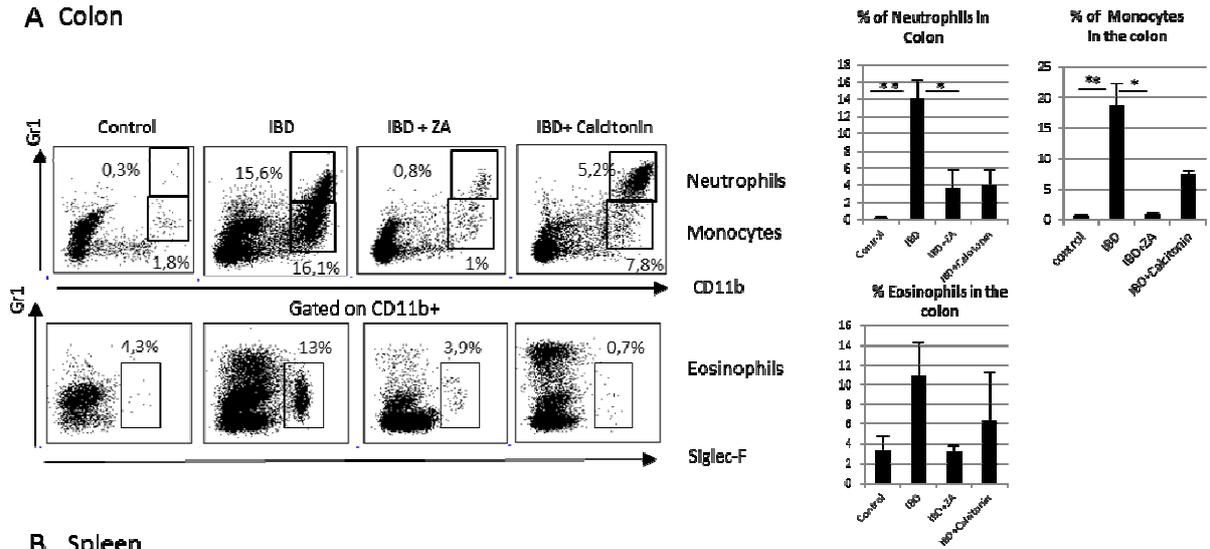
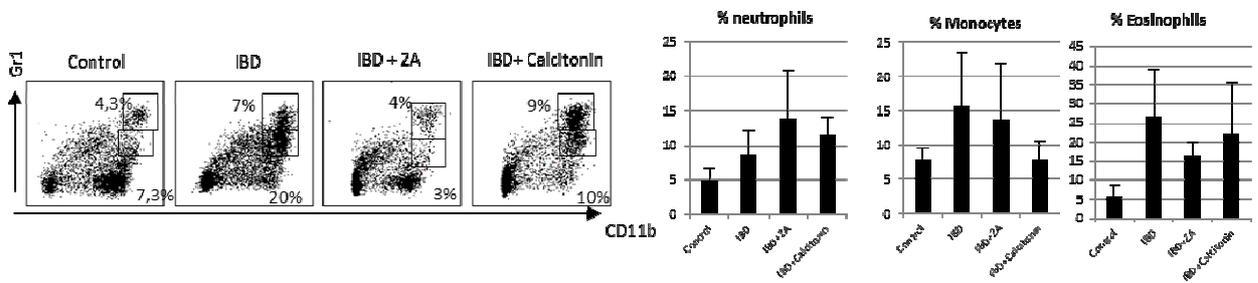


Figure2: Osteoclast activity increased infiltration and accumulation of myeloid cells in the colon and spleen of IBD mice

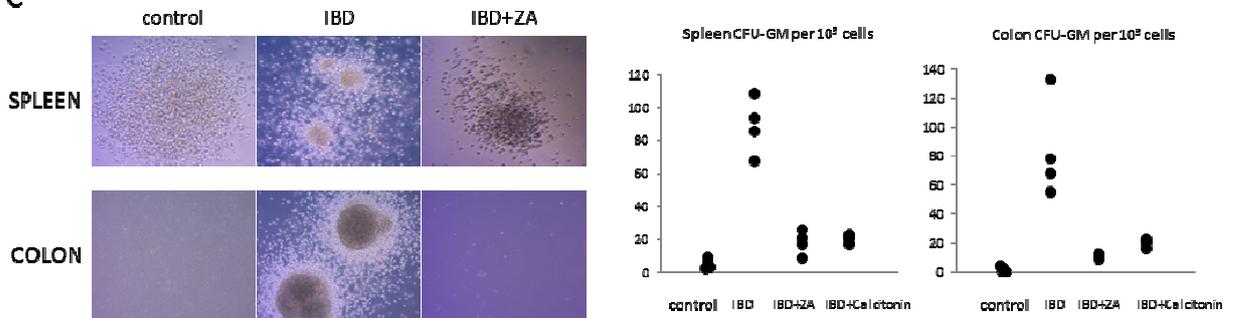
A Colon



B Spleen



C



D

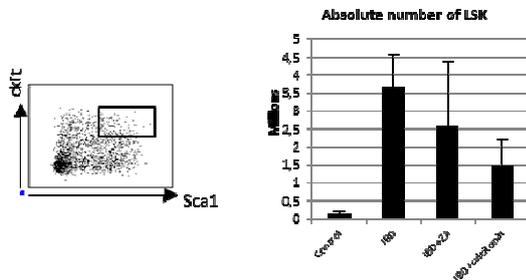


Figure 3: Osteoclast activity induced the proliferation of LSK cells and led their differentiation toward myeloid lineage in the bone marrow

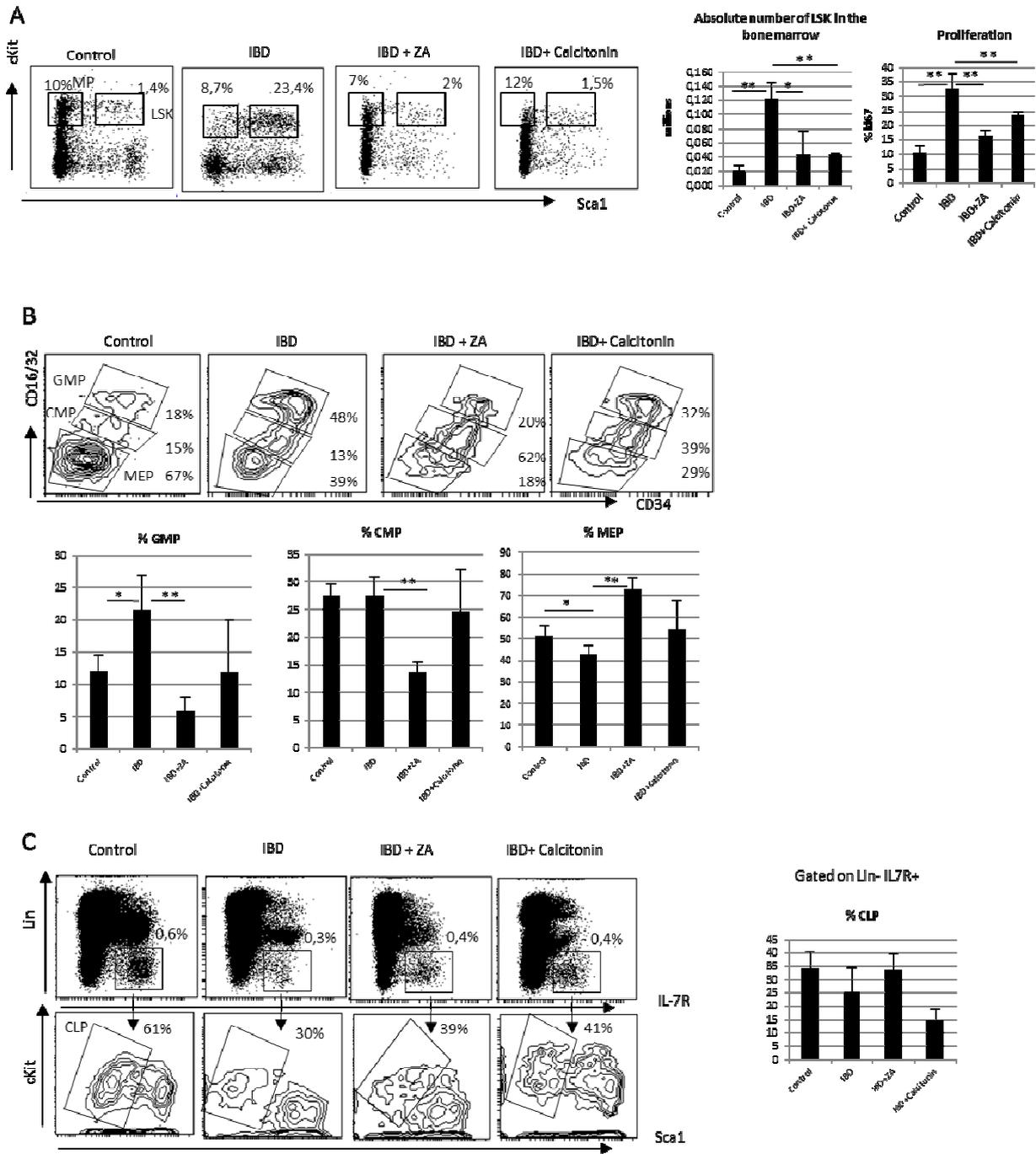
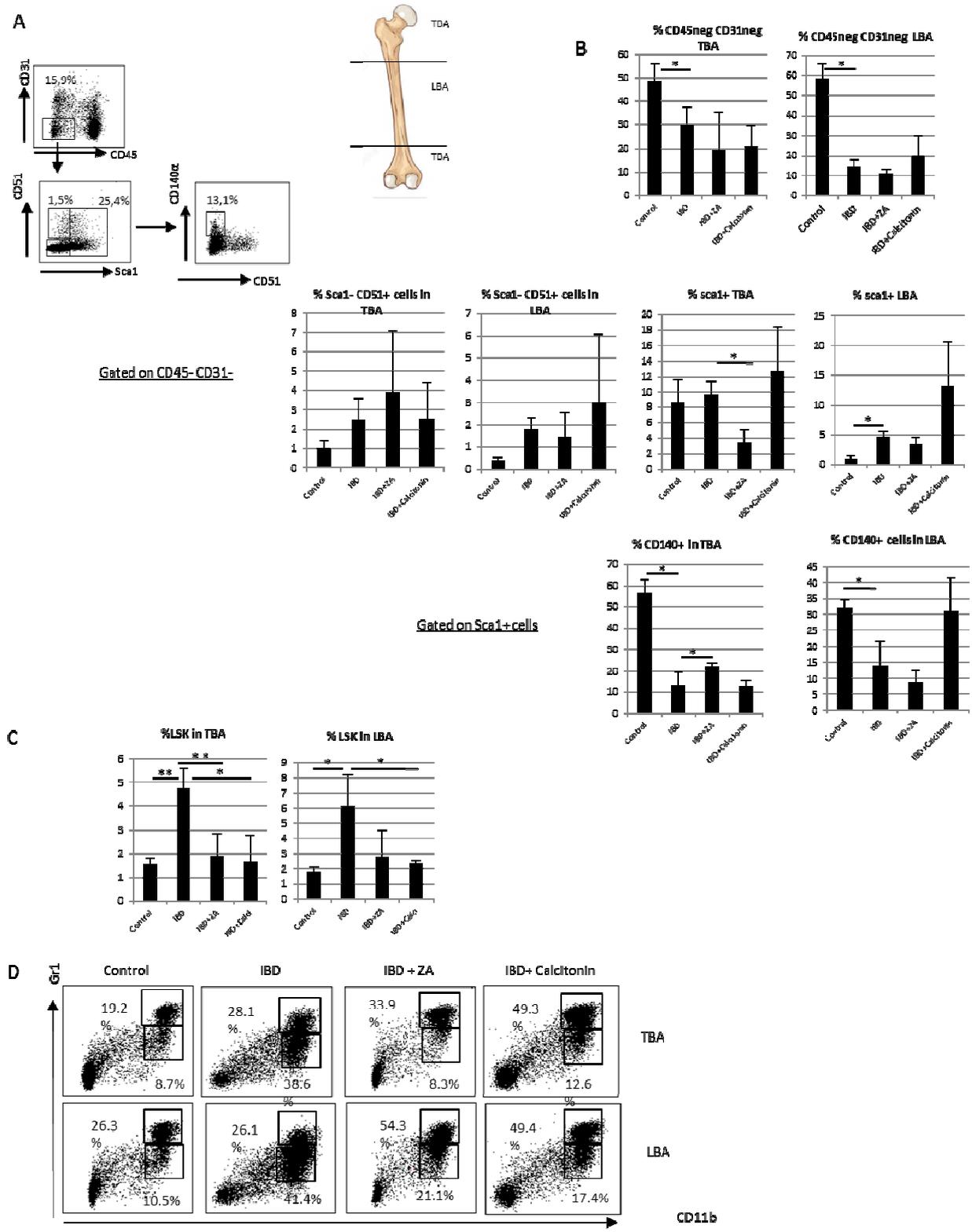


Figure 4: Osteoclast activity in Trabecular and long bone area



D. Discussion

Interaction between the immune system and the bone system are studied from many years in normal and inflammatory conditions (Powrie et al 1993; Ahern et al 2010; Ciucci et al 2015). Indeed, CD4+ T cells have been described to participate to bone remodeling enhancing bone loss in inflammatory bowel disease (Ciucci et al 2015). However, the effect of bone cells on inflammation is poorly study. In this work, we described for the first time the effect of OCL activity on hematopoiesis during IBD.

We showed that osteoclast activity is associated with an increase of colon inflammation by increasing the extra intestinal hematopoiesis. Griseri et al (2012) showed that inflammatory cytokines (GM-CSF and IFN γ) induce an increase of HSCs proliferation and differentiation toward myeloid cells. However, precedent studies showed that extra medullary hematopoiesis (EMH) is due to a modification of the bone marrow architecture and a disruption of vascular niche of HSCs (Kopp et al 2005). In agreement with this result, we observed that during IBD, there is a loss of trabecular bone and a decrease of perivascular cells that can induce LSK cell niche disruption. Mesenchymal stromal cells are responsible for CXCL12 secretion and the maintenance of LSK cells in the bone marrow (Sugiyama et al 2006). Maintenance of LSK cells in the spleen has been described as dependent of CXCL12 expression in the spleen (Yamamoto et al 2015). IBD is associated with high levels of inflammatory cytokines that participates to local differentiation of hematopoietic stem cells (Griseri et al 2012). Moreover, Th17 cells present in the spleen can produce GM-CSF that induced the differentiation of HSCs cells into myeloid cells *in situ* and participate to the maintenance of an extramedullary hematopoiesis (Hamilton et al 2008). Interestingly, blockade of osteoclast activity is associated with a decrease of inflammation of the colon but has little effect on the spleen of mice. Zoledronic acid is a bisphosphonate use as a blocker of osteoclast activity (Russel et al 2008). It already described that mice lacking osteoclast activity (oc/oc mice) associated an osteopetrosis and an extramedullary hematopoiesis in the spleen (Mansour et al 2012).

IBD is associated with an increase of LSK cells proliferation that is reversed after blockade of osteoclast activity (Fig 3). IBD is associated with a decrease of mesenchymal stromal cells in the bone marrow. Interruption of mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell interaction is associated with an egress of hematopoietic stem cells from the bone marrow (Kollet et al 2006). Zoledronic acid was not described as having a direct effect on hematopoietic stem cells. Injection of zoledronic acid was associated with a decrease of mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cells interaction (Mansour et al 2011; 2012). Indeed, my team has already published that mice injected with ZA have a decrease of CXCL12 and IL7 produced by mesenchymal stromal cells of the bone marrow (Mansour et al 2011). CXCL12 and IL-7 are implicated in the retention and the survival of hematopoietic stem cells in the bone marrow (Ding et al 2013). It is possible that LSK mobilization during

IBD is dependent to an effect of mesenchymal stromal cells on HSCs cells. Study of Balb/c mice showed that blockade of osteoclast activity reduces B lymphopoiesis (Mansour et al 2012). ZA treatment can induce an impaired recruitment of inflammatory T cells in the bone marrow or in their survival. Moreover, in another mechanism, calcitonin was described to block SIP secretion by osteoclast and T cells maintenance (Keller et al 2014). SIP signalization is implicated in the egress of T cells from the lymph node (Fukuhara et al 2012). SIP signaling disruption may induce an interruption of T cell maintenance and a decrease of clinical signs of IBD. All these results show that osteoclast activity participates to IBD acting on LSK niche.

Hematopoietic stem cell proliferation and egress is described as dependent of IFN γ signaling. However, IFN γ is an anti-osteoclastogenic cytokine (Takayanagi et al 2000). Precedent work show that anti-IFN γ antibody decrease the clinical signs of the disease among decrease of LSK proliferation. IFN γ is an inducer of dendritic cells activity, that promoting T cells activation (Gao et al. 2007). These T cells produced inflammatory cytokines that participate to osteoclast differentiation. Antibody anti-IFN γ abolished IFN γ signaling and could decrease local inflammation and osteoclast activation.

Analysis of bone marrow cells showed an increase of myeloid cells in IBD mice compared to control mice. These results are coherent with precedent observations that associated inflammation and bone loss (Ciucci et al 2015, Griseri et al 2012). Zoledronic acid has been described as inhibiting differentiation and fusion of osteoclasts and increases their apoptosis. Moreover, zoledronic acid treatment is associated with an increase of neutrophils and a decrease of monocytes in the bone marrow. During IBD, there is an increase of inflammatory CX3CR1 $^{+}$ osteoclasts that can induce the differentiation of CD4 $^{+}$ T cells into TNF α $^{+}$ producing CD4 $^{+}$ cells (Ibàñez et al 2016). These inflammatory osteoclasts may participate to the regulation of LSK niches. Analysis of TBA and LBA of cells show a decrease of monocytes presents in the bone marrow after injection of osteoclast blockers. Monocytes are the precursor of osteoclasts and a decrease of these cells could be due to a default of attraction because of a decrease of MSC secreting chemokines in the bone marrow. IBD is associated with an increase of inflammatory cytokines in the bone marrow. ZA may be associated with a decrease of inflammatory cytokines concentration that could explain the decrease of the clinical signs of the disease. Decrease of inflammation could induce a modification of osteoclast profile from inflammatory to tolerogenic osteoclast that will act on T cells and LSK cells present in the bone marrow.

In conclusion, we have shown that osteoclast activity participates to the regulation of LSK proliferation and differentiation into myeloid cell during IBD. Osteoclast activity has a global effect in the bone marrow. First of all, these cells degrade the bone marrow environment and release LSK cells from their niches in response to inflammatory signals. Osteoclasts formed the junction between inflammatory and bone system and can explain the phenotype observed during IBD. These cells formed an interesting target to fight against both inflammation and bone destruction in IBD.

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre les interactions établies au cours des maladies inflammatoires chroniques entre le système immunitaire et le système osseux. En effet, la perte osseuse observée lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est une conséquence majeure impactant sur la santé et la vie des patients. Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre ces interactions notamment en caractérisant les cellules immunitaires participant à la perte osseuse ainsi que le rôle des cellules osseuses dans l'activité des cellules inflammatoires et dans le maintien de la maladie.

I. Rôle des cellules CD4+ Th17 dans la maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) sont dues à une dérégulation du système inflammatoire. Au cours de ces maladies, il est possible d'observer une accumulation de cellules immunitaires responsables des signes cliniques de la maladie. Au cours de cette étude, nous avons identifié une population CD4+ Th17 TNF α +, présente dans la moelle osseuse des souris malades ainsi que dans le sang des patients, capable d'induire la différenciation des ostéoclastes.

A. Mécanismes d'action des cellules Th17

Nous avons décrit une population cellulaire CD4+ Th17 TNF α + qui va participer à la perte osseuse observée lors de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Ces cellules vont tout d'abord permettre la différenciation des précurseurs des ostéoclastes (monocytes et cellules dendritiques) en ostéoclastes fonctionnels grâce à leur sécrétion de RANKL. De plus, ces cellules Th17 induisent la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes ce qui participe à la différenciation ostéoclastique. Enfin, les cellules CD4+ Th17 de la moelle osseuse agissent sur les cellules stromales mésenchymateuses afin d'induire la production des chimiokines MCP1 et MIP1 α par les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) permettant le recrutement des monocytes dans la moelle osseuse. L'ensemble de ces mécanismes participe à l'augmentation de la perte osseuse.

Les cellules Th17 sont au carrefour entre la perte osseuse et l'inflammation intestinale.

Les cellules T CD4+ ont été décrites comme participant à la perte osseuse lors d'autres maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde. Au cours de l'arthrite, il a été décrit une population CD4+ RANKL+ présente au niveau du site inflammatoire situé à proximité de l'os ; la synovie (Kotake et al 2001). De plus, les travaux de Sato et al (2006) ont décrits le rôle inducteur des cellules T CD4+ Th17 induites *in vitro*, dans la différenciation des

ostéoclastes. Ces cellules Th17 sont caractérisées grâce à leur production d'IL-17. Cette cytokine a un potentiel ostéoclastogénique reconnu dans le cas des maladies inflammatoires chroniques. En effet, les taux élevés d'IL-17 dans la synovie des patients arthritiques sont associés à une augmentation de l'activité des ostéoclastes (Kotake et al 1999). De plus, les travaux de Shen et al (2005) ont montré que le blocage de l'IL-17 inhibe la différenciation des ostéoclastes. Nous avons montré que la sécrétion d'IL-17 par les cellules T CD4+ de la moelle osseuse induit la sécrétion des chimiokines MCP1 et MIP1 α par les cellules stromales mésenchymateuses permettant le recrutement des précurseurs des ostéoclastes. Mon équipe a montré que l'IL-17 participe à la différenciation des ostéoclastes inflammatoires (Ibàñez et al 2016). En effet, l'IL-17 induit la sécrétion de RANKL et de MCSF par les ostéoblastes, ce qui va contribuer à la différenciation ostéoclastogénique (Huang et al 2013). L'ensemble de ces preuves mettent en exergue le rôle central des cellules CD4+ Th17 dans la perte osseuse induite lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Outre cet effet médullaire, les cellules T CD4+ Th17 ont été décrites comme participant à l'inflammation intestinale lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Powrie et al 1994 ; Ahern et al 2010 ; Wakkach et al 2008). La présence d'un environnement riche en cytokines inflammatoires (IL-6, Il1beta) participe à la différenciation des cellules CD4+ en cellules Th17 responsables de l'inflammation intestinales. Cependant, les cellules Th17 jouent aussi un rôle essentiel dans la protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes extra-intestinaux. Il est ainsi apparu qu'il est possible de discriminer deux populations Th17 ; une population non-pathogénique et une population pathogénique. La pathogénicité des cellules Th17 est apparue comme dépendante de la présence d'IL-23 (Geremia et al 2010). Au niveau intestinal, l'IL-23 permet l'expression d'IFN γ par les cellules Th17 et l'acquisition d'un profil inflammatoire (IL17+/IFN γ +). Ces cellules Th17 pathogéniques produisent de grandes quantités de GM-CSF qui participent à la différenciation des cellules myéloïdes au niveau intestinal (Griseri et al 2012, 2015). Au niveau intestinal, l'expression d'IFN γ par les cellules T CD4+ va inhiber la formation de cellules T CD4+ régulatrices (Ahern et al 2010 ; Izcue et al 2008). Les travaux de Krausgruber et al 2016 ont montré que le maintien du profil pathogénique des cellules IL17+ IFN γ + dans l'intestin est dépendant de l'expression de Tbet et de l'expression d'IFN γ par les cellules Th17. En effet, l'absence de Tbet lors de la différenciation Th17 est associée à une augmentation de l'expression d'IL-17, d'IL-22 et à une diminution des dommages intestinaux associée à une perte de l'expression de GMCSF (Ahern et al 2010). Cependant, le rôle des cellules Th17 sur l'inflammation intestinale lors des maladies inflammatoires restent encore controversé.

En effet, les cellules Th17 au niveau intestinal produisent aussi de l'IL-22 qui participe à la protection de la barrière intestinale (Zheng et al 2008). Cette cytokine permet l'augmentation de l'activité du complément et participe ainsi à l'élimination des pathogènes (Hazegawa et al 2016). De plus, ces cellules Th17 vont produire de grandes quantités d'IL-17 qui va potentialiser l'activité des neutrophiles en augmentant notamment que leur activité de phagocytose (Hsu et al 2016). Les neutrophiles permettent la défense de la barrière

intestinale et l'augmentation de leur activité induit une protection accrue face aux. Cependant, les essais cliniques utilisant des anticorps bloquant l'IL-17 ont été décrits comme exacerbant la maladie (Hueber et al 2012). L'utilisation de Secukinumab (anticorps anti-IL-17 A), déjà utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Hueber et al 2010), n'induit pas la diminution de l'inflammation intestinale. De façon intéressante, l'utilisation de cet anticorps dans les modèles d'arthrite rhumatoïde est associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (Schminke et al 2015). De plus, l'utilisation anticorps bloquant l'IL-17A et IL-17-F induit une diminution de l'inflammation intestinale dans les modèles murins de colites (McClellan et al 2013 ; Schmidt et al 2013). Une augmentation de l'IL-17F est observée chez les patients atteints des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Seiderer et al 2008). Ces études ont ainsi mis en avant que les cellules Th17 via leur sécrétion d'IL-17 jouent un rôle inducteur de la perte osseuse lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'effet de ces cellules au niveau intestinal est toujours en cours d'étude mais il est apparu que les différents isoformes de l'IL-17 vont avoir différentes cibles cellulaires. Il est ainsi possible que les effets osseux et intestinaux de l'IL-17 soient dus aux différents isoformes de l'IL-17. L'ensemble de ces travaux n'ont pas permis de déterminer des marqueurs spécifiques des cellules Th17 pathogéniques. Ainsi, les travaux de Glaubomme et al (2015) ont décrit le marqueur CD5L comme marqueur des cellules mémoires pathogéniques. La capacité de ces cellules et leur rôle dans la perte osseuse observée lors des maladies inflammatoires chroniques n'a pas été établi. L'étude de cette population pourrait ainsi permettre de mettre en place des thérapies ciblées et de lutter plus efficacement contre les maladies inflammatoires.

B. Maintien des cellules Th17 dans la moelle osseuse

Au cours de notre étude, nous avons démontré la présence de 2 populations CD4+ IL17+. Au sein de la lamina propria nous avons décrits deux populations T CD4+ IL17+ IFN γ + et IL17+ IFN γ - bien que seule la population IFN γ - soit retrouvée dans la moelle osseuse des souris malades. Ces résultats nous ont conduits à émettre trois hypothèses ; seules les cellules IFN γ - sont attirées dans la moelle osseuse ; seules les cellules IFN γ - sont maintenues dans la moelle osseuse ou encore les cellules IFN γ + changent de phénotype une fois dans la moelle osseuse et deviennent IFN γ -. Nos études n'ont pas permis de conclure quant à la validité d'une de ces hypothèses. Ainsi, afin de comparer la migration des cellules vers la moelle osseuse, il serait intéressant de comparer les récepteurs aux chimiokines présents sur les cellules IFN γ positives et négatives.

La moelle osseuse a été décrite comme impliquée dans la rétention des cellules mémoires pathogéniques (Nemoto et al 2009, 2012). Ces cellules CD4+ sont capables de sortir de la moelle osseuse et de participer à l'exacerbation de la maladie. Les études sur les cellules mémoires dans la moelle osseuse ont montré que ces cellules sont maintenues dans un état

quiescent. Cet état rend les cellules insensibles aux traitements anti-inflammatoires visant à les éliminer (Tokoyoda et al 2009). Les cellules mésenchymateuses ont été décrites comme ayant un potentiel immunosuppresseur en inhibant la prolifération et la sécrétion cytokinique des cellules T CD4+. Ces cellules forment donc une cible intéressante dans l'étude de la rétention des cellules T CD4+.

L'analyse des cellules mémoires dans la moelle osseuse a retrouvé ces cellules à proximité des cellules mésenchymateuses VCAM1+/IL-7+ (Shinoda et al 2012). L'IL-7 a été décrite comme permettant la survie des cellules T CD4+ pathogéniques dans la moelle osseuse des souris atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Nemoto et al 2012). Nous avons démontré qu'au cours de l'IBD, il y a une augmentation de la sécrétion d'IL-7 par les cellules stromales mésenchymateuses (Ciucci et al 2015). L'IL-7 permet le maintien des cellules CD4+ IL17+ in vitro. Il semble donc que l'IL-7 soit central dans la rétention des cellules CD4+ pathogéniques dans la moelle osseuse. Cependant, les mécanismes d'attraction et d'interaction mis en place afin de permettre la migration des cellules T CD4+ et leur rétention ne sont pas déterminés.

Nous avons montré que les cellules CD4+ IL17+ présentes dans la moelle osseuse des souris malades expriment de grandes quantités de CXCR4, le récepteur au CXCL12. Ce couple de chimiokine a été décrit comme nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Pelus et al 2002). L'étude des progéniteurs des cellules T dans la moelle osseuse a démontré que des cellules sont localisées à proximité de l'endosteum et des cellules productrices de CXCL12 (Scadden et al 2012). Il n'y a cependant aucune étude ayant caractérisé la niche des cellules T CD4+ mémoires dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Le CXCL12 est la chimiokine nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques. Il est ainsi possible que les cellules T mémoires et les HSCs aient des niches communes ou alors partageant des caractéristiques communes. Ces cellules MSCs permettent une régulation de la réponse inflammatoire et pourraient participer à la formation de la niche des cellules T CD4+.

L'étude de la ou des niches des cellules T CD4+ dans la moelle osseuse nous permettrait de comprendre les mécanismes de rétention des cellules. Ces travaux pourraient ainsi conduire à la mise en place de traitements afin de rompre les interactions des cellules avec leur niches et ainsi de libérer les cellules CD4+ de leur niche. Ces traitements en association avec des anti-inflammatoires permettrait de limiter le développement et le maintien de la maladie.

II. Ostéoclastes et inflammation

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées issues de la fusion de cellules myéloïdes (monocytes et cellules dendritiques). Ces cellules participent à la régulation de l'activité des cellules souches hématopoïétiques et des cellules T CD4+ dans la moelle osseuse. Les

mécanismes d'action des ostéoclastes commencent à être connus et interviennent dans la rétention et le maintien des cellules immunitaires dans la moelle osseuse.

A. L'activité des ostéoclastes et la mobilisation des HSCs

Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) sont les cellules à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines ; myéloïdes et lymphoïdes. Ces cellules sont maintenues dans la moelle osseuse dans des niches protectrices où elles sont quiescentes et protégées. Ces niches sont formées des cellules mésenchymateuses et hématopoïétiques. Mon équipe a montré le rôle essentiel des ostéoclastes dans la formation des niches des cellules souches hématopoïétiques *in vivo* (Mansour et al 2012). Les situations de stress, sont associées à une augmentation de l'hématocrite et de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, les ostéoclastes ont été décrits comme participant à la mobilisation des HSCs depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine en rompant les interactions entre les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales (Kollet et al 2006). De plus, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à une augmentation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et de leur différenciation en cellules myéloïdes (Griseri et al 2012). Nous avons montré que le blocage de l'activité des ostéoclastes, dans un modèle d'inflammation chronique intestinale, est associé à une diminution de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques ainsi que de leur différenciation vers la voie myéloïde. Les travaux de Lymperi et al (2011) ont montré que bloquer l'activité des ostéoclastes chez la souris adulte était associée à une diminution du nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. De plus, les travaux de Soki et al (2013) ont montré que le blocage de l'activité des ostéoclastes induit une augmentation de LT-HSC (cellules mémoires à long terme). Nos travaux ont démontré qu'une activité excessive des ostéoclastes induisait une prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Nous avons pu montrer que l'augmentation de l'activité des ostéoclastes induit une différenciation des cellules souches hématopoïétiques vers la voie myéloïde au détriment de la voie lymphoïde. Ainsi, les ostéoclastes participent à l'exacerbation de la maladie en agissant sur les précurseurs des cellules inflammatoires responsables de la mise en place de la maladie. Ces cellules vont augmenter les signes cliniques osseux de la maladie mais ils vont permettre de réguler l'inflammation. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques passe par différentes étapes. L'étude des différents progéniteurs multipotent dans la moelle osseuse permettrait de connaître la ou les cellules cibles de l'activité des ostéoclastes. L'activité des ostéoclastes permet la libération de différentes cytokines et minéraux (notamment le calcium) important dans l'activité cellulaire et aussi dans la régulation des réponses inflammatoires. Ainsi, nous pouvons supposer que l'activité excessive des ostéoclastes va permettre de créer un cercle vicieux qui par sa libération de molécules induit une mobilisation et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les niches des cellules souches hématopoïétiques forment un microenvironnement complexe composé de cellules mésenchymateuses mais aussi immunitaires. Les cellules osseuses et notamment les ostéoblastes sont décrits comme permettant la rétention des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Vijnik et al 2004). La perte du ratio entre le nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes permet d'expliquer la mobilisation accrue des cellules souches hématopoïétiques.

Ainsi, l'activité excessive des ostéoclastes induit un remodelage de l'architecture osseuse conduisant à une perte des interactions entre les cellules souches hématopoïétiques et leurs niches, notamment avec les cellules souches mésenchymateuses. Les interactions cellules/cellules sont nécessaires à la survie et au maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Jung et al 2005). La rupture de ces interactions participe ainsi à leur mobilisation comme dans le cas de l'IBD. De plus, mon équipe a démontré que les traitements aux bisphosphonates induisent des changements au niveau de des cellules stromales mésenchymateuses et pourraient expliquer les modifications observées dans l'activité des cellules souches hématopoïétiques (Mansour et al 2011).

Les ostéoclastes sont les cibles principales des bisphosphonates. Cependant, des études récentes ont montré que ces molécules pouvaient agir sur d'autres cellules de la moelle osseuse. Ainsi, les précurseurs des ostéoclastes (monocytes et cellules dendritiques) sont eux aussi sensibles à ces drogues. De façon intéressante, les macrophages sont importants dans la régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques. La perte des macrophages contribue à une mobilisation accrue des HSCs. De plus, les bisphosphonates de troisième génération sont utilisés en thérapeutique comme anticancéreux de part leur effet sur les cellules cancéreuses (Jiang et al 2016). Ainsi, ces résultats ne nous permettent pas d'exclure que outre l'effet des ostéoclastes il y aurait aussi un effet des précurseurs myéloïdes sur la régulation de la niche des HSCs. Afin d'aller plus loin dans cette étude et de déterminer l'effet spécifique des ostéoclastes, il serait intéressant de déterminer des marqueurs spécifiques des ostéoclastes inflammatoires responsables de la destruction osseuse observée lors des maladies inflammatoires.

B. Interaction des ostéoclastes avec les cellules T CD4+

Les ostéoclastes sont décrits depuis quelques années comme des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, ces cellules expriment à leur surface l'ensemble des molécules permettant l'activation des cellules T CD4+ à savoir le complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que les protéines de co-stimulation CD80/86 (Li et al 2010, Grassi et al 2002). Les ostéoclastes sont capables d'induire la différenciation des cellules CD4+ en cellules tolérogéniques ou inflammatoires (Grassi et al 2011 ; Ibàñez et al 2016). Mon équipe a démontré qu'en condition non inflammatoire, les ostéoclastes ont un effet tolérogénique et induisent la formation de cellules T CD4+ régulatrices (FoxP3+). Au contraire, lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les ostéoclastes CX3CR1+ présents sont

inflammatoires capables d'induire la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules TNF α ⁺ (Ibàñez et al 2016).

Le TNF α est une cytokine inflammatoire participant au recrutement de monocytes CX3CR1 dans la moelle osseuse (Koizumi et al 2009). En effet, le TNF α agit au niveau des cellules stromales mésenchymateuses et induit la production de CX3CL1 et les ostéoblastes et permet l'attraction des monocytes CX3CR1⁺. En complément de l'effet du TNF α , l'IL-17 induit la production des chimiokines MCP1 et MIP1 α par les cellules stromales mésenchymateuses (Ciucci et al 2015). Ces chimiokines permettent l'attraction des monocytes inflammatoires dans la moelle osseuse où ils vont être différenciés en ostéoclastes inflammatoires. L'IL-17 a été décrit comme un inducteur de la différenciation des ostéoclastes en condition inflammatoire (Huang et al 2009). De plus, le profil inflammatoire des cellules CD4⁺ Th17 est associé avec une sécrétion de GM-CSF par ces cellules (Krausgruber et al 2016). Le GM-CSF est une des cytokines importante pour la génération des cellules myéloïdes (monocytes) à partir des cellules souches hématopoïétiques (Miyamoto et al 2001 ; Griseri et al 2012 ; 2015). Lors des maladies inflammatoires chroniques, les taux de cytokines inflammatoires produites par les cellules T CD4⁺ vont participer au recrutement des macrophages dans la moelle osseuse et à leur différenciation en ostéoclastes. Les ostéoclastes produits ont un phénotype inflammatoire et induisent la différenciation des cellules T CD4⁺ vers un profil ThTNF (Ibàñez et al 2016). La production de ces cellules va exacerber l'inflammation et contribue au maintien de la maladie.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont décrites comme des cellules Th1 (Powrie et al 1994 ; Griseri et al 2012). Ces cellules CD4 Th1 sont caractérisées grâce à leur production de TNF α et d'IFN γ . L'IFN γ est une cytokine décrite comme inhibant la différenciation des ostéoclastes *in vivo* et *in vitro* (Fox et al 2000 ; Takayanagi et al 2000). L'IFN γ a des effets plutôt controversés. Ainsi, l'IFN γ interrompt la signalisation entre le couple RANK/RANKL inhibant la différenciation des ostéoclastes (Takayanagi et al 2000). Cependant, la déplétion du récepteur de l'IFN γ est associée à une augmentation de la perte osseuse observée dans les modèles d'arthrite rhumatoïde (Vermeire et al 1997). De plus, la co-culture de cellules CD4⁺ IFN γ ⁻ et de monocytes est associée à une différenciation plus importante des cellules en ostéoclastes que si les monocytes sont mis en présence de cellules CD4⁺ IFN γ ⁺ (Kotake et al 2005). L'IFN γ participe aussi à l'activation et la maturation des cellules dendritiques (Pan et al 2004 ; He et al 2007). Ainsi, les travaux de Gao et al (2007) ont démontré que l'IFN γ participait à l'activation des cellules dendritiques et à la différenciation des cellules CD4⁺ en cellules ostéoclastogéniques. L'IFN γ a une double fonction, inhiber la différenciation des ostéoclastes en interrompant la signalisation du RANKL mais cette cytokine a aussi le pouvoir d'augmenter l'inflammation et l'activation des cellules CD4⁺. Ainsi, lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les cellules CD4⁺ Th1 vont participer à la perte osseuse en augmentant les capacités présentatrices des cellules dendritiques et la production de cellules CD4⁺ Rankl⁺ (Gao et al 2007).

Le blocage de l'activité des ostéoclastes est associé à une diminution de l'inflammation. Les traitements anti-ostéoclastogéniques sont associés à une diminution de l'inflammation en diminuant l'activité des cellules T $\gamma\delta$ mais aussi en diminuant leur rétention dans la moelle osseuse (Fowler et al 2014). La perte des cellules T inflammatoires dans la moelle osseuse est associée à une diminution des cytokines inflammatoires TNF α , IL-17. De plus, les bisphosphonates induisent une diminution de l'activation des cellules dendritiques (Bringmann et al 2007). La diminution de l'expression des molécules co-stimulatrices sur les cellules dendritiques est décrite comme intervenant dans l'orientation des cellules T CD4+ vers la polarisation tolérogénique. Les cellules T CD4+ régulatrices ont été décrites comme inhibant la formation des ostéoclastes et donc la perte osseuse. De plus, les traitements aux bisphosphonates tel que l'acide zolédronique (ZA), vont limiter la fusion des précurseurs des ostéoclastes ainsi que l'activité des cellules formées (Wolf et al 2006). Nous avons montré que le traitement à l'acide zolédronique était associé à une diminution des monocytes dans la moelle osseuse qui peut être associé à une diminution de l'expression de MCP1 par les cellules stromales mésenchymateuses (Jia et al 2015). L'utilisation de bloqueurs des ostéoclastes pourrait ainsi contribuer à une diminution de l'inflammation et permettrait la formation d'ostéoclastes tolérogéniques.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontrent le rôle central des ostéoclastes dans le maintien des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'activité ostéoclastique est responsable de la perte osseuse observée lors de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin mais permet aussi le maintien de l'inflammation. Ces ostéoclastes deviendraient donc des cibles thérapeutiques intéressantes dans la lutte contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Afin d'aller plus loin dans cette étude, la caractérisation des ostéoclastes inflammatoires et leurs différences par rapport aux ostéoclastes régulateurs, leurs mode de recrutement et de différenciation permettrait de mieux traiter les complications osseuses associées aux maladies inflammatoires chroniques.

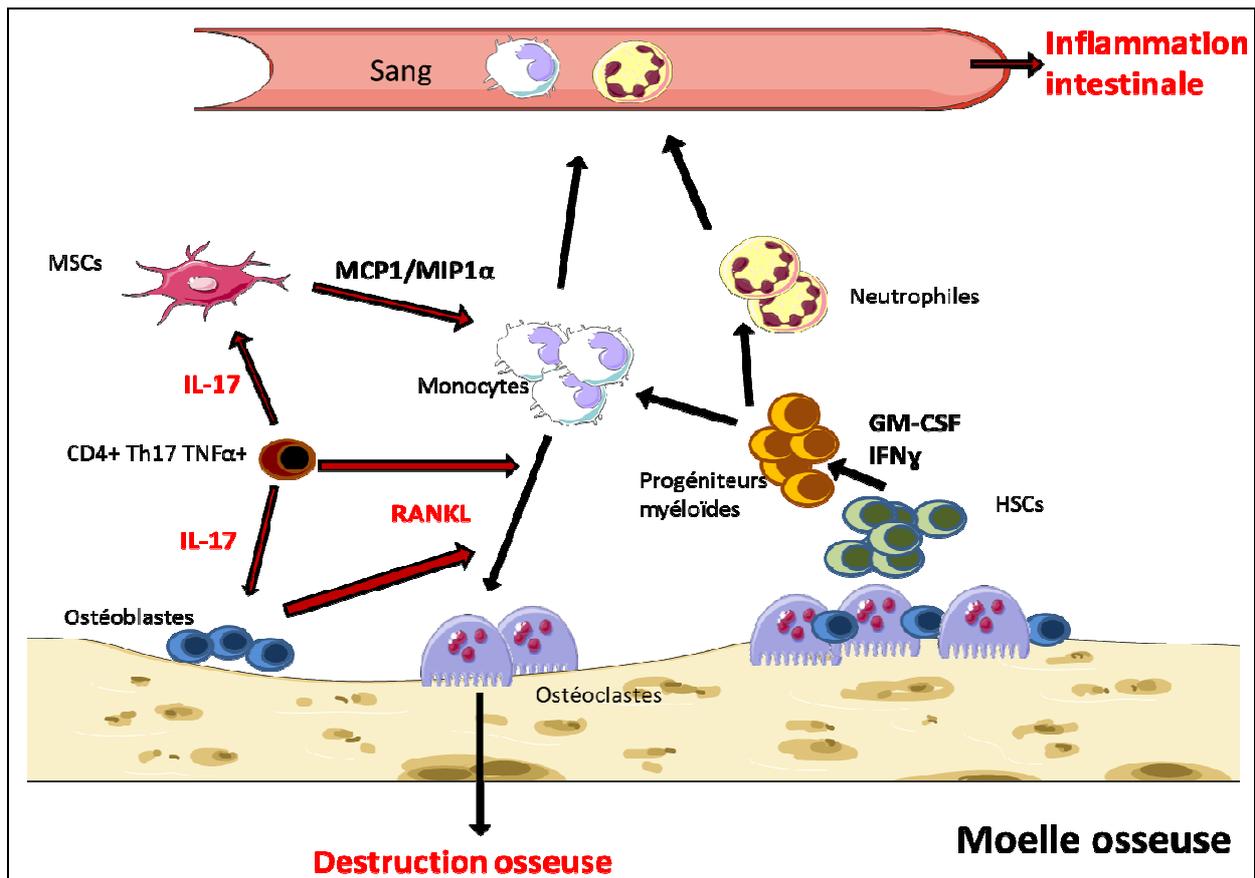


Figure 12: Les ostéoclastes cellules au centre de l'inflammation

Au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les cellules CD4+ Th17 TNFα+ produites au niveau de la lamina propria, migrent dans la moelle osseuse. Ces cellules induisent la différenciation des monocytes en ostéoclastes grâce à leur sécrétion de RANKL. De plus, les cellules Th17 produisent de l'IL-17 permettant la sécrétion de chimiokines (MCP1 et MIP1α) par les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) et le recrutement des monocytes dans la moelle osseuse. Au niveau des ostéoblastes, l'il-17 induit à la destruction osseuse observée lors de la maladie. L'activité des ostéoclastes induit la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et leur différenciation en cellules myéloïdes (neutrophiles et monocytes). Les monocytes néoformés permettent la formation de nouveau ostéoclastes exacerbant la perte osseuse. D'autre part, les cellules myéloïdes migrent au niveau de l'intestin et participent à l'inflammation intestinale.

Bibliographie

- Aarvak, T., Chabaud, M., Miossec, P., and Natvig, J.B. (1999). IL-17 Is Produced by Some Proinflammatory Th1/Th0 Cells But Not by Th2 Cells. *J Immunol* *162*, 1246–1251.
- Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* *406*, 782–787.
- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 593–623.
- Adler, B.J., Kaushansky, K., and Rubin, C.T. (2014). Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. *Nature Reviews Endocrinology* *10*, 737–748.
- Aguila, H.L., Mun, S.H., Kalinowski, J., Adams, D.J., Lorenzo, J.A., and Lee, S.-K. (2012). Osteoblast-specific overexpression of human interleukin-7 rescues the bone mass phenotype of interleukin-7-deficient female mice. *J. Bone Miner. Res.* *27*, 1030–1042.
- Aguirre, J.I., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., and Bellido, T. (2006). Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* *21*, 605–615.
- Ahern, P.P., Schiering, C., Buonocore, S., McGeachy, M.J., Cua, D.J., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Interleukin-23 Drives Intestinal Inflammation through Direct Activity on T Cells. *Immunity* *33*, 279–288.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* *272*, 54–60.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS ONE* *6*, e24226.
- Alegre, M.-L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-CELL REGULATION BY CD28 AND CTLA-4. *Nature Reviews Immunology* *1*, 220–228.
- Ali, N., Jurczyk, J., Shay, G., Tnimov, Z., Alexandrov, K., Munoz, M.A., Skinner, O.P., Pavlos, N.J., and Rogers, M.J. (2015). A highly sensitive prenylation assay reveals in vivo effects of bisphosphonate drug on the Rab prenylome of macrophages outside the skeleton. *Small GTPases* *6*, 202–211.
- Alnaeeli, M., Penninger, J.M., and Teng, Y.-T.A. (2006). Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c+ dendritic cells. *J. Immunol.* *177*, 3314–3326.
- Alp, Ö.S., Durlanik, S., Schulz, D., McGrath, M., Grün, J.R., Bardua, M., Ikuta, K., Sgouroudis, E., Riedel, R., Zehentmeier, S., et al. (2015). Memory CD8+ T cells colocalize with IL-7+ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. *Eur. J. Immunol.* n/a-n/a.

- Al-Rasheed, A., Scheerens, H., Srivastava, A.K., Rennick, D.M., and Tatakis, D.N. (2004). Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. *J. Periodont. Res.* *39*, 194–198.
- Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nature Reviews Immunology* *16*, 247–258.
- Arieta Kuksin, C., Gonzalez-Perez, G., and Minter, L.M. (2015). CXCR4 expression on pathogenic T cells facilitates their bone marrow-infiltration in a mouse model of aplastic anemia. *Blood*.
- Asseman, C., Fowler, S., and Powrie, F. (2000). Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *162*, S185-189.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.
- Bellido, T., Ali, A.A., Plotkin, L.I., Fu, Q., Gubrij, I., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., O'Brien, C.A., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2003). Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 50259–50272.
- Berard, M., and Tough, D.F. (2002). Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology* *106*, 127–138.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235–238.
- Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Quincey, D., and Carle, G.F. (2006). Interleukin-7 partially rescues B-lymphopoiesis in osteopetrotic oc/oc mice through the engagement of B220+CD11b+ progenitors. *Experimental Hematology* *34*, 851–859.
- Blin-Wakkach, C., Rouleau, M., and Wakkach, A. (2014). Roles of osteoclasts in the control of medullary hematopoietic niches. *Arch. Biochem. Biophys.* *561*, 29–37.
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 229–238.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* *423*, 337–342.
- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., and Hansen, W. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *34*, 623–630.
- Bultink, I.E.M., Lems, W.F., Kostense, P.J., Dijkmans, B.A.C., and Voskuyl, A.E. (2005). Prevalence of and risk factors for low bone mineral density and vertebral fractures in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *52*, 2044–2050.

Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., et al. (2014). HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20, 139–142.

Byrne, F.R., Morony, S., Warmington, K., Geng, Z., Brown, H.L., Flores, S.A., Fiorino, M., Yin, S.L., Hill, D., Porkess, V., et al. (2005). CD4⁺CD45RB^{hi} T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut* 54, 78–86.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.

Casey, K.A., Fraser, K.A., Schenkel, J.M., Moran, A., Abt, M.C., Beura, L.K., Lucas, P.J., Artis, D., Wherry, E.J., Hogquist, K., et al. (2012). Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol.* 188, 4866–4875.

Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., Learman, B.S., Parlee, S.D., Simon, B.R., Mori, H., Ning, X., Bree, A.J., Schell, B., Broome, D.T., et al. (2014). Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. *Cell Metabolism* 20, 368–375.

Centrella, M., McCarthy, T.L., and Canalis, E. (1988). Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 123, 1442–1448.

Chan, H.-L., Yip, H.-Y., Mak, N.-K., and Leung, K.-N. (2009). Modulatory effects and action mechanisms of tryptanthrin on murine myeloid leukemia cells. *Cell. Mol. Immunol.* 6, 335–342.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., et al. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85–A, 1544–1552.

Ciucci, T., Ibáñez, L., Boucoiran, A., Birgy-Barelli, E., Pène, J., Abou-Ezzi, G., Arab, N., Rouleau, M., Hébuterne, X., Yssel, H., et al. (2015). Bone marrow Th17 TNF α cells induce osteoclast differentiation, and link bone destruction to IBD. *Gut* 64, 1072–1081.

Cobb, R.M., Oestreich, K.J., Osipovich, O.A., and Oltz, E.M. (2006). Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv. Immunol.* 91, 45–109.

Coffman, R.L., Seymour, B.W., Lebman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F., Finkelman, F.D., and Bond, M.W. (1988). The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102, 5–28.

Cui, G., Staron, M.M., Gray, S.M., Ho, P.-C., Amezcua, R.A., Wu, J., and Kaech, S.M. (2015). IL-7-Induced Glycerol Transport and TAG Synthesis Promotes Memory CD8⁺ T Cell Longevity. *Cell* 161, 750–761.

- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (1998). CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J. Immunol.* *160*, 3236–3243.
- Dai, X.-M. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* *99*, 111–120.
- Dianda, L., Hanby, A.M., Wright, N.A., Sebesteny, A., Hayday, A.C., and Owen, M.J. (1997). T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am. J. Pathol.* *150*, 91–97.
- Di Rosa, F., and Pabst, R. (2005). The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends in Immunology* *26*, 360–366.
- Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231–235.
- Dominici, M., Hofmann, T.J., and Horwitz, E.M. (2001). Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* *15*, 28–37.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* *89*, 747–754.
- El Azreq, M.-A., Arseneault, C., Boisvert, M., Pagé, N., Allaey, I., Poubelle, P.E., Tessier, P.A., and Aoudjit, F. (2015). Cooperation between IL-7 Receptor and Integrin $\alpha 2\beta 1$ (CD49b) Drives Th17-Mediated Bone Loss. *J. Immunol.* *195*, 4198–4209.
- Esposito, M., Ruffini, F., Bergami, A., Garzetti, L., Borsellino, G., Battistini, L., Martino, G., and Furlan, R. (2010). IL-17- and IFN- γ -secreting Foxp3⁺ T cells infiltrate the target tissue in experimental autoimmunity. *J. Immunol.* *185*, 7467–7473.
- Ezine, S., and Ceredig, R. (1994). Haemopoiesis and early T-cell differentiation. *Immunol. Today* *15*, 151–154.
- Fazeli, P.K., Bredella, M.A., Freedman, L., Thomas, B.J., Breggia, A., Meenaghan, E., Rosen, C.J., and Klibanski, A. (2012). Marrow fat and preadipocyte factor-1 levels decrease with recovery in women with anorexia nervosa. *J. Bone Miner. Res.* *27*, 1864–1871.
- Feng, C., Woodside, K.J., Vance, B.A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B.J., Shores, E.W., and Love, P.E. (2002). A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* *14*, 535–544.
- Feng, T., Qin, H., Wang, L., Benveniste, E.N., Elson, C.O., and Cong, Y. (2011). Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J. Immunol.* *186*, 6313–6318.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.

- Fowler, D.W., Copier, J., Dalgleish, A.G., and Bodman-Smith, M.D. (2014). Zoledronic acid causes $\gamma\delta$ T cells to target monocytes and down-modulate inflammatory homing. *Immunology* *143*, 539–549.
- Franchimont, N., Reenaers, C., Lambert, C., Belaiche, J., Bours, V., Malaise, M., Delvenne, P., and Louis, E. (2004). Increased expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* *138*, 491–498.
- Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., and Wagner, D.D. (1998). Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 14423–14428.
- Fukuda, S. (2005). Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood* *105*, 3117–3126.
- Ganusov, V.V. (2007). Discriminating between different pathways of memory CD8+ T cell differentiation. *J. Immunol.* *179*, 5006–5013.
- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M.R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., Weitzmann, M.N., and Pacifici, R. (2007). IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J. Clin. Invest.* *117*, 122–132.
- Gasper, D.J., Tejera, M.M., and Suresh, M. (2014). CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit. Rev. Immunol.* *34*, 121–146.
- Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2013). Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood* *121*, 567–568.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine* *17*, 1290–1297.
- Gaublomme, J.T., Yosef, N., Lee, Y., Gertner, R.S., Yang, L.V., Wu, C., Pandolfi, P.P., Mak, T., Satija, R., Shalek, A.K., et al. (2015). Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* *163*, 1400–1412.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* *208*, 1127–1133.
- Gertz, B.J., Holland, S.D., Kline, W.F., Matuszewski, B.K., and Porras, A.G. (1993). Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int* *3 Suppl 3*, S13-16.
- Gottlieb, D.J., Cryz, S.J., Furer, E., Que, J.U., Prentice, H.G., Duncombe, A.S., and Brenner, M.K. (1990). Immunity against *Pseudomonas aeruginosa* adoptively transferred to bone marrow transplant recipients. *Blood* *76*, 2470–2475.

- Grassi, F., Manferdini, C., Cattini, L., Piacentini, A., Gabusi, E., Facchini, A., and Lisignoli, G. (2011). T cell suppression by osteoclasts in vitro. *J. Cell. Physiol.* *226*, 982–990.
- Griseri, T., McKenzie, B.S., Schiering, C., and Powrie, F. (2012). Dysregulated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Activity Promotes Interleukin-23-Driven Chronic Intestinal Inflammation. *Immunity* *37*, 1116–1129.
- Griseri, T., Arnold, I.C., Pearson, C., Krausgruber, T., Schiering, C., Franchini, F., Schulthess, J., McKenzie, B.S., Crocker, P.R., and Powrie, F. (2015). Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated Eosinophils Promote Interleukin-23 Driven Chronic Colitis. *Immunity* *43*, 187–199.
- Grymuła, K., Paczkowska, E., Dziedziejko, V., Baškiewicz-Masiuk, M., Kawa, M., Baumert, B., Celewicz, Z., Gawrych, E., and Machaliński, B. (2007). The influence of 3,3',5-triiodo-L-thyronine on human haematopoiesis. *Cell Proliferation* *40*, 302–315.
- Guntur, A.R., and Rosen, C.J. (2013). IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *BoneKEy Reports* *2*.
- Hamill, C.L., Bridwell, K.H., Lenke, L.G., Chapman, M.P., Baldus, C., and Blanke, K. (1997). Posterior arthrodesis in the skeletally immature patient. Assessing the risk for crankshaft: is an open triradiate cartilage the answer? *Spine* *22*, 1343–1351.
- Hanley, M.B., Napolitano, L.A., and McCune, J.M. (2005). Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis. *Stem Cells* *23*, 1170–1179.
- Hänninen, A., Maksimow, M., Alam, C., Morgan, D.J., and Jalkanen, S. (2011). Ly6C supports preferential homing of central memory CD8⁺ T cells into lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* *41*, 634–644.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* *423*, 349–355.
- Harbour, S.N., Maynard, C.L., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 7061–7066.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 349–356.
- Hasegawa, M., Yada, S., Liu, M.Z., Kamada, N., Muñoz-Planillo, R., Do, N., Núñez, G., and Inohara, N. (2014). Interleukin-22 regulates the complement system to promote resistance against pathobionts after pathogen-induced intestinal damage. *Immunity* *41*, 620–632.
- Hayashi, S.-I., Yamada, T., Tsuneto, M., Yamane, T., Takahashi, M., Shultz, L.D., and Yamazaki, H. (2003). Distinct osteoclast precursors in the bone marrow and extramedullary organs characterized by responsiveness to Toll-like receptor ligands and TNF- α . *J. Immunol.* *171*, 5130–5139.

He, T., Tang, C., Xu, S., Moyana, T., and Xiang, J. (2007). Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2.4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.* *4*, 105–111.

Hirbe, A.C., Roelofs, A.J., Floyd, D.H., Deng, H., Becker, S.N., Lanigan, L.G., Apicelli, A.J., Xu, Z., Prior, J.L., Eagleton, M.C., et al. (2009). The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* *44*, 908–916.

Horwood, N.J., Kartsogiannis, V., Quinn, J.M., Romas, E., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1999). Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *265*, 144–150.

Hsu, S.-C., Wang, L.-T., Yao, C.-L., Lai, H.-Y., Chan, K.-Y., Liu, B.-S., Chong, P., Lee, O.K.-S., and Chen, H.-W. (2013). Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells. *Immunobiology* *218*, 90–95.

Huang, H., Kim, H.J., Chang, E.-J., Lee, Z.H., Hwang, S.J., Kim, H.-M., Lee, Y., and Kim, H.-H. (2009). IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death and Differentiation* *16*, 1332–1343.

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

Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G.D., Mundy, G.R., and Boyce, B.F. (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* *10*, 1478–1487.

Ibáñez, L., Abou-Ezzi, G., Ciucci, T., Amiot, V., Belaïd, N., Obino, D., Mansour, A., Rouleau, M., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2016). Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4(+) T Cells and Express CX3 CR1. *J. Bone Miner. Res.*

Jaakkola, I., Merinen, M., Jalkanen, S., and Hänninen, A. (2003). Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells. *J. Immunol.* *170*, 1283–1290.

Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res.* *13*, 793–802.

Kalla, A.A., Fataar, A.B., Jessop, S.J., and Bewerunge, L. (1993). Loss of trabecular bone mineral density in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *36*, 1726–1734.

Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Hisamatsu, T., and Hibi, T. (2012). ROR γ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* *5*, 240–247.

Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Dig Dis* *28*, 395–405.

- Kavanagh, K.L., Guo, K., Dunford, J.E., Wu, X., Knapp, S., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., Russell, R.G.G., and Oppermann, U. (2006). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 7829–7834.
- Keller, J., Catala-Lehnen, P., Huebner, A.K., Jeschke, A., Heckt, T., Lueth, A., Krause, M., Koehne, T., Albers, J., Schulze, J., et al. (2014). Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nature Communications* *5*, 5215.
- Kiesel, J.R., Buchwald, Z.S., and Aurora, R. (2009). Cross-presentation by osteoclasts induces FoxP3 in CD8+ T cells. *J. Immunol.* *182*, 5477–5487.
- Koizumi, K., Saitoh, Y., Minami, T., Takeno, N., Tsuneyama, K., Miyahara, T., Nakayama, T., Sakurai, H., Takano, Y., Nishimura, M., et al. (2009). Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *J. Immunol.* *183*, 7825–7831.
- Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R.M., Goichberg, P., Spiegel, A., et al. (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature Medicine* *12*, 657–664.
- Kollet, O., Canaani, J., Kalinkovich, A., and Lapidot, T. (2012). Regulatory cross talks of bone cells, hematopoietic stem cells and the nervous system maintain hematopoiesis. *Inflamm Allergy Drug Targets* *11*, 170–180.
- Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* *99*, 1233–1239.
- Kondo, M. (2010). Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol. Rev.* *238*, 37–46.
- Kong, Y., Wang, H., Lin, T., and Wang, S. (2014). Sphingosine-1-phosphate/S1P receptors signaling modulates cell migration in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mediators Inflamm.* *2014*, 565369.
- Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., et al. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* *402*, 304–309.
- Koni, P.A., Joshi, S.K., Temann, U.A., Olson, D., Burkly, L., and Flavell, R.A. (2001). Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J. Exp. Med.* *193*, 741–754.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007). Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.* *19*, 362–371.
- Kotake, S., Udagawa, N., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Ishiyama, S., Kim, K.J., et al. (2001). Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* *44*, 1003–1012.

- Kotake, S., Nanke, Y., Mogi, M., Kawamoto, M., Furuya, T., Yago, T., Kobashigawa, T., Togari, A., and Kamatani, N. (2005). IFN- γ -producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. *Eur. J. Immunol.* *35*, 3353–3363.
- Krausgruber, T., Schiering, C., Adelman, K., Harrison, O.J., Chomka, A., Pearson, C., Ahern, P.P., Shale, M., Oukka, M., and Powrie, F. (2016). T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4⁺ T cell responses in the intestine. *Nature Communications* *7*, 11627.
- Krishnan, V., Moore, T.L., Ma, Y.L., Helvering, L.M., Frolik, C.A., Valasek, K.M., Ducey, P., and Geiser, A.G. (2003). Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol. Endocrinol.* *17*, 423–435.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* *75*, 263–274.
- Lancioni, C.L., Thomas, J.J., and Rojas, R.E. (2009). Activation requirements and responses to TLR ligands in human CD4⁺ T cells: comparison of two T cell isolation techniques. *J. Immunol. Methods* *344*, 15–25.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* *13*, 991–999.
- Lévesque, J.P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Williams, B., Winkler, I.G., and Simmons, P.J. (2002). Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp. Hematol.* *30*, 440–449.
- Li, Y.P., and Chen, W. (1999). Characterization of mouse cathepsin K gene, the gene promoter, and the gene expression. *J. Bone Miner. Res.* *14*, 487–499.
- Li, H., Hong, S., Qian, J., Zheng, Y., Yang, J., and Yi, Q. (2010). Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Blood* *116*, 210–217.
- Li, J., Huston, G., and Swain, S.L. (2003). IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J. Exp. Med.* *198*, 1807–1815.
- Lugli, E., Dominguez, M.H., Gattinoni, L., Chattopadhyay, P.K., Bolton, D.L., Song, K., Klatt, N.R., Brenchley, J.M., Vaccari, M., Gostick, E., et al. (2013). Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J. Clin. Invest.* *123*, 594–599.
- Lymperi, S., Ersek, A., Ferraro, F., Dazzi, F., and Horwood, N.J. (2011). Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood* *117*, 1540–1549.
- Mackay, L.K., Rahimpour, A., Ma, J.Z., Collins, N., Stock, A.T., Hafon, M.-L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S.N., Stefanovic, T., et al. (2013). The developmental pathway for CD103⁺CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* *14*, 1294–1301.

- Mansour, A., Anginot, A., Mancini, S.J.C., Schiff, C., Carle, G.F., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2011). Osteoclast activity modulates B-cell development in the bone marrow. *Cell Res.* 21, 1102–1115.
- Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., W. Jacobsen, S.E., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2012). Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 209, 537–549.
- Marshall, H.D., Chandele, A., Jung, Y.W., Meng, H., Poholek, A.C., Parish, I.A., Rutishauser, R., Cui, W., Kleinstein, S.H., Craft, J., et al. (2011). Differential Expression of Ly6C and T-bet Distinguish Effector and Memory Th1 CD4⁺ Cell Properties during Viral Infection. *Immunity* 35, 633–646.
- Maruyama, Z., Yoshida, C.A., Furuichi, T., Amizuka, N., Ito, M., Fukuyama, R., Miyazaki, T., Kitaura, H., Nakamura, K., Fujita, T., et al. (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev. Dyn.* 236, 1876–1890.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360.
- McDonald, P.W., Read, K.A., Baker, C.E., Anderson, A.E., Powell, M.D., Ballesteros-Tato, A., and Oestreich, K.J. (2016). IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat Commun* 7, 10285.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9.
- Méndez-Ferrer, S., Battista, M., and Frenette, P.S. (2010a). Cooperation of β 2- and β 3-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization: β -adrenoceptors in bone marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, 139–144.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010b). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
- Mercier, B.C., Cottalorda, A., Coupet, C.-A., Marvel, J., and Bonnefoy-Bérard, N. (2009). TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J. Immunol.* 182, 1860–1867.
- Mercier, F.E., Ragu, C., and Scadden, D.T. (2011). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nature Reviews Immunology* 12, 49–60.
- Miyamoto, K., Yoshida, S., Kawasumi, M., Hashimoto, K., Kimura, T., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyauchi, Y., Hoshi, H., Iwasaki, R., et al. (2011). Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J Exp Med* 208, 2175–2181.
- Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A.R.R., et al. (2014). Differential roles of epigenetic

- changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 5289–5294.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327–334.
- Moschen, A.R., Kaser, A., Stadlmann, S., Millonig, G., Kaser, S., Mühllechner, P., Habior, A., Graziadei, I., Vogel, W., and Tilg, H. (2005). The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J. Hepatol.* *43*, 973–983.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* *317*, 256–260.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annual Review of Immunology* *31*, 137–161.
- Muljo, S.A., and Schlissel, M.S. (2000). Pre-B and pre-T-cell receptors: conservation of strategies in regulating early lymphocyte development. *Immunol. Rev.* *175*, 80–93.
- Nakashima, T., and Takayanagi, H. (2011). New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1240*, E13-18.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17–29.
- Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M. (2007). Bone Marrow Retaining Colitogenic CD4+ T Cells May Be a Pathogenic Reservoir for Chronic Colitis. *Gastroenterology* *132*, 176–189.
- Nemoto, Y., Kanai, T., Takahara, M., Oshima, S., Nakamura, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2012). Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut*.
- O’Brien, C.A., Nakashima, T., and Takayanagi, H. (2013). Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* *54*, 258–263.
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* *33*, 387–399.
- Pacifici, R. (2016). The Role of IL-17 and TH17 Cells in the Bone Catabolic Activity of PTH. *Front Immunol* *7*, 57.
- Pan, J., Zhang, M., Wang, J., Wang, Q., Xia, D., Sun, W., Zhang, L., Yu, H., Liu, Y., and Cao, X. (2004). Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol. Lett.* *94*, 141–151.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance

and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* *150*, 823–832.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.

Pedroza-Pacheco, I., Shah, D., Domogala, A., Luevano, M., Blundell, M., Jackson, N., Thrasher, A., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2016). Regulatory T cells inhibit CD34+ cell differentiation into NK cells by blocking their proliferation. *Sci Rep* *6*, 22097.

Pène, J., Chevalier, S., Preisser, L., Vénéreau, E., Guilleux, M.-H., Ghannam, S., Molès, J.-P., Danger, Y., Ravon, E., Lesaux, S., et al. (2008). Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J. Immunol.* *180*, 7423–7430.

Pepper, M., and Jenkins, M.K. (2011). ORIGINS OF CD4+ EFFECTOR AND CENTRAL MEMORY T CELLS. *Nat Immunol* *12*, 467–471.

Pepper, M., Pagán, A.J., Igyártó, B.Z., Taylor, J.J., and Jenkins, M.K. (2011). Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* *35*, 583–595.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994a). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* *1*, 553–562.

Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R.L. (1994b). Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* *179*, 589–600.

Price, P.W., and Cerny, J. (1999). Characterization of CD4+ T cells in mouse bone marrow. I. Increased activated/memory phenotype and altered TCR Vbeta repertoire. *Eur. J. Immunol.* *29*, 1051–1056.

Pronk, C.J.H., Veiby, O.P., Bryder, D., and Jacobsen, S.E.W. (2011). Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med* *208*, 1563–1570.

Reffitt, D.M., Meenan, J., Sanderson, J.D., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., and Thompson, R.P. (2003). Bone density improves with disease remission in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* *15*, 1267–1273.

Ribeiro, S.P., Milush, J.M., Cunha-Neto, E., Kallas, E.G., Kalil, J., Somsouk, M., Hunt, P.W., Deeks, S.G., Nixon, D.F., and SenGupta, D. (2014a). The CD8+ Memory Stem T Cell (TSCM) Subset Is Associated with Improved Prognosis in Chronic HIV-1 Infection. *J. Virol.* *88*, 13836–13844.

Ribeiro, V., Garcia, M., Oliveira, R., Gomes, P.S., Colaço, B., and Fernandes, M.H. (2014b). Bisphosphonates induce the osteogenic gene expression in co-cultured human endothelial and mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 27–37.

- Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Rabourdin-Combe, C., Jurdic, P., and Servet-Delprat, C. (2004). Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* *104*, 4029–4037.
- Robinson, P.W., Green, S.J., Carter, C., Coadwell, J., and Kilshaw, P.J. (2001). Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin alphaEbeta7 (CD103). *Immunology* *103*, 146–154.
- van Roon, J.A.G., Verweij, M.C., Wijk, M.W., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., and Lafeber, F.P.J.G. (2005). Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages. *Arthritis Rheum.* *52*, 1700–1710.
- Russell, R.G.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., and Rogers, M.J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* *19*, 733–759.
- Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* *101*, 455–458.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., et al. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine* *203*, 2673–2682.
- Sato, M., Sardana, M.K., Grasser, W.A., Garsky, V.M., Murray, J.M., and Gould, R.J. (1990). Echinostatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture. *J. Cell Biol.* *111*, 1713–1723.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Schlissel, M.S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 359–383.
- SCHEININ, T., BUTLER, D.M., SALWAY, F., SCALLON, B., and FELDMANN, M. (2003). Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol* *133*, 38–43.
- Scheller, E.L., Doucette, C.R., Learman, B.S., Cawthorn, W.P., Khandaker, S., Schell, B., Wu, B., Ding, S.-Y., Bredella, M.A., Fazeli, P.K., et al. (2015). Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* *6*, 7808.
- Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity* *41*, 886–897.
- Schminke, B., Trautmann, S., Mai, B., Miosge, N., and Blaschke, S. (2016). Interleukin 17 inhibits progenitor cells in rheumatoid arthritis cartilage. *Eur. J. Immunol.* *46*, 440–445.

- Seiderer, J., Elben, I., Diegelmann, J., Glas, J., Stallhofer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Jürgens, M., Schmechel, S., Konrad, A., et al. (2008). Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 437–445.
- Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D.J., Radbruch, A., et al. (2012). Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 7409–7414.
- Shiow, L.R., Rosen, D.B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G., and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* *440*, 540–544.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* *89*, 309–319.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E.W. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* *17*, 463–472.
- Skon, C.N., Lee, J.-Y., Anderson, K.G., Masopust, D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 1285–1293.
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity* *8*, 363–372.
- Soki, F.N., Li, X., Berry, J., Koh, A., Sinder, B.P., Qian, X., Kozloff, K.M., Taichman, R.S., and McCauley, L.K. (2013). The effects of zoledronic acid in the bone and vasculature support of hematopoietic stem cell niches. *J. Cell. Biochem.* *114*, 67–78.
- Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L., and Ago, J.M. (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.* *138*, 1464–1468.
- Stockinger, B., Veldhoen, M., and Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *19*, 353–361.
- Stolina, M., Dwyer, D., Ominsky, M.S., Corbin, T., Van, G., Bolon, B., Sarosi, I., McCabe, J., Zack, D.J., and Kostenuik, P. (2007). Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses. *J. Immunol.* *179*, 7497–7505.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* *20*, 345–357.

- Sweeney, E., Campbell, M., Watkins, K., Hunter, C.A., and Jacenko, O. (2008). Altered endochondral ossification in collagen X mouse models leads to impaired immune responses. *Dev. Dyn.* 237, 2693–2704.
- Takahara, M., Nemoto, Y., Oshima, S., Matsuzawa, Y., Kanai, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Yamamoto, K., and Watanabe, M. (2013). IL-7 promotes long-term in vitro survival of unique long-lived memory subset generated from mucosal effector memory CD4⁺ T cells in chronic colitis mice. *Immunology Letters* 156, 82–93.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J., and Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600–2602.
- Takai, S., Schlom, J., Tucker, J., Tsang, K.Y., and Greiner, J.W. (2013). Inhibition of TGF- 1 Signaling Promotes Central Memory T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 191, 2299–2307.
- Takami, M., Kim, N., Rho, J., and Choi, Y. (2002). Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J. Immunol.* 169, 1516–1523.
- Takamura, S., Yagi, H., Hakata, Y., Motozono, C., McMaster, S.R., Masumoto, T., Fujisawa, M., Chikaishi, T., Komeda, J., Itoh, J., et al. (2016). Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *The Journal of Experimental Medicine* jem.20160938.
- Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., Koshihara, Y., Oda, H., Nakamura, K., and Tanaka, S. (2000). Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 259–269.
- Tilg, H., Moschen, A.R., Kaser, A., Pines, A., and Dotan, I. (2008). Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut* 57, 684–694.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* 20, 707–718.
- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A.N., Albrecht, I., Grün, J.R., Löhning, M., and Radbruch, A. (2009). Professional Memory CD4⁺ T Lymphocytes Preferentially Reside and Rest in the Bone Marrow. *Immunity* 30, 721–730.
- Vasaturo, A., Di Blasio, S., Peeters, D.G.A., de Koning, C.C.H., de Vries, J.M., Figdor, C.G., and Hato, S.V. (2013). Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Frontiers in Immunology* 4.
- Vermeulen, M., Le Pesteur, F., Gagnerault, M.C., Mary, J.Y., Sainteny, F., and Lepault, F. (1998). Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 92, 894–900.
- Vicente, R., Quentin, J., Mausset-Bonnefont, A.-L., Chuchana, P., Martire, D., Cren, M., Jorgensen, C., and Louis-Pence, P. (2016). Nonclassical CD4⁺CD49b⁺ Regulatory T Cells as a

Better Alternative to Conventional CD4+CD25+ T Cells To Dampen Arthritis Severity. *The Journal of Immunology* *196*, 298–309.

Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* *103*, 3258–3264.

Vitté, C., Fleisch, H., and Guenther, H.L. (1996). Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* *137*, 2324–2333.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.-P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* *18*, 605–617.

Wakkach, A., Mansour, A., Dacquin, R., Coste, E., Jurdic, P., Carle, G.F., and Blin-Wakkach, C. (2008). Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* *112*, 5074–5083.

Walsh, M.C., and Choi, Y. (2003). Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 251–263.

Walunas, T.L., Bruce, D.S., Dustin, L., Loh, D.Y., and Bluestone, J.A. (1995). Ly-6C is a marker of memory CD8+ T cells. *J. Immunol.* *155*, 1873–1883.

Wang, B.L., Dai, C.L., Quan, J.X., Zhu, Z.F., Zheng, F., Zhang, H.X., Guo, S.Y., Guo, G., Zhang, J.Y., and Qiu, M.C. (2006). Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells. *J. Endocrinol. Invest.* *29*, 101–108.

Wang, C., Yosef, N., Gaublot, J., Wu, C., Lee, Y., Clish, C.B., Kaminski, J., Xiao, S., Zu Horste, G.M., Pawlak, M., et al. (2015). CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* *163*, 1413–1427.

Wang, S., Zhang, Y., Soosairajah, J., and Kraft, A.S. (2007). Regulation of RUNX1/AML1 during the G2/M transition. *Leuk. Res.* *31*, 839–851.

Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., and Lazarevic, V. (2014). The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. *Immunity* *40*, 355–366.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 821–852.

Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 93–106.

Wolf, A.M., Rumpold, H., Tilg, H., Gastl, G., Gunsilius, E., and Wolf, D. (2006). The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica* *91*, 1165–1171.

Wu, Y., Humphrey, M.B., and Nakamura, M.C. (2008). Osteoclasts - the innate immune cells of the bone. *Autoimmunity* *41*, 183–194.

- Yan, Y., Zhang, G.-X., Gran, B., Fallarino, F., Yu, S., Li, H., Cullimore, M.L., Rostami, A., and Xu, H. (2010). IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *185*, 5953–5961.
- Yang, X., and Karsenty, G. (2002). Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* *8*, 340–345.
- Yoshida, C.A., Komori, H., Maruyama, Z., Miyazaki, T., Kawasaki, K., Furuichi, T., Fukuyama, R., Mori, M., Yamana, K., Nakamura, K., et al. (2012). SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS ONE* *7*, e32364.
- Zaiss, M.M., Axmann, R., Zwerina, J., Polzer, K., Gückel, E., Skapenko, A., Schulze-Koops, H., Horwood, N., Cope, A., and Schett, G. (2007). Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum.* *56*, 4104–4112.
- Zayzafoon, M., Meyers, V.E., and McDonald, J.M. (2005). Microgravity: the immune response and bone. *Immunol. Rev.* *208*, 267–280.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2013). Transforming growth factor- β signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* *39*, 687–696.
- Zhang, D.E., Fujioka, K., Hetherington, C.J., Shapiro, L.H., Chen, H.M., Look, A.T., and Tenen, D.G. (1994). Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol. Cell. Biol.* *14*, 8085–8095.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836–841.
- Zhao, H., and Patrick Ross, F. (2007). Mechanisms of osteoclastic secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1116*, 238–244.
- Zheng, S.G. (2008). The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med* *1*, 192–202.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587–596.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* *14*, 282–289.
- Ziegler, S.F., Ramsdell, F., and Alderson, M.R. (1994). The activation antigen CD69. *STEM CELLS* *12*, 456–465.

L'inflammation est un mécanisme complexe faisant intervenir les différentes cellules du système immunitaire. Les maladies inflammatoires chroniques sont associées à un maintien de la réponse inflammatoire et la présence des cellules inflammatoires notamment les lymphocytes T CD4+ mémoires. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn sont associées à une perte osseuse pathogénique. Lors de ces maladies, il a été observé une augmentation de l'activité des ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption osseuse. Ces cellules sont issues de la différenciation des monocytes en présence de deux cytokines, le MCSF et le RANKL. Lors des maladies inflammatoires chroniques les cellules T CD4+ ont été décrites comme participant à l'ostéoclastogénèse. Cependant, la nature exacte des cellules T CD4+ impliquées dans la perte osseuse reste encore indéterminée.

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique se caractérisant par une inflammation du tractus digestif et une perte osseuse pathogénique chez 50% des patients. Des études sur des modèles murins de la maladie nous ont permis de mettre en avant la présence d'une population T CD4+ ostéoclastogénique dans la moelle osseuse. Nous avons pu caractériser le phénotype et le mécanisme d'action de ces cellules au cours de la maladie et leur implication dans la perte osseuse. Nous avons pu démontrer que ces cellules CD4+ TNFalpha Th17+ participaient au recrutement et à la différenciation des monocytes en ostéoclastes en induisant la sécrétion de chimiokines par les stromales mésenchymateuses et en sécrétant du RANKL. De façon intéressante, nous avons pu retrouver cette population ostéoclastogénique dans le sang de patients atteints de la maladie de Crohn. Ces travaux ont permis de lier les deux phénomènes majeurs observés dans la maladie à savoir l'inflammation intestinale et la perte osseuse.

Au cours de l'inflammation, il a été observé une augmentation du nombre et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules vont être à l'origine des cellules inflammatoires responsables de la maladie. Les ostéoclastes ont été décrits comme participant à la régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques. Lors de la deuxième partie de ma thèse nous avons étudié le rôle des ostéoclastes dans la régulation des niches des cellules souches hématopoïétiques dans un contexte inflammatoire. L'utilisation de bloqueur de l'activité ostéoclastique, nous a permis de montrer que ces cellules participent à la mobilisation et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules CD4+ mémoires vont participer au développement de l'inflammation mais aussi à la perte osseuse pathogénique. Les études ont montré que ces cellules étaient maintenues dans la moelle osseuse. Cependant, la composition de leur niches ainsi que leur mécanismes de rétention dans la moelle restent encore à être déterminer et permettraient de lutter contre la maladie de Crohn.

Mots clés : inflammation, ostéoimmunologie, ostéoclastes, cellules CD4+ mémoires