

Etude du rôle de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8+ au niveau de la muqueuse intestinale

Ramdane Igalouzene

► To cite this version:

Ramdane Igalouzene. Etude du rôle de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8+ au niveau de la muqueuse intestinale. Immunologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT: 2021LYSE1227. tel-03957039

HAL Id: tel-03957039 https://theses.hal.science/tel-03957039

Submitted on 26 Jan 2023 $\,$

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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1227

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale : ED BMIC 340 (Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Immunologie **Discipline** : Immunologie des muqueuses

Soutenue publiquement le 02/11/2021, par :

Ramdane IGALOUZENE

Etude du rôle de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8⁺ au niveau de la muqueuse intestinale

Devant le jury composé de :

Sophie LUCAS	Professeur à l'Université Catholique de Louva	ain Rapporteur
Grégory VERDEIL	Chercheur à l'Université de Lausanne	Rapporteur
Jacqueline MARVEL	Directrice de recherche CNRS au CIRI/Lyon	Examinatrice
Hugues LELOUARD	Chercheur CNRS au CIML/Marseille	Examinateur
Ulrich VALCOURT	Professeur des Universités Lyon 1	Examinateur
Saidi M'HOMA SOUDJA	Chercheur CNRS au CRCL/Lyon	Directeur de thèse

<u> Université Claude Bernard – LYON 1</u>

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Résumé en Français

Les défis actuels dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) soulignent la nécessité de mieux comprendre leur étiologie. SMAD4, un médiateur clé de la signalisation du TGF-β, joue un rôle crucial dans les lymphocytes T pour prévenir les MICI. Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires n'ont pas encore été formellement démontrés. Au cours de ma thèse, nous avons révélé de manière inattendue qu'une fonction SMAD4 indépendante du TGF-β dans les lymphocytes T CD8 est cruciale pour prévenir l'inflammation intestinale chronique spontanée induite par le microbiote. Nous avons montré que la délétion de cette fonction de SMAD4 indépendante du TGF-β affecte largement abiologie des lymphocytes T CD8 au niveau moléculaire et fonctionnel, avec des conséguences importantes sur l'homéostasie intestinale. Nous avons découvert de manière surprenante que SMAD4 antagonise la signature du TGF-B dans les lymphocytes T CD8 d'une manière complètement indépendante d'un stimulus TGF- β au préalable. Ainsi, la délétion de SMAD4 provoque des conséquences transcriptionnelles et fonctionnelles opposées par rapport à la délétion de la signalisation du TGF-β. Une autre conclusion clé de mes travaux de thèse est que la fonction SMAD4 indépendante du TGF-β réprime l'expression des gènes de la boucle de rétrocontrôle négative de la signalisation du TGF-β, tels que SMAD7, Ski, Skil et Smurf2. En effet, en l'absence de SMAD4, la signalisation du TGF- β est, de manière inattendue, déjà altérée en amont de SMAD4. De plus, nous avons révélé que la perturbation de la fonction de SMAD4 favorise une génération et une accumulation impressionnante de cellules T CD8 intraépithéliales intestinales, en partie à cause de l'augmentation de l'expression de l'intégrine de rétention épithéliale CD103. Ainsi, la suppression de la fonction de SMAD4 indépendante au TGF-β dans les lymphocytes T CD8, favorise fortement l'inflammation intestinale spontanée provoquée par le microbiote.

Résumé en Anglais

Current challenges in the treatment of chronic inflammatory bowel disease (IBD) underscore the need to better understand their etiology. SMAD4, a key mediator of TGF- β signaling, plays a crucial role in T cells to prevent IBD. However, the cellular and molecular mechanisms have not yet been formally demonstrated. During my thesis, we unexpectedly revealed that a TGF-β-independent SMAD4 function in CD8 T cells is crucial to prevent microbiota-induced spontaneous chronic intestinal inflammation. We have shown that the disruption of this TGF- β -independent SMAD4 function broadly affects CD8 T cell biology at the molecular and functional level, with important consequences for intestinal homeostasis. Surprisingly, we found that SMAD4 antagonizes the TGF- β signature in CD8 T cells in a manner completely independent of a prior TGF- β stimulus. Thus, deletion of SMAD4 causes opposite transcriptional and functional consequences compared to deletion of TGF- β signaling. Another key finding of my thesis work is that TGF-β-independent SMAD4 function represses the expression of genes in the negative feedback loop of TGF- β signaling, such as SMAD7, Ski, Skil and Smurf2. Indeed, in the absence of SMAD4, TGF- β signaling is unexpectedly already impaired upstream of SMAD4. Furthermore, we revealed that disruption of SMAD4 function promotes impressive generation and accumulation of intestinal intraepithelial CD8 T cells, in part due to increased expression of the epithelial retention integrin CD103. Thus, suppression of TGF-β-independent SMAD4 function in CD8 T cells strongly promotes spontaneous microbiota-induced intestinal inflammation.

Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier le Dr Grégory VERDEIL ainsi que le Pr Sophie LUCAS d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Dr Jacqueline MARVEL, le Pr Ulrich VALCOURT et le Dr Hugues LELOUARD pour accepter d'être examinateurs de mon travail. Je voudrais remercier aussi les membres de mon comité de suivi de thèse : le Dr Bertrand MERESSE, le Dr Antoine MARCAIS et le Dr Nathalie AUPHAN-ANEZIN qui m'ont donné beaucoup de conseils et d'idées pour mon travail de thèse.

Je voudrais remercier beaucoup mon directeur de thèse Monsieur Saidi SOUDJA. Sans l'encouragement et l'énorme aide de Saidi je n'aurais jamais fait ce que j'ai pu faire durant cette thèse. Tu as été quelqu'un de passionné qui a consacré toute sa vie pour la recherche scientifique. Ta passion pour l'immunologie et ta persévérance dans le travail ne nous laissent pas indifférents. Merci pour tout Saidi.

Ensuite je voudrais remercier énormément le directeur de mon laboratoire d'accueil Monsieur Julien MARIE. Tout d'abord Monsieur Julien MARIE m'a ouvert les portes de son laboratoire et il m'a donné l'opportunité pour faire mon stage de Master 2 et il m'a soutenu et poussé pour réussir le concours de l'école doctorale. Je voudrais te remercier Julien pour la confiance que t'as eu en moi et aussi pour ton écoute et ton ouverture d'esprit pour les projets secondaires au projet initial de ma thèse.

Je reviens à tous les membres de cette équipe de recherche avec qui j'ai passé quatre belles années de ma vie. À toi Olivier, tu as toujours été sympa et drôle, l'ambiance nous a quand même manqué après ton départ. Merci pour tes blagues, ton humour et tes imitations qui resteront gravés dans nos mémoires. Merci à toi Nicolas pour ton énergie positive et ton aide concernant les questions médicales. Je ne peux pas m'empêcher de remercier Alexandra Lainé (La Tornade) pour ta présence et ton aide ainsi que ton grand esprit d'équipe. Tu nous as énormément aidé dans les moments difficiles. Merci à toi Apos pour ton aide en biologie moléculaire. Merci Sarah pour la bonne humeur. Merci Vincent pour ton aide et ta sympathie. Je voudrais te remercier, Ossama pour ta bienveillance et ta gentillesse. Nous avons passé de bons moments au labo et en dehors (Tacos party ... etc), je te souhaite une bonne réussite. Merci à toi Valentin, tu as été très sympathique et surtout calme durant mes années passées au labo. Merci à tous les autres membres d'équipe, à Hector pour les discussions scientifiques très agréables et positives. À Chloé pour ton soutien et ta bonne humeur. À Elodie et Hélène pour votre aide et votre soutien, sans votre travail, l'équipe ne fonctionnera plus. Merci à toi Stéphanie pour ton calme et ta compréhension par rapport aux PCR haha. Merci Vincent pour ta bonne humeur, tes blagues et ton implication. Merci à toi Guilhem pour les moments techno R&B haha, merci à toute l'équipe Grinberg. Je voudrais aussi remercier tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé et que je n'ai pas cité.

Merci à tous mes amis (Mokh, Houssem, Hani, Hichem, Fricks, Imad, Aimen, Reda, Wassim, Ahmed)

Un grand merci pour les personnes les plus chères dans ma vie, merci Papa, merci Maman pour l'éducation et la confiance que vous m'avez donné. Sachez que c'est votre réussite avant qu'elle soit la mienne. Merci à toi Oncle Moussa pour ton aide et ta présence. À ma sœur qui a toujours été avec moi et m'a encouragé depuis mon enfance. À mes frères malgré qu'ils m'aient opprimé quand j'étais jeune (haha).

Enfin, merci beaucoup ma chère épouse, tu as été extrêmement patiente durant ces quatre années. Je ne pourrais jamais te remercier asse

Abréviations

Atg16l1 : gène 16-like 1 lié à l'autophagie **BMP**: Bones Morphogenetic Proteins **CSI**: Cellules souches intestinales CMH : complexe majeur d'histocompatibilité **CU** : colite ulcérative **CBCC** : Cellule cylindrique à base de crypte **CPA** : cellule présentatrice d'antigènes **DC** : cellule dendritique DCP4 : deleted in pancreatic cancer 4 **DSS**: Sodium Sulfate Dextran **EEC** : cellules entéroendocrines ESC : cellules souches embryonnaires FABP2 : protéine de liaison aux acides gras 2 **GI**: tractus gastro-intestinal **GWAS**: études d'association pangénomiques **GZMK**: Granzyme K **GZMB**: Granzyme B **GZMA**: Granzyme A GARP : protéine prédominante des répétitions de la glycoprotéine A **GESEA :** Gene Set Enrichment Analysis **HOBIT** : homologue de Blimp1 dans les cellules T HAT : Histone Acetyl Transferase **HEV** : veinules à endothélium épais ILC : cellules lymphocytaires innées **IOIBD**: l'Organisation internationale pour l'étude des maladies inflammatoires de iTreg : lymphocytes T régulateurs induits IEL : Lymphocytes intra-épithéliaux

IFNy : interféron gamma

Kd : constante de dissociation

Lgr5: leucie-rich repeat-containing G-proteincoupled receptor 5

LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus

LAP : peptide associé à la latence

LTBP : protéine de liaison au TGF-β latent

LLC : grand complexe latent

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MLN : ganglions mésentériques

MC : maladie de Crohn

MPEC : cellules effectrices précurseurs de mémoire

MH1 : Mad Homology 1

MH2 : Mad Homology 2

MMP : métalloprotéinases de la matrice

MDP : Muramyl Dipeptide

NLR : récepteurs Nod-like

NK : cellule tueuse naturelle

NKT : cellule tueuse naturelle T

NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2

nTreg : lymphocytes T régulateurs naturels

PP: plaques de Peyer

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs

RA : Acide rétinoïque

RAG : gènes d'activation de la recombinase

Single Cell RNA-Seq : Analyse transcriptionnelle monocellulaire

SAA : sérum amyloïde A

SFB : bactéries filamenteuses segmentées

SCFA : acide gras à chaîne courte

SAM : souris à sénescence accélérée dérivées de souris AKR/J

SNP : polymorphismes mononucléotidiques

l'intestin

SLEC : cellules effectrices à courte durée de vie

SMURF : SMAD ubiquitination related factor

TA : Progéniteurs d'amplification du transit

TCF4 : facteur de transcription 4

TFF3 : peptide Trefoil Factor 3

TSLP : lymphopoïétine stromale thymique

Treg : lymphocytes T CD4 régulateurs

 $TGF-\beta$: facteur de croissance transformant

TNBS : l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

TLR : récepteurs Toll-like

TCR : récepteur de cellule T

TNF : facteur de nécrose tumorale

Tcm : cellules T de mémoire centrale

Tem : cellules T de mémoire effectrice

Trm : cellules T mémoires résidant les tissus

Tscm: lymphocytes T mémoires à caractère souches

TRIM33 : tripartite motif-containing 33

Tfh : cellules T auxiliaires folliculaires

Table des matières

Résumé en Français	3
Résumé en Anglais	3
Remerciements	4
Abréviations	5
Introduction	9
1. L'intestin : l'organe hétérogène de tous les records	11
1.1. Aspects structuraux des intestins	11
1.1.1. L'épithélium intestinal, vaste, hétérogène cellulairement et fonctionnellement :	14
1.1.2. Système immunitaire intestinal :	16
1.1.3. Le microbiote intestinal	21
1.2. Ménage à trois : Dialogue entre le microbiote, l'épithélium, et le système immunitaire	22
2. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)	25
2.1. Les modèles expérimentaux pour étudier les MICI chez la souris	25
2.2. Les causes de développement des MICI	28
2.2.1. Les facteurs génétiques	28
2.2.2. Facteurs environnementaux	29
2.2.3. Rôle du microbiote intestinal dans les MICI	30
2.2.4. Dérégulations de la barrière intestinale : l'épithélium et le système immunitaire	32
3. Les lymphocytes T CD8 : un acteur mis à l'écart dans les MICI	38
3.1. Circulation et quiescence des CD8 naïfs	38
3.2. L'activation des lymphocytes T CD8	39
3.2.1. Les étapes d'activation des lymphocytes T CD8	39
3.3. Les lymphocytes T CD8 se différencient en plusieurs sous populations hétérogènes après	
activation	42
3.3.2. Les lymphocytes T CD8 effecteurs à coutre durée de vie (SLEC) et les précurseurs de mémoires (MPEC)	44
3.3.3. Les CD8 mémoires effecteurs (Tem) et mémoires centraux (Tcm)	45
3.3.4. Les lymphocytes T CD8 mémoires résidants les tissus (Trm)	46
3.4. Le rôle pathogénique des lymphocytes T CD8 dans les maladies auto-immunes	47
3.5. Les lymphocytes T CD8 dans les MICI :	47
4. Le TGF-β : gardien de l'homéostasie intestinale	49
4.1. Production et sécrétion du TGF-β	49
4.2. Activation du TGF-β	50
4.2.1. L'activation du TGF-β par des facteurs physico-chimiques	50
4.2.2. L'activation enzymatique et protéolytique du TGF-β	50
4.2.3. L'activation du TGF-β par les intégrines	51
4.3. Signalisations et régulation transcriptionnelle médiée par le TGF-β	52
4.3.1. Les récepteurs du TGF-β	53
4.3.2. Les voies de signalisations médiées par les SMAD	54
4.3.3. Voies non-canoniques de la signalisation du TGF-β	59
4.3.4. Régulation de la signalisation du TGF-β par rétroaction	59
4.4. Le rôle du TGF-β dans la biologie des lymphocytes T	60
4.5. La dérégulation du TGF-β dans les MICI	63
4.6. La complexité des voies de signalisation du TGF-β : entre opposition et indépendance	66
4.6.1. Tif1γ régule négativement la signalisation médiée par SMAD4	66
4.6.2. SMAD4 ne s'empêche pas d'agir en absence du TGF-β	67

5. Les	s traitements actuels des MICI	68
5.1.	Les traitements visant la modification du microbiote intestinal	68
5.2.	Les traitements ciblant le système immunitaire	68
Probléma	itique :	70
Résultats		71
TGF-β-	independent function of SMAD4 preconditions naïve CD8 T-cells to p	prevent
severe	microbiota-driven chronic intestinal inflammation	73
Discussio	n	127
1. Le	rôle de SMAD4 indépendant du TGF-β	127
1.1)	Un effet unique pour chaque type cellulaire (NK, CD4, CD8) ?	127
1.2)	Comment est induite l'action de SMAD4 indépendante du TGF- eta dans les CD8 ?	129
1.3)	TGF-β-dépendant ou plutôt indépendant, lequel choisir et quand ?	129
2. L'iı	npact de l'activation des CD8 sur l'épithélium intestinal	131
2.1)	Comment les lymphocytes T CD8 affectent la muqueuse intestinale ?	131
3. Le	rôle du microbiote intestinal	136
4. Pe	rspectives cliniques	138
4.1)	Les CD8 comme outils de diagnostic précoce des MICI ?	138
4.2)	Les anti αΕβ7 (anti-CD103) dans les MICI, les IELs CD8 comme cibles ?	139
Référence	25	141

Introduction

« C'est en mettant en doute les certitudes de ce monde que l'on peut découvrir de nouvelles choses ! »

Ludovic Zufferey

1. L'intestin : l'organe hétérogène de tous les records

L'intestin des mammifères est un organe important qui sépare l'organisme de l'environnement extérieur remplissant comme premières fonctions l'absorption alimentaire et la défense contre les pathogènes. L'une des caractéristiques principales des intestins des mammifères c'est la grande hétérogénéité des tissus qui les composent ainsi que leurs cohabitations. En effet, le tractus gastrointestinal se compose principalement d'une monocouche de cellules épithéliales, un système immunitaire, un système nerveux, un endothélium, des cellules stromales et un microbiote riche en bactéries commensales. Le tractus gastro-intestinal est constamment mis à l'épreuve par les antigènes de la lumière intestinale et doit donc être capable de distinguer quels antigènes doivent être tolérés ou non.

1.1. Aspects structuraux des intestins

Les intestins, à savoir l'intestin grêle et le gros intestin, forment un tube continu qui s'étend de la sortie de l'estomac jusqu'à l'anus. L'intestin grêle commence au pylore et se termine à la valve iléo-caecale, qui est le point d'entrée dans le gros intestin. L'intestin grêle est divisé en trois segments principaux, une partie proche de l'estomac appelée le duodénum, suivi par le jéjunum au milieu puis l'iléon à la partie distale de l'intestin grêle (Figure 1). Le gros intestin commence au niveau du cæcum, suivi du côlon ascendant (proximal), du côlon transverse, du côlon descendant (distal) et du rectum, se terminant à l'anus. L'intestin grêle est caractérisé par la présence de structures en forme de doigt appelées villosités intestinales. En revanche, il n'existe pas de villosités dans le gros intestin dans lequel la surface épithéliale est plutôt plate (Figure 2). La majorité du système immunitaire est présente dans la muqueuse, qui comprend l'épithélium, la Lamina Propria sous-jacente et la musculeuse. La Lamina Propria est constituée de tissu conjonctif lâche qui forme l'échafaudage des villosités, ainsi que l'approvisionnement en sang, le drainage lymphatique et l'approvisionnement nerveux de la muqueuse. Il contient également de nombreuses cellules des systèmes immunitaires innés et adaptatifs. En plus de la présence des cellules immunitaires dans la Lamina Propria, des lymphocytes se trouvent également dans l'épithélium et sont nommés les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), dont les fonctions sont distinctes de celles présents au niveau de la Lamina Propria [1]



Figure 1 : structures des intestins chez la souris et chez l'Homme. Le duodénum représente le pont de liaison entre l'estomac et l'intestin grêle. Après le duodénum, il y a le jéjunum qui représente la portion centrale de l'intestin grêle où se passe la grande partie de la digestion et de l'absorption des nutriments. Enfin, il y a l'iléon qui représente la dernière partie de l'intestin grêle. L'iléon est la partie la plus longue de l'intestin grêle, représentant environ les trois cinquièmes de sa longueur totale. À l'extrémité distale, l'iléon est séparé du gros intestin par la valve iléo-caecale, un sphincter formé par les couches musculaires circulaires de l'iléon et du cæcum, et contrôlé par un système nerveux et hormonal. Le cæcum est suivi par le côlon ascendant (proximal), le côlon transverse, le côlon descendant (distal), du rectum, et se termine à l'anus [2], [3].



Figure 2 : Les différentes couches structurales de l'intestin grêle et du côlon. L'intestin grêle et le gros intestin sont chacun composés de plusieurs couches : séreuse, musculeuse externe, sous-muqueuse et muqueuse. La membrane séreuse est un tissu lisse qui forme la membrane externe des intestins. Adjacente à la séreuse, la musculeuse externe qui propulse les aliments et les déchets. La couche suivante, la sous-muqueuse, soutient les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que le tissu lymphoïde. La muqueuse forme la barrière entre la lumière intestinale et la sous-muqueuse et est composée de trois sous-couches : l'épithélium, la *Lamina Propria*, et la musculeuse muqueuse. La musculeuse muqueuse effectue des contractions localisées, mélangeant le contenu intestinal, tandis que la *Lamina Propria* ou le tissu conjonctif sous-jacent abritent plusieurs cellules immunitaires. Enfin, l'épithélium tapisse la surface interne intestinale, en interface avec le contenu luminal. L'épithélium de l'intestin grêle possède des unités répétitives constituées d'une crypte-villosité conçue pour maximiser la surface d'absorption. En revanche, l'épithélium du gros intestin ne possède que des cryptes.

1.1.1. L'épithélium intestinal, vaste, hétérogène cellulairement et fonctionnellement :

L'épithélium intestinal représente la plus grande surface muqueuse du corps, couvrant environ 400 m² de surface. L'épithélium intestinal est constitué d'une seule couche de cellules organisées en cryptes et villosités (Figure 3). Il existe plusieurs types de cellules épithéliales intestinales spécialisées qui assurent les différentes fonctions de l'intestin : l'absorption des aliments, la sécrétion d'hormones, de peptides antimicrobiens et de mucus, ainsi que la régénération tissulaire (Figure 3).



Figure 3 : Les différents sous-types de cellules épithéliales intestinales. L'épithélium intestinal est organisé en régions de crypte et de villosités (villosité uniquement pour l'intestin grêle). Les modèles actuels favorisent l'existence de deux populations de cellules souches, la cellule souche +4 et la cellule cylindrique à base de crypte (CBCC), qui sont considérées comme des cellules souches actives et quiescentes, respectivement. Les progéniteurs d'amplification du transit (TA) proviennent du compartiment des cellules souches et se différencient en entérocytes absorbants ou sécrétoires. Mis à part les cellules de Paneth, la plupart des populations de cellules différenciées migrent vers le haut. [4]

Voici quelques caractéristiques des différents sous-types des cellules épithéliales intestinales :

Cellules souches épithéliales intestinales : les cellules souches intestinales (CSI) sont présentes dans l'intestin grêle et le côlon au niveau des cryptes et fournissent en permanence leurs cellules filles différenciées de la crypte aux villosités (dans le cas de l'intestin grêle). Alors que la majorité des cellules filles différenciées se renouvellent en 3 à 5 jours, les CSI ont une longue durée de vie et peuvent s'autorenouveler. Les modèles actuels favorisent l'existence de deux populations de cellules souches, la cellule souche +4 et la cellule cylindrique à base de crypte (CBCC), qui sont considérées comme des cellules souches actives et quiescentes, respectivement. L'un des marqueurs des CSI, est Lgr5+ (*leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*) qui est un récepteur de la R-spondine, et sa liaison renforce la signalisation Wnt par la stabilisation de la beta-caténine [5]. Plusieurs voies sont fortement activées dans les CSI pour maintenir leur activité de cellules souches. La signalisation Wnt, transduite par la beta-caténine/facteur de transcription 4 (TCF4), est essentielle au développement intestinal au stade embryonnaire et joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de la muqueuse et les fonctions des cellules souches dans l'épithélium intestinal adulte. Le récepteur Notch est exprimé dans les cellules Lgr5+ et sa signalisation est requise pour le maintien des cellules souches [6].

Cellules dites de transit (TA) : les cellules TA comprennent des populations cellulaires plus différenciées qui sont en prolifération active mais à durée de vie relativement courte. Les TA comprenant à la fois des progéniteurs sécrétoires et absorbants, qui peuvent donner naissance à des cellules de type souche suite à des dommages aux CSI [4].

Cellules entérocytes (intestin grêle) ou Colonocytes (côlon) : la majorité des cellules épithéliales intestinales est constituée de cellules absorbantes nommées entérocytes, qui assurent les fonctions métaboliques et l'absorption des nutriments. En plus de leur rôle dans l'absorption des aliments, les entérocytes sont importants dans la formation de la barrière physique intestinale. Parmi les marqueurs des entérocytes, il y a la protéine de liaison aux acides gras 2 (FABP2) et l'échangeur d'anions chlorure (SLC26a3), ainsi que d'autres canaux membranaires spécifiques permettant le transport des nutriments [7].

Cellules de Goblets : les cellules de Goblets sont des cellules caractérisées par la production du mucus. En effet, les cellules de Goblets assurent la couverture de la couche épithéliale de deux couches de mucus dans les intestins, en particulier des couches de mucus internes épaisses et externes minces [8]. Les cellules de Goblets produisent également des molécules anti-inflammatoires telles que le peptide Trefoil Factor 3 (TFF3) [9].

Les cellules de Paneth : les cellules de Paneth résident dans les cryptes intestinales et sont spécialisées dans la production de molécules antimicrobiennes telles que le lysozyme, les α -défensines, la

phospholipase A2 sécrétoire (sPLA2) et RegIIIy [10]. Les cellules de Paneth sont observées uniquement dans l'intestin grêle, mais pas dans le côlon. Cependant, des études récentes basées sur la technique d'analyse transcriptionnelle monocellulaire (Single Cell RNA-Seq) ont montré la présence de cellules épithéliales présentes dans le côlon qui produisent des molécules antimicrobiennes et qui compensent donc les cellules de Paneth dans le côlon [7].

Les cellules Tuft : les cellules Tuft jouent un rôle important dans la détection les helminthes de la lumière intestinale, grâce à leur protéine de liaison au GTP, la gustducine [11]. Les cellules Tuft produisent de l'IL-25 et de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) en réponse aux helminthes pour induire des réponses immunitaires de type lymphocytes T CD4 Th2 [12].

Les cellules entéroendocrines : les cellules entéroendocrines (EEC), répondent aux signaux de la présence des nutriments en sécrétant des hormones peptidiques pour contrôler la sécrétion d'enzymes gastro-intestinales [13].

Il existe d'autres types de cellules épithéliales intestinales plus ou moins étudiées telles que les cellules M qui ont des caractéristiques morphologiques uniques, notamment la présence d'un glycocalyx réduit, d'une bordure en brosse irrégulière et de microvillosités réduites [14]. Les cellules M sont hautement spécialisées pour la phagocytose et la transcytose des macromolécules de la lumière intestinale, des antigènes particulaires et des micro-organismes pathogènes ou commensaux à travers l'épithélium intestinal.

1.1.2. Système immunitaire intestinal :

Le système immunitaire intestinal représente le plus grand compartiment immunitaire de l'organisme et se concentre principalement au niveau de la *Lamina Propria* et l'épithélium intestinal avec une composition et des fonctions bien distinctes.

Système immunitaire de la Lamina Propria : La *Lamina Propria* contient des lymphocytes T CD4 et CD8, des lymphocytes B, ainsi que des cellules immunitaires innées comme les macrophages, les cellules dendritiques, et des lymphocytes innées. Concernant les lymphocytes T CD4, on peut trouver plusieurs sous-types, notamment les CD4 Th1 Tbet⁺ IFNg⁺, des CD4 Th17 RORγT⁺ IL17⁺, des lymphocytes T CD4 Th2 GATA3⁺ IL4⁺, des lymphocytes T CD4 Th9 PU1⁺ IL9⁺, et aussi la présence de lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg) qui expriment le facteur de transcription FOXP3 (Figure 4) [15]. D'autres populations lymphocytaires CD4 ont été décrites chez l'Homme et la souris à l'exemple des cellules CD4 FOXP3⁺ RORγT⁺, dont la présence est dépendante du microbiote intestinal et aussi l'expression du facteur de transcription C-MAF [16]. Il est à noter que la répartition des différents sous-types de

16

lymphocytes T CD4 est très hétérogène tout au long des intestins. Par exemple, les lymphocytes T CD4 Th17 diminuent progressivement du duodénum jusqu'au côlon tandis que le nombre de Treg est le plus élevé dans le côlon [17]. En plus des Lymphocytes T CD4, la *Lamina Propria* contient une concentration importante de lymphocytes B et de plasmocytes produisant principalement des immunoglobulines de type IgA afin de contrôler le microbiote intestinal. Les lymphocytes T CD8 sont moins représentés que les lymphocytes T CD4 au niveau de la *Lamina Propria*. En plus des lymphocytes T et B conventionnels, il existe des cellules lymphocytaires innées (ILC), divisées en 3 sous- types, ILC1, ILC2, et ILC3. Les ILC font aujourd'hui l'objet d'intenses investigations afin de mieux comprendre leur biologie et leur contribution dans l'homéostasie et les pathologies inflammatoires. Outre les lymphocytes, la *Lamina Propria* abrite plusieurs types de cellules immunitaires innées non lymphoïdes comme les macrophages et les cellules dendritiques qui jouent un rôle dans la phagocytose des microorganismes et la présentation des antigènes aux lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes intestinaux, à savoir les ganglions mésentériques (MLN) et les plaques de Peyer (PP). D'autres cellules comme les mastocytes et les monocytes sont aussi présents au niveau de la *Lamina Propria*.



Figure 4 : les principales cellules du système immunitaire au niveau de la *Lamina Propria***.** Les macrophages et les cellules dendritiques (cellules myéloïdes représentées en bleu et vert) sont stratégiquement situés à côté de la couche épithéliale. Les cellules T et B (principalement les plasmocytes producteurs d'IgA) s'accumulent également dans la *Lamina Propria*. Différents sousensembles de lymphocytes T CD4 se trouvent dans la *Lamina Propria*, tels que les lymphocytes T régulateurs (Treg et Tr1) et les cellules effectrices (Th1, Th2 et Th17). Enfin, les cellules lymphoïdes innées (ILC), divisées en trois sous-ensembles principaux (ILC1, ILC2 et ILC3), sont aussi présents dans la *Lamina Propria* [15].

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) : les lymphocytes constituent la composante principale du système immunitaire présent au niveau de la monocouche épithéliale intestinale. Les IEL s'intercalent entre les cellules épithéliales et sont présents à une concentration qui peut varier entre 1 et 2 IEL pour 10 cellules épithéliales [18][19]. Les IEL peuvent être classés en deux sous-ensembles, des IEL qui expriment un récepteur des cellules T (TCR) (IEL TCR+) et d'autres qui n'expriment pas de TCR (IEL TCR-). Les IEL TCR+ sont eux-mêmes divisés en deux sous-catégories : IEL induits (conventionnels), et des IEL naturels (non conventionnels) (Figure 5). Les IEL TCR+ induits expriment tous un TCR composé d'une chaîne α et β (TCR $\alpha\beta$). La grande majorité des IEL induits exprime le corécepteur hétérodimérique CD8 $\alpha\alpha$. Les IEL induits TCR+ dérivent principalement de cellules T naïves conventionnelles qui ont été activées en dehors de l'épithélium intestinal et qui se transforment en IEL au niveau de l'épithélium. Les IEL TCR+ naturels expriment soit un TCR $\alpha\beta$ soit un TCR $\gamma\delta$ et

n'expriment pas le corécepteur hétérodimérique CD8 $\alpha\beta$, mais la plupart expriment un homodimère CD8 $\alpha\alpha$. Concernant les IEL TCR-, ils sont tous naturels et peuvent exprimer des récepteurs de type cellules tueuses naturelles (NK1.1 ou NKp46) [19].



Figure 5 : classification des IEL induits (dits conventionnels) et IEL naturels (dits nonconventionnels)[19].

Les IEL sont distribués selon un gradient décroissant allant du duodénum au côlon. De plus, la majorité des IEL de l'intestin grêle sont des IEL non conventionnels, tandis que dans le côlon la majorité des IEL sont de type conventionnel.

Les IEL expriment plusieurs récepteurs caractéristiques tels que le récepteur de chimiokine CCR9, qui interagit avec la chimiokine CCL25 produites par les cellules épithéliales intestinales qui permet de recruter les IEL au niveau de la muqueuse intestinale. Les IEL intestinaux expriment également l'intégrine α E β 7, appelée CD103, qui interagit avec la E-cadhérine exprimée par les cellules épithéliales intestinales. L'interaction de CD103 avec L'E-cadhérine facilite l'entrée et la rétention des IEL dans l'épithélium intestinal. Voici un tableau récapitulatif des différents IEL avec leurs caractéristiques et fonctions connues :

Sous-ensemble IEL	Développement	Propriétés effectrices	Rôles fonctionnels
TCRαβ ⁺ CD4 ⁺	Développement de cellules T conventionnelles Cellules expérimentées avec des antigènes	Propriétés de T auxiliaires	Mémoire effectrice Réponses Th1 et Th17 contre les agents pathogènes des muqueuses
TCRαβ ⁺ CD4 ⁺ CD8αα ⁺	Dérivé de cellules expérimentées avec un antigène Dépendant du TGF-β, de l'IFN-γ, de l'IL-27, T-bet et de Runx3	Cytotoxicité	Cytotoxicité dépendante du CMH de classe II Fonctions régulatrices
TCRαβ ⁺ CD8αβ ⁺	Développement de cellules T conventionnelles Cellules expérimentées avec des antigènes	Cytotoxicité	Mémoire effectrice contre les agents pathogènes des muqueuses Effecteurs dans la maladie cœliaque
TCRαβ ⁺ CD8aβ ⁺ CD8aa ⁺	Dérivé de cellules expérimentées avec un antigène	Cytotoxicité	Pas bien compris
TCRαβ ⁺ CD8aa ⁺	Développement thymique Dépendant du TGF-β, de l'IFN-γ, de l'IL-15, du T-bet et de Runx3	Propriétés de type NK	Immunorégulation
TCRγδ ⁺ CD8aa ^{+/-}	Développement extrathymique Dépendant des molécules de type butyrophiline	Cytotoxicité Produit de l'IFN-γ, TGF-β, IL-10, IL-13 et KGF	Antimicrobien Favorise la cicatrisation et protège l'intégrité de l'épithélium intestinal

Tableau 1 : différents sous-types d'IEL et leurs fonctions connues [19].

1.1.3. Le microbiote intestinal

L'intestin humain contient un microbiote riche estimé à plus de 10¹⁴ microorganismes [20], [21]. Les bactéries constituent la majorité de ce microbiote intestinal (99,1 %), tandis que les virus et les champignons constituent moins de 1% restants [22]. Avec plus de 1000 espèces bactériennes différentes [20], le microbiote intestinal est considéré comme l'écosystème le plus riche en bactéries. Les principaux phylums bactériens présents dans le microbiote intestinal humain sont : *Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia* et *Bacteriodetes*. Le microbiote intestinal diffère entre les différents segments du tractus gastro-intestinal (proximal vs distal), mais aussi entre la lumière et la couche muqueuse [23]. La diversité du microbiote dans l'intestin grêle est supérieure à celle de l'estomac et de l'œsophage. Remarquablement, la diversité et la complexité de ce microbiote augmentent progressivement dans tout l'intestin grêle pour atteindre les niveaux les plus élevés dans l'iléon. En ce qui concerne la flore normale du gros intestin, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les phylums bactériens prédominants **(Figure 6).**



Figure 6 : Le microbiote intestinal : La densité et la diversité des bactéries augmentent le long de l'axe longitudinal. L'intestin grêle favorise les bactéries anaérobies protéolytiques facultatives et le côlon favorise les bactéries anaérobies et saccharolytiques. Le long de l'axe transversal, la plupart des bactéries sont spatialement séparées du tissu hôte par des barrières immunologiques et physicochimiques [23].

1.2. Ménage à trois : Dialogue entre le microbiote, l'épithélium, et le système immunitaire

Les cellules épithéliales intestinales assurent la médiation entre le microbiote et les cellules immunitaires intestinales en répondant aux signaux microbiens et environnementaux. Ceci est réalisé par un certain nombre de mécanismes, notamment la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'autres molécules immunomodulatrices. Les cellules épithéliales intestinales modulent aussi le système immunitaire grâce au transport d'antigènes et de métabolites microbiens. Parmi les molécules immunomodulatrices produites par les cellules épithéliales intestinales, la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), le facteur de croissance transformant (TGF- β), l'acide rétinoïque (RA), plusieurs interleukines dont l'IL-10, IL-15, IL-18, IL-6, IL-25 ainsi que plusieurs chimiokines inflammatoires comme RANTES, IP-10 et MCP [24]. De leur côté, les cellules immunitaires produisent un nombre important de cytokines et de molécules qui ont un effet direct sur le développement et la biologie de l'épithélium intestinal. Par ailleurs, le microbiote intestinal prend une place majeure en tant que modulateur de la composition et la fonction de l'épithélium ainsi que des cellules immunitaires. Le microbiote est la source de nombreux métabolites qui module l'activité des cellules épithéliales et du système immunitaire. Voici quelques exemples qui illustrent le dialogue entre ces trois acteurs :

Régulation des cellules immunitaires par les cellules épithéliales intestinales

En réponse à la colonisation par des microbes adhérents comme les bactéries filamenteuses segmentées (SFB), les cellules épithéliales intestinales secrètent la protéine sérum amyloïde A (SAA) qui favorise la maturation fonctionnelle du facteur de transcription RORyT induisant ainsi la différentiation des lymphocytes T CD4 Th17 [25]. Une étude récente a montré que dans le cas des bactéries SFB, le transfert d'antigènes bactériens à travers les cellules épithéliales intestinales via l'endocytose microbienne déclenchée par adhésion (MATE) joue un rôle central dans la génération des lymphocytes T CD4 Th17 [26].

Récemment, la production de l'IL-15 par les cellules épithéliales intestinales s'est révélée cruciale pour le recrutement des lymphocytes intra-épithéliaux TCR $\gamma\delta^+$ au niveau de l'intestin grêle [27]. Cependant, les mécanismes régulant ce processus restent à déterminer.

L'effet des cellules épithéliales sur le système immunitaire s'étend aussi pour inclure les ILC. Une étude récente a montré que les cellules Tuft produisent la cytokine IL-25 en présence de parasites et d'helminthes, avec un effet direct sur l'activation des ILC2, qui à leur tour vont induire un remodelage de l'intestin grêle [12], [28].

Régulation des cellules épithéliales intestinales par le système immunitaire

En parallèle à l'effet des cellules épithéliales intestinales sur les fonctions des cellules immunitaires, plusieurs types de cellules immunitaires intestinales influencent à leur tour l'homéostasie et la biologie de l'épithélium intestinal. Par exemple, en réponse à des métabolites microbiens tels que les catabolites du tryptophane, les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) produisent la cytokine IL-22, qui favorise l'homéostasie et la réparation de la barrière épithéliale [29]. L'IL-22 peut induire des peptides antimicrobiens pour contrôler la croissance des microbes pathogènes et commensaux [30]. Les cytokines sécrétées par les cellules Th17 (IL-17A, IL-17F) peuvent également induire la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales et renforcer les jonctions serrées de la barrière épithéliale [31]. Dans une autre étude, il a été montré que les Treg produisent la cytokine IL-10 et soutiennent directement le renouvellement des cellules souches intestinales via l'interaction avec le complexe majeur d'histocompatibilité 2 (CMH2) [32].

Les cellules myéloïdes jouent également un rôle important dans la différenciation et la fonction des cellules épithéliales intestinales. Par exemple, les perturbations des interactions entre les macrophages et les cellules épithéliales intestinales conduisent à une différenciation aberrante des cellules souches intestinales Lgr5+, des cellules de Paneth et une augmentation des cellules de Goblet [33].

Régulation du système immunitaire par le microbiote intestinal

Dans des études séminales, il a été démontré que le butyrate, un acide gras à chaîne courte (SCFA) dérivé des bactéries commensales, plus particulièrement la famille des *Clostridium*, induisait la différenciation de cellules Treg périphériques dans le côlon [34]–[36]. Au sevrage, le microbiote intestinal induit une réponse immunitaire suivie par la génération de cellules Treg FOXP3+ RORyT+ d'une manière dépendante de l'acide rétinoïque et des SCFA [37]. Comme mentionné précédemment, le développement des lymphocytes CD4 Th17 dans les intestins nécessite la production de la molécule SAA par les cellules épithéliales intestinales en réponse à l'adhésion microbienne des bactéries SFB. Une autre souche de bactérie commensales nommée *Bifidobacterium adolescentis*, peut aussi induire

la différenciation des lymphocytes T CD4 Th17 [38]. Les IEL sont aussi fortement régulés par le microbiote intestinal. Par exemple, les IEL TCR $\alpha\beta^+$ sont absents chez les souris dépourvues de microbiote commensal. Le microbiote intestinal est également important dans la génération des IEL TCR $\alpha\beta^+$ CD4+ CD8 $\alpha\alpha^+$. Dans une étude récente, la souche *Lactobacillus reuteri* était suffisante pour induire une différenciation des IEL TCR $\alpha\beta^+$ CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ + et ceci en métabolisant le tryptophane [39].

Ce ménage à 3 dépend de beaucoup de paramètres et peut se trouver parfois en situation de déséquilibre, chose qui peut amener au développement de certaines pathologies telles les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), présentées dans le chapitre suivant.

2. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

La rectocolite hémorragique, aussi appelée colite ulcérative (CU), et la maladie de Crohn (MC) sont classées comme des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui présentent des symptômes similaires et entraînent des troubles digestifs et une inflammation chronique de certaines parties du système digestif [40]. Parmi les symptômes de la MC et de la CU, on peut trouver la diarrhée, des douleurs abdominales, des saignements rectaux et une perte de poids [41]. Les deux maladies peuvent survenir chez les adolescents et les adultes et affecter les hommes et les femmes de manière égale. Malgré la similitude entre les symptômes de ces deux maladies, il existe néanmoins quelques différences entre les symptômes de la MC et de la CU. Les zones touchées du tube digestif varient dans les MICI. Par exemple, la MC affecte souvent l'iléon et une partie du côlon. De manière non répandue, la MC peut affecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal (GI), y compris la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le rectum et l'anus. Alors que la MC peut toucher tout le tractus gastro-intestinal, la CU est limitée au gros intestin et se trouve principalement dans certaines parties de ce dernier, y compris le côlon et le rectum [41]. Il est à noter que de manière générale, dans la CU, le gros intestin devient enflammé et l'intestin grêle fonctionne naturellement. D'un point de vue histologique, la MC présente une sous-muqueuse épaissie, une inflammation transmurale, une ulcération fissurée et des granulomes, alors que l'inflammation dans la rectocolite hémorragique est limitée à la muqueuse et à la sous-muqueuse avec une inflammation des cryptes et la présence d'abcès cryptiques.

2.1. Les modèles expérimentaux pour étudier les MICI chez la souris

A l'heure actuelle, il n'existe aucun modèle expérimental qui reproduit à l'identique toutes les caractéristiques des MICI à lui seul. Cependant, chaque modèle fournit des informations précieuses sur un ou plusieurs aspects majeurs de la maladie. On peut classifier les modèles expérimentaux des MICI en fonction de la nature de la perturbation effectuée au niveau des intestins. Les modèles principaux sont induits 1) chimiquement, 2) par des mutations spontanées, 3) par des modifications génétiques et 4) par transfert adoptif de lymphocytes T.

Modèle	Exemples de	Lieu de la	Type de réponse
	modèles	réponse	et mécanismes
	Modèle de colite induit par le Sodium Sulfate Dextran (DSS)	Côlon	La colite DSS est essentiellement une colite due à la perte de la fonction de barrière épithéliale et à l'entrée d'organismes luminaux ou de leurs produits dans la <i>Lamina</i> <i>Propria</i> . Une telle entrée entraîne la stimulation d'éléments lymphoïdes innés et adaptatifs et la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires.
1) Induit chimiquement	Modèle de colite induite par l'acide 2,4,6- trinitrobenzène sulfonique (TNBS)	Côlon	L'administration intra rectale du TNBS rend les protéines coliques immunogènes pour le système immunitaire de l'hôte et initie ainsi une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes CD4 Th1 et caractérisée par une infiltration de la <i>Lamina Propria</i> par les lymphocytes T CD4, des neutrophiles, des macrophages ainsi que le développement de diarrhée sévère, de perte de poids et de prolapsus rectal.
	Modèle de colite induit par l'Oxazolone	Côlon	La colite à l'oxazolone est provoquée par les cellules tueuses naturelles T (NKT) suite aux dommages causés sur l'épithélium intestinal. Ce modèle est caractérisé par la production de la cytokine inflammatoire IL-13.
2) Mutation spontanée	SAMP1/Yit	lléon	La souche SAMP1/Yit a été établie par élevage sélectif de souris SAM (souris à sénescence accélérée dérivées de souris AKR/J) de souche P1 présentant des ulcérations cutanées spontanées. Ce modèle est caractérisé par une inflammation spontanée de l'iléon terminal et du cæcum entraînée par une réponse de type Th1. Il faut noter que c'est l'un des rares modèles présentant une inflammation sévère de l'iléon terminal, siège principal des lésions de la MC.
	C3H/HeJBir	Côlon	Les souris C3H/HeJBir ont été sélectionnées pour une incidence élevée d'ulcération périanale, d'excréments mous et de résultats positifs au test Hemoccult. Dans des conditions de logement conventionnelles, les souris C3H/HeJBirLtJ développent une colite spontanée. Il est à noter que le phénotype de la colite chez cette souche nécessite une

			interaction avec un composant encore non défini de la flore intestinale. L'inflammation est présente principalement dans le cæcum et le côlon droit. La colite se développe tôt dans la vie et disparaît à l'âge de trois mois. Cette colite est caractérisée par une inflammation aiguë et chronique, des ulcérations, des abcès cryptiques, une hyperplasie et des cicatrices sous-muqueuses.
3) Modifications génétiques	Souris Knockout pour l'interleukine-10 (IL-10)	Côlon	Les souris dépourvues d'IL-10 (II10 ^{-/-}) développent une inflammation spontanée du côlon caractérisée par la présence d'un infiltrat inflammatoire constitué de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles. En outre, la suppression de l'IL- 10 dans toutes les cellules T ou spécifiquement dans les cellules Treg FOXP3+ entraîne également une colite spontanée, indiquant que l'IL-10 dérivée de ces cellules est importante pour le maintien de l'homéostasie intestinale. L'inflammation est initialement provoquée par une réponse de type CD4 Th1.
4) Colite induite	Transfert de	Côlon	Ce modèle est basé sur le transfert de cellules
par le	cellules CD4+		CD4 naïves vers un receveur syngénique
transfert	CD45RB ^{hi} (CD25-)		immunodeficient SCID ou RAG27. Cette
adoptif de			cellules T reg dans la population de cellules T
lymphocytes T			naïves. Le modèle de transfert de lymphocytes T adoptif est donc utilisé pour étudier le rôle des lymphocytes T pathogènes dans l'inflammation des muqueuses, et de nombreuses recherches sur les T regs et autres populations de lymphocytes T ont été réalisées dans ce modèle.

Tableau 2 : Les différents modèles expérimentaux reproduisent différentes caractéristiques desMICI humaines

2.2. Les causes de développement des MICI

Les mécanismes de développement des MICI sont encore un mystère. Cependant, il existe un consensus scientifique sur le fait que ces maladies sont multifactorielles et complexes. Parmi ces facteurs, il y a le système immunitaire, la prédisposition génétique, et l'environnement, agissant tous autour d'un acteur important : le microbiote intestinal **(Figure 7)**.





2.2.1. Les facteurs génétiques

Les études d'association pangénomiques (GWAS), ainsi que des études de séquençage haut débit ont identifié plus de 200 loci de risque génétique pour le développement des MICI. Environ 30 loci génétiques sont communs entre la MC et la CU [42], [43]. Ce qui rappelle que bien qu'elles aient une base commune, leurs étiologies semblent différentes. De façon intéressante, entre 80 % à 90 % des loci identifiés par GWAS sont liés à des variations non codantes, suggérant ainsi que la majorité des loci génétiques de susceptibilité dans les MICI agissent en régulant l'expression génique pour exercer leurs effets pathogéniques [42], [44]. Globalement, l'analyse des loci génétiques identifiés dans les MICI indique que plusieurs voies jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale, telles que la fonction de barrière épithéliale, la réponse antimicrobienne, la régulation immunitaire innée et adaptative. L'un des exemples les plus emblématiques est le gène *Nod2* (Nucleotide-binding oligomerization domain 2). *Nod2* est muté chez environ 30% des patients atteints de la MC [45]. NOD2, membre de la famille des récepteurs cytosoliques Nod-like (NLR), peut reconnaître le fragment de peptidoglycane présent dans la paroi cellulaire des bactéries Gramnégatives et Gram-positives, appelé Muramyl Dipeptide (MDP) et induire l'activation de la voie de signalisation NF-KB conduisant à la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-

12 [46]. En plus du gène *Nod2*, des polymorphismes au sein du gène 16-like 1 lié à l'autophagie (*Atg16l1*), ont également été liés aux MICI. En lien avec ce gène de susceptibilité dans les MICI lié à l'autophagie, des travaux ont révélé que l'autophagie est un processus pathogénique important dans le développement de ces maladies [47].

Autre exemple des facteurs génétiques liés au MICI est l'identification de nombreux polymorphismes mononucléotidiques (SNP) dans le gène du récepteur à la cytokine IL-23 (*II23r*), avec une forte association pour la MC et la CU [48]. La majorité des loci associés au risque de MICI est partagée entre les populations, mais certains loci présentent une spécificité ethnique entre les populations. Ainsi, les variants génétiques de susceptibilité au MICI, *Nod2* et *II23r* sont présents chez la majorité des patients européens, mais pas chez les patients de l'Asie de l'est [49]. De plus, bien que de nombreuses personnes portent des loci de risque associé aux MICI, seule une petite fraction d'entre eux développe la maladie. Ces études d'association ont été importantes dans la compréhension de la physiopathologie des MICI, mais n'expliquent pas tout. D'autres facteurs sont nécessaires pour le développement des MICI.

2.2.2. Facteurs environnementaux

Indubitablement, les facteurs environnementaux constituent un élément important dans la physiopathologie des MICI. La fréquence de la MC a considérablement augmenté dans les pays les plus développés au cours des 50 dernières années mais aussi dans les pays en voie de développement. Un lien étroit a été établi entre le mode de vie occidental et l'incidence des MICI. Les facteurs environnementaux mis en lumière, à l'heure actuelle, concernent en particulier la mauvaise alimentation, le tabagisme, l'absence d'activités physiques et la consommation excessive de médicaments [50].

L'alimentation est un facteur environnemental important qui affecte le développement des MICI. Des études ont fourni des preuves que la consommation de fruits et légumes est associée à une diminution du risque de développer la MC [51]. En revanche, une alimentation basée sur la restauration rapide contenant de nombreux aliments riches en graisses et en sucre est, quant à elle, un facteur de risque important pour le développement de la MC [52]. Récemment, l'Organisation internationale pour l'étude des maladies inflammatoires de l'intestin (IOIBD) a formé un groupe de travail pour formuler des recommandations pour les médecins, les diététistes et les patients. L'IOIBD a recommandé de prendre des habitudes alimentaires adéquates pour contrôler et prévenir les MICI **(Figure 8)** [53].

29



Figure 8 : Conseils diététiques pour les patients atteints de MICI [53].

Le tabagisme est un autre exemple de facteur environnemental qui semble aggraver la MC tout en protégeant contre la CU. Une relation dose-réponse était apparente dans les études épidémiologiques. Cependant, le rôle du tabagisme semble être fortement impacté par des facteurs génétiques et l'origine ethnique du fumeur [50]. Il a été démontré que le tabagisme affecte les réponses immunitaires cellulaires et humorales et favorise la production du mucus au niveau du côlon [54]. Le tabagisme peut influencer le développement des MICI par des altérations épigénétiques affectant l'autophagie et la composition du microbiote intestinal [55],[56].

2.2.3. Rôle du microbiote intestinal dans les MICI

Les MICI sont fortement associées à une dysbiose, c'est-à-dire un changement de la composition du microbiote. La dysbiose peut être un acteur essentiel dans la pathogenèse de la maladie. Souvent, cette dysbiose est caractérisée par une diminution de la diversité du microbiote intestinal chez les patients atteints de MICI [57]. Par exemple, la CU a été associée à une diminution du nombre de membres du phylum *Firmicutes* par rapport aux individus sains [57], [58]. Dans la MC, une augmentation significative des entérobactéries a été documentée [59], en particulier la souche *E.Coli*

dont la présence est liée à la sévérité de la maladie [60]. Alors que la présence de certaines souches de bactéries promeut la pathologie, certaines souches ont plutôt un rôle protecteur telle La souche *Faecalibacterium prausnitzii*. En effet, cette souche diminue la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-2 et l'IFNy et augmente au contraire la sécrétion de la cytokine antiinflammatoire IL-10 [61]. Voici un tableau récapitulatif des principales altérations du microbiotes observées dans les MICI [62] :

Diminuées dans les MICI	Augmentées dans les MICI
Bifidobacterium sp. Clostridium des groupes IV et XIVA Faecalibacterium prausnitzii Roseburia espèces Suterella espèces Bactéroïdes Saccharomyces cerevisiae	Protéobactéries Escherichia Coli, adhérente/invasivea Espèces Fusobacterium Ruminococcus gnavusa Pasteurellacées Veillonellacées Caudovirales Clavispora lusitaniae Kluyveromyces marxianus Candida albicans Candida tropicalis Cyberlindnera jadinii

Tableau 3 : Principales altérations du microbiote intestinal dans les MICI [62].

Certains travaux suggèrent que cette altération du microbiote intestinal est due au processus inflammatoire et constitue donc une conséquence de la maladie et non un élément déclencheur [63]. En effet, parmi les 200 loci identifiés par les études d'association pangénomiques, beaucoup sont directement liés à la réponse immunitaire contre le microbiote intestinal à l'image du gène *Nod2*. Cette altération du système immunitaire affecte le microbiote intestinal qui à son tour favorise la pathogenèse des MICI.

2.2.4. Dérégulations de la barrière intestinale : l'épithélium et le système immunitaire

Les MICI résultent d'une réaction immunitaire inappropriée contre les microorganismes commensaux contenus dans la lumière intestinale. Il existe différents mécanismes pour empêcher ces réactions immunes inappropriées. Néanmoins, ces mécanismes de protection peuvent se retrouver altérés et amener au MICI [64] [65].

2.2.4.1. Dérégulations des fonctions immunes innées de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal représente une première barrière physique face au microbiote commensal, les pathogènes ainsi que les antigènes alimentaires, limitant ainsi leur contact avec les cellules immunitaires intestinales [66]. Les cellules épithéliales intestinales expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs NOD-like (NLR), qui leur permettent de reconnaître les ligands microbiens et déclencher une réponse immunitaire innée. Cependant, l'intestin des mammifères est colonisé par de nombreuses bactéries commensales, auxquelles le système immunitaire doit être tolérant afin d'éviter l'inflammation intestinale chronique et le développement de MICI. Lors de l'inflammation intestinale, cette tolérance au microbiote semble être rompue. Ainsi, comprendre comment les cellules épithéliales intestinales perdent leur tolérance est un enjeu crucial en termes de prévention et de traitement des MICI. Les cellules épithéliales intestinales jouent donc un rôle immunitaire important dans l'intestin en fournissant la machinerie de reconnaissance du non-soi. Comme indiqué dans le chapitre 1, les cellules épithéliales intestinales comprennent plusieurs sous-populations : les entérocytes, les cellules de Goblet, les cellules neuroendocrines, les cellules souches intestinales, les cellules de Paneth, les cellules Tuft et les cellules M [67]. Les cellules de Goblet produisent le mucus recouvrant l'épithélium intestinal, essentiel pour la défense et la réparation de la muqueuse. La délétion génétique du gène Muc2 codant pour la protéine MUCINE-2, une mucine sécrétoire majeure produite par les cellules de Goblet, induit une colite spontanée chez la souris, mettant en évidence le rôle crucial des cellules de Goblet dans le maintien de l'homéostasie intestinale [68]. En plus des cellules de Goblet, les dérégulations liées aux cellules de Paneth sont aussi associées à un risque accru de développer des MICI [69]. Les cellules de Paneth, présentes dans les cryptes intestinales sont spécialisées dans la production et la sécrétion des peptides antimicrobiens comme les défensines [70]. Plusieurs facteurs de risques génétiques identifiés dans les MICI ont un lien avec les fonctions des cellules de Paneth, notamment le gène Nod2, évoqué dans la section facteurs génétiques. En effet, la protéine NOD2 est fortement exprimée par les cellules de Paneth et les cellules épithéliales absorbantes. Par exemple, les variants de risque du gène Nod2 sont associés à des niveaux inférieurs de défensines dans les cellules de Paneth, entraînant une altération de la fonction antimicrobienne [71] [72]. En plus des fonctions citées ci-dessus, une étude GWAS a identifié 3 loci de susceptibilité liée à la fonction de barrière épithéliale chez les patients atteints de MICI. Le premier d'entre eux, le locus *Hnf4a qui* régule l'expression des jonctions cellulaires. Le deuxième locus est le locus *Cdh1* codant pour l'E-cadhérine, importante molécule dans les jonctions d'adhésion entre les cellules épithéliales intestinales. Enfin, le gène *Lamb1* codant pour la sous-unité laminine bêta 1, exprimée au niveau de la membrane intestinale basale [73]. Nous constatons ainsi que ces différents loci sont souvent liés à la fonction de barrière exercée par les cellules épithéliales intestinales.

2.2.4.2. Dérégulations des cellules immunitaires innées

En plus des cellules épithéliales intestinales, les cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques apportent une deuxième couche de protection à la barrière physique des cellules épithéliales intestinales qui représente une importante ligne de défense de tout ce système inné. Par exemple, les patients atteints de MICI ont souvent des réponses immunitaires innées défectueuses, notamment un recrutement altéré des neutrophiles, facilitant le passage des microbes à travers la muqueuse intestinale [74]. Ces patients présentent également une population de macrophages inflammatoires qui produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-23 et l'IFNy [75]. Les modèles murins de colite ont mis en évidence le rôle crucial des cellules dendritiques dans le développement de l'inflammation intestinale. Plus précisément, des études ont montré que le transfert de cellules dendritiques aggrave l'inflammation intestinale induite expérimentalement chez la souris par le DSS [76]. A l'inverse, la déplétion des cellules dendritiques dans le même modèle expérimental diminue drastiquement l'inflammation intestinale, suggérant un rôle pro-inflammatoire des cellules dendritiques dans les MICI [76]. En lien avec ces résultats obtenus chez la souris, les cellules dendritiques isolées de tissu intestinal enflammé de patients atteints de MICI montrent une expression plus élevée de CD40, molécule associée à l'activation des lymphocytes T [77]. Les cellules NKT sont elles aussi potentiellement impliquées dans le développement des MICI. Les cellules NKT sont des cellules innées qui expriment à la fois un récepteur T (TCR) et un récepteur spécifique des cellules tueuses naturelles et qui s'activent rapidement après la reconnaissance de l'antigène [78]. Les cellules NKT peuvent être activées directement en reconnaissant certaines molécules spécifiques comme les phospholipides présentés sur des molécules de présentation d'antigènes non-conventionnelles telle que CD1d [78], mais aussi indirectement via des cytokines, telles que l'IL-12 et l'IL-18 [79]. Il a été montré que la suppression de la molécule CD1d, tout comme la suppression des cellules NKT atténuent de manière considérable le développement de colite expérimentale chez la souris [80].

2.2.4.3. Dérégulations du système immunitaire adaptatif

Les lymphocytes T CD4 dans les MICI :

Le rôle des lymphocytes T CD4 a toujours été mis en avant dans le développement des MICI car il existe un certain nombre de preuves qui suggèrent que les lymphocytes T CD4 sont impliqués à la fois dans l'initiation mais aussi dans la répression du processus pathologique des MICI. Les premières études ont décrit la présence des lymphocytes CD4 Th1 et Th2 à la fois dans les intestins sains mais aussi enflammés [81]. Par la suite, d'autres types de lymphocytes T CD4 tels que les Th17 et les Th9 ont pris une place majeure dans les muqueuses intestinales lors du développement des MICI.

Les lymphocytes T CD4 Th1 : Les lymphocytes CD4 Th1 sont une sous population de lymphocytes CD4 impliqués dans la protection contre les pathogènes, la réponse antitumorale, et plusieurs maladies auto-immunes. Les CD4 Th1 produisent principalement de l'IFNy et le facteur de nécrose tumorale (TNF) qui ont un rôle dans l'activation des macrophages et des lymphocytes T CD8. Le développement des CD4 Th1 repose sur certains facteurs de transcription comme STAT4 et Tbet. Les premiers modèles murins de MICI ont montré un rôle important pour les CD4 Th1 et aussi la cytokine IFNy dans le développement de la maladie. En effet, la colite induite par le transfert de cellules T CD4 CD45RB^{hi} naïves dans des souris dépourvues des gènes d'activation de la recombinase (Rag -/-), est atténuée par l'injection d'un anticorps qui bloque la cytokine IFNy [82]. De plus, le transfert de cellules T CD4 CD45RB^{hi} naïves dépourvues du facteur de transcription STAT4 ou Tbet ne parvient pas à induire l'inflammation intestinale [83], [84]. Dans un autre modèle de colite induite par l'administration du DSS, des chercheurs ont pu observer que la maladie est réduite chez des souris déficientes en IFNy [85]. Alors que toutes ces études tendent à montrer un rôle pathologique de la cytokine IFNy, des études récentes ont montré que les souris déficientes en IFNy étaient en fait plus sensibles à la colite induite par le DSS, suggérant un rôle protecteur de l'IFNy [86]. Ces résultats contradictoires suggèrent que le rôle de l'IFNy diffère selon l'environnement expérimental, à savoir le microbiote intestinal et le fond génétique des animaux qui peuvent influencer les mécanismes de l'inflammation. Chez l'Homme, la présence de lymphocytes T CD4 produisant de l'IFNy est souvent observée chez les patients atteints de MICI. De plus, des études GWAS humaines ont montré l'existence de mutations spécifiques présentes dans les gènes Ifny, Tbet et Stat4. De façon intéressante, ces mutations sont fonctionnellement liées à une expression plus élevée d'IFNy chez les patients atteints de MICI, suggérant un rôle pathologique de l'IFNy dans les MICI [42], [87]–[89].

Les lymphocytes T CD4 Th2 : Les lymphocytes T CD4 Th2 sont généralement considérés comme des effecteurs qui interviennent dans l'élimination des parasites en produisant des cytokines

inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et ceci grâce à des facteurs de transcription tels que STAT6 et GATA3 [90]. Les lymphocytes CD4 Th2 sont aussi souvent impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires comme la dermatite atopique et l'asthme bronchique [91]. Les lymphocytes CD4 Th2 sont associés aux MICI et plus particulièrement la CU [92]. Bien que des études phénotypiques n'ont pas montré une augmentation du niveau de l'IL-4 chez les patients atteints de MICI, le blocage de cette cytokine s'est avéré bénéfique dans certains modèles de colite induite chez la souris [93] [94]. A l'inverse de l'IL-4, l'IL-5 est fortement retrouvée dans les lymphocytes T isolés à partir de biopsies coliques de patients atteints de CU [95]. L'IL-5 est une cytokine qui favorise l'induction de la population d'éosinophiles. Néanmoins, le rôle de cette population dans le développement de la CU reste à investiguer. Le niveau de la cytokine IL-13 est lui aussi augmenté dans les lymphocytes T issus de tissues coliques de patient atteints de MICI. Malheureusement, le blocage de cette cytokine chez l'Homme, n'a pas montré une réponse clinique significative comparé au placébo, suggérant l'absence de rôle ou la présence d'une potentielle redondance entre l'IL-13 et d'autres cytokines inflammatoires [96]. Chez la souris, la suppression du facteur de transcription GATA3 spécifiquement dans les lymphocytes T, réduit considérablement la colite induite par le DSS [97]. Une molécule faite d'oligonucléotides nommée SB012, visant à bloquer l'expression de GATA3 a montré des résultats prometteurs chez la souris [97]. Un essai clinique utilisant la même molécule chez des patients atteints de CU modérée à sévère a récemment été achevé mais les résultats ne sont pas encore publiés [98].

Les lymphocytes T CD4 Th17 : Les lymphocytes CD4 Th17 sont une population de CD4 différenciée, qui produisent principalement les cytokines IL-17A, IL-17F et l'IL-22 mais peuvent aussi produire des cytokines inflammatoires comme l'IFNγ, l'IL-23 et le GM-CSF selon le contexte physiologique. Dans une étude sur des patients atteints de MICI, l'expression d'IL-17 et les niveaux d'ARNm d'IL-17A et d'IL-17F étaient plus élevés dans la muqueuse et le sérum des patients atteints de MICI comparés aux témoins sains [99]. De plus, de nombreuses études ont rapporté une expression élevée des cytokines liées aux Th17, y compris l'IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23 et IL-22 dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI actives [100]. Ces évidences cumulées indiquent un rôle putatif des cellules Th17 dans la pathogenèse des MICI. Néanmoins, le rôle des Th17 dans les MICI semble plus complexe. Chez la souris, le blocage de l'IL-17A ou bien l'IL-17F montre des rôles opposés de ces deux cytokines dans un modèle de colite induite par le DSS. En effet, il a été montré que la neutralisation de l'IL-17A aggravait l'inflammation intestinale tandis que le blocage de l'IL-17F pourrait avoir un rôle bénéfique [101]. Concernant le potentiel clinique impliquant les Th17 directement, des essais cliniques ont été effectués chez des patients atteints de MICI. Malheureusement, les anticorps dirigés contre l'IL-17A ou la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-17 n'ont pas été efficaces, du moins dans la MC [102]. Ces résultats
peuvent être dus au fait que l'IL-17A, qui, en plus d'induire une inflammation, favorise aussi la fonction et la réparation de la barrière épithéliale intestinale [31].

Les lymphocytes T CD4 Th9 : Il y a une dizaine d'années, un autre sous-ensemble de lymphocytes T CD4, qui sécrètent principalement la cytokine pro-inflammatoire IL-9, a été identifiée et baptisée cellules Th9. Les cellules Th9 sont connues pour leur rôle de défense immunitaire contre les helminthes ainsi qu'un important rôle antitumorale [103], [104]. Il a été montré que le rôle des lymphocytes Th9 qui expriment le facteur de transcription PU.1 est primordial dans la colite médiée par le transfert cellules T [105]. Les auteurs ont montré que ce mécanisme intervient via la signalisation du récepteur à l'IL-9 présent au niveau des cellules épithéliales intestinales. Il semble que l'IL-9 agit positivement sur l'expression des protéines de jonction serrées essentielles au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale [106]. L'IL-9 est également connue pour recruter et activer les mastocytes qui sécrètent de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires et des protéases mastocytaires dans l'intestin, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale et de l'anaphylaxie intestinale [107]. Bien que la cytokine IL-9 soit impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires, il manque encore de preuves solides prouvant que les Th9 sont la principale source d'IL-9 *in vivo* dans le développement des MICI. En effet, la cytokine IL-9 est aussi produite par d'autres cellules immunitaires comme les ILC2 [108]. Il reste donc beaucoup d'hypothèses à étudier quant au rôle des CD4 Th9 dans les MICI.

Les lymphocytes T régulateurs : Les lymphocytes CD4 Treg sont des cellules capables d'inhiber d'autres sous-types de lymphocytes effecteurs, tels que les CD8, Th1, Th2 et Th17 par la libération des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β mais aussi par contact direct avec la surface des cellules effectrices. Les Treg expriment de manière caractéristique la sous unité α du récepteur de l'IL-2 (CD25) et le facteur de transcription FOXP3 qui est essentiel pour leur phénotype suppressif et leur stabilité [109]. De manière générale, on distingue deux catégories principales de Treg : les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) et les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg). Souvent, un défaut dans le nombre et les fonctions des Treg est observé dans les MICI [110]. Les travaux pionniers menés par Fiona Powrie [82] ont mis en évidence le puissant rôle des Treg et notamment de l'IL-10 dans l'inhibition de la colite induite par le transfert de T chez la souris. De façon indubitable, le co-transfert de cellules Treg avec des T naïves empêche la colite. Par ailleurs, l'IL-10 a été identifiée comme un médiateur essentiel de cette puissante suppression exercée par les lymphocytes Treg in vivo [111]. En effet, par la suite, Il a été démontré que l'ablation sélective de l'expression de l'IL-10 dans les lymphocytes Treg suffit à provoquer une colite spontanée chez la souris [112]. Récemment, le facteur de transcription C-MAF a été démontré comme un régulateur clé de la fonction des Treg intestinales ainsi que leur production d'IL-10, jouant ainsi un rôle déterminant dans l'établissement et le maintien de l'homéostasie intestinale et la composition du microbiote [113]. Un déficit en C-MAF spécifiquement dans les Treg amène à une dysbiose microbienne associée à une augmentation des plasmocytes producteurs d'IgA intestinales, des Th17 producteurs d'IL-17A, et l'IL-22. Bien que l'administration d'IL-10 recombinante freine la colite expérimentale chez la souris, l'administration systémique d'IL-10 n'est pas bénéfique chez les patients atteints de MICI, ce qui nécessite de futures investigations cliniques [114]. En parallèle à l'IL-10, les lymphocytes Treg sont capables de produire et d'activer le TGF- β , qui a un effet immunosuppresseur très puissant sur la prolifération et l'activation des lymphocytes T effecteurs [115], [116]. La source du TGF- β régulant l'activité des lymphocytes T dans l'intestin n'est pas encore claire. Cependant, une étude parue en 2007 indique que le TGF- β 1 produit par les cellules T régulatrices est requis pour inhiber la différenciation des cellules Th1 et ainsi empêcher la maladie inflammatoire de l'intestin dans un modèle de transfert de lymphocyte T chez la souris [117]. Une autre étude menée en collaboration entre notre équipe et celle de Mark Travis, a montré que l'activation du TGF- β par l'intégrine $\alpha\nu\beta$ 8 exprimée sur les Treg pourraient à la fois fournir le TGF- β mais aussi l'activer dans l'intestin.

Les lymphocytes B dans les MICI : Dans les MICI, des réponses des lymphocytes B peuvent se manifester également. En effet, les lymphocytes B produisent des IgA, qui sont une classe majeure d'immunoglobulines produites au niveau de la muqueuse intestinale. Dans la lumière intestinale, l'IgA est produite sous forme d'IgA polymérique à des concentrations élevées, qui est transportée par le récepteur d'immunoglobuline polymérique (pIgR) exprimé sur les cellules épithéliales intestinales et libérée dans la lumière intestinale sous forme d'IgA sécrétées (SIgA). Les SIgA recouvrent les antigènes du microbiote afin d'inhiber leur liaison à l'épithélium et, par conséquent, leur translocation dans les compartiments sous-jacents. En plus des IgA, les lymphocytes B produisent aussi l'immunoglobuline IgG qui aurait un rôle dans les MICI. Parmi les premières études fonctionnelles, le transfert d'IgG antiflagelline chez des souris naïves augmente de manière considérable la gravité de la colite induite chimiquement [119]. Chez l'Homme, les patients atteints de MC présentent généralement des réponses IgG et IgA antimicrobiennes systémiques élevées et les IgG réactives au microbiote, sont également augmentées dans la muqueuse enflammée à la fois dans la MC et la CU [120]. De plus, cette étude a identifié un module immunitaire lié à la résistance à certaines thérapies et qui est composé de plasmocytes IgG⁺, de macrophages inflammatoires IL-1β⁺, et de lymphocytes Th1/Th17.

3. Les lymphocytes T CD8 : un acteur mis à l'écart dans les MICI

Les lymphocytes B, les lymphocytes T CD8 et CD4, représentant la branche adaptative du système immunitaire, constituent un mécanisme très efficace et spécifique pour éliminer les pathogènes. Bien que beaucoup d'études évoquent régulièrement le rôle des lymphocytes T CD4, les lymphocytes CD8 ont récemment été mis en lumière dans le développement des MICI. Avant d'évoquer le rôle des lymphocytes T CD8 dans les MICI, il est important de revoir les différentes bases qui régulent la biologie de ces cellules.

3.1. Circulation et quiescence des CD8 naïfs

Un individu peut contenir des milliards de lymphocytes T CD8 dont environ 100 à 1000 cellules naïves peuvent s'activer et monter une réponse contre un antigène spécifique. Afin de faciliter la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T CD8 naïfs, le système immunitaire met en place un système très dynamique de circulation des cellules entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions. Les lymphocytes T CD8 naïfs expriment plusieurs molécules à leurs surfaces les aidant à migrer vers les organes lymphoïdes. Certaines molécules de surface sont utilisées comme marqueurs pour faire la distinction entre les lymphocytes T CD8 naïfs et les autres populations. Pour entrer dans les ganglions lymphatiques, les cellules T CD8 naïves s'attachent d'abord aux veinules à endothélium épais (HEV) grâce à l'expression de la molécule CD62L (L-selectin). En plus de CD62L, les lymphocytes T CD8 naïfs expriment aussi un récepteur à chimiokine 7 (CCR7), un récepteur de chimiokine couplé aux protéines G qui reconnaît les ligands CCL21 et CCL19 qui sont présents dans les HEV. La signalisation via CCR7 induit l'expression de LFA1, qui se lie à ICAM1 (molécules d'adhésion intercellulaire), favorisant la localisation dans les organes lymphoïdes. Ainsi, CD62L et CCR7 sont des marqueurs importants de lymphocytes T CD8 naïfs. Les cellules T CD8 naïves ont relativement une faible activité métabolique basale qui est maintenue au stade d'interphase pendant plusieurs mois. Pour survivre, les lymphocytes T CD8 naïfs doivent en permanence reconnaître des peptides du soi dans le cadre du complexe TCR/peptide-CMH, et aussi recevoir un signal homéostatique permanent via l'interleukine IL-7. Les lymphocytes T CD8 naïfs qui n'ont pas ces deux signaux critiques finissent par mourir et leur nombre diminue drastiquement [121]. Le fait que ces signaux conduisent à l'expression de gènes anti-apoptotiques (comme Bcl-2) nourrit l'idée qu'un faible signal TCR et le signal IL-7 permettent de maintenir les cellules en vie mais sans les activer fortement pour éviter des réactions auto-immunes. Pendant longtemps, il a été débattu si la quiescence des cellules T naïves est finement régulée ou bien s'il s'agit uniquement d'un stade par défaut. Actuellement, il y a beaucoup d'évidences que la quiescence des cellules T naïves sont bien régulées par des mécanismes transcriptionnels actifs impliquant des facteurs de transcription spécifiques. Un

38

bon exemple est le facteur de transcription KLF2. Les cellules T déficientes en KLF2 se développent normalement dans le thymus, mais sont extrêmement rares dans la périphérie. En plus, elles expriment des marqueurs d'activation, suggérant une perte de quiescence [122]. Des études récentes ont indiqué qu'une autre famille de facteurs de transcription, la box Forkhead (Fox), jouent un rôle direct dans le contrôle de la survie et de la quiescence des cellules T naïves. Un membre de cette famille, Foxo1 est essentiel à l'expression de l'IL-7R dans les cellules T périphériques, permettant ainsi leur survie homéostatique [123], [124]. Récemment, un nouveau récepteur appelé VISTA a été proposé comme une molécule cruciale pour maintenir la quiescence des lymphocytes T CD4 naïfs [125], reste à voir si VISTA a les mêmes effets dans les lymphocytes T CD8. La quiescence dans les cellules T naïves est probablement nécessaire pour maintenir un pool assez important et diversifié de lymphocytes dans la périphérie. Le degré de quiescence cellulaire semble être étroitement régulé par des facteurs de transcription et des récepteurs spécifiques. Comprendre la balance entre l'état d'activation et l'état de quiescence est nécessaire afin de prévenir des processus inflammatoires tels que l'auto-immunité.

3.2. L'activation des lymphocytes T CD8

3.2.1. Les étapes d'activation des lymphocytes T CD8

La réponse immunitaire des lymphocytes T CD8 cytotoxiques peut généralement être divisée en quatre phases : (a) une phase effectrice durant laquelle les lymphocytes T CD8 naïfs subissent une expansion clonale et acquièrent des fonctions cytolytiques et inflammatoires afin d'éliminer l'agent pathogène ; (b) la phase de contraction, la majorité des lymphocytes T CD8 effecteurs meurent par apoptose laissant uniquement de 5 à 10 % de cellules qui vont devenir ce qu'on appelle des cellules mémoires à longue durée de vie; (c) une phase de maintien de la mémoire, dans laquelle les lymphocytes T CD8 mémoires spécifiques de l'agent infectieux sont maintenus à des niveaux stables tout au long de la vie de l'individu ; (d) finalement une phase de réponse rapide lors d'une infection secondaire par le même pathogène **(Figure 9)**.



Figure 9 : Les différentes phases d'activation des lymphocytes T CD8 suite à la rencontre d'un antigène [126].

3.2.2. Les différents signaux d'activation des Lymphocytes T CD8

L'activation des lymphocytes T CD8 nécessite de multiples signaux. Le signal 1, transmis par les interactions entre le TCR et le complexe CMH-peptide antigénique qui est fourni par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le signal 2, émis par une variété de molécules stimulatrices comme le CD28 exprimées par les lymphocytes T CD8 dont les ligands se trouvent exprimés au niveau des CPA. Le signal 2 peut dicter le sort de la réponse immune et fournit un mécanisme pour réguler l'activation des lymphocytes T CD8. Signal 3 : il s'agit d'un signal cytokinique fourni par les CPA ou bien les lymphocytes T CD8 eux-mêmes de manière autocrine afin de favoriser l'expansion clonale, la survie et les fonctions effectrices des LT CD8 activés **(Figure 10)**.



Figure 10 : Les différents signaux d'activation des lymphocytes T CD8

3.2.2.1. Le signal TCR

Le principal médiateur de l'activation des lymphocytes T CD8 est le TCR. Généré par la recombinaison de séquences d'ADN génomique au cours du développement des cellules T dans le thymus, chaque TCR est essentiellement unique et responsable de la spécificité de chaque cellule T. L'activation du TCR implique des interactions coordonnées entre un certain nombre de molécules sur le lymphocyte T et l'antigène spécifique présenté sous forme de complexe peptide-CMH par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques. Le TCR est composé de deux chaînes (α et β), qui ne reconnaissent l'antigène peptidique que lorsqu'il est lié à la molécule CMH. Sur la cellule T, le TCR s'associe à un complexe de protéines membranaires collectivement appelé CD3 (composé de sous-unités γ -, δ -, ϵ -et ζ), et c'est la région cytosolique de ce complexe qui est responsable de la propagation de la signalisation intracellulaire après la reconnaissance de l'antigène. Dans le cadre des lymphocytes T CD8, le TCR s'associe également à un corécepteur CD8 qui se lie au CMH I, ce qui stabilise davantage l'interaction entre la cellule T et la CPA [127].

3.2.2.2. Les signaux de costimulation et co-inhibition

Les lymphocytes T CD8 naïfs expriment de manière constitutive ou bien après stimulation du TCR, des molécules dites de costimulation ou co-inhibition qui peuvent affecter positivement ou négativement leur activation. Au stade naïf, toutes les molécules de co-inhibition et la grande partie des molécules de costimulation sont absentes sur les lymphocytes T CD8 et uniquement quelques molécules sont constitutivement exprimées telles que CD28, CD27 et HVEM. Le premier signal de costimulation est fourni par la molécule CD28 qui se lie à l'une des deux molécules présentes sur la CPA : B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) [128]. Dans une étude chez la souris, les auteurs ont montré qu'après infection par le virus de l'Influenza de type A, le nombre de lymphocytes T CD8 spécifiques du virus a été 8 fois moins important lorsque les lymphocytes T CD8 n'ont pas la molécule CD28 comparés aux souris contrôles, et ceci au moment du pic de la réponse immunitaire primaire, c'est à dire 8 jours après l'infection [129]. Néanmoins, d'autres molécules peuvent participer à l'activation des lymphocytes T CD8 en l'absence de CD28. En effet, il a été montré que l'absence de CD28 n'abolit pas complètement l'activation des lymphocytes T CD8 [130]. Parmi ces molécules, CD2, qui lorsque délétée simultanément avec CD28, permet de réduire drastiquement la capacité de prolifération des CD8 en présence de leur antigène spécifique comparés aux souris qui ont une simple délétion du CD28 [130]. En plus du CD28 et du CD2, le CD27 est exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes T CD8 naïfs et peut favoriser leur prolifération en se liant sur son récepteur CD70 exprimé sur la CPA [131]. A l'inverse du CD28, le CD27 n'agit pas au niveau de la prolifération des lymphocytes T CD8 mais plutôt en favorisant leur survie [131]. Rapidement après l'activation du TCR, les lymphocytes T CD8 expriment sur leur surface d'autres molécules de costimulation comme ICOS, 4-1BB, GITR et OX-40 qui jouent un rôle à la fois dans leur survie mais aussi dans leurs fonctions effectrices [132]. De l'autre côté, les molécules de co-inhibition sont absentes dans les CD8 naïfs et induites sur la surface des lymphocytes T CD8, une fois ces derniers activés, afin de moduler la réponse immunitaire et freiner une éventuelle suractivation.

Une fois activés, les lymphocytes T CD8 expriment diverses molécules qui permettent de freiner leur activation. Parmi les molécules co-inhibitrices les plus étudiées, PD-1, CTLA4, BTLA, TIM3 et LAG3. Ces molécules de co-inhibition freinent la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8 par différents mécanismes tels que l'inhibition de la prolifération et la survie, ou bien l'inhibition directe des voies de signalisation du TCR comme dans le cas de PD1 [133]. Les molécules de costimulation et de co-inhibition ont donc une place très importante dans la modulation de la réponse immunitaire contre les pathogènes mais aussi dans d'autres contextes pathologiques comme le cancer. L'identification et la caractérisation de ces molécules a fait l'objet de beaucoup de projet de recherche ces dernières années. Aujourd'hui, de nouvelles thérapies basées sur l'activation ou l'inhibition des molécules de

41

costimulation et co-inhibition sont associées aux thérapies classiques dans beaucoup de maladies. Parmi ces thérapies, on peut citer les anticorps anti PD-1 et anti CTLA4 qui sont aujourd'hui utilisés dans le traitement de plusieurs types de cancers.

3.2.2.3. Les cytokines jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T CD8

Dans le modèle actuel décrivant l'activation des lymphocytes T, le signal 3 qui provient des cytokines pro-inflammatoires, est requis pour une activation efficiente. Les cytokines les plus importantes dans l'activation des lymphocytes T CD8 sont l'IL-12 et les interférons de type 1 (IFN β /IFN α) et de type 2 (IFN γ). La première preuve directe du rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la réponse à une infection virale chez la souris a été démontré avec le modèle d'infection par LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus). Dans ces études *in vivo*, des lymphocytes T CD8 spécifiques du LCMV (P14) qui n'expriment pas le récepteur des interférons de type 1 (T1IFNR) ont été transférés dans des souris receveuses infectées par le LCMV et leur expansion clonale a été réduite de plus de 99% contrairement aux CD8 sauvages [134]. Une autre étude utilisant le même système de transfert adoptif de CD8 sauvages ou bien des clones qui n'expriment pas le récepteur à l'IL-12 (IL-12R), a montré que l'absence de l'IL-12R réduit de manière drastique l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 après infection par la bactérie *Listeria monocytogène*.

3.3. Les lymphocytes T CD8 se différencient en plusieurs sous populations hétérogènes après activation

Pendant la réponse effectrice primaire, une bifurcation développementale des lymphocytes T CD8 se produit. La plupart des cellules effectrices deviennent des cellules effectrices terminales, appelées cellules effectrices terminales/à courte durée de vie (TE/SLEC), tandis qu'une minorité de cellules effectrices, appelées cellules effectrices précurseurs de mémoire (MPEC), acquièrent une plus forte capacité de survie durant la phase de contraction de la réponse immunitaire [135]. Les MPEC se différencient davantage en un pool hétérogène de cellules CD8 mémoires. Les lymphocytes mémoires peuvent persister pendant de longues périodes et maintenir la capacité de remonter rapidement une réponse effectrice lors de la rencontre secondaire avec leur antigène apparenté. Au début, ces cellules T mémoires sont subdivisées en deux sous-populations principales : les cellules T de mémoire centrale (Tcm) et les cellules T de mémoire effectrice (Tem). Initialement classés sur la base de l'expression des molécules de localisation tissulaire comme CCR7 et CD62L [135]. Les Tem ont un niveau plus bas de ces récepteurs par rapport aux cellules naïves et Tcm, et sont principalement retrouvés dans la circulation sanguine et les tissus périphériques non lymphoïdes. Les cellules Tcm quant à elles, expriment à la fois CCR7 et CD62L et elles sont capables de circuler entre le sang et les tissus

lymphoïdes dans des conditions homéostatiques. Au cours de la dernière décennie, plusieurs nouvelles populations de lymphocytes T CD8 mémoires ont été décrites. Plus précisément, une population de lymphocytes qui ne circulent pas dans le sang, appelés lymphocytes T CD8 résidants les tissus (Trm). Les cellules Trm sont caractérisées par l'expression des marqueurs spécifiques CD69 et CD103 [136]. Les Trm sont localisées au point d'entrée des pathogènes envahissants pour fournir une première ligne de défense rapide. En plus des Trm, les lymphocytes T CD8 mémoires à caractère souches (Tscm), caractérisées chez l'Homme par l'expression de CD122, CD95 et CXCR3 CD45RA, CCR7 et CD62L [136]. Les Tscm ont un fort potentiel de développement multipotent par rapport aux autres populations de lymphocytes T CD8 mémoires, ce qui leur permet de générer des sous populations différenciées, y compris les Tem et les Tcm *in vitro* et *in vivo* [136]. Les différentes caractéristiques des lymphocytes T CD8 sont présentées dans la (**Figure 11**)



Figure 11: Schéma illustrant les principales populations de lymphocytes T CD8 et leurs caractéristiques connues à ce jour [136]. Les quatre premières barres indiquent les capacités de trafic et l'historique de stimulation des cellules. Les autres barres indiquent l'expression des gènes ou les caractéristiques phénotypiques, axées sur les molécules associées au trafic, à la rétention tissulaire et aux « marqueurs de mémoire » (chez la souris, cela inclurait une expression élevée de CD44 et CD11a et une expression réduite de CD45RB). L'ombrage gris dans ces barres indique où les caractéristiques phénotypiques/d'expression génique ne sont pas clairement corrélées avec les barres rouges et vertes

sur la gauche. Abréviations des cellules : T Naïves : TN ; Mémoires centraux : Tcm ; Mémoires effecteurs : Tem ; Mémoires résidents dans les tissus : Trm.

3.3.2. Les lymphocytes T CD8 effecteurs à coutre durée de vie (SLEC) et les précurseurs de mémoires (MPEC)

L'identification des lymphocytes T CD8 effecteurs à courte durée de vie (SLEC) et précurseurs mémoires (MPEC) est un objectif de longue date. Beaucoup d'études ont été effectuées pour identifier l'origine et les caractéristiques des SLEC et MPEC. Historiquement, l'identification des SLEC et MPEC au sein des lymphocytes T CD8 activés s'est avérée difficile parce que la plupart des marqueurs étudiés au début (CD44 et CD11) sont exprimés de la même manière par toutes les cellules activées [137]. Des travaux pionniers ont montré que l'expression de l'IL-7Ra par les lymphocytes T CD8 suite à une infection virale est essentielle au développement de la mémoire [138]. L'expression de l'IL-7Rα était associée à l'expression de molécules de survie et des molécules anti-apoptotique comme Bcl-2 [138], [139]. Ensuite, la combinaison de l'expression de l'IL-7Rα et de l'expression du récepteur G1 (KLRG1) a été utilisée pour différencier les SLEC et les MPEC [140]–[142]. Ainsi, les cellules CD8 IL-7R α^{high} KLRG1^{low} représentent les MPEC tandis que les cellules IL-7Ra^{low} KLRG1^{high} représentent les SLEC. Cependant, d'autres investigations ont montré que l'expression de l'IL-7Ra seule n'est pas suffisante pour le développement des lymphocytes T CD8 mémoires, car la surexpression de l'IL-7Rα n'a pas forcément conduit à une plus forte génération de cellules mémoires après infection virale [141], [143]. Bien que le potentiel inhibiteur de KLRG1 ait été établi in vitro, on ne sait pas encore si KLRG1 inhibe les SLEC in vivo afin de mettre fin à la phase effectrice de la réponse immunitaire. Dans une étude récente chez la souris, il a été montré que les capacités effectrices des MPEC et SLEC sont similaires in vivo et chacune des populations produisait les mêmes quantités de molécules effectrices comme l'IFN γ et TNF α , 4 jours après infection par LCMV [144]. Par contre, au fur et à mesure de la réponse immunitaire, les MPEC réduisent plus rapidement leurs fonctions effectrices comparés aux SLEC. Concernant la régulation du programme transcriptionnel des SLEC et des MPEC, de nombreuses études ont identifié d'une part, des « facteurs de transcription précoces » en amont, qui régulent l'ensemble du réseau transcriptionnel permettant l'initiation de la différenciation des lymphocytes T CD8, et d'autre part des facteurs de transcription spécifiques pour chaque lignée. En effet, le facteur de transcription IRF-4 coopère avec BATF en tant que facteur de transcription précoce favorisant l'accessibilité à la chromatine et l'expression génétique associée à divers aspects de la différentiation des lymphocytes T CD8 effecteurs [145]–[147]. En outre, Runx3 est un autre facteur de transcription précoce qui peut entraîner des changements dans l'accessibilité de la chromatine après les premiers stades d'activation des lymphocytes T CD8, en particulier sur les sites de fixation des IRF, des facteurs de transcription bZIP et Blimp1 [148]. Une fois la chromatine rendue accessible par les facteurs de transcription précoces, d'autres facteurs de transcription spécifiques pour chaque lignée (SLEC et MPEC) commencent à réguler un programme transcriptionnel spécifique.

3.3.3. Les CD8 mémoires effecteurs (Tem) et mémoires centraux (Tcm)

La première distinction phénotypique entre les lymphocytes T mémoires s'est basée sur l'expression des molécules de localisation dans les organes lymphoïdes, CD62L et CCR7. Ainsi, il a été défini deux populations de lymphocytes T CD8 mémoires ; les mémoires centraux (Tcm) et les mémoires effecteurs (Tem). Les Tcm sont CD62L^{high} CCR7^{high} tandis que les Tem sont CD62L^{low} CCR7^{low} [149]. L'expression de CCR7 et de CD62L sur les cellules Tcm facilite leur localisation vers les organes lymphoïdes secondaires, tandis que les cellules Tem ont une activité effectrice plus importante et expriment des intégrines et des récepteurs de chimiokines nécessaires à la localisation dans les tissus périphériques [149]. Les facteurs de transcription qui favorisent le développement et les fonctions des cellules Tcm sont Eomes sont TCF1, BCL-6, ID3 et STAT3 [140], [150]. Concernant les Tem, ils partagent les mêmes facteurs de transcription que les lymphocytes T CD8 effecteurs, en l'occurrence T-bet, Blimp1, ID2 et STAT4 [151], [152]. Les cellules Tcm semblent jouer un rôle dans la protection contre des infections plutôt systémiques et chroniques, compte tenu de leur localisation centralisée dans les organes lymphoïdes secondaires [153]. Cependant, les cellules Tem joueraient un rôle plutôt dans la protection contre les infections survenant dans les organes périphériques en raison de leur cytotoxicité plus importante et leur capacité à se localiser dans les tissus [154]. Récemment, la caractérisation des populations Tem et Tcm a progressé et une nouvelle population de lymphocytes T CD8 mémoires a été décrite suite à l'identification de cellules mémoires qui expriment un niveau intermédiaire de CX3CR1 (CX3CR1^{int}) [155]. Le marquage de CX3CR1 dans les lymphocytes T CD8 mémoires a permis de séparer ces derniers avec 3 niveaux d'expression : CX3CR1^{neg}, CX3CR1^{int}, CX3CR1^{high}. Les cellules qui sont CX3CR1^{high} semblent correspondre aux Tem classiques car elles n'expriment pas CD62L et ne sont pas présentes dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, ces cellules CX3CR1^{high} produisent de faibles quantités d'IL-2 et ont plus de capacités cytolytiques en réponse à l'antigène. Ainsi, fonctionnellement et géographiquement les cellules CX3CR1^{high} correspondent au lymphocytes Tem décrits par Sallusto et collègues [149]. À l'inverse, les populations CX3CR1^{neg} et CX3CR1^{int} se trouvent dans les ganglions lymphatiques, et l'expression de CX3CR1 peut être utilisée pour distinguer deux populations parmi les cellules Tcm. Les cellules CX3CR1^{neg} présentent les caractéristiques des cellules Tcm classiques. Malgré leur présence dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules CX3CR1^{int} n'expriment pas toutes CD62L, seulement 50% d'entre elles sont CD62L+ comparées aux cellules CX3CR1^{neg} qui sont toutes CD62L+ [155]. En plus de leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules CX3CR1^{int} se retrouvent dans les tissus périphériques également. Comme les cellules CX3CR1^{int} présentent des propriétés phénotypiques, homéostatiques et migratoires uniques,

elles ont été proposées comme une nouvelle population appelées les lymphocytes T CD8 mémoires périphériques ayant principalement un rôle dans les tissus non lymphoïdes (à ne pas confondre avec les lymphocytes T CD8 mémoires résidants les tissus (Trm), détaillés dans le paragraphe suivant).

3.3.4. Les lymphocytes T CD8 mémoires résidants les tissus (Trm)

La période du COVID remet en lumière le rôle clé joué par les lymphocytes T CD8 mémoires résidants [156]. Ils sont la première ligne immunitaire lymphocytaire empêchant l'invasion des microorganismes. Les lymphocytes T CD8 mémoires résidants les tissus (Trm) représentent une population de cellules mémoires distinctes des Tcm et Tem. Ils sont générés et persistent au niveau des tissus [157]. Lorsque l'organisme est exposé une seconde fois à un même pathogène, les cellules Trm fournissent une première ligne de défense cellulaire adaptative et sont indispensables dans l'élimination de l'agent pathogène [158]. Les cellules Trm sont présentes principalement dans les muqueuses comme les intestins, les voies génitales féminines, les glandes salivaires, les amygdales et les poumons. Ensuite, des cellules Trm ont été décrites dans d'autres sites non muqueux, y compris les tissus lymphoïdes et périphériques tels que le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques, le foie, les reins, le pancréas, le cœur, la peau et le cerveau [136]. Les cellules Trm sont souvent identifiées en fonction de l'expression d'un certain nombre de molécules. Les intégrines CD103 et CD49a, les molécules CD69, CD44 ainsi que Sip1 sont généralement utilisées pour caractériser les cellules Trm [159]-[161]. Cependant, l'expression de ces protéines peut varier en fonction du tissu de résidence. Les cellules Trm sont également décrites comme exprimant CXCR3 et n'expriment pas KLRG1, CCR7 et CD62L, et ayant une expression intermédiaire ou faible de CX3CR1 [155], [162]. Concernant la régulation transcriptionnelle des Trm, plusieurs études récentes ont identifié des facteurs de transcription spécifiques agissant seuls ou en coopération. Chez la souris, les cellules Trm de plusieurs tissus expriment des niveaux relativement élevés du facteur de transcription HOBIT (homologue de Blimp1 dans les cellules T) par rapport aux cellules T périphériques [163]. En effet, le facteur de transcription HOBIT forme un module avec le facteur transcription Blimp1 et permet la régulation d'un programme transcriptionnel spécifique dans les Trm au niveau des intestins, la peau, le foie et les reins. De plus, le niveau d'expression des facteurs de transcription Tbet, Eomes, KLF2 et TCF1 est relativement bas dans les Trm [164], [165]. Cependant, un niveau minimum de Tbet doit être présent dans les Trm afin de garantir leur maintien [165]. La protection médiée par les Trm passe par leur capacité cytotoxique mais aussi par leur capacité à secréter rapidement des cytokines telles que l'IFNγ. En effet, les cellules Trm des poumons peuvent produire de grandes quantités d'IFNy en réponse à une infection secondaire par le virus de l'influenza ou après infection par le COVID19. L'importance de l'IFNy secrétée par les Trm est montrée par l'observation que les souris dont les Trm n'expriment pas l'IFNy n'éliminent pas le virus lors de l'infection secondaire, et meurent plus rapidement [166].

3.4. Le rôle pathogénique des lymphocytes T CD8 dans les maladies auto-immunes

Les lymphocytes T CD8 contribuent à la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes, notamment la sclérose en plaques (SEP), la sclérose systémique (SSc), le diabète de type 1 (T1D), maladie de Grave (GD), lupus érythémateux disséminé (LED), anémie aplastique (AA) et le vitiligo [167]. En plus de leur rôle effecteur pathogénique, des sous-ensembles de lymphocytes T CD8 ont également été identifiés comme régulateurs négatifs des réponses auto-immunes. Voici un tableau qui résume le rôle des LT CD8 dans différentes maladies auto-immunes :

Maladies	Niveau de cellules T	Rôle potentiel des cellules T CD8+
	CD8	
SEP	Augmenté	Médiation de l'inflammation
SS	Augmenté	Contribue à la fibrose cutanée
T1D	Augmenté	Induit la mort des cellules β
LED	Augmenté	Induit l'apparition d'auto-anticorps et cause des
		dommages aux organes
GD	Diminué	Provoque la production d'auto-anticorps intrathyroïdiens
AA	Augmenté	Provoque des altérations des cellules hématopoïétiques
Vitiligo	Augmenté	Médiation de la destruction des mélanocytes

Tableau 4 : le rôle des lymphocytes T CD8 dans différentes maladies auto-immunes [167].

3.5. Les lymphocytes T CD8 dans les MICI :

Il y a une dizaine d'années, et grâce à des approches transcriptionnelles sur des lymphocytes T CD8 circulants isolées de patients atteints de MICI, une équipe de recherche a pu identifier des signatures d'expression génique qui ont divisé les patients en deux sous-groupes avec des évolutions différentes [168]. Une fréquence de rechute plus élevée a été observée chez les patients définis par une expression élevée des gènes impliqués dans la signalisation initiée par la cytokine IL-7 et le TCR [168]. Fait intéressant, aucune corrélation n'a été trouvée avec le profil d'expression génique des lymphocytes T CD4 circulants [168], suggérant pour la première fois un rôle potentiel des lymphocytes T CD8 dans les MICI. Une étude récente a montré elle aussi que les profils de transcription et de méthylation de l'ADN des lymphocytes T CD8 issus du sang périphérique corrèlent avec la présence de MICI mais ne corrèlent pas avec l'évolution de la maladie chez les patients pédiatriques [169]. Néanmoins, ces études ont été effectuées sur des lymphocytes circulants et aucune preuve n'a été émise quant à l'éventuelle

participation des lymphocytes T CD8 présents dans les intestins. Les lymphocytes T CD8 présents au niveau des tissus ont d'abord été impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes comme le psoriasis et la maladie céliaque [170]-[172]. Récemment, plusieurs études ont commencé à faire émerger le rôle direct des lymphocytes T CD8 intestinaux dans les MICI. Une équipe a montré pour la première fois que la présence et la persistance d'expansion clonale de lymphocytes T CD8, et non pas les lymphocytes T CD4, sont associées à la récidive endoscopique postopératoire chez les patients atteints de MC [173]. Ensuite, une nouvelle étude récente a apporté un éclairage supplémentaire en utilisant des approches Single Cell RNA-Seq, effectuées sur des lymphocytes T CD8 issus de tissus coliques de patients atteints de MICI. Dans cette étude, [174], les chercheurs ont exploré les phénotypes cellulaires et les fonctions des lymphocytes T CD8 dans les MICI. Un atlas unicellulaire des lymphocytes T CD8 coliques humains dans la rectocolite hémorragique a été créé en utilisant une approche combinant la transcriptomique unicellulaire, l'analyse du répertoire des récepteurs des TCR et la cytométrie de masse [174]. Dans cette étude, les chercheurs ont observé une hétérogénéité importante dans les lymphocytes T CD8 que ce soit chez les patients atteints de MICI ou bien chez les non malades. De façon intéressante, en cas de MICI, plus particulièrement la rectocolite hémorragique, ils ont pu observer l'expansion de populations de lymphocytes T CD8 effecteurs producteurs de molécules cytotoxiques telles que Granzyme K (GZMK) et TNF α . En parallèle, ils ont rapporté l'augmentation de populations de lymphocytes T CD8 exprimant le facteur de transcription FOXP3 et aussi la cytokine IL-26, avec des caractéristiques régulatrices et immunosuppressives. En utilisant un modèle de souris transgénique avec l'expression de la cytokine IL-26 humanisée, les chercheurs ont découvert que l'IL-26 atténue la gravité de la maladie dans la colite expérimentale induite par le DSS chez la souris. Cependant, la limite de cette étude c'est le fait qu'ils ont utilisé uniquement 3 patients et 3 contrôles dans leurs investigations. Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier les mécanismes d'action de l'IL-26 dans les MICI. De manière générale, le rôle des lymphocytes T CD8 dans les MICI commence à être mis en lumière et d'autres investigations seront à faire pour mieux comprendre leur contribution conjointement aux autres cellules immunitaires. L'une des pistes importantes pour comprendre la dérégulation des lymphocytes T CD8 dans les MICI c'est d'investiguer d'avantage les mécanismes d'immunorégulation qui permettent de limiter leur hyper-activation. Parmi les mécanismes qui contrôlent l'activation des lymphocytes T CD8, outre les lymphocytes Treg, la cytokine TGF-β, qui a un potentiel immunorégulateur important.

4. Le TGF-β : gardien de l'homéostasie intestinale

Le TGF- β est une cytokine ubiquitaire hautement conservée chez les mammifères. Cette cytokine joue un rôle primordial dans le développement ainsi que les fonctions biologiques majeures de l'organisme en agissant sur plusieurs types cellulaires. La plupart des types cellulaires de mammifères adultes réagissent au TGF- β avec des effets sur la prolifération, la différenciation, l'adhésion, le mouvement, le métabolisme, la communication et la mort cellulaire. La superfamille du TGF- β comprend 32 membres regroupés en deux sous-familles de protéines : la sous-famille des Bones Morphogenetic Proteins (BMP) et la sous-famille du TGF- β [175]. Cette classification est basée sur les critères de similarité des séquences génomiques et de fonctionnalité. La sous-famille TGF- β comprend trois isoformes : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, deux activines (A et B), la protéine Nodal, le facteur de croissance et de différenciation 1 (GDF1), ainsi que GDF3, GDF8 (également connu sous le nom de myostatine), GDF9 et GDF11. La sous-famille des BMP comprend 10 BMP, plusieurs GDF et l'hormone anti-mullerienne [175].

4.1. Production et sécrétion du TGF-β

Les isoformes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 sont synthétisés sous forme de précurseurs nommés pré-pro-TGF- β . Ces pré-pro-TGF- β comprennent une séquence signal permettant le transport jusqu'au réticulum endoplasmique, une grande partie N-terminale appelée peptide associé à la latence (LAP) et un segment C-terminal court, qui correspond au monomère de la cytokine active mature [176]. Une fois le peptide signal retiré, le polypeptide restant se transloque dans la lumière du réticulum endoplasmique, où il est assemblé en un dimère grâce à trois liaisons disulfures pouvant être clivées par l'endoprotéase Furine. Après le clivage médié par la Furine, l'homodimère lié au disulfure du fragment C-terminal reste associé de manière non covalente à l'homodimère lié au disulfure du LAP N-terminale pour former le petit complexe latent. Le clivage médié par la Furine est nécessaire à l'activité du TGF- β , et la perte de la Furine dans certains types cellulaires chez la souris ressemble phénotypiquement à la perte du TGF- β [176].

La structure cristalline du petit complexe latent a révélé que le LAP encercle la partie active du TGF- β et cache ses sites de liaisons avec les récepteurs membranaires [177]. Dans la majorité des cellules, les deux copies du LAP sont elles-mêmes chimiquement réticulées par des liaisons disulfures avec deux résidus de cystéine présents sur une autre protéine appelée protéine de liaison au TGF- β latent (LTBP). Les LTBP s'associent de manière covalente au petit complexe latent pour former une structure appelée le grand complexe latent (LLC).

En plus de sa forme secrétée, le TGF-β peut être fixé à la surface des cellules par association avec la protéine prédominante des répétitions de la glycoprotéine A (GARP) [178], [179]. La molécule GARP est une protéine transmembranaire qui, comme les LTBP, est liée de manière covalente au LAP par la formation d'une liaison disulfure [180]. Contrairement aux LTBP, qui sont largement exprimées, l'expression de GARP semble être étroitement limitée aux lymphocytes T régulateurs exprimant le facteur de transcription FOXP3 [181].

4.2. Activation du TGF-β

Contrairement à la plupart des cytokines qui sont prêtes à fonctionner une fois sécrétées, le TGF- β est unique dans le sens où il est sécrété en tant que partie d'un complexe latent. Ainsi, l'ampleur et la durée de la signalisation du TGF- β sont soigneusement contrôlées à de nombreux niveaux différents, notamment la synthèse et l'activation des isoformes latentes du TGF- β . L'activation temporelle et spatiale du TGF- β est donc essentielle pour ses effets physiologiques *in vivo*.

4.2.1. L'activation du TGF-β par des facteurs physico-chimiques

Comme le fragment court C-terminal qui représente la partie active du TGF- β est maintenu à l'état latent par association non covalente avec le LAP, l'activation du TGF- β est relativement facile et se fait par différents mécanismes. Des conditions physiques spécifiques comme la chaleur, les pH extrêmes ou bien les radiations ionisantes permettent d'activer le TGF- β *in vitro* [182]. Dans les laboratoires, la chaleur et le changement de pH sont couramment utilisées pour activer le TGF- β latent. Cependant, il n'existe pas au jour d'aujourd'hui des études convaincantes qui montrent que les changements de température ou de pH activent le TGF- β *in vivo*.

4.2.2. L'activation enzymatique et protéolytique du TGF-β

Le TGF- β latent peut être activé *in vitro* par une variété de glycosidases, y compris la N-glycanase, la sialidase et la neuraminidase. Néanmoins, le rôle des glycosidases n'a toujours pas été apprécié *in vivo* [182]. D'autres enzymes et protéines de la matrice extracellulaire peuvent activer le TGF- β . On peut citer deux familles d'enzymes capables d'activer le TGF- β : les protéases à sérine, en particulier la plasmine et la cathepsine D, et les métalloprotéases, notamment MMP9 et MMP14 [182]. La structure cristalline du petit complexe latent a permis d'identifier les sites de clivage protéolytique accessibles et a suggéré comment les protéases pourraient conduire à la libération du TGF- β actif. Cependant, comme pour les glycosidases, la plupart des données impliquant les protéases dans l'activation sont basées sur des observations *in vitro* avec des protéines purifiées ou des cellules en culture. Les phénotypes des souris dépourvues spécifiquement de protéases candidates ne conduisent pas à la perte de la fonction du TGF- β [182]. De tels résultats pourraient être expliqués par une redondance

fonctionnelle pour ces protéases. Cependant, la métalloprotéase MMP14 peut coopérer avec l'intégrine $\alpha\nu\beta$ 8 dans l'activation du TGF- β *in vivo* (voir paragraphe suivant). Récemment, il a été démontré que la Ténascine-X, autre composant de la matrice extra cellulaire, interagissait avec le complexe LAP in *vitro et in vivo*. Cette interaction réside dans le domaine de type FBG C-terminal de la Ténascine-X. Plus important encore, le domaine de type FBG était capable d'activer le TGF- β latent dans différents types de cellules.

4.2.3. L'activation du TGF-β par les intégrines

En plus des paramètres physico-chimiques et protéolytiques, le TGF- β peut être activé par des membres de la famille des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs dimériques exprimées sur la surface cellulaire et sont composées des sous-unités α et β . Les données actuelles montrent qu'au moins deux mécanismes sont impliqués dans l'activation du TGF-β latent par les intégrines. Le premier mécanisme proposé est dépendant des métalloprotéinases de la matrice (MMP). Plus précisément, il est suggéré que les intégrines organisent spatialement les MMP, le TGF-β latent et le récepteur du TGF- β à proximité, ce qui favorise une activation du TGF- β latent par clivage protéolytique [182]. Le second mécanisme est indépendant de l'action protéolytique, mais il est plus étroitement associé aux forces de traction des cellules qui sont directement transmises à la LLC par la liaison des intégrines. L'idée sur le rôle des intégrines dans l'activation du TGF-B a été suggérée suite aux analyses phénotypiques des souris dépourvues de la sous unité β6 de l'intégrine αvβ6. Les souris n'exprimant pas l'intégrine β6 développent des réponses inflammatoires exacerbées au niveau des poumons et de la peau, semblables au phénotype d'absence du TGF-β [183]. Les cellules qui expriment l'intégrine $\alpha\nu\beta6$ peuvent activer à la fois le TGF- $\beta1$ et le TGF- $\beta3$ en se liant à un motif commun de reconnaissance des intégrines, le tripeptide linéaire RGD qui est présent dans une boucle exposée au niveau du LAP [184].

Comme l'intégrine β 6, l'intégrine $\alpha\nu\beta$ 8 se lie au même site RGD et peut également activer le TGF- β [185]. Les souris dépourvues de la sous-unité β 8 de l'intégrine $\alpha\nu\beta$ 8 meurent au cours du développement embryonnaire ou immédiatement après la naissance à la suite d'une hémorragie intracérébrale causée par un développement vasculaire défectueux dans le système nerveux central [186]. Cet effet semble être dû à une altération de la signalisation du TGF- β . Outre les intégrines $\alpha\nu\beta$ 6 et $\alpha\nu\beta$ 8, quatre autres intégrines reconnaissent le site RGD dans la région LAP du TGF- β 1 : α 8 β 1, $\alpha\nu\beta$ 1, $\alpha\nu\beta$ 3, et $\alpha\nu\beta$ 5. Toutefois, aucun rôle d'activation du TGF- β par des intégrines autres que $\alpha\nu\beta$ 6 et $\alpha\nu\beta$ 8 n'a encore été démontré dans le système immunitaire [176].



Synthèse et activation du TGF-b actif. Dans le réticulum endoplasmique, chaque molécule de pro-TGF-b s'assemble en un dimère via trois liaisons disulfures inter-chaînes. Après le clivage par l'endoprotéase Furine, le fragment Cterminal reste associé de manière non covalente à l'homodimère LAP. Cette molécule est appelée le petit complexe latent. Trois principaux mécanismes de libération du TGF-b actif sont représentés : (1) le clivage extracellulaire via les protéases au niveau du domaine LAP, (2) fixation du petit complexe latent à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du LTBP1 et libération du TGF-b actif par une tension transmise par les intégrines lors de la contraction cellulaire, et (3) l'attachement du petit complexe latent à la GARP sur la surface de la cellule et activation du TGF-b actif par les intégrines.

4.3. Signalisations et régulation transcriptionnelle médiée par le TGF-β

La signalisation par le TGF- β est initiée lorsque la forme active du TGF- β se lie au récepteur TGF- β RII, entraînant son autophosphorylation, qui à son tour phosphoryle le TGF- β RI par l'intermédiaire de son domaine kinase. Le TGF- β RI induit ensuite la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3, qui interagissent ensuite avec SMAD4 ou TRIM33 (tripartite motif-containing 33). En outre, d'autres voies de signalisation non canonique telles que les MAPK, ont été décrites en aval de l'engagement du récepteur. Ces complexes transloquent dans le noyau et régulent l'expression de plusieurs ensembles de gènes en fonction du contexte cellulaire et moléculaire (Figure 12). Bien qu'elles soient relativement simples et directes, les voies de signalisation du TGF- β sont régulées par diverses boucles de rétroaction à différents niveaux. La régulation de la signalisation du TGF- β se joue au niveau du ligand, du récepteur, des différentes protéines SMAD et de leur localisation dans la cellule. La signalisation du TGF- β et est donc finement ajustée en termes de robustesse, de durée, de spécificité et de plasticité de signalisation. Ce contrôle précis donne lieu à des fonctions physiopathologiques polyvalentes et dépendantes du contexte.



Figure 12 : Schéma illustrant les principales voies de signalisation du TGF-β.

4.3.1. Les récepteurs du TGF-β

Comme indiquée dans le paragraphe précédent, le TGF- β induit la signalisation via un complexe de deux types de récepteurs : TGF-BRI et TGF-BRII. Les deux types de récepteurs du TGF-B sont des kinases transmembranaires et partagent des structures similaires. Ils sont composés d'un ectodomaine glycosylé d'environ 100 acides aminés et qui est riche en disulfure, une région transmembranaire, une courte séquence juxta-membranaire et une kinase cytoplasmique avec 11 sous-domaines. Les séquences juxta-membranaires des récepteurs de type I ont une courte séquence Glycine-Serine (Gly-Ser), appelée domaine GS, qui est phosphorylé par la kinase du récepteur de type II en présence du ligand [187]. Chez les mammifères, on compte cinq sous-types de récepteurs appartenant à la famille du TGF-βRII et onze sous-types de récepteurs appartenant à la famille du TGF-βRI. Plus récemment, des études structurales ont montré qu'une molécule dimérique de TGF- β se lie à deux molécules de TGF-BRI et deux molécules de TGF-BRII formant un complexe symétrique. Les TGF-B1 et TGF-B3 se lient avec une grande affinité au TGF-β-RII sans avoir besoin des récepteurs de type I, alors que les TGF-β-RI n'ont qu'une faible affinité pour le TGF-β1 et TGF-β3 [188]. En revanche, le TGF-β2 possède une faible affinité pour les deux récepteurs TGF-BRII et TGF-BRI. Le TGF-B se lie aux complexes de récepteurs hétérométriques avec une affinité très élevée avec une valeur de constante de dissociation (Kd) d'environ 10⁻¹¹ M [189]. De plus, l'abondance des récepteurs du TGF- β sur la surface cellulaire est relativement faible par rapport à d'autres récepteurs à activité kinases. La grande affinité du ligand et la faible concentration en récepteur permettent aux cellules de réguler finement leur sensibilité au TGF-β.

4.3.2. Les voies de signalisations médiées par les SMAD

La nomenclature "SMAD " a été utilisé pour la première fois en 1996, une contraction des noms des membres prototypiques SMA et MAD1, Il s'agit de facteurs de transcription intracellulaires qui régulent la transduction du signal du TGF-β. Chez l'Homme et la souris, on compte huit protéines SMAD (de SMAD1 à SMAD8), quatre chez la drosophile et trois dans le C. elegans [190]. Les huit membres de la famille SMAD sont classés en trois groupes en fonction de leurs fonctions : les SMAD activés par les récepteurs (R-SMAD), les SMAD co-médiateurs (CO-SMAD) et les SMAD inhibiteurs (I-SMAD). Lors de l'activation de la voie de signalisation du TGF-β, les récepteurs phosphorylent les R-SMAD SMAD2 et SMAD3, tandis que les autres R-SMAD, à savoir SMAD1/5/8, sont activés par les BMP et sont phosphorylés par les récepteurs des BMP de type I/II (BMPRI, BMPRII). SMAD4, le CO-SMAD, également appelé " deleted in pancreatic cancer 4 (DPC4), est un suppresseur de tumeur qui est altéré dans de nombreux types de cellules tumorales. SMAD4 est particulièrement intéressant car il peut former des complexes avec tous les R-SMAD activés, et transloquer dans le noyau, pour réguler la transcription des gènes cibles, contrôlant la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose et d'autres fonctions biologiques. Les I-SMAD (SMAD6 et SMAD7), régulent négativement la signalisation des protéines SMAD via leur interférence avec des interactions R-SMAD-récepteur ou R-SMAD-R-SMAD.

4.3.2.1. Aspect structurel des protéines SMAD

Les protéines SMAD ont environ 500 acides aminés et se composent de deux domaines globulaires couplés par une région de liaison [191]. Le domaine N-terminal, ou « Mad-homology 1 » (MH1), est très conservé dans tous les R-SMAD et SMAD4, mais pas dans SMAD6 et SMAD7. La région de liaison est très variable entre les différents sous-groupes, alors que le domaine C-terminal ou MH2 est conservé dans toutes les protéines SMAD (**Figure 13**). Les études structurelles basées sur les rayons X ont fourni des informations essentielles permettant la compréhension des interactions des protéines SMAD entre elles-mêmes d'un côté, et avec l'ADN et les autres facteurs de transcription de l'autre. Avec la présence du motif structurel d'épingle à cheveux de type beta, conservé dans tous les R-SMAD

et SMAD4, le domaine MH1 sert pour un module de liaison à l'ADN. Le domaine MH1 est suivi par la région de liaison, qui a plusieurs fonctions selon le type de la protéine SMAD. Dans les R-SMAD et les I-SMAD, la région de liaison contient un motif PY qui est reconnaissable par le domaine WW de la protéine SMURF (SMAD ubiquitination related factor), qui permet la formation de complexe avec les R-SMAD et les I-SMAD régulant ainsi négativement la signalisation du TGF-β. En plus du motif PY, les R-SMAD contiennent un site de phosphorylation pour plusieurs protéines kinases. Dans la protéine SMAD4, la région de liaison contient une séquence d'exportation nucléaire (NES). Le domaine MH2 quant à lui, est hautement conservé dans les protéines SMAD. Les R-SMAD ont un domaine C-terminal conservé avec un motif Ser–X–Ser qui est phosphorylé par le récepteur. Une poche avec des résidus basiques interagit avec le site phosphorylé du récepteur dans le cas des R-SMAD et avec la queue phosphorylée des R-SMAD dans le cas de SMAD4. Le domaine MH2 possède des modules hydrophobes qui permettent aux R-SMAD et SMAD4 d'interagir avec des facteurs de rétention cytoplasmique, des protéines de la membrane nucléaire et enfin des protéines facilitant la liaison à l'ADN. Dans la protéine SMAD4, le domaine MH2 contient une région d'interaction avec des corépresseurs et des coactivateurs.



Figure 13 : Comparaison schématique des structures simplifiées des R-SMAD (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, et SMAD8), SMAD4, et des SMAD inhibiteurs (SMAD6 et SMAD7). Les R-SMAD et SMAD4 possèdent deux domaines conservés, les domaines MH1 et MH2, séparés par une région de

liaison variable riche en sérine et en proline. La région de liaison est ciblée pour la phosphorylation (P) par diverses kinases de signalisation. Les SMAD inhibiteurs sont dépourvus de domaine MH1. La boucle L3, chargée positivement, dans le domaine MH2 sert de médiateur à l'association avec les récepteurs de type I activés. Avec les récepteurs de type I activés et avec d'autres SMAD. Les R-SMAD ont un motif SXS C-terminal conservé qui est phosphorylé par le récepteur de type I activé ce qui entraîne leur activation [192].

La formation des complexes SMAD suite à la phosphorylation du récepteur

L'association des R-SMAD avec les complexes des récepteurs permet aux kinases des récepteurs de type I de phosphoryler les R-SMAD au niveau de deux sérines C-terminales, favorisant ainsi la dissociation des deux R-SMAD activés des récepteurs et leur association avec SMAD4 dans des complexes trimériques [193]. La sélectivité de l'activation des R-SMAD est dictée par les récepteurs de type I auxquels les R-SMAD sont recrutés. Les principaux récepteurs de type I de l'activine et du TGF- β (ActRIB et TGF- β RI) activent SMAD2 et SMAD3, tandis que les principaux récepteurs de type I des BMP, à savoir (ALK-1, ALK-2, BMPRIA et BMPRIB), activent SMAD1 et SMAD5 [194]. L'assemblage trimérique des complexes SMAD est médié par les domaines MH2 et les extrémités C-terminales phosphorylées des R-SMAD [193]. Les complexes hétérotrimériques composés de deux R-SMAD et d'un SMAD4 sont considérés comme les complexes fonctionnels les plus courants et prédominants.

4.3.2.2. Liaison des complexes SMAD à l'ADN

Les R-SMAD et SMAD4 font la navette entre le cytoplasme et le noyau, mais les complexes SMAD activés se trouvent principalement dans le noyau. Des séquences de localisation nucléaire se trouvent dans les domaines MH1 de plusieurs SMAD, et les interactions des SMAD avec des importines ou des nucléoporines distinctes suggèrent une régulation différentielle de leur importation nucléaire. Il est à noter que l'activation ou la répression transcriptionnelle directe des gènes cibles nécessite souvent l'association des complexes SMAD avec des facteurs de transcription qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques dans les régions promotrices ou enhancers proximales avec une grande affinité. L'activation ou la répression de la transcription par les SMAD dépend donc de plusieurs paramètres, des facteurs de transcription et des co-régulateurs associés aux SMAD, des gènes cibles, de l'état physiologique de la cellule et de la composition trimérique des complexes SMAD. La grande diversité des facteurs de transcription avec lesquels s'associent les SMAD explique le grand nombre de gènes cibles du TGF-β rendant ainsi difficile d'identifier de manière claire une seule séquence de liaison à l'ADN. Des séquences d'ADN optimales ont été proposées pour la liaison des SMAD et sont appelées SMAD Binding Elements (SBE). Par exemple, pour SMAD3 et SMAD4, cette séquence est AGAC alors que pour SMAD1 et SMAD5 c'est plutôt GGCGCC. Ces séquences, qui ont été validées expérimentalement, sont donc souvent considérées comme prédictives des sites de liaison des SMAD. Cependant, Des analyses complémentaires d'immunoprécipitation de la chromatine, ont révélé une liaison préférentielle de tous les R-SMAD et SMAD4 à des séquences riches en GC qui se rapprochent d'une séquence consensus GGCGCG ou GGCCG. Comme les complexes SMAD agissent par le biais d'une coopération avec des facteurs de transcription qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques, leur liaison est principalement dictée par le facteur de transcription associé. Sans cette association, les SMAD ne se lient que faiblement à l'ADN, avec un Kd d'environ 10⁻⁷ M, alors que les facteurs de transcription spécifiques aux séquences se lient souvent à l'ADN avec des valeurs de Kd de 10⁻⁹ à 10⁻¹¹ M.

4.3.2.3. Régulation différentielle de la transcription par les complexes SMAD

Le complexe transcriptionnel SMAD4/R-SMAD recrute des coactivateurs et des corépresseurs et cible plus de 500 gènes spécifiques, selon le contexte et le type cellulaire, pour les induire ou bien les réprimer. Parmi les centaines de gènes cibles du TGF-ß, seulement quelques-uns sont régulés par liaison d'un coactivateur ou un corépresseur spécifique. Cette propriété régule finement l'action du TGF-ß selon le type cellulaire. En effet, des cellules qui n'expriment pas le même coactivateur ou corépresseur développent des effets biologiques différents. L'idée que les complexes SMAD s'associent à des facteurs de transcription spécifiques à un type cellulaire a été développée lorsque l'analyse de la précipitation de la chromatine a montré que SMAD3 cooccupe le génome avec des facteurs de transcription distincts, en fonction du type cellulaire. En effet, il a été montré que SMAD3 interagit avec OCT4, SOX2 et NANOG dans les cellules souches embryonnaires (ESCs), MYOD dans les myoblastes et PU.1 dans les cellules pro-B [195]. Les complexes SMAD régulent la transcription des gènes en s'associant à des facteurs de transcription, souvent eux-mêmes induits par des facteurs de croissances, cytokines, et aussi le stress cellulaire. Par exemple, les complexes SMAD3-SMAD4 s'associent et coopèrent avec c-Jun dans le complexe de transcription AP1 [196] ou avec ATF3 [197], qui sont activés en réponse à des facteurs de croissance et à des cytokines inflammatoires. Un autre exemple de ce phénomène est l'interaction entre le gène suppresseur de tumeur p53 et SMAD2/3, qui ne se produit que lorsque p53 est phosphorylé en réponse à la signalisation des récepteurs tyrosine kinase et l'activation des voies Ras/MAP kinase [198]. Par conséquent, cette signalisation croisée avec d'autres voies de signalisation amène un niveau de régulation supplémentaire dans l'action des SMAD.

4.3.2.4. Remodelage de la chromatine et modifications épigénétiques induites par les complexes SMAD

Coactivateurs

Beaucoup de coactivateurs des complexes SMAD modifient l'acétylation et/ou la méthylation des histones, directement ou indirectement, permettant aux SMAD d'exercer des changements épigénétiques avec des conséquences majeures sur l'expression des gènes. La première indication sur le rôle de modification épigénétique des complexes SMAD a été évoqué suite à la découverte des liaisons entre les SMAD et p300, une Histone Acetyl Transferase (HAT), et cette coopération était nécessaire pour l'induction de l'expression des gènes cibles du TGF- β [199]–[202]. En partie, cela provient d'expériences utilisant des formes mutées de p300/CBP qui n'avaient pas de possibilités de se lier à l'ADN. Le fait que les complexes coactivateurs p300/CBP possèdent une activité d'acétylation des histones, le rôle du complexe SMAD4/R-SMAD en tant que facteur de remodelage de la chromatine a été fortement suggéré. D'autres HAT qui s'associent aux SMAD ont été découvertes par la suite, notamment GCN5 ou P/CAF (p300/CBP-associated factor) qui ont été identifiées comme des partenaires de liaison direct de SMAD2/3 et des coactivateurs de la signalisation du TGF- β [203]. En utilisant des complexes SMAD2-SMAD4 phosphorylés recombinants (pSMAD2-SMAD4), il a été démontré que malgré une liaison efficace à l'ADN, les SMAD ne présentaient aucune activité transcriptionnelle sur des matrices d'ADN sous sa forme native. En revanche, les mêmes complexes SMAD ont efficacement activé la transcription à partir de matrices de chromatine, ce qui suggère que les SMAD fonctionnent principalement via le remodelage de la chromatine [204].

Corepresseurs

Bien que le complexe SMAD4/R-SMAD ait intrinsèquement une fonction d'induction de transcription, il existe également de nombreux exemples de gènes qui sont réprimés par les SMAD. L'un des premiers exemples est la répression du gène c-Myc après traitement par le TGF-β. L'analyse du promoteur de c-Myc a permis d'identifier une région de fixation de SMAD4/R-SMAD dans le promoteur proximal. La fixation de SMAD4/R-SMAD sur le promoteur de c-Myc permet de former un complexe répressif en recrutant le corepressor p107 [205]. Les complexes SMAD activés par le TGF-β peuvent également recruter des histone méthyltransférases. Le recrutement de Suv39h1 à titre d'exemple, entraîne une méthylation de l'histone H3K9 favorisant la répression de la transcription au niveau des séquences promotrices de gènes comme l'II2 [206]. De plus, les complexes SMAD peuvent également recruter des histone désacétylases, soit directement, comme dans le cas du recrutement de HDAC4 ou HDAC5 par SMAD3 au promoteur du gène de l'ostéocalcine, soit par le recrutement d'un corépresseur tel que TGIF (5'TG3'-interacting factor), qui, à son tour, recrute des histone désacétylases, inhibant ainsi éventuellement le recrutement de l'acétyltransférases p300 [207]. SKI et SKIL (anciennement appelé SnoN) sont d'importants répresseurs transcriptionnels qui interagissent avec les SMAD, mais leur mécanisme d'action est nettement différent de ceux décrits ci-dessus. SKI et SKIL se lient à SMAD4 et SMAD2/3 en absence du signal du TGF- β [208], et, de façon frappante, SKI et SKIL sont tous deux rapidement dégradés après traitement avec le TGF- β [209]. Il a été montré que SKI et SKIL peuvent se fixer sur les sites de liaison d'ADN comme ceux des SMAD (SBE) [210]. De manière surprenante, en absence de tout signal TGF- β , SKIL et SMAD4 se fixent sur les SBE des gènes cibles du TGF- β et les répriment en recrutant des corépresseurs tels que NCOR (anciennement N-CoR) ou SIN3A [208]. Après le stimulus du TGF- β , SKIL est rapidement dégradé laissant ainsi les SBE libres et permettant le recrutement des complexes SMAD3-SMAD4 [209]. Cependant, SKIL est aussi un gène cible induit par le TGF- β et, ainsi, il pourra à nouveau réprimer les gènes cibles du TGF- β dans une sorte de rétrocontrôle négatif.

4.3.3. Voies non-canoniques de la signalisation du TGF-β

Alors que la signalisation de la famille TGF- β implique souvent les voies SMAD, les récepteurs de la famille TGF- β activent également d'autres voies de signalisation, notamment les voies de signalisation MAPK et la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) -AKT – mTOR [211]. De manière générale, l'ampleur de l'activation de ces voies non-SMAD en réponse au TGF- β ou aux BMP est généralement plus faible que leur activation par des facteurs de croissance. Ceci pourrait être expliqué par les niveaux beaucoup plus faibles de récepteurs du TGF- β à la surface cellulaire, comparé à d'autre récepteurs avec activité tyrosine kinase. L'activation des voies de signalisation non-SMAD par les récepteurs de la famille du TGF- β est considérée comme une activation supplémentaire à la voie de signalisation des SMAD et contribue avec cette dernière aux réponses physiologiques du TGF- β . De telles contributions, dépendent de la régulation coordonnée des voies de signalisation entre elles. Un exemple qui illustre cette coordination et celui du rôle du TGF- β dans la transition epithélio-mésenchimateuse qui implique les deux voies, SMAD et MAPK [212].

4.3.4. Régulation de la signalisation du TGF-β par rétroaction

La rétroaction est un mécanisme de régulation important dans les systèmes biologiques, et joue un rôle central dans le maintien de l'équilibre homéostatique après un processus biologique. La rétroaction se forme lorsqu'un produit en aval de la cascade de signalisation, agit à son tour sur un

composant en amont pour moduler la voie de signalisation. Les récepteurs du TGF-β sont principalement contrôlés par des mécanismes de rétroaction négative impliquant SMAD7. En effet, SMAD7 agit comme un hub en orchestrant une plénitude de régulateurs. SMAD7 forme un complexe avec le TGF-βRI lors de la stimulation du TGF-β et entrave le recrutement des R-SMAD. De plus, SMAD7 induit l'ubiquitination et la dégradation du TGF-βRI en recrutant plusieurs ubiquitine ligases E3 ou réduit l'activité de signalisation en recrutant le GADD34-PP1c pour la déphosphorylation du TGF-βRI. Plusieurs régulateurs de rétroaction, notamment Arkadia, TSC-22, BAMBI et SIK, agissent sur SMAD7 pour moduler la stabilité ou l'activité de TGF-βRI. De plus, d'autres régulateurs, tels que BAMBI, DRAK2, CEA et SPSB1, peuvent moduler l'activité du récepteur par association directe [213].

4.4. Le rôle du TGF-β dans la biologie des lymphocytes T

En ce qui concerne le système immunitaire, le TGF- β régule la génération et les fonctions effectrices de nombreux types de cellules immunitaires [214]. Le TGF- β contrôle l'immunité adaptative en favorisant directement l'expansion des cellules T CD4 régulatrices (Treg), et en inhibant la génération et la fonction des cellules T effectrices et des cellules dendritiques (DC). Le TGF- β contrôle également le système immunitaire inné en inhibant les cellules tueuses naturelles (NK) et en régulant les macrophages et les neutrophiles.

*TGF-*β *et développement thymique des lymphocytes T :* À l'entrée du thymus, ces progéniteurs suivent une voie de différenciation et de sélection extrêmement régulée qui aboutit à la génération de cellules T naïves capables de sortir du thymus et migrer dans les réseaux sanguins et lymphatiques et aussi les organes périphériques. Une fois entrés avec succès dans la jonction cortico-médullaire du thymus, les progéniteurs se développent progressivement à travers diverses étapes de stade CD8- CD4- double négatif (DN) tout en migrant vers le cortex extérieur. Ensuite, ces cellules expriment en même temps les corécepteurs CD4 et CD8 donnant ce qu'on appelle les cellules double positives (DP). Les cellules CD4⁺ CD8⁺ doublement positives doivent subir avec succès une sélection positive et négative avant de pouvoir quitter le thymus. La sélection positive se produit lorsque le TCR des lymphocytes DP se lie au complexe peptide-CMH I ou peptide-CMH II des cellules épithéliales corticales avec une affinité assez élevée. La sélection négative, à l'inverse de la sélection positive, se produit lorsque des lymphocytes T doubles positifs reconnaissent avec une affinité assez élevée les peptides du sois présentés par les macrophages et cellules dendritiques. Les cellules qui reconnaissent les peptides du sois avec une grande affinité subissent une mort par apoptose.

Le TGF-β a des fonctions importantes dans le développement de plusieurs lignées de lymphocytes T. Les souris dépourvues de la signalisation du TGF-β dans les lymphocytes T du stade DP dans le thymus, développent une auto-immunité multi-organes précoce sévère, amenant à la mort des souris à environ 4 semaines après la naissance [115], [116]. De manière intéressante, la suppression de la signalisation du TGF-β après la sélection négative, plus précisément dans les lymphocytes T matures périphériques, n'a pas réussi à induire cette auto-immunité léthale suggérant un rôle crucial de cette cytokine dans le processus de la sélection négative [215]. Récemment, il a été montré que la cytokine TGF-β joue effectivement un rôle important lors du développement des lymphocytes T en favorisant directement le processus de sélection négative [216]. Dans le thymus, la différenciation des lymphocytes T CD8 conventionnels nécessite à la fois l'engagement du TCR et la signalisation par l'interleukine 7 (IL-7) [217]. En plus de son rôle dans la sélection négative, le TGF- β régule l'expression de la chaîne α du récepteur IL-7 (IL-7Rα) dans le développement des cellules CD8+ dans le thymus, soutenant ainsi la signalisation de l'IL-7, et donc la génération des lymphocytes T CD8 [218]. Comme les lymphocytes T CD8, le développement des lymphocytes T CD4 est aussi régulé par le TGF-β. Plus précisément, les lymphocytes T régulateurs générés dans le thymus, dits Treg naturels (nTreg), sont dépendants du TGF- β [219]. Les lymphocytes intra-épithéliaux innés CD8 $\alpha\alpha$ + TCR $\alpha\beta$ + (voir chapitre 2), sont eux aussi dépendants du TGF-β durant leur développement dans le thymus [220]. Il a aussi été démontré que la signalisation TGF-B orchestre directement plusieurs étapes de différenciation des précurseurs des cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT) [221].

TGF-β et différenciation des lymphocytes T : Le TGF-β favorise ou inhibe la différenciation de plusieurs sous types de lymphocytes T. Le TGF-β supprime la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques en inhibant directement le facteur de transcription T-bet [222]. Le TGF- β inhibe aussi les lymphocytes T CD4 T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) en inhibant l'expression des facteurs de transcription T-bet et Gata3, respectivement [223], [224]. Contrairement à son rôle dans l'inhibition de la différenciation des cellules Th1 et Th2, le TGF-β favorise le développement des cellules T régulatrices périphériques (pTreg), les Th17, les Th9 et les T auxiliaires folliculaires (Tfh). En effet, il a été montré que le TGF-β induit directement ou indirectement l'expression du facteur de transcription Foxp3 dans les lymphocytes T CD4 périphériques, ce qui déclenche leur différenciation en pTreg [225]. Le TGF-β favorise la génération des Th17 directement par l'induction de l'expression du facteur de transcription RORyT [226], [227] et aussi indirectement en inhibant les autres facteurs de transcription des autres sous types comme T-bet et Gata3. En synergie avec la cytokine IL-4, le TGF-β promeut la différenciation des cellules T CD4 Th9 capables de produire la cytokine IL-9 qui joue probablement un rôle important dans la défense contre les infections gastro-intestinales [228], [229]. Le TGF- β joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T pendant l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 en favorisant l'apoptose des cellules effectrices T CD8 de courte durée de vie (SLEC, voir chapitre 3) [230]. Une fois dans l'épithélium, les IEL sont retenus par l'interaction entre les l'intégrines de surface CD103 (α E β 7) et la (E)-cadhérine épithéliale. Le TGF- β induit l'expression de la sous-unité α E,

conduisant au maintien de l'expression de l'intégrine CD103 à la surface des IEL et joue donc un rôle pivot dans la génération et le maintien des IEL au niveau de l'épithélium des muqueuses [231], [232]. En plus des IEL, le TGF- β est important pour la génération des lymphocytes résidants dans les tissus (Trm, voir chapitre 3). La délétion de l'expression du TGF β -RII dans les cellules T CD8 entraîne un défaut de rétention des Trm intestinaux et au niveau de la peau, probablement en raison du manque d'expression de CD103 [159], [165], [233]. Cependant, récemment une étude menée par l'équipe de Laura Mackay montre que les Trm du foie ne dépendent pas du TGF- β comme ceux de la peau ou de l'intestin [234]. Cette nécessité du TGF- β dans la génération des Trm des muqueuses passe notamment par sa capacité à induire l'expression de la molécule d'adhésion CD103.

Voici une figure qui résume les différents effets du TGF-β sur la biologie des lymphocytes T :



Figure 14 : Régulation des lymphocytes T par le TGF-β : (A) Le TGF-β favorise le développement thymique de plusieurs lignées de lymphocytes T. Le TGF-β soutient la survie des Treg dérivés du thymus (nTreg), des cellules tueuses naturelles invariantes T (iNKT) et des précurseurs des cellules T CD8 $\alpha\alpha$ + . Le TGF-β soutient également le développement de cellules CD8 conventionnelles en favorisant l'expression par les thymocytes du récepteur à l'interleukine 7 (IL-7R α). **(B)** Le TGF-β régule l'homéostasie des cellules T périphériques en favorisant la survie dépendante de l'IL-7 des cellules T de faible affinité, grâce à son contrôle de l'expression de l'IL-7R α dans les thymocytes et en **(C)** inhibant les cellules T auto-réactives ou de haute affinité. **(D)** Aux premiers stades de la différenciation des lymphocytes T CD8, le TGF-β inhibe le développement des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et favorise également l'apoptose des cellules effectrices à courte durée de vie (SLEC) et la différenciation des cellules de mémoire résidentes tissulaires (Trm) exprimant l'intégrine CD103. **(E)** Alors que le TGF-β inhibe la différenciation des cellules T helper Th1 et Th2, il favorise le développement des Treg périphériques (pTreg), Th17, Th9 et T auxiliaires folliculaires (Tfh) [214].

4.5. La dérégulation du TGF-β dans les MICI

Le système immunitaire intestinal est souvent mis à l'épreuve par des antigènes commensaux, alimentaires, mais aussi pathogènes dans la lumière intestinale. Le dysfonctionnement de ce système entraîne une inflammation intestinale chronique (voir chapitre 2). La cytokine TGF- β et les voies de signalisation liées à cette dernière jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Il a été rapporté que la signalisation du TGF- β est altérée chez les patients atteints de MICI [235]. En effet, bien que la muqueuse intestinale de ces patients présente un niveau élevé de TGF- β [236], leurs cellules T intestinales répondent mal à cette cytokine anti-inflammatoire en raison de la surexpression du répresseur du TGF- β , SMAD7. En outre, les patients porteurs de mutations germinales de SMAD4 développent des polypes intestinaux et sont davantage prédisposés à développer des pathologies intestinales [237]. L'implication de la réponse au TGF- β été également suggérée à l'aide de modèles génétiques de souris dépourvues du TGF- β RII ou bien SMAD4 dans les cellules T. En effet, ces souris développent une inflammation chronique de l'intestin et amène à des cancers [238]–[240]. Voici un tableau qui résume les différents phénotypes suite à l'altération d'une ou plusieurs composantes de la signalisation du TGF- β de manière totale, dans des cellules immunitaires spécifiques, ou bien au niveau des cellules épithéliales intestinales [241]:

Modèles de souris	Phénotypes intestinaux	Autres descriptifs			
Modèles KO total					
TGF-β1 -/-	Colite spontanée à 3-4 semaines d'âge	Auto-immunité multi-organes avec 60% de décès in utero			
<i>SMAD3</i> ^{ex2/ex2} (Laboratoire Jackson)	Sensible à la colite DSS	Un déclencheur bactérien est requis pour la colite			
SMAD3 ^{ex8/ex8}	Colite spontanée	Développement d'adénocarcinome colique à l'âge de 6 mois			
SMAD4 +/-	Sensible à la colite DSS	Dysbiose caractérisée par une augmentation d' <i>Enterococcus faecalis</i>			
Modèles KO spécifiques aux cellules					
Épithélium					
ITF-dnTGF-βRII	Sensible à la colite DSS	Génération des auto-anticorps contre les cellules de Goblets			
LFABP-PTS4-dnTGF-βRII	Sensible à la colite DSS	Retard de cicatrisation des plaies intestinales			
Villin-CreER <i>TGF-βr2</i> ^{fl/fl}	Sensible à la colite DSS	La signalisation épithéliale TGF-β supprime la tumorigenèse associée à la colite			
Cellules T					
CD2-dnTGF-βRII	Normal	Organes lymphoïdes agrandis avec expansion des cellules CD8 ⁺ T			
CD4-dnTGF-βRII	Colite spontanée à 3-4 mois	Auto-immunité multi-organes			

Modèles de souris	Phénotypes intestinaux	Autres descriptifs			
CD4-dnTGF-βRII; <i>IL10r2 ^{-/-}</i>	Colite spontanée	Le traitement antibiotique prévient la colite			
CD4-Cre <i>TGF-β1</i> ^{fl/-}	Colite spontanée à partir de 4 mois	Auto-immunité multi-organes à partir de 4 mois			
CD4-Cre TGF-βr1 ^{fl/fl}	Normal	Réduction des IELs CD8αα ⁺			
CD4-Cre <i>TGF-βr2</i> ^{fl/fl}	Colite spontanée à 3-5 semaines d'âge	Auto-immunité multi-organes plus agressive que CD4-dnTGF-βRII			
CD4-Cre SMAD4 fl/fl	Colite spontanée à 9 mois	Développer un adénocarcinome colique entre 9 et 16 mois			
CD4-Cre β1 ^{glo}	Normal	Surexpression du TGF-β1 dans les cellules T			
cLck-Cre TGF-βr2 ^{fl/fl}	Normal	Souche utile pour comprendre les fonctions des cellules T post-thymiques			
cLck-Cre SMAD4 ^{fl/fl}	Colite spontanée à partir de 9 mois	Développement d'adénocarcinome colique entre 9 et 16 mois			
CD2- SMAD7 ^{tg}	Sensible à la colite DSS	Ne montre pas d'auto-immunité à plus de 18 semaines			
Cellules B					
CD19-Cre <i>TGF-βr2</i> ^{fl/fl}	Normal	Hyperplasie des lymphocytes B dans les plaques de Peyer avec déficit en IgA sérique			
Cellules dendritiques					

Modèles de souris	Phénotypes intestinaux	Autres descriptifs			
CD11c-dnTGF-βRII	Normal	Ne montre pas d'auto-immunité et survit plus d'un an			
CD11c-Cre <i>TGF-βr2</i> ^{fl/+}	Sensible à la colite DSS	Le traitement antibiotique prévient la colite DSS			
CD11c-Cre <i>TGF-βr2</i> ^{fl/fl}	Colite spontanée à 5-14 semaines d'âge	Microbiote colitogène, auto-immunité multi-organes			
CD11-Cre SMAD2 fl/fl	Améliorer la colite DSS	Tregs augmentés			
Macrophages					
CD68-dnTGF-βRII	Sensible à la colite DSS	Diminution de la production d'IL-10 et augmentation des macrophages producteurs d' IL-33			
Lysm-Cre <i>TGF-βr2 ^{f I/fl}</i>	Normal	La signalisation myéloïde du TGF-β favorise la tumorigenèse associée à la colite			

Tableau 5 : Modèles expérimentaux murins ciblant la signalisation TGF-β

4.6. La complexité des voies de signalisation du TGF-β : entre opposition et indépendance

4.6.1. Tif1y régule négativement la signalisation médiée par SMAD4

Les voies de signalisation activées par le TGF- β peuvent fonctionner en synergie ou en opposition selon le contexte. Par exemple, au cours de l'hématopoïèse ou de la différenciation des cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT), chaque voie régule des ensembles distincts et sélectifs de groupes de gènes en réponse au TGF- β , régulant ainsi différentes étapes de l'hématopoïèse et de la différenciation des iNKT (Doisne et al., 2009 ; Havenar-Daughton et al., 2012 ; He et al., 2006 ; Xi et al., 2011). Outre cette interaction complémentaire, les voies activées par le TGF- β peuvent également entrer en compétition et s'inhiber mutuellement. Par exemple, TIF1γ peut entrer en compétition avec SMAD4 pour interagir avec SMAD2 et SMAD3, et peut en outre induire la dégradation de SMAD4 par sa fonction d'ubiquitine ligase E3 [242]–[244]. De plus, TIF1γ peut entrer en compétition direct avec SMAD4 et fonctionner comme un cofacteur du complexe SMAD2/3 phosphorylé lors de l'hématopoïèse [245]. Par conséquent, l'ablation d'une voie peut avoir un impact fonctionnel sur les autres.

4.6.2. SMAD4 ne s'empêche pas d'agir en absence du TGF-β

Au cours des dernières années, une fonction inattendue de SMAD4 a été rapportée dans plusieurs type de cellules immunitaires. Etonnement, SMAD4 peut réguler la différenciation, la prolifération et la croissance des cellules T de manière totalement indépendante du TGF- β . Par exemple, pendant que le TGF- β induit la différentiation des lymphocytes T CD4 Th17 en présence de l'IL- β , SMAD4 pourrait supprimer leur différenciation, en se liant avec SKI directement à la région du promoteur du gène Rorc, et ceci en absence du TGF- β [246]. En présence du TGF- β , cette suppression est éliminée, du fait de la dégradation de SKI suite à l'activation de la signalisation du TGF- β . SMAD4 favorise aussi la capacité effectrice des lymphocytes T de manière indépendante du TGF- β [247]. En plus des lymphocytes T CD4, SMAD4 amplifie de manière aberrante la réponse au TGF- β dans les cellules NK avec des conséquences profondes sur leur l'homéostasie et leur fonction et ceci encore une fois, de manière indépendante du TGF- β laure torte du TGF- β [248]. Récemment, une étude a montré que les cellules Th17 générées à une température fébrile située entre 38,5°C–39,5°C, avaient des capacités pro-inflammatoires meilleures que celles générées à 37°C. Mécaniquement, la température fébrile favorise la SUMOylation de SMAD4 pour faciliter sa localisation nucléaire de façon indépendante du TGF- β [249].

5. Les traitements actuels des MICI

La prise en charge des MICI est complexe, multidisciplinaire et souvent permanente. Les 2 dernières décennies ont vu de nombreuses avancées dans le paysage thérapeutique des MICI. Aujourd'hui le cœur du traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin c'est d'inhiber la réponse immunitaire excessive au niveau des intestins. En plus des thérapies qui ciblent le système immunitaire, il y a eu pas mal d'avancées concernant les traitements basés sur la modification de la composition du microbiote intestinal. Dans ce paragraphe, nous allons voir en résumé l'actualité de la prise en charge thérapeutique des MICI.

5.1. Les traitements visant la modification du microbiote intestinal

Au cœur des acteurs impliqués dans le développement des MICI, on trouve l'interface qui est le microbiote intestinal dont la composition est clairement prédisposée par des facteurs génétiques et modifiée par les facteurs environnementaux. La composition du microbiote a un impact direct sur la réponse immunitaire, ce qui donne un énorme potentiel de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, suite au succès du traitement de l'infection à *C. difficile* avec une transplantation de microbiote fécal (FMT), l'attention s'est tournée vers son utilisation potentielle dans le traitement des MICI. Une revue systématique de 60 études qui ont utilisé la FMT comme traitement principal des MICI a montré des différences significatives en faveur de la transplantation de microbiote fécal par rapport au placebo [250]. Une rémission clinique globale de 37 %, une réponse clinique globale de 54 % ont été rapportées. Les matières fécales congelées et les donneurs universels étaient liés à une meilleure efficacité. De plus, les analyses comparatives ont démontré que les matières fécales congelées provenant de donneurs universels peuvent être liées à un taux plus élevé de rémission clinique, en particulier pour la MC [250].

5.2. Les traitements ciblant le système immunitaire

Historiquement, le traitement de base des MICI a été les *aminosalicylates*, avec de courtes cures de stéroïdes pour les poussées sévères, et l'escalade vers des immunomodulateurs et des inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale alpha (anti-TNFα) [251]. Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans la thérapeutique des MICI, environ 40% des patients sont insensibles aux anti-TNFα ou bien perdent la réponse au cours du temps. Plusieurs nouveaux médicaments ayant des effets mécanistiques différents ont été développés pour répondre à ce besoin. Nous aurons bientôt cinq familles de traitement dans les MICI qui ciblent principalement le système immunitaire et les voies inflammatoires. La première classe thérapeutique constitue le groupe des anti-TNF, la deuxième

famille comprend des anticorps monoclonaux qui ciblent la circulation des cellules inflammatoires qui ont la capacité d'adhérer à la barrière intestinale, la troisième famille de médicaments a pour effet l'inhibition des interleukines inflammatoires (IL-23, IL-12), la quatrième famille sont des inhibiteurs des voies JAK-STAT qui médient la signalisation des cytokines inflammatoires, et enfin, la cinquième famille correspond à des modulateurs de la sphingosine 1 phosphates (S1P), une molécule qui joue un rôle dans l'angiogenèse et la circulation des lymphocytes. Voici un résumé des différentes voies inflammatoires ciblées aujourd'hui dans le traitement des MICI :



Figure 15 : Les différentes voies inflammatoires ciblées aujourd'hui dans le traitement des MICI [252].

Problématique :

L'intestin des mammifères est un organe extrêmement riche en microbes commensaux mais aussi en cellules immunitaires très variées. Une dérégulation de cette homéostasie finement régulée est la base de différentes pathologies. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par des réponses immunitaires exacerbées contre le microbiote intestinal. Afin de prévenir de telles réponses immunes, il existe plusieurs mécanismes immunorégulateurs dont la cytokine TGF- β . L'altération de la signalisation du TGF- β dans les cellules T chez la souris, en particulier la délétion de SMAD4, conduit souvent au développement de pathologies intestinales inflammatoires. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ces pathologies demeurent obscurs pour diverses raisons :

 La compétition potentielle entre les voies de signalisation du TGF-β. Ainsi, l'inflammation intestinale observée suite à la délétion de SMAD4 dans les cellules T, pourrait très bien résulter d'une forte activation des autres voies restantes.

2) Les composantes des voies de signalisation du TGF- β peuvent avoir un rôle complètement indépendant d'une stimulation par le TGF- β , à l'exemple de SMAD4 qui se lie à SKI et SKIL et inhibent des gènes cibles du TGF- β en l'absence de ce dernier.

3) Les modèles utilisés n'identifient pas la population lymphocytaire T impliquée dans la pathologie. En effet, la délétion de SMAD4 est ciblée par le promoteur CD4. Passant par un stade double positif lors de leur ontogénèse dans le thymus à la fois les lymphocytes CD4 et CD8 sont touchés par la délétion.

4) Les mécanismes par lesquels les lymphocytes dépourvus de SMAD4 promeuvent la pathologie intestinale n'ont pas été démontrés.

Par conséquent, étant donné cette interaction complexe entre les voies du TGF- β dans les cellules immunitaires et en particulier dans les cellules T, et le rôle du TGF- β dans le contrôle de l'homéostasie intestinale, il était crucial de clarifier mécaniquement comment les différentes voies du TGF- β , notamment SMAD4 et TIF1 γ , dans les cellules T, peuvent avoir un impact sur l'homéostasie intestinale et le développement des MICI.

Résultats
Résumé de l'article scientifique (en révision dans le journal JCI)

Au cours de ma thèse, nous avons pu découvrir une régulation anticipée et non caractérisée régie par SMAD4 qui, avant l'engagement du récepteur du TGF- β , agit au niveau de la chromatine pour dicter plusieurs processus biologiques des lymphocytes T CD8, protégeant les souris contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Nous avons découvert de manière inattendue que la fonction SMAD4 indépendante du TGF- β réprime l'expression des répresseurs du TGF- β (Smad7, Ski, Smurf2, Skil), qui entravent la réponse au TGF- β . Par conséquent, en l'absence de SMAD4, même une concentration supra-physiologique de TGF- β ou une suractivation génétique des autres voies de signalisation du TGF- β ne peuvent pas restaurer l'immunosuppression médiée par le TGF- β , SMAD4 restreint l'accumulation et la rétention épithéliale intestinale des lymphocytes T CD8. De façon remarquable, le blocage de la rétention épithéliale des lymphocytes T CD8 prévient le développement d'inflammation intestinale chez les souris dépourvues de SMAD4. Ainsi, en l'absence de SMAD4, l'augmentation de la rétention épithéliales des lymphocytes T CD8, combinée à l'incapacité de ces derniers de répondre à l'immunosuppression médiée par le TGF- β favorise l'activation exacerbée des lymphocytes T CD8 intestinaux de manière dépendante du microbiote.



Title:

TGF-β-independent function of SMAD4 preconditions naïve CD8 Tcells to prevent severe microbiota-driven chronic intestinal inflammation

Authors:

Ramdane Igalouzene^{1,2}, Hector Hernandez-Vargas¹, Nicolas Benech^{1,2}, David Bauché^{1,2}, Célia Barrachina³, Emeric Dubois³, Julien C. Marie^{1,2*} and Saïdi M'Homa Soudja^{1,2,4*}

Affiliations:

1: Lyon Cancer Research Center (CRCL), INSERM 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France.

2: University of Lyon-France.

3: Montpellier GenomiX, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier France

4: Lead contact: <u>saidi.soudja@inserm.fr</u> (ORCID: 0000-0002-5663-0226) * Co-corresponding Authors

Abstract:

SMAD4, a mediator of TGF-β-signaling, plays an important role in T-cells to prevent inflammatory bowel disease (IBD) and gastrointestinal cancer. However, the precise mechanisms underlying this control remain elusive. Here, we unexpectedly reveal that SMAD4 protects from IBD by preconditioning naïve CD8 T-cell fate in a TGF- β -independent manner. Before TGF-β-receptor engagement, SMAD4 restrains the epigenetic, transcriptional and functional landscape of TGF-β-signature in naïve CD8 T-cells, with direct consequences on intestinal homeostasis. Regardless of TGF-β-receptor signaling, SMAD4-ablation impaired naïve CD8 T-cell effector predisposition. However, SMAD4-ablation endowed naïve CD8 T-cells with a superior homeostatic survival capacity and a predisposition to gut-epithelium tropism. Additionally, regardless of TGF- β -receptor signaling, SMAD4-deletion unleashed the expression of TGF-β negative feedback-loop genes and impaired profoundly TGF-β-mediated immunosuppression in CD8 T-cells. Accumulation, epithelial-retention and escape from TGFβ-control elicit chronic microbiota-driven CD8 T-cell activation in the gut, an organ enriched in TGF- β . Hence, in a TGF- β -independent manner, SMAD4 imprints a program that preconditions naïve CD8 T-cell fate preventing from IBD.

Summary: TGF- β -independent function of SMAD4 predisposes naïve CD8 T-cell fate to maintain intestinal homeostasis.

74

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of debilitating diseases that expose bearers to inflammation-associated cancers such as colorectal cancer (CRC) (Laukoetter et al., 2008). An excessive immune reaction against microbiota is widely regarded as a common feature of IBD (Lee and Chang, 2021). Several immune-regulatory mechanisms prevent IBD, including the presence of the transforming growth factor beta (TGF- β) cytokine. This cytokine is abundantly produced in the mammalian gut (Barnard et al., 1993), and is implicated in T lymphocyte regulation by repressing numerous effector T cell functions and promoting regulatory T cell development, stability and function (Li and Flavell, 2008).

TGF- β binds to TGF- β RII and phosphorylates TGF- β RI. TGF- β RI then induces the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3, which subsequently interact with either SMAD4 or tripartite motif-containing 33 (TRIM33). In addition, TGF- β R engagement triggers non-canonical signaling pathways, namely MAPK/MEK, JNK/p38 and AKT/PI3K (Massagué and Wotton, 2000). TGF- β signaling pathways regulate the expression of several genes, including TGF- β -repressor genes such as *Smad7* and *Ski*, thus generating a negative feedback loop to control TGF- β responses (Nakao et al., 1997; Yan et al., 2018).

TGF- β signaling pathways work either in concert, in opposition or in competition depending on the context. For instance, TRIM33 competes with SMAD4 to interact with SMAD2 and SMAD3, and in addition induces SMAD4 degradation (Agricola et al., 2011; Dupont et al., 2009). Given this intricate interplay and interference, ablating one branch of TGF- β signaling may functionally impact the others positively or negatively, hampering their deciphering (Cortez et al., 2017).

75

TGF- β signaling is altered in IBD and CRC patients (Monteleone et al., 2012). In particular, patients harboring SMAD4 germline mutations are predisposed to develop intestinal pathologies (Howe et al., 1998). The role of SMAD4 in intestinal homeostasis has been further reported in genetic mouse models, in which SMAD4 deficiency in T cells drove chronic inflammation and cancer (Kim et al., 2006). Hence, given the complex interplay and interference between TGF- β pathways, the precise mechanisms governed by SMAD4 in T cells that prevent IBD remain to be deciphered.

Here, we uncover that contrary to an expected TGF- β -dependent function of SMAD4, SMAD4 in T cells protects mice from severe chronic intestinal inflammation in a TGF- β independent manner. In addition, we show that CD8 T cells play a critical role in this microbiota-driven immune-pathology. Mechanistically, prior to TGF- β -receptor engagement, SMAD4 acts at the chromatin level and imprints in naïve CD8 T-cells an opposite signature of TGF- β effect with direct impact on intestinal homeostasis. This imprinting at naïve state preconditions CD8 T cell functional and spatial commitment. Remarkably, inversely to TGF- β signaling, SMAD4 endows naïve CD8 T cells with an effector program but limits their accumulation and intestinal intraepithelial retention. Additionally, we uncover that, prior to TGF- β receptor engagement, SMAD4 inhibits the expression of TGF- β -signaling-repressors, such as Smad7 and Smurf2 predisposing CD8 T cells to an efficient TGF-β-mediated immunosuppression. Consequently, in absence of SMAD4, CD8 T cells massively colonize the intestinal epithelium and escape TGF- β -mediated immunosuppression, leading to their activation by the microbiota. Our findings assign an uncharacterized and crucial TGF- β independent function of SMAD4 that programs naïve CD8 T cell fate thus preventing severe chronic intestinal inflammation.

RESULTS

SMAD4 in T cells has a TGF- β -independent function that protects mice from severe chronic intestinal inflammation

Given the intricate interplay between TGF- β pathways, we first investigated the impact of other TGF-β signaling pathways in the gut inflammation described in mice lacking SMAD4 in T lymphocytes. To this end, we used the CD4-CRE conditional deletion system (Lee et al., 2001) to establish several mouse strains lacking one or several TGF- β signaling pathways. We established mice with a single deletion of SMAD4 (SKO), single deletion of TRIM33 (TKO), double deletion of TRIM33 and SMAD4 (STKO) or double deletion of TGF-BRII and SMAD4 (R2SKO) in T cells (Fig. 1A, S1A). Consistent with previous studies, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice did not display any signs of autoimmunity even at an advanced age (Doisne et al., 2009; Gu et al., 2015; Tanaka et al., 2018). However, strikingly, the weight of all mice lacking SMAD4 in T cells (SKO, STKO and R2SKO) stopped increasing from 4 months of age onwards (Fig. 1B). Postmortem analysis revealed an important intestinal inflammation in these animals, illustrated by an enlargement of the duodenum and a shortening of the colon (Fig. 1C-D). Histological analysis revealed massive immune cell infiltrations in the mucosa and submucosa in both the small intestine and the colon of these mice compared to WT and TKO mice. Additionally, evident hyperplasia, crypt abscesses and strong intestinal crypt inflammation were detected in all mice lacking SMAD4 in T cells, indicative of a strong chronic inflammation in these animals (Fig. 1E, S2B). Collectively, our data genetically demonstrate that the ablation of the remaining TGF- β pathways in SKO mice does not prevent mice from developing chronic intestinal inflammation.

Then, given that SMAD4 could mediate biological functions independently of TGF-β signaling in T cells (Gu et al., 2015; Zhang et al., 2017), we assessed whether a TGF-β-independent SMAD4 function in T cells could contribute to maintain intestinal homeostasis. TGF-βRII-deficient (R2KO) mice die within 3-4 weeks (Li et al., 2006; Marie et al., 2006) and intestinal inflammation only develops at 5 months in SMAD4-deficient mice, so we employed a bone marrow (BM)-engrafted mouse model to compare age-matched adult mice. We engrafted irradiated adult mice with BM from WT, R2KO, SKO, and R2SKO mice. Mice engrafted with R2KO, SKO, and R2SKO BM cells lose weight compared to BM WT-engrafted mice **(Fig. 1F)**. However, mice engrafted with BM cells from SKO and R2SKO mice developed more severe gut inflammation compared to those engrafted with R2KO BM cells, as evidenced by shorter colons, massive immune cell infiltrations, hyperplasia and important mucosal damage **(Fig. 1G-I, S1C)**. These observations demonstrate that SMAD4 in T cells has a role that is TGF-β-independent protecting mice from severe chronic intestinal inflammation.

CD8 $\alpha\beta$ T cells are a key effector population in intestinal immunopathologies observed in SMAD4 deficient mice

Since SMAD4 is deleted in both CD8 and CD4 T cells (Lee et al., 2001), we next examined which effector T cell population mediates this intestinal immunopathology by using specific anti-CD4 and anti-CD8β depleting antibodies. To avoid undesirable long-term side effects of depleting antibody treatment, we used the BM-engrafted mouse models (Fig. 2A). Flow cytometry analysis confirmed the effective ablation of conventional CD8αβ and CD4 T cells in secondary lymphoid organs and in the gut without depleting the other populations, such as CD8αα TCRαβ and TCRγδ populations (Fig. S2A-B). Remarkably, BM SKO-engrafted mice

treated with anti-CD8^β did not exhibit weight loss and colon length reduction, in sharp contrast to anti-CD4 treated mice (Fig. 2B-C). Furthermore, histological examination showed a substantial decrease in immune cell infiltration and absence of hyperplasia and crypt abscesses in BM SKO-engrafted mice treated with anti-CD8 β (Fig. 2D). To ensure that CD8 $\alpha\beta$ T cells are also the main effectors driving intestinal damage in R2SKO reconstituted mice, we conducted CD8 T-cell depletion in BM R2SKO-engrafted mice. Similarly, anti-CD8^β treatment rescued BM R2SKO-engrafted mice from developing intestinal inflammation (Fig. S2C-D). Because a defect in T regulatory cells (Tregs) in SMAD4 deficient mice has been observed, in particular, in R2SKO mice (Gu et al., 2015), we further performed 1:1 mixed chimera with WT and R2SKO BM cells to address whether the function of SMAD4 in CD8 T cell is cell-intrinsic. Mice transplanted with 1:1 WT and R2SKO BM cells kept losing weight and developed intestinal inflammation judged by the shortness of the colon (Fig. S2E-G), suggesting that the presence of WT Treg cells is not sufficient to prevent intestinal inflammation. Collectively, these results suggest an important role for $CD8\alpha\beta$ T cells in contributing to the intestinal damage in SMAD4 deficient mice.

SMAD4 prevents microbiota-driven accumulation and activation of CD8 $lpha\beta$ T cells within the gut-epithelium

We then assessed the mechanism by which SMAD4 in CD8 $\alpha\beta$ T cells prevents intestinal immunopathology. Strikingly, we observed in all SMAD4-deficient mice (SKO, STKO and R2SKO) a substantial increase in the frequency and numbers of CD8 $\alpha\beta$ T cells in secondary lymphoid organs, as well as in the lungs, skin, colon, and small intestine, compared to WT or TKO mice **(Fig. 3A-B, S3A-B).** This data revealed a systemic accumulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells in the absence of SMAD4. Besides this important accumulation, CD8 $\alpha\beta$ T cells from SKO, STKO and R2SKO mice, expressed large amounts of cytotoxic molecules including granzymes A and B (GZMA and GZMB) or pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IFN- γ , TNF α and CCL3 in the intestinal epithelium compared to WT and TKO mice (Fig. 3C, S3C-D). Importantly, the strong co-expression of the epithelial retention marker CD103 and GZMB suggests that the activated CD8 $\alpha\beta$ T cells were likely *bona fide* intra-epithelial lymphocytes (IELs) (Fig. S3E). Remarkably, CD8 $\alpha\beta$ T cells from SMAD4-deficient mice were barely or not activated in the spleen, the lung, skin, lymph nodes, and *lamina propria* of the intestine (Fig. 3C, S3F-G). This indicates that activation of SMAD4-deficient CD8 T cells within the intestinal epithelium is spatially restricted.

Next, we investigated the mechanisms triggering intestinal epithelial activation of CD8 $\alpha\beta$ T cells in SMAD4-deficient mice. Given the importance of the microbiota in shaping intestinal immunity and promoting IBD (Round and Mazmanian, 2009; Spencer et al., 2019), we hypothesized that commensal bacteria could be responsible for CD8 $\alpha\beta$ T cell exacerbated intestinal epithelial activation. In order to confirm this scenario, SKO mice were treated with antibiotics (ATB). Strikingly, ATB treatment of SKO mice completely abrogated CD8 $\alpha\beta$ T cell accumulation in the gut epithelium (Fig. 3D). In addition, the enhanced production of IFN- γ and granzymes in CD8 $\alpha\beta$ IELs was also abolished in ATB-treated SKO mice (Fig. 3E). Hence, these data reveal that SMAD4 prevents the microbiota-driven activation of CD8 $\alpha\beta$ T cells within the epithelial layer of the intestine.

The TGF- β -independent SMAD4 function restrains the TGF- β transcriptional signature and endows an effector predisposition in naïve CD8 T cells.

To go deeper into the molecular processes governing SMAD4-mediated control of CD8 T cells, we next performed a global gene expression profile of CD8 T cells from WT, SKO and R2KO mice. In order to rule out any potential extrinsic effects of the inflammatory environment (IBD or autoimmunity) and focus precisely on the specific intrinsic role of SMAD4 in CD8 T cells, we opted to use naïve F5 TCR transgenic CD8 T cells, which recognize a peptide from the influenza virus (Mamalaki et al., 1993). Conducting our investigation with a TCR transgenic model will allow us also to exclude the impact of the TCR repertoire in shaping the transcriptome of the T cells. To note, F5 TCR transgenic mice in a RAG2KO background do not develop any intestinal inflammation or autoimmunity (Fig. S4A). Unexpectedly, the comparison between SKO and R2KO naïve F5 TCR CD8 T cells resulted in a larger set of significantly differentially expressed genes (DEGs) (1573 genes) (FDR < 0.05) than the comparison between SKO and WT F5 TCR CD8 T cells (408 DEGs) (Fig. 4A), highlighting a wider molecular gap between SKO and R2KO naïve CD8 T cells. An unsupervised hierarchical clustering of all DEGs revealed five distinct clusters. Strikingly, DEGs in which SMAD4 deletion and TGF-BRII deletion show a distinct expression pattern (clusters II, III and V) represent more than 92 % of all DEGs, indicating a wide transcriptional disparity between SKO and R2KO CD8 T cells. (Fig. 4B, S4B). More importantly, the large majority of the DEGs behave oppositely between SKO and R2KO CD8 T cells (cluster II and III) (Fig. 4B-C). Thus, this wide transcriptional disparity is largely attributed to an evident opposition between SMAD4 and TGF- β signaling. To assess whether this marked transcriptional opposition orchestrated by SMAD4 is not mediated by a TGF- β signal, we then conducted a genome-wide RNA sequencing in R2SKO F5 TCR CD8 T cells. This analysis unveiled a larger set of DEGs (740 genes) in the comparison between R2SKO and R2KO CD8 T cells in contrast to the comparison between SKO and R2SKO CD8 T cells (106 DEGs) (Fig. 4D). Furthermore, in R2SKO CD8 T cells, the absence of SMAD4 largely reverses the gene expression observed after total TGF- β signaling deletion (R2KO) **(Fig. 4E).** Thus, in the absence of TGF- β , SMAD4 acts as a basal repressor of TGF- β -transcriptional landscape in CD8 T cells.

Next, we determined functional outcomes of this transcriptional divergence. A deeper examination of the divergent DEGs highlights many genes belonging to the T cell effector program. In contrast to SKO, R2KO naïve CD8 T cells exhibit an enhanced expression of genes encoding effector molecules (eg. *IFNg, CCL5*) and transcription factors known to direct T cell effector differentiation (eg. *Tbx21, Zeb2, Irf4*). Conversely, genes associated with quiescence/naiveness (eg. *Lef1, itgae, II7r, Ets2*) were repressed in R2KO but upregulated in SKO CD8 T cells (**Fig. 4F**). A gene set enrichment analysis (GSEA) of all DEGs and the expression of 43 selected genes associated with T cell activation indicated that SMAD4 deletion in R2SKO CD8 T cells abrogates effector gene expression observed in the single TGF-βRII deletion (R2KO) (**Fig. 4G, S4C-D**). Overall, our data reveal that before TGF-βR engagement, SMAD4 restricts transcriptional and functional TGF-β signatures in CD8 T cells.

SMAD4 preconditions naïve CD8 T cells to TGF-β-mediated immunosuppression

Since SMAD4 deletion limits effector predisposition of naïve CD8 T cells, a compensatory mechanism must allow microbiota-driven activation of CD8 T cells lacking SMAD4, in the gut. Intriguingly, genes encoding potent TGF-β signaling repressors (e.g. *Smad7*, *Ski, Skil* and *Smurf2*) were enhanced in SKO and R2SKO compared to R2KO CD8 T cells (**Fig. 5A**). We validated the overexpression of those genes by quantitative real-time RT-PCR on naïve F5 CD8 T cells, as well as on polyclonal CD8 T cells (**Fig. 5B, S5A**), attesting that this overexpression was not restricted to a specific TCR repertoire. The expression defect of TGF-

β repressors in R2KO CD8 T cells confirms that they are TGF-β target genes (Yan et al., 2018). Since the double deletion of TGF-βRII and SMAD4 (R2SKO) restored the gene expression of TGF-β repressors (Fig. 5B, S5A), this demonstrates that SMAD4 inhibits the expression of TGFβ repressors in a TGF-β-independent manner.

Since expression of TGF- β repressors has been associated with a profound defect in T cell responses to TGF- β in IBD (Monteleone et al., 2012), we examined the effect of TGF- β on SMAD4-deficient CD8 T cell activation. While TGF-B strongly inhibited GZMB and TBET expression in activated WT CD8 T cells even at low doses, their expression was maintained even at high concentrations of TGF- β in SKO CD8 T cells (**Fig. 5C-D**). Thus, these observations reveal that SMAD4 ablation limits the immune-regulatory effects of TGF- β on CD8 T cells. Importantly, this demonstrates that SMAD4 is crucial and not redundant for TGF-β-mediated immunosuppression. Because TGF-β is highly enriched in the gut (Barnard et al., 1993) and represses T cell activation (Li and Flavell, 2008), this impaired response to TGF-β could contribute to chronic microbiota-driven CD8 T cell activation. In order to confirm this assumption in vivo, we forced the activation of SMAD4 independent pathways of TGF-B signaling by crossing SKO mice with mice bearing a conditionally-expressed, constitutivelyactive form of the TGF- β RI (LSL-TGF β RICA mouse strain) (Bartholin et al., 2008). In the resulting SKO-RCA mice, CD8 $\alpha\beta$ T cells were as abundant and activated in the gut epithelium as in SKO mice (Fig. 5E-F), and more importantly, SKO-RCA mice developed IBD (Fig. 5G-H). Hence, remaining TGF-β signaling pathways are unable to compensate for SMAD4 loss *in vivo*. Collectively, these data suggest that the TGF-β-independent function of SMAD4 facilitates the response of CD8 T cells to TGF- β , by restraining the expression of TGF- β repressors in a feedforward mechanism (prior to any TGF-β signal) and SMAD4 appears to be a major mediator of immune-regulatory-effects of TGF-β.

TGF-β-independent function of SMAD4 restrains homeostatic survival and gut-epithelial retention of CD8 T cells

Given that R2KO mice in which T cells do not respond to TGF- β signals, do not exhibit as severe gut inflammation as SKO and R2SKO mice (Fig. 1F-I), additional factors might enhance the intestinal inflammation in SKO and R2SKO mice. Strategically, we focused on genes crucial for CD8 T cell homeostasis and epithelial layer retention that are similarly affected in SKO and R2SKO and inversely affected in R2KO CD8 T cells. Our first target was IL-7R (also termed CD127) since it plays a crucial and non-redundant role in homeostatic survival of CD8 T cells (Surh and Sprent, 2008) and recent studies associated IL-7 signaling overactivation and IBD (Belarif et al., 2019). In line with the RNA-seq data, flow cytometry analysis validated that naïve F5 TCR SMAD4-deficient (SKO and R2SKO) CD8 T cells overexpressed IL-7R compared to WT CD8 T cells, in sharp contrast to R2KO CD8 T cells (Fig. 6A). Similarly, we observed this upregulation of IL-7R in naïve and memory CD8 T cells with a polyclonal TCR repertoire (Fig. S6A). Consistent with the level of IL-7R expression, STAT5 phosphorylation, which is induced upon IL-7 stimulation, was slightly enhanced in SKO and R2SKO CD8 T cells, and impaired in R2KO CD8 T cells (Fig. 6B). A time-course analysis of survival demonstrated that, in sharp contrast to R2KO CD8 T cells, IL-7 treatment impressively increases the survival of SKO and R2SKO CD8 T cells compared to WT cells (Fig. 6C). Accordingly, we observed a substantial increase in the absolute number and the proportion of CD8 T cells in secondary lymphoid organs from SKO and R2SKO F5 transgenic mice, unlike R2KO mice (Fig. 6D and data **not shown**). These findings reveal a critical role for the TGF- β -independent SMAD4 function in restraining CD8 T cell accumulation by repressing the IL-7 response.

In addition to *II7r, Itgae* encoding CD103 was also aberrantly upregulated in CD8 T cells from SKO mice. CD103 is of great interest as it elicits T cell retention within the intestinal epithelial layer (El-Asady et al., 2005). In agreement with the RNA-seq data, SKO and R2SKO naïve CD8 T cells exhibited an enhanced level of CD103 (Fig. 6E). Similarly, we observed this upregulation in naïve and memory CD8 T cells with a polyclonal TCR repertoire (Fig. S6B). We further generated 1:1 mixed chimera with WT and either R2KO, SKO, or R2SKO BM cells to address whether the expression of CD103 is intrinsic or induced by the inflammatory environment. Flow cytometry staining showed that the upregulation of CD103 in SKO and R2SKO CD8 T cells is intrinsic because WT CD8 T cells were not affected by this upregulation (Fig. 6F). In correlation with the absence of CD103 expression, R2KO CD8 T cells are less enriched in the intestinal epithelium compared to R2SKO and SKO CD8 T cells (Fig. S6C-E). This impaired epithelial tropism of R2KO CD8 T cells may explain the milder intestinal inflammation observed in those mice compared to R2SKO mice. In line with this assumption, we next addressed whether the exacerbated expression of CD103 plays a role in the IBD observed in SKO mice. We treated BM-engrafted mice with a blocking antibody that specifically recognizes CD103 (Fig. 6G). The CD103 blockade led to a decrease in CD8 T cell numbers within the intestinal epithelium of SKO mice, without altering their accumulation in secondary lymphoid organs such as the spleen and mesenteric lymph nodes (Fig. 6H). Although this treatment did not fully restore body weight in SKO reconstituted mice, the colon length and immunehistology analysis highlighted clear improvement (Fig. 6I-K). The colon length reduction and the mucosal damage due to immune infiltration were alleviated, indicating a beneficial effect of CD103 blockade in SKO mice. Globally, in addition to the impaired response to TGF-βmediated immune-regulatory functions, SMAD4 disruption promotes IL-7 responsiveness and epithelial retention of CD8 T cells in a TGF-β-independent manner. This combined altered positioning and increased numbers of CD8 T cells in the gut-epithelium of SMAD4 deficient mice lead to severe chronic intestinal inflammation compared to R2KO mice.

In the absence of TGF- β R engagement, SMAD4 mediates epigenetic control of TGF- β target genes and regulates their expression in naïve CD8 T cells

To further decipher at the chromatin level the mechanisms by which SMAD4 regulates TGF-β signature imprinting in CD8 T cells, prior to any TGF-β signal, we conducted a chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) of SMAD4 on naïve CD8 T cells from WT, R2KO and SKO mice. 2982 peaks were identified in WT cells and 3432 peaks were identified in R2KO cells, demonstrating that SMAD4 broadly binds to the genome even without TGF- β signal in naïve CD8 T cells. Of the 2982 peaks in WT cells and 3432 peaks in R2KO cells, 1954 peaks were common, highlighting an important similarity in regional binding sites irrespective of the cellular response to TGF- β (Fig. 7A). Since most of the binding sites were localized in promoter regions (64% for the WT and 67% for the R2KO) or were closely located around the transcription start site (TSS) regions (Fig. 7B-C, S7A), this indicates that SMAD4, before any TGF-βR-engagement, occupies promoters and enhancers of many genes in naïve CD8 T cells and may regulate their expression. Interestingly, SMAD4 binds irrespective or not to TGF- β signaling to genomic regions that regulate diverse biological pathways involved for instance in TCR signaling, RNA translation or TGF- β signaling regulation in naïve CD8 T cells (Fig. S7B). This data highlights the broad potential impact of TGF-β-independent function of SMAD4 in diverse CD8 biological processes already at naïve state.

In order to associate this strategic location and direct gene regulation, we combined the ChIP-seq peaks of SMAD4 and the DEGs from the RNA-seq (Fig. 4). We found that more than a third of the DEGs (541 genes) present SMAD4 binding sites and are potentially directly regulated by SMAD4 in CD8 T cells (Fig. 7D). Amongst those DEGs potentially directly regulated by SMAD4, 103 genes are differentially expressed regardless of TGF- β signal. Those SMAD4 TGF- β -independent genes comprised genes implicated in CD8 T cell differentiation such as *Tcf4* and *Lef1* but also many well-characterized TGF-β-target genes. More precisely, we found TGF-β-repressors (Smad7, Smurf2, Ski, Skil) and genes involved in lymphocyte epithelialretention (e.g Itgae), the expression of which is upregulated upon SMAD4 deficiency (Fig. 7D-**E**, **S7C**). Thus, SMAD4, by acting at the chromatin level, directly impedes TGF- β target gene expression in CD8 T cells, before any TGF-βR engagement. To identify putative partners of SMAD4 in WT and R2KO CD8 T cells, we conducted an enrichment motif analysis. We found similar motifs in the top 3 enriched motifs, notably ETS and RUNX family motifs (Fig. 7F-G). Interestingly, this indicates a potential interaction between SMAD4 and ETS or RUNX transcription factors that are important regulators of T cell differentiation and homeostasis (Cruz-Guilloty et al., 2009; Wang et al., 2018; Zamisch et al., 2009), exemplifying that SMAD4 interacts with different partners to mediate its wide transcriptional impact in CD8 T cells.

Finally, to gain further insight into the epigenetic mechanisms by which SMAD4 mediates TGF- β target-gene repression before TGF- β -signal, we performed a ChIP of SMAD4 and a ChIP of a histone mark associated with gene expression, namely the acetylation of the 27th lysine residue of the histone H3 protein (H3K27ac). We found that H3K27ac was enriched at the same SMAD4 binding regions of *Smad7*, *Skil* and *Itgae*, specifically in the absence of SMAD4 (SKO and R2SKO CD8 T cells). In contrast, we observed less enrichment in these SMAD4 binding regions in R2KO CD8 T cells (**Fig. 7H-I**). This indicates that SMAD4, in of TGF- β -independent manner and opposite to TGF- β R signaling, promotes histone deacetylation of TGF- β target gene promoters and enhancers likely mediating their repression.

DISCUSSION

Our study uncovers a fundamental role for TGF- β independent function of SMAD4 in preconditioning CD8 T cell fate and limits IBD development. We reveal that the TGF-βindependent function of SMAD4 acts as a basal repressor of TGF-β target genes, restraining the TGF- β signature in CD8 T cells in absence of any TGF- β R engagement. Ablation of SMAD4 in T cells promotes naïve CD8 T cells with poor effector predisposition, as well as their accumulation and intestinal epithelial retention. In parallel, by inducing expression of genes encoding components of the TGF-β negative feedback loop in an anticipatory manner, SMAD4 ablation predisposes CD8 T cells to escape the immune-regulatory effects of TGF- β . Thus, although it imposes poor effector predisposition, SMAD4 deprivation in CD8 T cells leads to IBD development as a consequence of the accumulation and chronic microbiota-dependent activation of CD8 T cells in the gut, an organ highly enriched in TGF- β (Barnard et al., 1993). Interestingly, this poor response to TGF- β is reminiscent of what is described in patients suffering from IBD and CRC (Monteleone et al., 2012). Due to an elevated expression of SMAD7, a potent TGF-β signaling repressor, T cells from those patients are not responsive to the immunoregulatory effect of TGF- β , highly enriched within the intestine (Babyatsky et al., 1996; Barnard et al., 1993).

Evidence over the last decade suggests that the presence and aberrant activation of CD8 T cells in the intestinal mucosa correlates with IBD development (Lee et al., 2011). Mechanisms underlying CD8 T cell activation in IBD remain elusive, however. In seminal work, Massagué et al, demonstrated the importance of TGF- β in controlling T cell effector gene

expression (Thomas and Massagué, 2005). The exact signaling branch of TGF- β , critical in establishing TGF- β -driven immunosuppression, remains nevertheless imprecise. Here we reveal that the absence of SMAD4 strongly impaired CD8 T cell sensitivity to TGF- β . Indeed, absence of SMAD4 elicits CD8 T cell activation in such a manner that even a genetic activation of the remaining TGF- β pathways cannot rescue TGF- β -mediated immunosuppression.

Our current results reveal that independently from TGF-β, SMAD4 promotes CD8 T cell activation by predisposing an effector differentiation program in naïve CD8 T cells. It has been reported that SMAD4 contributes to T cell activation by inducing c-Myc during T cell activation (Gu et al., 2015). Here, we reveal that SMAD4-promoted T cell activation intervenes prior to any TCR-dependent activation. Our findings enforce studies questioning the previously presented dogma by which naïve T cells are considered unpoised (Davenport et al., 2020). Indeed, depending on their developmental origin, naïve CD8 T cells could be differentially "preconditioned," thereby imprinting their fate after peripheral cognate antigen encounter (Smith et al., 2018). Our study describes SMAD4 as a novel and critical actor of this preconditioning and future investigation will be required to determine the molecular partners of SMAD4 that are important in mediating this process in naïve CD8 T cells.

TGF- β is critical for CD103 induction and IEL formation and retention in the gut (Bergsbaken and Bevan, 2015; El-Asady et al., 2005). In a recent study, it was reported that SMAD4 restrains the generation of CD103+CD8+ tissue resident memory T cells after viral infection in the lungs (Wu et al., 2020). However, the role of SMAD4 in limiting the microbiotamediated generation of intestinal CD8 IELs and its consequences on IBD have not been investigated. In addition, we reveal that the TGF- β independent function of SMAD4 restrains epigenetically the epithelial retention ability of CD8 T cells, already at naïve state. TGF- β RII

89

knockout mice (R2KO) did not develop severe intestinal inflammation in contrast to TGF-βRII and SMAD4 double knockout mice (R2SKO). This difference is likely due to the lack of expression of CD103 in CD8 T cells from R2KO mice. Indeed, ablation of SMAD4 in a setting of TGFβ-RII deficiency restores the epithelial retention capacity of CD8 T cells. This restoration could explain the severe intestinal immunopathology observed in R2SKO compared to R2KO mice. Accordingly, CD103-blockade alleviates intestinal immunopathology in SMAD4-deficient mice, pinpointing the central role of gut-epithelial retention in IBD development.

SMAD4 deletion and total TGF- β signaling disruption have strikingly opposite transcriptional and functional outcomes in CD8 T cells. We show that SMAD4 binds to promoter regions of numerous TGF- β target genes and regulates their expression in the absence of TGF- β signaling by inducing epigenetic modifications such as chromatin acetylation. By repressing several TGF- β repressors such as *Smad7, Ski, Skil* and *Smurf2,* SMAD4 facilitates TGF- β effects, in a TGF- β independent manner. In line with this potentiation, SMAD4 limits the basal expression of TGF- β target genes and likely allows better fine-tuned regulation of T cell responses to TGF- β . Indeed, by reducing the background ("noise") expression of TGF- β target genes, in the absence of TGF- β signal, SMAD4 potentiates the efficient action of TGF- β once a TGF- β signal is received. This uncharacterized anticipatory regulation governed by SMAD4 in CD8 T cells, in a TGF- β - independent manner, explains the dual effect by which SMAD4 restrains the action of TGF- β prior to TGF- β signaling, but potentiates it after TGF- β R engagement.

In summary, our study reveals that SMAD4 preconditions the fate of naïve CD8 T cells. We uncover a critical and non-redundant regulation governed by SMAD4 that, in a TGF- β

90

independent manner, finely preprograms naïve CD8 T cell homeostasis, with direct consequences on chronic intestinal inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Mice

CD4-Cre;Smad4^{flox/flox} (SKO), *CD4-Cre;Trim33^{flox/flox}* (TKO), *CD4-Cre;Smad4^{flox/flox}Trim33^{flox/flox}* (*STKO*), *CD4-Cre;Smad4^{flox/flox} Tgf-6RII^{flox/flox}* (R2SKO), *CD4-Cre;Tgf-6RII^{flox/flox}* (R2KO) and *CD4-CRE;TGF-6RI^{CA}* (*RCA*) were generated as previously described (Tanaka et al., 2018; Kim et al., 2006; Li et al., 2006; Marie et al., 2006; Bartholin et al., 2008). SKO-RCA mice were obtained by crossing *CD4-Cre;Smad4^{flox/flox} Stop^{flox/flox}* With *TGF-6RI^{CA}* mice. The different F5 transgenic mouse models were obtained by crossing *SKO*, or R2SKO and R2KO mice with F5 transgenic mice in RAG2KO background (Mamalaki et al., 1993). RAG2KO mice and all mice were crossed and maintained in AniCan, a specific pathogen free animal facility of the Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France. Unless mentioned otherwise, male and female mice were used. The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAP).

Bone marrow transfer, CD8/CD4 depletion, and CD103 blockade

RAG2KO mice were irradiated (6 Gray) and reconstituted by intra-orbital injections with 10⁶ T cell-depleted bone marrow (BM) cells either from WT, R2KO, SKO or R2SKO mice. For the CD8/CD4 depletion, 20 days after BM reconstitution, mice received intraperitoneally 150µg of

anti-CD8β (clone. 53-5.8 Bioxcell) or anti-CD4 (clone GK1.5, Bioxcell) once a week. We used different antibody clones to verify the depletion by flow cytometry. For CD103 blockade, RAG2KO mice were irradiated (6 Gray) and reconstituted by intra-orbital injections with 10⁶ T cell-depleted BM cells either from WT or SKO mice and 14 days after BM reconstitution, mice received intraperitoneally 100µg of anti-CD103 blockade antibody (clone. M290 InVivoMab) or PBS 3 times per week.

Histological Assessment of Inflammation

Colon and small intestine were fixed in 2% formaldehyde (VWR), embedded in paraffin and sectioned. Hematoxylin/eosin (Sigma Aldrich) staining was performed in embedded tissue. Intestinal inflammation was scored in a blinded fashion using a scoring system based on the following criteria: colon length, inflammatory cell infiltrate (severity and extent), crypt hyperplasia, and presence of neutrophils within the crypts, presence of crypt abscesses, erosion, granulation tissues and villous blunting.

Antibiotic treatment

For antibiotics treatment, drinking water was supplemented with an antibiotic cocktail composed with Ampicillin (1g/L), Metronidazole (1g/L), Neomycin (1g/L), Vancomycin (0.5g/L) all purchased from Sigma-Aldrich. Antibiotic treatment was administrated just after weaning and until 5 months of age.

Isolation of solenocytes, lymph nodes, lung, skin, intra epithelial and *lamina propria* cells Spleens, peripheral (inguinal and axillary) or mesenteric lymph nodes were dissociated on

nylon mesh and red blood cells were lysed with NH₄Cl 9g/L (vol/vol). Lungs and ears were cut

in small pieces and incubated in RPMI medium (Gibco) containing 20% Fetal Bovine Serum (Gibco), DNAse I Roche) at 100µg/ml and Collagenase from Clostridium Histolyticum (Sigma Aldrich) at 0.6mg/ml. For lungs, mice were perfused with PBS 1X, filtered and centrifuged on a percoll gradient 67%/44%. Small and large intestines were dissected after removing fat and payer patches. Intestines were longitudinally opened and washed in PBS 1X. Intestines were cut into small pieces and incubated with 5mM EDTA, 1mM DTT (Sigma Aldrich) at 37°C, under agitation. Epithelial cells and IELs were separated from tissue after 20 min. Tissues were then digested in RPMI medium (Gibco) containing 20% Fetal Bovine Serum (Gibco), DNAse I Roche) at 100µg/ml and Collagenase from Clostridium Histolyticum (Sigma Aldrich) at 0.6mg/ml. Intestinal LP was harvested from a 44% - 67% percoll gradient run for 20min at 1300 x g.

Flow cytometry

Intra cellular and surface cell staining were performed using the following antibodies:

Antibody	Fluorochrome	Clone	Company
CD8β	Alexa Fluor 488	eBioH35-17.2	Ebioscience
CD8β	Alexa Fluor 700	YTS156.7.7	Biolegend
CD8a	BV605	53-6.7	Biolegend
CD45	BV711	30-F11	BD
CD3	BV650	145-2C11/17A2	BD/Biolegend
CD4	V500	RM4-5	BD
Granzyme A	PerCP-eF710	GzA 3G8.5	eBiosciences
Granzyme B	APC	REA226	Miltenyi

IFNγ	APC	XMG1.2	eBiosciences
ΤΝΓα	Pe Cy7	MP6-XT22	Abcam
CCL3	PE	REA355	Miltenyi
CD103	eF450/bv421	2E7/M290	eBioscience/BD
CD127 (IL-7Ra)	APC-eF780	A7R34	eBioscience
CD44	PerCP-Cy5.5	IM7	BD
T-bet	PE-Cy7	eBio4B10	eBioscience
Mouse anti mouse	purified	36/E-Cadherin	BD
E-cadherin			
p-stat5 (p-Y694)	Alexa Fluor 647	47/Stat5	BD
Rabbit anti mouse	purified	E8F3R	Cell Signaling
p-smad2			
(Ser465/Ser467)			
ΤϹℝγδ	PE	GL3	BD
Donkey Anti	APC		Life Technologies
mouse IgG (H+L)			
Goat Anti rabbit	A488		Life Technologies
IgG (H+L)			

For IFN γ , TNF α , and CCL3 cytokine staining, cells were stimulated *ex vivo* for 4h with 1mg/ml PMA (Sigma Aldrich) and 1mg/ml Ionomycin (Sigma Aldrich) in presence of Brefeldin A (BD pharmingen) and Golgi Stop. After extracellular staining, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD) for IFN γ , TNF α , CCL3 staining and Fixation Permeabilization kit (invitrogen) for granzymes A/B and Tbet according to manufacturer's protocol. For pSTAT5 and pSMAD2 intracellular staining, cells were fixed with 2% paraformaldehyde (EMS company) for 10 minutes at room temperature and then permeabilized with ice-cold Methanol for 30 minutes before intracellular staining. Flow cytometry data was acquired on BD LSR Fortessa using DIVA software and analysed by FlowJo software.

Real time quantitative PCR

RNA was isolated with RNeasy mini kit (Qiagen) and reverse transcribed with iScript cDNA synthesis kit (Bio-rad). Real-time RT-PCR was performed using LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche) and different set of primer (table) on LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Samples were normalized on GAPDH and analyzed according to the $\Delta\Delta$ Ct method. There are the sequences of the primers used for qRT-PCR :

GAPDH: FW : 5' CATGGCCTTCCGTGTTCCTA 3' RV : 5' TGTCATCATACTTGGCAGGT 3' SMURF2: FW: 5' AAACAGTTGCTTGGGAAGTCA3' RV:5' TGCTCAACACAGAAGGTATGGT3' SKI: FW: 5' TGACTCTGGACACAGCAGGA3' RV:5'GAGAGGACAGCGAGGACAAG3' SKIL: FW: 5' AATAAAAAGCTGAACGGCATGGA3' RV:5'GGGTTTTCCCATTGGCATGAAT3' SMAD7: FW: 5'AAGTGTTCAGGTGGCCGGATCTCAG3' RV:5'ACAGCATCTGGACAGCCTGCAGTTG3'

Bioinformatic Analyses

All genomic data was analysed with R/Bioconductor packages, R version 3.6.3 (2020-02-29) [https://cran.r-project.org/; http://www.bioconductor.org/].

RNA-Seq

Illumina sequencing was performed on RNA extracted from triplicates of each condition. Standard Illumina bioinformatics analysis were used to generate fastq files, followed by quality assessment [MultiQC v1.7 https://multiqc.info/], trimming and

demultiplexing. 'Rsubread' v1.34.6 was used for mapping to the hg38 genome and creating a matrix of RNA-Seq counts. Next, a DGElist object was created with the 'edgeR' package v3.26.7 [https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616]. After normalization for composition bias, genewise exact tests were computed for differences in the means between groups, and differentially expressed genes (DEGs) were extracted based on an FDR-adjusted p value < 0.05 and a minimum absolute fold change of 2. DEG' gene symbols were tested for the overlap with published signatures of interest using the 'pathfindR' package [https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00858].

ChIP-Seq

ChIP libraries were prepared (Active Motif) and sequenced (Illumina NextSeq500) using a standard workflow. Resulting 75-nt single-end reads were mapped to the mm10 genome using the BWA algorithm with default settings [https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324]. Only reads that passed Illumina's purity filter, align with no more than 2 mismatches, and map

uniquely to the genome were used in subsequent analyses. In addition, duplicate reads were removed. After normalization, the peak callers MACS/MACS2 [https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137] were used to describe genomic regions with local enrichments in tag numbers relative to the Input data file (~ random background). Genomic ranges ('GenomicRanges' package) were used to perform genomic context annotations using the R packages 'annotatr' [DOI: 10.1093/bioinformatics/btx183], 'ChIPSeeker' [DOI: 10.1093/bioinformatics/btv145], and 'ChipPeakAnno' [DOI: 10.1186/1471-2105-11-237]. Enriched heatmaps ('EnrichedHeatmap') [https://doi.org/10.1186/s12864-018-4625-x] were used to visualize average ChIP peak signals. HOMER v3.12 was used to calculate motif enrichment in the vicinity of ChIP peaks.

All sequencing data has been uploaded into the GEO repository, with Accession number: XXXXXXXXXX

qPCR-based ChIP

The PCR based ChIP was done using ChIP It PBMC kit from Active Motif catalog n° 53042 and ChIP It qPCR analysis kit from Active Motif catalog n° 53029. Cells were collected from freshly harvested spleen, MLN and peripheral lymph nodes and then sorted using CD8+ isolation kit from Miltenyi Biotec n° 130-104-075. Chromatin catalog preparation and immunoprecipitation (IP) were performed according to manufacturer's protocol. IP were performed using anti-SMAD4 (EP618Y, Abcam); anti-H3K27ac (4729, Abcam); and rabbit IgG control (2729s, Cell Signaling). These are the sequences of the primers used por qPCR-based ChIP : SKIL promoter (SMAD4 binding site) FW : 5' TATGACGGGCTAGCTTCACA 3' RV : 5' GAGACGGTAAGAGGTGGAGG 3' CD103 (SMAD4 binding site) FW : 5'ggcagagcaaggatttgaac3'

RV : 5'CAGAGGCTcagagaaaatagcc3' SMAD7 (SMAD4 binding site) FW : 5'AAACCCGATCTGTTGTTTGC 3' REV : 5' GGCCGTCTAGACACCCTGT 3'

In vitro survival assay and IL-7 response

CD8 T cells were obtained from freshly harvested mesenteric lymph nodes (MLN) from F5 transgenic WT, R2KO, SKO, and R2SKO mice. F5 naïve CD8 T cells were cultured in 96 well plate (10⁵ cells/well) in complete RPMI media with or without recombinant IL-7 at 10 ng/ml for different time points (0, 1, 3 and 5 days). For each time point, cells were washed and stained with LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stains kit (Life Technologies) according to manufacturer's protocol, and fluorescent Abs against CD8 and CD45. The frequency of surviving CD8 T cells was determined by flow cytometry. For pSTAT5 staining, naïve CD8 T cells from the MLN of F5 transgenic WT, R2KO, SKO, and R2SKO mice were starved for 30 minutes at room temperature and then treated with mouse recombinant IL-7 at 10 ng/ml in RPMI 2% SVF for 30 minutes at 37°C. After 30 minutes of IL-7 stimulation, cells were immediately prepared for pSTAT5 staining (see Flow Cytometry section).

In vitro CD8 T cells activation and differentiation

Briefly, splenic naïve CD8 T cells of WT, R2KO, and SKO mice were isolated using Mojosort negative selection kit from Biolegend and activated for 4 days via anti-CD3/anti-CD28 antibodies (10 μg/ml) plate bound (CD3, clone 145-2C11 catalog no 16-0031-86.; CD28, clone 37.51 catalog no. 16-0281-86). F5 naïve CD8 T cells were cultured in 96 well anti-CD3/anti-CD28 plate bound (10⁵ cells/well) in complete RPMI media with the presence of recombinant

IL-7 at 10 ng/ml for all conditions. 4 days after, cells were washed and stained with LIVE/DEAD and Abs against CD45, CD8, Granzyme B and Tbet.

In vitro TGF-β treatment and suppression assay

Splenic naïve CD8 T cells of WT, R2KO, and SKO mice were isolated using Miltenyi selection kit (Miltenyi Biotec) or Mojosort negative selection (Biolegend) and activated for 4 days via anti-CD3/anti-CD28 antibodies (as described above) in the presence or absence of human recombinant TGF-β1 (Miltenyi Biotec). The cells were cultured with TGF-β1 since the beginning. We note that we added IL-7 at 10 ng/ml for all our in vitro activation assays to maintain cells live. 4 days after, cells were washed and stained with LIVE/DEAD and Abs against CD45, CD8, Granzyme B and TBET. For p-SMAD2 staining, splenic naïve CD8 T cells from F5 transgenic WT, R2KO, SKO, and R2SKO mice were starved for 30 minutes at room temperature and then treated with human recombinant TGF-β1 at 10 ng/ml in RPMI 2% SVF for 20 minutes at 37°C. After 20 minutes of TGF-β1 stimulation, cells were immediately prepared for pSMAD2 staining (see Flow Cytometry section).

Statistics

Unless mentioned otherwise two-tailed Student's t test was used to calculate statistical significance. P values <0.05 were considered significant. ns: nonsignificant; *p < 0.05; **p < 0.01; p< 0.001; ****p < 0.0001. Statistics were performed using Prism Software.

99

References and Notes

- Agricola, E., R.A. Randall, T. Gaarenstroom, S. Dupont, and C.S. Hill. 2011. Recruitment of TIF1γ to Chromatin via Its PHD Finger-Bromodomain Activates Its Ubiquitin Ligase and Transcriptional Repressor Activities. *Mol. Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.020.
- Babyatsky, M.W., G. Rossiter, and D.K. Podolsky. 1996. Expression of transforming growth factors α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. doi:10.1053/gast.1996.v110.pm8613031.
- Barnard, J.A., G.J. Warwick, and L.I. Gold. 1993. Localization of transforming growth factor β isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology*. doi:10.1016/0016-5085(93)90011-Z.
- Bartholin, L., F.S. Cyprian, D. Vincent, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Léon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. 2008. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TβRI/ALK5 receptor. *Genesis*. 46:724–731. doi:10.1002/dvg.20425.
- Belarif, L., R. Danger, L. Kermarrec, V. Nerrière-Daguin, S. Pengam, T. Durand, C. Mary, E. Kerdreux, V. Gauttier, A. Kucik, V. Thepenier, J.C. Martin, C. Chang, A. Rahman, N.S. Le Guen, C. Braudeau, A. Abidi, G. David, F. Malard, C. Takoudju, B. Martinet, N. Gérard, I. Neveu, M. Neunlist, E. Coron, T.T. MacDonald, P. Desreumaux, H. Le Mai, S. Le Bas-Bernardet, J.F. Mosnier, M. Merad, R. Josien, S. Brouard, J.P. Soulillou, G. Blancho, A. Bourreille, P. Naveilhan, B. Vanhove, and N. Poirier. 2019. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 129:1910–1925. doi:10.1172/JCI121668.
- Bergsbaken, T., and M.J. Bevan. 2015. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8+ T cells responding to infection. *Nat. Immunol.* 16:406–414. doi:10.1038/ni.3108.
- Cortez, V.S., T.K. Ulland, L. Cervantes-Barragan, J.K. Bando, M.L. Robinette, Q. Wang, A.J. White, S. Gilfillan, M. Cella, and M. Colonna. 2017. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF-β signaling. *Nat. Immunol.* 18:995–1003. doi:10.1038/ni.3809.
- Cruz-Guilloty, F., M.E. Pipkin, I.M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M.G. Lichtenheld, Y. Groner, and A. Rao. 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 206:51–59. doi:10.1084/jem.20081242.
- Davenport, M.P., N.L. Smith, and B.D. Rudd. 2020. Building a T cell compartment: how immune cell development shapes function. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/s41577-020-0332-3.
- Doisne, J.M., L. Bartholin, K.P. Yan, C.N. Garcia, N. Duarte, J.B. Le Luduec, D. Vincent, F. Cyprian, B. Horvat, S. Martel, R. Rimokh, R. Losson, K. Benlagha, and J.C. Marie. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-β signaling. *J. Exp.*

Med. doi:10.1084/jem.20090127.

- Dupont, S., A. Mamidi, M. Cordenonsi, M. Montagner, L. Zacchigna, M. Adorno, G. Martello,
 M.J. Stinchfield, S. Soligo, L. Morsut, M. Inui, S. Moro, N. Modena, F. Argenton, S.J.
 Newfeld, and S. Piccolo. 2009. FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for
 TGFβ Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell*.
 doi:10.1016/j.cell.2008.10.051.
- El-Asady, R., R. Yuan, K. Liu, D. Wang, R.E. Gress, P.J. Lucas, C.B. Drachenberg, and G.A. Hadley. 2005. TGF-β-dependent CD103 expression by CD8+ T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 201:1647–1657. doi:10.1084/jem.20041044.
- Gu, A. Di, S. Zhang, Y. Wang, H. Xiong, T.A. Curtis, and Y.Y. Wan. 2015. A Critical Role for Transcription Factor Smad4 in T Cell Function that Is Independent of Transforming Growth Factor β Receptor Signaling. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.019.
- Howe, J.R., S. Roth, J.C. Ringold, R.W. Summers, H.J. Järvinen, P. Sistonen, I.P. Tomlinson,
 R.S. Houlston, S. Bevan, F.A. Mitros, E.M. Stone, and L.A. Aaltonen. 1998. Mutations in
 the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*. 280:1086–1088.
- Kim, B.-G., C. Li, W. Qiao, M. Mamura, B. Kasprzak, B. Kasperczak, M. Anver, L. Wolfraim, S. Hong, E. Mushinski, M. Potter, S.-J. Kim, X.-Y. Fu, C. Deng, and J.J. Letterio. 2006. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature*. 441:1015–1019. doi:10.1038/nature04846.
- Laukoetter, M.G., P. Nava, and A. Nusrat. 2008. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14:401–7.
- Lee, J.C., P.A. Lyons, E.F. McKinney, J.M. Sowerby, E.J. Carr, F. Bredin, H.M. Rickman, H. Ratlamwala, A. Hatton, T.F. Rayner, M. Parkes, and K.G.C. Smith. 2011. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. J. Clin. Invest. 121:4170–4179. doi:10.1172/JCI59255.
- Lee, M., and E.B. Chang. 2021. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome— Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology*. 160:524–537. doi:10.1053/j.gastro.2020.09.056.
- Lee, P.P., D.R. Fitzpatrick, C. Beard, H.K. Jessup, S. Lehar, K.W. Makar, M. Pérez-Melgosa, M.T. Sweetser, M.S. Schlissel, S. Nguyen, S.R. Cherry, J.H. Tsai, S.M. Tucker, W.M. Weaver, A. Kelso, R. Jaenisch, and C.B. Wilson. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*. 15:763–774. doi:10.1016/S1074-7613(01)00227-8.
- Li, M.O., and R.A. Flavell. 2008. TGF-β: A Master of All T Cell Trades. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2008.07.025.
- Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A.A. Flavell. 2006. Transforming Growth Factor-β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms. *Immunity*. 25:455–471. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.011.

- Mamalaki, C., J. Elliott, T. Norton, N. Yannoutsos, D. Kioussis, A.R. Townsend, P. Chandler, and E. Simpson. 1993. Positive and Negative Selection in Transgenic Mice Expressing a T-Cell Receptor Specific for Influenza Nucleoprotein and Endogenous Superantigen. *Dev. Immunol.* 3:159–174. doi:10.1155/1993/98015.
- Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2006. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factorβ Receptor. *Immunity*. 25:441–454. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.012.
- Massagué, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745–54. doi:10.1093/emboj/19.8.1745.
- Monteleone, G., R. Caruso, and F. Pallone. 2012. Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 18:5664–5668. doi:10.3748/wjg.v18.i40.5664.
- Nakao, A., M. Afrakhte, A. Morén, T. Nakayama, J.L. Christian, R. Heuchef, S. Itoh, M. Kawabata, N.E. Heldin, C.H. Heldin, and P. Ten Dijke. 1997. Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. *Nature*. doi:10.1038/39369.
- Round, J.L., and S.K. Mazmanian. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* doi:10.1038/nri2515.
- Smith, N.L., R.K. Patel, A. Reynaldi, J.K. Grenier, J. Wang, N.B. Watson, K. Nzingha, K.J. Yee Mon, S.A. Peng, A. Grimson, M.P. Davenport, and B.D. Rudd. 2018. Developmental Origin Governs CD8 + T Cell Fate Decisions during Infection. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2018.05.029.
- Spencer, S.P., G.K. Fragiadakis, and J.L. Sonnenburg. 2019. Pursuing Human-Relevant Gut Microbiota-Immune Interactions. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2019.08.002.
- Surh, C.D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. 29:848–862. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.002.
- Tanaka, S., Y. Jiang, G.J. Martinez, K. Tanaka, X. Yan, T. Kurosaki, V. Kaartinen, X.H. Feng, Q.
 Tian, X. Wang, and C. Dong. 2018. Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.20170779.
- Thomas, D.A., and J. Massagué. 2005. TGF-β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. doi:10.1016/j.ccr.2005.10.012.
- Wang, D., H. Diao, A.J. Getzler, S. Crotty, A.W. Goldrath, and M.E. Pipkin Correspondence.
 2018. The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation.
 Immunity. 48:659–674.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.028.
- Wu, B., G. Zhang, Z. Guo, G. Wang, X. Xu, J. liang Li, J.K. Whitmire, J. Zheng, and Y.Y. Wan.
 2020. The SKI proto-oncogene restrains the resident CD103+CD8+ T cell response in viral clearance. *Cell. Mol. Immunol.* doi:10.1038/s41423-020-0495-7.
- Yan, X., X. Xiong, and Y.G. Chen. 2018. Feedback regulation of TGF-β signaling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* doi:10.1093/abbs/gmx129.
- Zamisch, M., L. Tian, R. Grenningloh, Y. Xiong, K.F. Wildt, M. Ehlers, I.C. Ho, and R. Bosselut.

2009. The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3 upregulation during CD8 T cell differentiation in the thymus. *J. Exp. Med.* 206:2685–2699. doi:10.1084/jem.20092024.

Zhang, S., M. Takaku, L. Zou, A. Gu, W. Chou, G. Zhang, B. Wu, Q. Kong, S.Y. Thomas, J.S. Serody, X. Chen, X. Xu, P.A. Wade, D.N. Cook, J.P.Y. Ting, and Y.Y. Wan. 2017. Reversing SKI–SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature*. 551:105–109. doi:10.1038/nature24283.

Figure legends

Fig. 1: SMAD4 in T cells prevents severe chronic intestinal inflammation in a TGF-βindependent manner. (a): Scheme representing pathways of TGF- β signaling and mice models. (b): On the left panel, body weight of mice from 1 to 10 months old (n= 2 to 10 mice per group for each time point) and on the right panel, weight of the mice at 5-7 months old (n=6 to 10 mice per group). All mice are male. (c-d): Representative pictures of colon and duodenum, colon length and duodenum enlargement of the different strains of mice at 7 months of age. (e): Representative Hematoxylin & Eosin (H&E) staining of duodenum and colon sections at 7 months old. Scale bar represents 50µm. (f-i): Irradiated RAG2KO mice were reconstituted with WT, R2KO, SKO, or R2SKO bone marrow (BM) cells; Percentage change in body weight between the beginning and the end of experiment (f); colon length (g); histological intestinal damage score (h); and representative H&E staining of duodenum and colon sections (i). Scale bar represents 50µm. Red arrows highlight crypt abscesses. All Data represent at least 3 independent experiments (C, D, E, F, G, H, I) and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t Test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. 2: CD8 $\alpha\beta$ T cell-depletion prevents intestinal inflammation upon SMAD4 deletion in T cells. (a): Scheme of the *in vivo* CD8 β and CD4 depletion experiment. (b): Body weight at day

40 after WT or SKO BM reconstitution and treatment with anti-CD8 β or anti-CD4 depleting antibody. **(c):** Representative pictures of colons and colon length measurement of BM reconstituted mice, treated with anti-CD8 β or anti-CD4 depleting antibody. **(d):** Representative H&E staining of duodenum and colon sections of irradiated mice reconstituted with WT or SKO BM cells and treated with anti-CD8 β or anti-CD4 depleting antibody. Scale bar represents 50µm. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. 3: SMAD4 in T cells prevents microbiota-mediated accumulation and epithelial activation of CD8 T cells. (a): Representative flow cytometry data showing the frequency of CD8αβ T cells among CD45+ cells in the spleen and epithelium from the colon and small intestine of 7 months aged mice, (n= minimum 4 mice per group). **(b):** Representative pictures showing immune-fluorescence staining of CD8β (green), E-cadherin (red), DAPI (blue) in the small intestine and colon sections of 7 months-aged WT and SKO mice. **(c):** Flow cytometry staining of GZMA, GZMB and IFN-γ among splenic and colonic intra-epithelial lymphocytes (IEL) CD8αβ T cells. **(d-e):** Effect of antibiotic (ATB) treatment on the frequency, numbers, and activation of colonic intraepithelial CD8αβ T cells from WT and SKO mice. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. 4: In absence of TGF- β R signaling, SMAD4 restrains TGF- β signature in naïve CD8 T cells inversely of TGF- β R signaling. (a): Venn diagram showing the numbers of differentially expressed genes between WT, R2KO, and SKO naïve F5 CD8 $\alpha\beta$ T cells. (b): Heatmap showing

104

the hierarchical clustering of differentially expressed genes between WT, SKO and R2KO F5 naïve CD8αβ T cells. **(c):** Fold change (logarithmic scale) of gene expression of SKO vs WT (in orange) and R2KO vs WT (in green). DEGs correspond to those shown in heatmap 4B. **(d):** Volcano plot of RNA-seq data from R2KO, SKO, and R2SKO naïve F5 CD8αβ T cells. The data for all genes are plotted as log2 fold change versus the –log10 of the adjusted p-value. Genes selected as significantly different are highlighted as green and red dots. **(e):** Heatmap showing the Log2 fold change expression of genes of cluster II and III highlighted in Fig. 2b, and for each condition, the heatmap value corresponds to the KO relative to WT (average of 3 biological replicates). **(f):** Heatmaps showing the expression of genes linked to CD8 T cell effector functions and genes linked to naïve and quiescence stage in WT, SKO or R2KO F5 naïve CD8αβ T cells. **(g):** Violin plot showing the relative expression of effector genes from R2KO, SKO, and R2SKO as compared to WT CD8 T cells.

Fig. 5: SMAD4 depletion promotes expression of TGF-β **repressors and impedes TGF-**β **response in CD8 T cells** *in vitro* **and** *in vivo*. **(a):** Volcano plot showing TGF-β inhibitory genes in SKO (orange), R2KO (green), and R2SKO (brown) F5 naïve CD8αβ T cells, all relative to WT. **(b):** Quantitative RT-PCR analysis of the expression of indicated TGF-β regulatory genes in F5 naïve CD8αβ T cells from spleen of WT, R2KO, SKO, and R2SKO mice (n=5-6). These mice are different from those used for RNA-seq data. **(c-d):** Flow cytometry data showing inhibition of GZMB and TBET after anti-CD3/CD28 stimulation of WT or SKO CD8αβ T cell with or without recombinant TGF-β at 10ng/ml **(c)** or different concentrations **(d)**. The percentage inhibition of CD8αβ T cells was appreciated by calculating the ratio between anti-CD3/CD28 + TGF-β condition and anti-CD3/CD28 alone. **(e-h):** Flow cytometry plots showing the frequency of

CD8 $\alpha\beta$ T cells among CD45+ cells present within the colonic epithelium (e), and intra-cellular staining for GZMB among colonic epithelial CD8 $\alpha\beta$ T cells (f); Body weight (g); and H&E staining of duodenum and colon sections (h); from 8 months aged mice, (n= minimum 6 mice per group). Scale bar represents 200 μ m. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p < 0.01; ****p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. 6: SMAD4 promotes homeostatic survival and epithelial retention of CD8αβ T cells in an opposite way to TGF-βR signaling. (a): Flow cytometry staining of CD127 on WT, R2KO, SKO and R2SKO F5 naïve CD8 $\alpha\beta$ T cells. (b): Flow cytometry staining of p-STAT5 in WT, R2KO, SKO and R2SKO F5 naïve CD8αβ T cells after in vitro IL-7 treatment. (c): Survival monitoring of WT, R2KO, SKO, or R2SKO naïve F5 CD8 $\alpha\beta$ T cells treated or not with IL-7. (d): Flow cytometry data showing the frequency with absolute numbers of F5 naïve CD8αβ T cells among CD45+ cells in the spleen of 3 months aged WT, R2KO, SKO and R2SKO F5 mice. (e): Flow cytometry staining of CD103 on WT, R2KO, SKO and R2SKO F5 naïve CD8αβ T cells. (f): Flow cytometry expression of CD103 on CD8 T cells, shown as relative to WT, after mixed bone marrow experiment. (gk): Experimental procedure for anti-CD103 blocking treatment (g); CD8 T cell numbers (h), Body weight (i); colon length (j); and H&E staining of duodenum and colon sections (k) of irradiated mice reconstituted with WT or SKO BM cells and treated or not with anti-CD103 blocking antibody. Scale bar represents 200µm. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed

Fig. 7: In absence of TGF-βR signaling, SMAD4 largely binds to DNA and mediates epigenetic control of TGF-β target genes in naïve CD8 T cells. (a): Venn diagram showing the number of SMAD4 common peaks between WT and R2KO naïve CD8 $\alpha\beta$ T cells. (b): The proportions of SMAD4 peaks associated with promoter, 5 UTR, 3 UTR, exon, intron, and intergenic regions in WT and R2KO naïve F5 CD8 $\alpha\beta$ T cells. (c): Enriched heatmaps showing the SMAD4-occupancy signals in genomically aggregated TSS regions in WT and R2KO CD8 T cells. Each panel represents 2 kb upstream and downstream of the TSSs. (d): Venn diagram showing the overlap between SMAD4 ChIP-seq peaks and RNA-seq DEGs. (e): SMAD4 binding ChIP-seq peaks in WT (blue), R2KO (green) or SKO control (orange), in corresponding genes. (f): Transcription factor (TF) top motifs in SMAD4 binding sites in WT and R2KO CD8 T cells. X-axis represents the logPvalue of the motif enrichment. Y-axis represents the fold change of the motif enrichment. (g): The three top motifs found by Hypergeometric Optimization of Motif Enrichment (HOMER) analysis among SMAD4 binding peaks in WT and R2KO CD8 T cells. (h): q-PCR-based ChIP analysis of SMAD4 on the promoters/enhancers of Smad7, Skil and Itgae in WT, R2KO and SKO F5 naïve CD8 $\alpha\beta$ T cells. Each point represents a pool of minimum 3 mice. (i): qPCR-based ChIP analysis of H3K27ac on the promoters/enhancers of Smad7, Skil and Itgae in WT, R2KO, SKO, and R2SKO F5 naïve CD8 $\alpha\beta$ T cells. Each point represents a pool of minimum 3 mice.

Acknowledgments:

We thank all the members of the lab and the cytometry, histology, genomic and animal platforms of the CRCL and CLB for their help and assistance. In addition, we thank Brigitte Manship, Anne-Marie Schmitt Verhulst, Lee Leserman and Gregoire Lauvau for critical reading of the manuscript.
Funding:

The "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC) S.M. Soudja and R. Igalouzene. La ligue Nationale contre le cancer, J.C Marie.

Author contributions :

R.I and S.M.S planned, supervised and conducted the experiments. H.H, C.B, and E.D performed the bio-informatics analysis. R.I, H.H, S.M.S, N.B, D.B and J.C.M discussed the data and provided conceptual input. S.M.S and J.C.M provided financial resources. R.I and S.M.S wrote the manuscript.

Competing interests:

The authors declare no conflict of interest.

Data and materials availability:

All data are available in the main text or the supplementary materials.

Supplementary Materials

Supplementary figures legend

Fig. S1: relative to Fig. 1. (a): Flow cytometry staining of SMAD4 and TGFβ-RII in T cells and non-T cells from WT, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice. **(b):** Representative H&E staining of duodenum and colon sections from 7 months-aged WT, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice. **(c):**

Representative H&E staining of duodenum and colon sections of irradiated RAG2KO mice reconstituted with WT, R2KO, SKO, or R2SKO BM cells.

Fig. S2: relative to Fig. 2. (a-b): Representative flow cytometry plots showing the frequency of CD4 and CD8αβ T cells (**a**); TCRγδ and CD8αα (**b**) among CD45+ cells in the MLN and intra epithelial lymphocytes of irradiated RAG2KO mice reconstituted with WT BM cells and injected with PBS or anti-CD8β or anti-CD4 depleting antibody. (**c-d**): Representative pictures of colon (**c**) and body weight shown as relative to WT (**d**) of irradiated RAG2KO mice reconstituted with WT or R2SKO BM cells and treated with anti-CD8β depleting antibody or PBS. (**e-g**): Experimental procedure for mixed BM transplantation in irradiated RAG2KO mice (**e**), colon length (**f**) and Body weight (**g**) of irradiated mice reconstituted with mixed WT and R2SKO BM cells. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. S3: relative to Fig. 3. (a): Histograms showing the absolute numbers of CD8 $\alpha\beta$ T cells in the spleen and colonic intra epithelial lymphocytes of 7 months aged WT, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice. (b): Histograms showing the frequency of CD8 $\alpha\beta$ T cells in the peripheral lymph nodes (PLN), lungs and the skin of 7 months-aged WT, SKO and R2SKO mice. (c): Flow cytometry staining of GZMA and GZMB in CD8 $\alpha\beta$ T cells of the epithelium of the small intestine of WT, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice. (d): Histograms showing the frequency of TNF- α and CCL3 producing CD8 $\alpha\beta$ T cells in the colonic epithelium of 7 months-aged WT and SKO mice. (e): CD103 and GZMB staining showing that activated CD8 $\alpha\beta$ T cells are mainly CD103+ and are present in the intestinal epithelium. (f): Flow cytometry staining of GZMA and GZMB in the colonic lamina propria CD8 $\alpha\beta$ T cells of WT, TKO, SKO, STKO and R2SKO mice. (g): The

frequency of GZMB producing CD8 $\alpha\beta$ T cells in the PLN, lungs and the skin of 7 months-aged WT, SKO and R2SKO mice. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse. Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: nonsignificant; * p<0,05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.001.

Fig. S4: relative to Fig. 4. (a): Representative pictures of colon and duodenum from F5 TCR transgenic WT, R2KO and SKO 8 months-aged mice. **(b):** Pie chart showing the frequency of each cluster (related to Fig. 2b). **(c):** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) plot comparing gene expression arrays related to naïve or effector state of WT, R2KO, SKO, and R2SKO CD8αβ T cells. **(d):** List of the 43 selected genes related to the CD8 T cell effector state.

Fig. S5: relative to Fig. 5. (a): Quantitative RT-PCR analysis of the expression of indicated TGF- β regulatory genes in polyclonal CD8 $\alpha\beta$ T cells from spleen of WT, SKO, and R2SKO mice. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse.

Fig. S6: relative to Fig. 6. (a-b): Flow cytometry staining of CD107 **(a)** and CD103 **(b)** on naïve (CD44 negative CD8 T cells) and memory (CD44 positive CD8 T cells) in the MLN of WT, SKO and R2SKO mice. **(c):** Flow cytometry staining of CD103 on naïve (CD44 negative CD8 T cells) and memory (CD44 positive CD8 T cells) from irradiated and transplanted mice. **(d)** Histogram showing the frequency of CD8 $\alpha\beta$ T cells among CD45+ cells in the colonic epithelium of RAG2KO irradiated mice and reconstituted with WT, R2KO, SKO or R2SKO BM cells **(e):** Representative pictures showing immune-fluorescence staining of CD8 β (green), E-cadherin (red), DAPI (blue) in the small intestine and colon sections of irradiated RAG2KO mice reconstituted with WT, R2KO, or R2SKO BM cells. All data represent at least 3 independent experiments and are presented as mean ± SD. Each symbol represents an individual mouse.

110

Data were analyzed by unpaired Student t test. ns: non-significant; * p<0,05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Fig. S7: relative to Fig. 7. (a) Enriched heatmaps showing the SMAD4-occupancy signals in WT, SKO and R2KO (SKO was used as a negative control). **(b):** Biological pathway enrichment analysis in SMAD4 binding genes in WT and R2KO CD8 T cells. **(c):** List of common genes that have a SMAD4 positive binding peak and are deferentially expressed between WT, SKO and R2KO naïve F5 CD8αβ T cells.



Figure 2















В













С

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)



D

List of genes used for violin plot

Ccl3 Ccl4 Ccl5 Ccr2 Ccr4 Ccr5 Cd244a Cxcr3 Fasl Gzma Gzmb ld2 lkzf2 ll12rb1 ll12rb2 ll2ra ll2rb ll2rg lrf4 lrf8 ltgax Klra2 Klra7 Klrb1b Klrb1f Klrc1 Klri2 Klrk1 Prdm1 Prf1 Rora Tbx21 Xcl1 Zeb2 Mki67 Ctla4 Cdk1 Cd44 Bhlhe40 ltga1 ll18rap Pde4a Eomes







D



Ε







124



С

List of the 103 genes

Sgk1 Ly6e Kcnc1 Sfr1 Arrb2 Atp8b4 F2r Tnk2 Fam3c II12rb1 Ly6c2 Cxcr6 Ift80 Prkcz Ccr9 Snord110 Golm1 Nt5e Arhgef12 Tgfb1i1 Smurf2 Smpd5 Pde3b P2rx7 St8sia6 Pdlim1 Ski Baiap3 Ifngr1 Gm8369 Ly6i Rgs10 Celsr1 Smad3 Il6ra Slc6a19 Rasal1 Fmnl3 Enc1 Lpxn Snord32a Vmp1 Snord34 Slc16a5 Atxn1 Snord49b Btg1 Zfp605 Rab3ip Dzip1 Fyn Gimap7 Camsap2 Kctd12 Dnajb1 Cd163l1 Dtx1 Myh9 Dennd4a Ttc28 Susd3 Xdh Snord57 Lrig1 Relb Ly6a Eef2k Fam102a Skil Rora Tcf4 Slfn5 Itgae Podnl1 Lef1 Actb Wnt5b Tfrc Dad1 1700017B05Rik Smad7 Gng2 Erdr1 Arl4c Tnfrsf14 Cobll1 Irf6 Oasl2 Coro2a Tmem64 Tle3 Abi3 Cd3d Pde4a Marc1 Lpin2 Spsb1 Gpr68 Emid1 Tgfbr2 E2f2 Cotl1 Gdpd

Discussion

1. Le rôle de SMAD4 indépendant du TGF-β

1.1) Un effet unique pour chaque type cellulaire (NK, CD4, CD8) ?

L'effet transcriptionnel des complexes SMAD induit suite à un stimulus par le TGF- β diffère d'un type cellulaire à un autre. Comme évoqué dans le chapitre 4, l'effet différentiel du TGF-β serait influencé par la présence de facteurs de transcription et de signaux spécifiques à chaque type cellulaire. La question serait donc d'étudier si le rôle TGF-β-indépendant de SMAD4 a aussi un effet différentiel selon le type cellulaire. En effet, nous avons pu identifier un nouveau mécanisme par lequel SMAD4 agit de manière indépendante du TGF-β dans les lymphocytes T CD8. Cet effet de SMAD4 TGF-β-indépendant permet de maintenir les lymphocytes T CD8 dans une certaine configuration afin de prévenir le développement d'une inflammation chronique intestinale. Parmi les effets TGF-β-indépendants de SMAD4, c'est la répression de l'accumulation des lymphocytes T CD8 dans les intestins et également dans les organes lymphoïdes via l'inhibition de l'intégrine CD103 et le récepteur à l'IL-7. Bien que dans le modèle utilisé (CD4-Cre) la délétion de SMAD4 affecte à la fois les Lymphocytes T CD8 et T CD4, nous n'avons pas observé les mêmes effets dans les lymphocytes T CD4. En l'occurrence, l'absence de SMAD4 dans les lymphocytes T CD4 ne conduit pas à une accumulation massive et à une rétention épithéliale accrue comme observées pour les lymphocytes T CD8. En lien avec cette observation, l'expression de CD103 et du récepteur à l'IL-7 ne sont pas non plus augmentées dans les lymphocytes T CD4 dépourvus de SMAD4 (Figure 16).



Figure 16 : Analyse de l'effet de la délétion de SMAD4 sur les Lymphocytes T CD4. A: Nombres absolus des lymphocytes T CD4 dans la rate (spleen), ganglions mésentériques (MLN), les IELs, et la Lamina Propria. **B:** Analyse par cytométrie de flux montrant le manque d'expression de l'intégrine CD103 dans les lymphocytes T CD4 de la rate et des MLN suite à la délétion de SMAD4

Dans les lymphocytes T CD4, il a été montré que SMAD4 agit de manière indépendante au TGF-β pour réprimer l'expression du gène Rorc et la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17 en absence du TGF-β [246]. La délétion de SMAD4 favorise donc la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th17 ainsi que la production de la cytokine IL-17 in vitro et in vivo. Encore une fois, nous n'avons pas observé le même effet dans les lymphocytes T CD8 dépourvus de SMAD4. Au contraire, nous avons observé une baisse du niveau du gène Rorc dans les lymphocytes T CD8 après la délétion de SMAD4, ce qui suggère que l'effet TGF-β-indépendant de SMAD4 diffère entre les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes T CD4. Un autre exemple de cellules immunitaires dans lesquelles a été rapporté une action TGF-β-indépendante de SMAD4, c'est les cellules NK. En effet, il a été montré dans une étude récente que SMAD4 empêche la conversion des cellules NK en cellules de type ILC1 en inhibant la signalisation non canonique du TGF- β et ceci de manière indépendante du stimulus du TGF- β [248]. Les cellules NK déficientes en SMAD4 ont donc une meilleure réponse au TGF-B, passant par l'amplification des voies non-canoniques. Nous avons envisagé au début le même mécanisme d'action dans les lymphocytes T CD8. En effet, beaucoup de gènes surexprimés dans les lymphocytes T CD8 déficients en SMAD4 sont des gènes qui sont normalement induits par le TGF- β (ex : CD103, IL-7r, SMAD7, Ski ...etc). L'hypothèse était donc que l'expression de ces gènes serait augmentée suite à une potentielle amplification des autres voies de signalisation restantes après la délétion de SMAD4. Cette hypothèse a été vite écartée car l'analyse transcriptionnelle des lymphocytes T CD8 dépourvus à la fois de SMAD4 et du TGF- β RII (R2SKO), a montré le même phénotype que les lymphocytes T CD8 dépourvus de SMAD4 (SKO). De plus, l'expérience de précipitation de la chromatine a montré que SMAD4 se fixe directement sur des gènes comme CD103 ou SMAD7 et régulerait leur expression par modulation épigénétique, probablement en s'associant à des HDAC, en l'absence de TGF- β . Cela suggère donc que SMAD4 dans les lymphocytes T CD8 agit directement au niveau de l'expression génique et non pas par l'inhibition des voies non-canoniques de la signalisation du TGF-β, comme rapporté dans les cellules NK [248]. Ces effets distincts de SMAD4 en absence de signal TGF-β pourraient être expliqués par des inducteurs distincts et spécifiques à chaque lignée cellulaire, amenant à la formation de complexes protéiques différents au niveau de l'ADN. Il serait intéressant de comparer les différents complexes protéiques formés par SMAD4 en l'absence du TGF-β dans chaque type cellulaire. L'effet TGF-βindépendant de SMAD4 semble être spécifique à chaque type de cellule immunitaire, ce qui nous amène à poser la question suivante ; Comment est induite l'action de SMAD4 indépendante du TGF-β dans les lymphocytes T CD8 ?

1.2) Comment est induite l'action de SMAD4 indépendante du TGF-β dans les CD8 ?

Nous avons pu voir que le rôle TGF- β -indépendant de SMAD4 a lieu directement dans le noyau des lymphocytes T CD8 (Expérience d'immunoprécipitation de la chromatine). En plus de la cytokine TGFβ, la translocation de SMAD4 dans le noyau peut être médiée par les BMP qui pourraient induire la formation des complexes SMAD4-SMAD5/1/8. Nous pourrions ainsi imaginer que le rôle TGF-β indépendant de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8 pourrait être médié par les BMP. La validité de cette hypothèse est peu probable car il a été montré chez la souris que l'expression du récepteur des BMP (BMPR1α) est uniquement observée dans les lymphocytes T CD4, plus particulièrement les Treg [285]. Les BMP ne semblent donc pas avoir un effet sur les lymphocytes T CD8, qu'ils soient à l'état naïf ou bien activés. En soutien à cette conclusion, une étude récente a montré que BMP7, un membre de la famille des BMP, agit uniquement sur les lymphocytes T CD4 intra-tumoraux tandis qu'aucun effet direct n'a été observé dans les lymphocytes T CD8 [286]. De plus, l'analyse du ChIP-Seq de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8 a révélé des motifs de liaisons à l'ADN similaires à ceux des facteurs de transcription ETS et RUNX tandis qu'il n'y a pas de motif pour SMAD5/1/8, suggérant que l'effet TGFβ indépendant de SMAD4 n'est pas induit par les BMP. Il serait intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de SMAD4 suivie par une spectroscopie de masse afin d'identifier tous les partenaires de SMAD4 en l'absence du TGF-β. Cela nous indiquera les différents partenaires de SMAD4 et pourrait nous donner des pistes sur des mécanismes potentiels d'induction de la translocation nucléaire de SMAD4. L'autre hypothèse est que SMAD4, en l'absence du TGF- β , peut transloquer dans le noyau sans avoir besoin d'un signal extra-cellulaire. En effet, SMAD4 possède un signal d'exportation nucléaire fonctionnel dans la région linker, et d'un signal de localisation nucléaire constitutivement actif dans le domaine N-terminal MH1 [287]. Afin de tester cette hypothèse, il serait donc envisageable de muter les régions impliquées dans l'exportation et la localisation nucléaire de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8 et analyser le phénotype de ces derniers.

1.3) TGF-β-dépendant ou plutôt indépendant, lequel choisir et quand ?

Nous avons montré que SMAD4, en plus de son rôle de médiateur de la signalisation du TGF- β , il a un rôle indépendant du TGF- β dans les lymphocytes T CD8, qui permet de maintenir l'homéostasie intestinale. Cependant, nous avons démontré ce processus en utilisant un système de délétion du gène SMAD4 et TGF- β RII simultanément au moment du stade double positif (CD4+ CD8+) dans le thymus. La question qui se pose est donc comment SMAD4 dans les lymphocytes T CD8, en conditions physiologiques, intègre à la fois la médiation de la signalisation du TGF- β mais aussi les fonctions TGF- β -indépendantes.

La première hypothèse est que SMAD4 agit par défaut indépendamment du TGF-ß seulement en l'absence de ce dernier sous sa forme active, et une fois le récepteur TGF-βRII engagé, SMAD4 agit principalement pour médier la signalisation avec SMAD2 et SMAD3. En effet, le besoin d'être sous une forme active pour exercer ses processus biologiques rend l'action du TGF-β spécifique est limitée dans l'espace et le temps. On peut imaginer donc que lors du développement, circulation, ou bien résidence dans les tissus, les lymphocytes T CD8 sont affrontés à un stimulus différentiel du TGF-β selon l'état physiologique et la localisation tissulaire. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la délétion du récepteur TGF-BRII n'a pas le même effet si elle intervient au niveau du thymus ou bien dans la périphérie [233]. De même, la délétion de SMAD4 dans les lymphocytes T périphériques n'a pas le même effet sur les lymphocytes T CD8 comparé à ce que nous avons démontré (délétion depuis le stade DP dans le thymus) [238]. Pour tester l'hypothèse suggérant un rôle TGF- β indépendant de SMAD4 par défaut en l'absence de la cytokine active, il serait intéressant de voir la corrélation entre la présence physiologique du TGF- β active et le phénotype imposé par l'action TGF- β indépendante de SMAD4. Par exemple, nous pourrions analyser le profil d'expression génique des CD8 dans différents tissus et états biologiques tout en dosant en parallèle le TGF- β actif dans le même environnement. Il serait intéressant aussi d'utiliser des modèles de délétion conditionnelle distincts dans la même cellule en utilisant deux systèmes de délétions inductibles avec des agents différents. Par exemple, on peut utiliser le système SMAD4^{flox/flox} CD8beta-CRE-DHFR pour induire la délétion de SMAD4 avec l'injection de l'antibiotique triméthoprime, et en même temps la présence d'un système TGF-BRII FRT/FRT CD8a-FLP-ERT2 pour induire la délétion du TGF-βRII avec l'injection du Tamoxifène. Ce système nous permettrait de contrôler la délétion de SMAD4 et du TGF-BRII avec des différences temporelles ce qui nous indiquerait à quel moment sont importants les rôles TGF-β-dépendants et indépendants de SMAD4.

Une autre hypothèse est que les lymphocytes T CD8 peuvent intégrer les deux rôles de SMAD4, à savoir TGF- β -dépendant et TGF- β -indépendant, de manière simultanée. Un tel scénario serait envisageable avec l'existence de seuils d'activation des deux fonctions de SMAD4. Nous pouvons imaginer qu'une faible concentration de TGF- β actif induit la formation de seulement quelques complexes SMAD4-SMAD2-SMAD3 et que les molécules SMAD4 restantes assurent une fonction TGF- β -indépendante. Cette hypothèse est vérifiable en stimulant les lymphocytes T CD8 avec différentes concentrations de TGF- β et ensuite en analysant les différents complexes formés par SMAD4.

2. L'impact de l'activation des CD8 sur l'épithélium intestinal

2.1) Comment les lymphocytes T CD8 affectent la muqueuse intestinale ?

En l'absence des lymphocytes T CD8, nous avons observé une abolition complète de l'inflammation intestinale. Le mécanisme par lequel les lymphocytes T CD8 peuvent favoriser l'inflammation intestinale chez les souris dépourvues de SMAD4 n'est pas encore élucidé. L'expression de molécules cytotoxiques comme granzyme B et granzyme A peut suggérer qu'ils pourraient potentiellement tuer les cellules épithéliales intestinales affectant ainsi les différentes fonctions assurées par l'épithélium. Par ailleurs, les lymphocytes T CD8 présents dans l'épithélium expriment des quantités élevées de cytokines qui pourraient aussi contribuer à la mise en place de l'inflammation intestinale. Plus particulièrement, nous avons observé une forte production de la cytokine inflammatoire IFNy au niveau des lymphocytes T CD8 intra-épithéliaux. Nous avons donc suggéré que l'IFNy dérivé des lymphocytes T CD8 pourrait agir sur les cellules épithéliales favorisant ensuite le développement des MICI. Afin d'analyser de plus près l'état de l'épithélium intestinal, nous avons isolé les cellules épithéliales du colon de souris dont les lymphocytes sont dépourvus de SMAD4, SKO et de souris sauvages, WT et nous avons effectué un RNA-Seq pour avoir une idée globale sur l'état inflammatoire de l'épithélium. Nous avons révélé que les cellules épithéliales coliques des souris SKO expriment massivement des gènes impliqués dans plusieurs processus immunitaires. Ces cellules épithéliales intestinales expriment alors un fort niveau de chimiokines telles que CXCL9, CCL2 et KC recrutant des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Elles expriment aussi alors abondamment des peptides antimicrobiens (RegIIIB, iNOS) permettant de lutter contre les bactéries. De façon intéressante, elles expriment également un haut niveau de gènes jouant un rôle dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8 via le CMH1 (PSMB9, PSMB8, qui sont des molécules de l'immunoproteasome permettant une présentation efficace des antigènes) et aussi des gènes impliqués dans la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4 via le CMH2 (CIITA, facteur de transcription favorisant l'expression du CMH2). Enfin, elles expriment aussi lors de l'inflammation, des gènes qui vont participer à la différenciation des lymphocytes T (SAA favorisant les Th17). Globalement, cette signature de gènes reflète fortement la contribution importante des cellules épithéliales intestinales dans le maintien de la barrière intestinale qui est fortement challengée dans le contexte inflammatoire (Figure 17).



Figure 17 : Etat inflammatoires des cellules épithéliales coliques des souris SKO comparées aux cellules WT. A : Classification hiérarchique des gènes différentiellement exprimés entre les cellules épithéliales coliques SKO comparées aux WT. **B :** Analyse d'enrichissement en groupes de gènes (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) montrant l'enrichissement des réponses immunes innées ainsi que la signature IFNγ, présentation antigénique. En parallèle, on voit une diminution du métabolisme.

Nous avons confirmé l'expression de certains gènes tels que CMH2 par cytométrie et par immunofluorescence sur tissu (Figure 18). De manière inattendue, l'expression du CMH2 par les cellules épithéliales est polarisée avec une présence majoritaire au niveau apical, c'est à dire vers la lumière intestinale. Logiquement, on pourrait s'attendre que le CMH2 soit exprimé sur la partie basale vers la lamina propria, endroit où se trouvent les lymphocytes T CD4, mais ce ne fut pas le cas. Ceci reste donc un mystère qui demande plus d'investigations. Une hypothèse est que cette localisation apicale du CMH2 permettrait après endocytose un meilleur chargement avec les peptides bactériens plutôt localisés vers la lumière intestinale.



Figure 18 : Immunofluorescence montrant l'expression de la molécules CMH2 par les cellules épithéliales intestinales des souris SKO. DAPI : marquage des noyaux cellulaires. EPCAM : marquage des cellules épithéliales. On peut voir clairement que le CMH2 est exprimé au niveau apical (partie de la lumière intestinale).

Les cellules épithéliales intestinales sont hétérogènes et ont des fonctions distinctes qui les caractérisent. Nous nous sommes posé la question si toutes les cellules épithéliales, qui sont bien distinctes à la base, acquièrent toutes des propriétés inflammatoires communes. Pour répondre à cette question, nous avons isolé les cellules épithéliales coliques enflammées et nous avons effectué une analyse transcriptionnelle monocellulaire (Single Cell RNA-Seq) (Figure 19). Nous avons d'abord identifié les différents sous-types de cellules épithéliales, à savoir les cellules souches et les progéniteurs, cellules entérocytes, cellules de Goblet, cellules Tuft, cellules entéroendocrines. De manière intéressante, nous avons identifié plusieurs sous-populations de cellules entérocytes, caractérisées par l'expression commune de gènes spécifiques aux entérocytes mais aussi une expression différentielle de gènes impliqués dans les processus immunitaires. De plus, nous pouvons observer clairement l'expansion de la population Entérocytes 4 durant l'inflammation intestinale.



Figure 19 : Analyse transcriptionnelles monocellulaire (Single Cell RNA-Seq) : les cellules épithéliales coliques ont été isolés de souris WT et SKO en utilisant un tri basé sur l'expression du marqueur épithélial EPCAM et en excluant les cellules immunitaires exprimant le marqueur CD45. L'analyse UMAP montre la présence de plusieurs types de cellules épithéliales intestinales ainsi que la présence de sous-types parmi les entérocytes.

L'analyse du score inflammatoire, et plus particulièrement le score de la signature de l'IFN γ a montré que la majorité des cellules épithéliales intestinales acquièrent une signature inflammatoire imposée par l'IFN γ . Cependant, en plus de leur forte expansion, la population que nous avons nommé Entérocytes 4 possède la signature inflammatoire IFN γ la plus remarquable **(Figure 20).**





Figure 20 : Score inflammatoire basé sur la signature de l'IFNγ : Le score inflammatoire a été effectué en analysant le niveau d'expression des gènes cibles de l'IFNγ tels que le CMH1 et le CMH2. On voit clairement que la population Entérocytes 4 s'expand et acquière une forte signature IFNγ durant l'inflammation. Il serait intéressant d'étudier comment cette population Entérocyte 4 est modifiée durant l'inflammation intestinale. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour répondre à cette question. L'hypothèse que cette population est prédisposée à répondre mieux à l'interféron gamma n'est pas fortement envisageable car nous avons analysé le niveau d'expression des récepteurs et médiateurs de l'IFNγ et nous n'avons pas trouvé une augmentation particulière de leur expression au niveau de cette population (données pas montrées). Cependant, nous pourrons imaginer que durant l'inflammation chronique, les cellules souches et progéniteurs se différencient davantage en cette population Entérocyte 4 en réponse à des cytokines comme l'IFNγ. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de supprimer les récepteurs de l'IFNγ spécifiquement sur les cellules souches ou les progéniteurs et analyser ensuite la population Entérocytes 4.

D'un point de vue clinique, la sécrétion d'IFNy est souvent augmentée chez les patients atteints de MICI [288], cependant, les stratégies thérapeutiques utilisant un anticorps spécifique bloquant l'IFNy ont été inefficaces [289], indiquant l'existence de paramètres supplémentaires qui compromettent l'efficacité du traitement. Il serait intéressant de neutraliser la signalisation de l'IFNy spécifiquement dans les cellules épithéliales chez les souris SKO et de voir si cela a un impact sur l'établissement de l'IFNy.

Un autre mécanisme par lequel les cellules T CD8 dans les souris SKO peuvent conduire à l'inflammation intestinale est leur forte expression du TNF- α qui est aussi fréquemment régulée à la hausse chez les patients atteints de MICI [288]. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le blocage du TNF- α dans les MICI améliore significativement l'inflammation intestinale et la guérison macroscopique [290]. Cependant, les conséquences exactes de la sécrétion de TNF et quelles sont les cibles du TNF restent encore élusifs.

3. Le rôle du microbiote intestinal

Il est aujourd'hui largement admis qu'un groupe défini de microbes commensaux peut contrôler de façon marquée et dominante l'homéostasie immunitaire, comme par exemple les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) qui favorisent l'accumulation de Th17 dans l'intestin [291]. Contrairement aux cellules T CD4, la relation entre le microbiote et les cellules T CD8 intestinales reste mal caractérisée, bien que l'activation médiée par le microbiote de cette population ait été impliquée à la fois dans le contrôle immunitaire de l'hôte contre l'infection par des pathogènes mais aussi dans l'efficacité de l'immunothérapie anticancéreuse [292] [293]. Récemment, un consortium de 11 souches bactériennes isolées à partir de fèces de donneurs humains sains induisent de manière robuste l'activation des lymphocytes T CD8 caractérisés par une forte production de la cytokine IFNy [294].

Dans notre étude, nous attribuons un rôle clé au microbiote dans l'induction de l'inflammation intestinale. En utilisant un large spectre d'antibiotiques comprenant l'ampicilline, le métronidazole, la néomycine et la vancomycine, nous avons complètement aboli l'inflammation intestinale dépendante des lymphocytes T CD8. Ainsi, la prochaine étape consistera à caractériser quels groupes de bactéries commensales sont à l'origine de l'activation des cellules T CD8 dans l'épithélium. À cette fin, des études supplémentaires utilisant un antibiotique avec un spectre d'action plus petit ou utilisant le transfert de microbiote pourraient être réalisées pour préciser quelles bactéries sont impliquées dans la pathologie.

L'utilisation d'un modèle de souris transgénique ayant uniquement des lymphocytes T CD8 avec le TCR transgénique dirigé contre un épitope unique a révélé la nécessité de la spécificité du TCR dans le développement de l'inflammation intestinale dans les souris SKO. Cependant, la spécificité du TCR n'indique pas forcément la présence d'un antigène commensal spécifique qui est à l'origine de l'activation des lymphocytes T CD8 dans les souris SKO. En effet, les lymphocytes T CD8 intra épithéliaux ont besoin d'engager leur TCR pour qu'ils puissent migrer dans l'épithélium intestinal. Nous pourrons donc imaginer que la nécessité d'avoir un répertoire de TCR naturel pour induire l'inflammation, consiste à permettre de générer uniquement des lymphocytes T CD8 mémoires capables d'aller dans l'épithélium intestinal et une fois dedans, ils n'ont plus besoin d'engager leur TCR pour s'activer. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des lymphocytes T CD8 IEL isolés de souris SKO peuvent secréter de l'IFN γ *in vitro* en présence des cytokines IL-12 et IL-18 (données non montrées). Finalement, le microbiote peut également jouer un rôle en fournissant des métabolites nécessaires pour le maintien des lymphocytes T CD8 au niveau de l'épithélium intestinal. Ceci nous

136

amène donc à analyser le changement de métabolites au niveau de l'intestin inflammatoire et tester leurs effets sur la biologie des lymphocytes T CD8 IEL.

4. Perspectives cliniques

4.1) Les CD8 comme outils de diagnostic précoce des MICI ?

Les MICI sont des maladies multifactorielles et très complexes qui présentent un large éventail de phénotypes. L'évolution de la maladie et le résultat clinique de la réponse à certains traitements par les patients sont déterminés par des facteurs multiples et variés. Il n'est peut-être pas réaliste d'envisager aujourd'hui qu'un seul marqueur biologique peut permettre un diagnostic précoce de la maladie ainsi que la réponse aux traitements. Pour essayer de trouver une signature spécifique aux lymphocytes T CD8 avant l'établissement de l'inflammation intestinale chronique dans les souris SKO, nous avons isolé des IEL CD8 du colon et des MLN de souris SKO et WT jeunes et nous les avons analysés par Single Cell RNA-Seq. De manière intéressante, et avant l'apparition des premiers signes inflammatoires, nous avons identifié la présence d'une sous-population parmi les IEL CD8 SKO avec un profil transcriptionnel bien distinct des autres sous-types. De plus, cette population est minime dans les IEL CD8 de souris sauvages. Cette population présente dans les souris dépourvues de SMAD4 est principalement caractérisée par l'expression de gènes de prolifération active comme Ki67 et des cyclines. Fait intéressant, beaucoup de gènes liés aux remodelages de la chromatine comme le gène *Ezh2* et *Dnmt1* sont aussi exprimés fortement dans cette population. **(Figure 21).**



Figure 21 : Présence d'une population unique dans les IEL CD8 de souris SKO jeunes. A : L'analyse UMAP montre la présence d'une population spécifique dans les CD8 SKO. **B** : cette population exprime des gènes liés à la prolifération active mais aussi à la modification épigénétique de la chromatine.

En plus d'une forte expression de CD103 et un tropisme intestinal élevé, Il n'est pas inintéressant d'envisager que cette population Ezh2^{hi} soit à l'origine des IEL CD8 accumulés et activés dans l'épithélium intestinal des souris SKO. On sait aujourd'hui que les lymphocytes T CD8 présents dans le sang pourraient apporter des informations sur la gravité des MICI et la prédiction de rechute [168]. De plus, certains marqueurs de méthylation d'ADN dans les lymphocytes T CD8 circulants corrèlent avec la présence de la maladie [169]. Avec la présence précoce d'une population d'IEL CD8 possédant des caractéristiques de cellules prolifératives et pouvant jouer potentiellement un rôle de progéniteurs d'IEL CD8 inflammatoires. La prochaine étape consistera à isoler cette population et la réinjecter dans des souris receveuses sauvages et voir si elle peut induire la génération d'IEL CD8 pathologiques au niveau des intestins. Ensuite, il faudrait vérifier la présence de cette population dans le sang à des stades qui précédent l'établissement de l'inflammation intestinale, ce qui peut ouvrir la porte vers un nouvel outil de dépistage des MICI.

4.2) Les anti αEβ7 (anti-CD103) dans les MICI, les IELs CD8 comme cibles ?

Les patients atteints de MICI ont généralement une augmentation significative de lymphocytes T activés au niveau de la Lamina Propria et aussi la couche épithéliale. La migration des lymphocytes T au niveau de la Lamina Propria et l'épithélium nécessite l'expression de plusieurs molécules de surface dont les intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha E\beta 7$. Durant les 20 dernières années, les thérapies anti-intégrines ont montré une certaine efficacité dans le traitement des MICI. L'Etrolizumab est un anticorps monoclonal expérimental qui bloque la sous-unité β 7 de l'intégrine α 4 β 7 et α E β 7, est actuellement en cours de développement pour la MC [295]. Chez l'homme comme chez la souris, la plupart des cellules T CD8 intestinales expriment des niveaux élevés de l'intégrine aEB7. Par contre, il existe des différences majeures dans l'expression de l'intégrine $\alpha E\beta7$ entre les cellules CD4 + T humaines et murines [296]. Par exemple, les cellules Treg chez l'Homme ont une expression faible de l'intégrine α E β 7, tandis que chez la souris les Treg intestinaux expriment un niveau élevé de de cette intégrine. Malgré les résultats bénéfiques qu'apportent les traitements ciblant les intégrines dans les MICI, nous n'avons pas encore disséqué tous les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires de ces traitements. Une étude a montré une réduction des lymphocytes T CD4 au niveau des intestins chez les patients atteints de la MC et traités par le Natalizumab (anticorps bloquant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$) [297]. Récemment, une étude a montré que le blocage de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ combiné avec le blocage de l'intégrine $\alpha E\beta 7$ réduit significativement le nombre des lymphocytes T CD8 dans la muqueuse intestinale, plus que le blocage de l'intégrine $\alpha 4\beta7$ seul [296]. De plus, l'Etrolizumab (anticorps bloquant l'intégrine $\alpha E\beta7$) réduit les gènes l'expression de gènes cytotoxiques et inflammatoires dans les IEL CD8 chez les patients atteints de la MC [296]. Ces dernières données ont mis en évidence un rôle sous-estimé de la rétention des lymphocytes T CD8 au niveau de l'épithélium intestinal ainsi que le potentiel thérapeutique que peut amener le blocage de cette rétention. Tout comme chez l'Homme, nous avons identifié un processus préventif assuré par un rôle de SMAD4 indépendant du TGF- β dans les lymphocytes T CD8. Ce rôle préventif de SMAD4, non caractérisé auparavant, prévient l'accumulation et la rétention d'IEL CD8 dans les intestins, afin de prévenir le développement d'inflammation intestinal chronique.

Mes travaux de thèse ont mis en avant un rôle clé de SMAD4 dans les lymphocytes T CD8 dans la prévention des MICI et ouvrent des nouvelles pistes thérapeutiques et de dépistages intéressantes à investiguer.

Références

- A. M. Mowat and W. W. Agace, "Regional specialization within the intestinal immune system," *Nat. Rev. Immunol. 2014* 1410, vol. 14, no. 10, pp. 667–685, Sep. 2014, doi: 10.1038/nri3738.
- [2] Nigam Y et al (2019), "Nigam Y et al (2019) Gastrointestinal tract 4: anatomy and role of the jejunum and ileum. Nursing Times [online]; 115: 9, 43-46."
 https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/gastroenterology/gastrointestinal-tract-4-anatomy-role-jejunum-ileum-19-08-2019/ (accessed Sep. 14, 2021).
- P. M. Treuting, S. M. Dintzis, and K. S. Montine, "Comparative Anatomy and Histology," *Comp. Anat. Histol.*, 2012, doi: 10.1016/C2009-0-61166-1.
- [4] C. AJ, S. LC, and S. S, "Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics," Integr. Biol. (Camb)., vol. 6, no. 3, pp. 243–257, 2014, doi: 10.1039/C3IB40163D.
- J. Schuijers and H. Clevers, "Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins," *EMBO J.*, vol. 31, no. 12, pp. 2685–2696, Jun. 2012, doi: 10.1038/EMBOJ.2012.149.
- K. Kurokawa, Y. Hayakawa, and K. Koike, "Plasticity of Intestinal Epithelium: Stem Cell Niches and Regulatory Signals," *Int. J. Mol. Sci. 2021, Vol. 22, Page 357*, vol. 22, no. 1, p. 357, Dec. 2020, doi: 10.3390/IJMS22010357.
- Y. Wang *et al.*, "Single-cell transcriptome analysis reveals differential nutrient absorption functions in human intestine," *J. Exp. Med.*, vol. 217, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.1084/JEM.20191130.
- [8] M. E. V. Johansson, J. M. H. Larsson, and G. C. Hansson, "The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. Supplement 1, pp. 4659–4665, Mar. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1006451107.
- [9] A. JM *et al.*, "Frontline defenders: goblet cell mediators dictate host-microbe interactions in the intestinal tract during health and disease," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 314, no. 3, pp. G360–G377, Mar. 2018, doi: 10.1152/AJPGI.00181.2017.
- [10] V. S *et al.*, "The antibacterial lectin RegIllgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine," *Science*, vol. 334, no. 6053, pp. 255–258, Oct. 2011, doi: 10.1126/SCIENCE.1209791.
- [11] M. R. Howitt *et al.*, "Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity

in the gut," *Science (80-.).*, vol. 351, no. 6279, pp. 1329–1333, Mar. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAF1648.

- O. CE, S. C, and L. RM, "Tuft Cells-Systemically Dispersed Sensory Epithelia Integrating Immune and Neural Circuitry," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 37, pp. 47–72, Apr. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042718-041505.
- W. JJ, R. F, and G. FM, "Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity," *Mucosal Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–20, Jan. 2018, doi: 10.1038/MI.2017.73.
- M. NA, D. DS, O. H, W. IR, and M. A, "Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium," *Mucosal Immunol.*, vol. 6, no. 4, pp. 666–677, Jul. 2013, doi: 10.1038/MI.2013.30.
- [15] P. SM, E. M, L. P, G. S, and V. EJ, "Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity," *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JUL, 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00415.
- [16] C. Imbratta, M. M. Leblond, H. Bouzourène, D. E. Speiser, D. Velin, and G. Verdeil, "Maf deficiency in T cells dysregulates Treg TH17 balance leading to spontaneous colitis," *Sci. Reports 2019 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42486-2.
- T. L. Denning *et al.*, "Functional Specializations of Intestinal Dendritic Cell and Macrophage Subsets That Control Th17 and Regulatory T Cell Responses Are Dependent on the T Cell/APC Ratio, Source of Mouse Strain, and Regional Localization," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 2, pp. 733–747, Jul. 2011, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1002701.
- C. H, L. F, and M. D, "The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 7, pp. 445–456, Jul. 2011, doi: 10.1038/NRI3007.
- [19] O.-V. D and V. K. L, "Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier," *Trends Immunol.*, vol. 39, no. 4, pp. 264–275, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.IT.2017.11.003.
- [20] P. B. Eckburg *et al.*, "Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora," *Science*, vol. 308, no. 5728, p. 1635, Jun. 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1110591.
- G. SR *et al.*, "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome," *Science*, vol. 312, no. 5778, pp. 1355–1359, Jun. 2006, doi: 10.1126/SCIENCE.1124234.
- [22] J. Qin *et al.*, "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing," *Nat. 2010 4647285*, vol. 464, no. 7285, pp. 59–65, 2010, doi:

10.1038/nature08821.

- [23] C. Tropini, K. A. Earle, K. C. Huang, and J. L. Sonnenburg, "The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function," *Cell Host Microbe*, vol. 21, no. 4, pp. 433–442, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.CHOM.2017.03.010.
- [24] S. AW, "Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines," *Can. J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 4, pp. 241–246, 2002, doi: 10.1155/2002/941087.
- [25] A. K *et al.*, "Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells," *Cell*, vol. 163, no. 2, pp. 367–380, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.08.058.
- [26] L. MS *et al.*, "Endocytosis of commensal antigens by intestinal epithelial cells regulates mucosal T cell homeostasis," *Science*, vol. 363, no. 6431, 2019, doi: 10.1126/SCIENCE.AAT4042.
- [27] M. D. Hu *et al.*, "Epithelial IL-15 Is a Critical Regulator of γδ Intraepithelial Lymphocyte Motility within the Intestinal Mucosa," *J. Immunol.*, vol. 201, no. 2, pp. 747–756, Jul. 2018, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1701603.
- [28] S. C et al., "A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling," Cell, vol. 174, no. 2, pp. 271-284.e14, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.05.014.
- [29] T. Zelante *et al.*, "Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22," *Immunity*, vol. 39, no. 2, pp. 372–385, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.08.003.
- [30] L. CA *et al.*, "Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration," *Nature*, vol. 528, no. 7583, pp. 560–564, Dec. 2015, doi: 10.1038/NATURE16460.
- [31] L. JS *et al.*, "Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability," *Immunity*, vol. 43, no. 4, pp. 727–738, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2015.09.003.
- B. M *et al.*, "T Helper Cell Cytokines Modulate Intestinal Stem Cell Renewal and Differentiation," *Cell*, vol. 175, no. 5, pp. 1307-1320.e22, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.10.008.
- [33] A. Sehgal, D. S. Donaldson, C. Pridans, K. A. Sauter, D. A. Hume, and N. A. Mabbott, "The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche," *Nat. Commun.* 2018 91, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03638-6.
- P. M. Smith *et al.*, "The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis," *Science (80-.).*, vol. 341, no. 6145, pp. 569–573, 2013, doi: 10.1126/SCIENCE.1241165.
- [35] A. K *et al.*, "Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota," *Nature*, vol. 500, no. 7461, pp. 232–236, 2013, doi: 10.1038/NATURE12331.
- [36] A. N *et al.*, "Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory Tcell generation," *Nature*, vol. 504, no. 7480, pp. 451–455, 2013, doi: 10.1038/NATURE12726.
- [37] A. N. Z et al., "A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult," *Immunity*, vol. 50, no. 5, pp. 1276-1288.e5, May 2019, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2019.02.014.
- [38] T. G. Tan *et al.*, "Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 50, pp. E8141–E8150, Dec. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1617460113.
- [39] C.-B. L *et al.*, "Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4 + CD8αα + T cells," *Science*, vol. 357, no. 6353, pp. 806–810, Aug. 2017, doi: 10.1126/SCIENCE.AAH5825.
- [40] G. P and F. LA, "Dining With Inflammatory Bowel Disease: A Review of the Literature on Diet in the Pathogenesis and Management of IBD," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 26, no. 2, pp. 181– 191, Jan. 2020, doi: 10.1093/IBD/IZZ268.
- [41] S. SS, N. F, and M. MD, "A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease," *J. Med. Life*, vol. 12, no. 2, pp. 113–122, Apr. 2019, doi: 10.25122/JML-2018-0075.
- [42] J. L *et al.*, "Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease," *Nature*, vol. 491, no. 7422, pp. 119–124, Nov. 2012, doi: 10.1038/NATURE11582.
- [43] E. D *et al.*, "Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci," *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 5, pp. 510–518, May 2016, doi: 10.1038/NG.3528.
- [44] M. DP, K. S, and C. JH, "Genetics of Inflammatory Bowel Diseases," *Gastroenterology*, vol. 149, no. 5, pp. 1163-1176.e2, Oct. 2015, doi: 10.1053/J.GASTRO.2015.08.001.

- [45] O. Y *et al.*, "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease," *Nature*, vol. 411, no. 6837, pp. 603–606, May 2001, doi: 10.1038/35079114.
- [46] S. Maeda *et al.*, "Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-κB activity and IL-1β processing," *Science (80-.).*, vol. 307, no. 5710, pp. 734–738, Feb. 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1103685.
- [47] M. A *et al.*, "A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3," *Nature*, vol. 506, no. 7489, pp. 456–462, 2014, doi: 10.1038/NATURE13044.
- [48] R. H. Duerr *et al.*, "A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene," *Science*, vol. 314, no. 5804, p. 1461, Dec. 2006, doi: 10.1126/SCIENCE.1135245.
- [49] L. JZ *et al.*, "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 9, pp. 979–986, Aug. 2015, doi: 10.1038/NG.3359.
- P. D, D. S, P.-B. L, N. GK, L. T, and B. S, "Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel
 Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses," *Gastroenterology*, vol. 157, no. 3, pp. 647-659.e4, Sep. 2019, doi: 10.1053/J.GASTRO.2019.04.016.
- [51] D. KT and C. EB, "Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases," Mol. Nutr. Food Res., vol. 61, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1002/MNFR.201600129.
- [52] H. T and O. H, "Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease," J.
 Gastroenterol., vol. 41, no. 1, pp. 10–16, Jan. 2006, doi: 10.1007/S00535-005-1744-3.
- [53] L. A *et al.*, "Dietary Guidance From the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 18, no. 6, pp. 1381–1392, May 2020, doi: 10.1016/J.CGH.2020.01.046.
- [54] P. GC, W. K, and L. JO, "Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect," J. Crohns. Colitis, vol. 8, no. 8, pp. 717–725, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.CROHNS.2014.02.002.
- [55] M. MM *et al.*, "Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 9, pp. 5425–5435, Nov. 2010, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1001603.
- [56] B. JL *et al.*, "Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 18, no. 6, pp. 1092–1100, Jun. 2012,

doi: 10.1002/IBD.21864.

- [57] W. AW *et al.*, "High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease," *BMC Microbiol.*, vol. 11, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-7.
- [58] C. Manichanh *et al.*, "Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach," *Gut*, vol. 55, no. 2, p. 205, Feb. 2006, doi: 10.1136/GUT.2005.073817.
- [59] S. P *et al.*, "Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon," *Gut*, vol. 52, no. 2, pp. 237–242, Feb. 2003, doi: 10.1136/GUT.52.2.237.
- [60] B. DC and C. SR, "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology," *Lancet (London, England)*, vol. 369, no. 9573, pp. 1627–1640, May 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60750-8.
- [61] S. H et al., "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 105, no. 43, pp. 16731–16736, Oct. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0804812105.
- [62] Z. T and N. SC, "The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.02247.
- [63] B. SM *et al.*, "Commensal Bacteroides species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease," *Cell Host Microbe*, vol. 9, no. 5, pp. 390– 403, May 2011, doi: 10.1016/J.CHOM.2011.04.009.
- [64] D. Zheng, T. Liwinski, and E. Elinav, "Interaction between microbiota and immunity in health and disease," *Cell Res. 2020 306*, vol. 30, no. 6, pp. 492–506, May 2020, doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.
- [65] B. Y and H. OJ, "Homeostatic Immunity and the Microbiota," *Immunity*, vol. 46, no. 4, pp. 562– 576, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2017.04.008.
- [66] P. LW and A. D, "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 3, pp. 141–153, Mar. 2014, doi: 10.1038/NRI3608.
- [67] L. G. van der Flier and H. Clevers, "Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium," http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145, vol. 71, pp.

241–260, Feb. 2009, doi: 10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.010908.163145.

- [68] V. der S. M *et al.*, "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 1, pp. 117–129, 2006, doi: 10.1053/J.GASTRO.2006.04.020.
- [69] S. NH, U. MA, and B. CL, "Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa," *Semin. Immunol.*, vol. 19, no. 2, pp. 70–83, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.SMIM.2007.04.002.
- [70] J. Wehkamp and E. F. Stange, "An Update Review on the Paneth Cell as Key to Ileal Crohn's Disease," *Front. Immunol.*, vol. 0, p. 646, Apr. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.00646.
- [71] T. Fritz, L. Niederreiter, T. Adolph, R. S. Blumberg, and A. Kaser, "Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge," *Gut*, vol. 60, no. 11, p. 1580, Nov. 2011, doi: 10.1136/GUT.2009.206466.
- [72] G. Tan *et al.*, "Down-Regulation of Human Enteric Antimicrobial Peptides by NOD2 during Differentiation of the Paneth Cell Lineage," *Sci. Reports 2015 51*, vol. 5, no. 1, pp. 1–6, Feb. 2015, doi: 10.1038/srep08383.
- [73] G. Q, "A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease," J. Immunol. Res., vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/7247238.
- [74] S. AM *et al.*, "Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 9, pp. 1883–1897, Aug. 2009, doi: 10.1084/JEM.20091233.
- [75] N. Kamada *et al.*, "Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-γ axis," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 6, pp. 2269–2280, Jun. 2008, doi: 10.1172/JCI34610.
- [76] B. E. Berndt, M. Zhang, G.-H. Chen, G. B. Huffnagle, and J. Y. Kao, "The Role of Dendritic Cells in the Development of Acute Dextran Sulfate Sodium Colitis," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 9, pp. 6255–6262, Nov. 2007, doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.9.6255.
- [77] H. AL *et al.*, "Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases," *Gastroenterology*, vol. 129, no. 1, pp. 50–65, 2005, doi: 10.1053/J.GASTRO.2005.05.013.
- [78] D. G. Pellicci, H.-F. Koay, and S. P. Berzins, "Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge," *Nat. Rev. Immunol. 2020 2012*, vol. 20, no.

12, pp. 756–770, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0345-y.

- [79] A. J. Tyznik, S. Verma, Q. Wang, M. Kronenberg, and C. A. Benedict, "Distinct Requirements for Activation of NKT and NK Cells during Viral Infection," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 8, pp. 3676– 3685, Apr. 2014, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1300837.
- [80] F. IJ *et al.*, "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 10, pp. 1490–1497, 2004, doi: 10.1172/JCI19836.
- [81] M. CL and W. CT, "Intestinal effector T cells in health and disease," *Immunity*, vol. 31, no. 3, pp. 389–400, Sep. 2009, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.08.012.
- [82] P. F, L. MW, M. S, M. S, C. LB, and C. RL, "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells," *Immunity*, vol. 1, no. 7, pp. 553–562, 1994, doi: 10.1016/1074-7613(94)90045-0.
- [83] S. SJ *et al.*, "T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 187, no. 8, pp. 1225–1234, Apr. 1998, doi: 10.1084/JEM.187.8.1225.
- [84] M. F. Neurath *et al.*, "The Transcription Factor T-bet Regulates Mucosal T Cell Activation in Experimental Colitis and Crohn's Disease," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 9, p. 1129, May 2002, doi: 10.1084/JEM.20011956.
- [85] N. P et al., "Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways," *Immunity*, vol. 32, no. 3, pp. 392–402, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2010.03.001.
- [86] A. R. B. M. Muzaki *et al.*, "Intestinal CD103+CD11b- dendritic cells restrain colitis via IFN-γ-induced anti-inflammatory response in epithelial cells," *Mucosal Immunol. 2016 92*, vol. 9, no. 2, pp. 336–351, Jul. 2015, doi: 10.1038/mi.2015.64.
- [87] R. Gonsky, R. L. Deem, C. J. Landers, T. Haritunians, S. Yang, and S. R. Targan, "IFNG rs1861494
 Polymorphism is Associated with IBD Disease Severity and Functional Changes in both IFNG
 Methylation and Protein Secretion," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 20, no. 10, p. 1794, Oct. 2014, doi: 10.1097/MIB.0000000000172.
- [88] M. CM *et al.*, "Association of signal transducer and activator of transcription 4 genetic variants with extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease," *Life Sci.*, vol. 86, no. 17–

18, pp. 661–667, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.LFS.2010.02.016.

- [89] K. Soderquest *et al.*, "Genetic variants alter T-bet binding and gene expression in mucosal inflammatory disease," *PLOS Genet.*, vol. 13, no. 2, p. e1006587, Feb. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1006587.
- [90] S. A, W. S, and N. R, "T helper 2 and T follicular helper cells: Regulation and function of interleukin-4.," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 30, pp. 29–37, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2016.03.011.
- [91] M. Khn, F. Dimitriou, and U. C. Steiner, "Réponse immunitaire TH2: signification et influence thérapeutique," Forum Médical Suisse – Swiss Med. Forum, Jan. 2021, doi: 10.4414/FMS.2021.08619.
- [92] L. J et al., "Profiles of Lamina Propria T Helper Cell Subsets Discriminate Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 22, no. 8, pp. 1779–1792, May 2016, doi: 10.1097/MIB.00000000000811.
- [93] M. A, M. E, and B. AK, "The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice," *Gastroenterology*, vol. 116, no. 2, pp. 320–326, 1999, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70128-9.
- [94] M. Boirivant, I. J. Fuss, A. Chu, and W. Strober, "Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4," J. Exp. Med., vol. 188, no. 10, pp. 1929–1939, Nov. 1998, doi: 10.1084/JEM.188.10.1929.
- [95] I. J. Fuss *et al.*, "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFNgamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5.," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 3, 1996.
- [96] R. W *et al.*, "Anrukinzumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study," *Gut*, vol. 64, no. 6, pp. 894–900, Jun. 2015, doi: 10.1136/GUTJNL-2014-308337.
- [97] P. V *et al.*, "Rectal Delivery of a DNAzyme That Specifically Blocks the Transcription Factor GATA3 and Reduces Colitis in Mice," *Gastroenterology*, vol. 152, no. 1, pp. 176-192.e5, Jan. 2017, doi: 10.1053/J.GASTRO.2016.09.005.
- [98] "Efficacy, Pharmacokinetics, Tolerability, Safety of SB012 Intrarectally Applied in Active Ulcerative Colitis Patients - No Study Results Posted - ClinicalTrials.gov."

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02129439 (accessed Sep. 14, 2021).

- [99] S. J et al., "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. 437–445, Apr. 2008, doi: 10.1002/IBD.20339.
- [100] H. G and B. S, "Th17 Cells in Inflammatory Bowel Disease: An Update for the Clinician," Inflamm. Bowel Dis., vol. 26, no. 5, pp. 653–661, Apr. 2020, doi: 10.1093/IBD/IZZ316.
- [101] X. O. Yang *et al.*, "Regulation of inflammatory responses by IL-17F," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 5, p. 1063, May 2008, doi: 10.1084/JEM.20071978.
- [102] H. W et al., "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, vol. 61, no. 12, pp. 1693–1700, Dec. 2012, doi: 10.1136/GUTJNL-2011-301668.
- [103] V. F *et al.*, "The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells," *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 758–766, 2014, doi: 10.1038/NI.2925.
- [104] W. B and N. MF, "Th9 cells in inflammatory bowel diseases," *Semin. Immunopathol.*, vol. 39, no. 1, pp. 89–95, Jan. 2017, doi: 10.1007/S00281-016-0603-Z.
- [105] K. Gerlach *et al.*, "TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell–mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells," *Nat. Immunol. 2014 157*, vol. 15, no. 7, pp. 676–686, Jun. 2014, doi: 10.1038/ni.2920.
- [106] G. K, M. AN, N. MF, and W. B, "IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cellmediated colitis," *Tissue barriers*, vol. 3, no. 1–2, 2015, doi: 10.4161/21688370.2014.983777.
- [107] F. EE *et al.*, "IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 897–913, Apr. 2008, doi: 10.1084/JEM.20071046.
- [108] K. MH, "Th9 cells: differentiation and disease," *Immunol. Rev.*, vol. 252, no. 1, pp. 104–115, Mar. 2013, doi: 10.1111/IMR.12028.
- [109] D. Shevyrev and V. Tereshchenko, "Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis," Front. Immunol., vol. 0, p. 3100, Jan. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2019.03100.
- [110] M. J et al., "Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 7, pp. 1868–1878, 2005, doi:

10.1053/J.GASTRO.2005.03.043.

- [111] C. Asseman, S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie, "An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation," J. Exp. Med., vol. 190, no. 7, pp. 995–1004, Oct. 1999, doi: 10.1084/JEM.190.7.995.
- [112] R. YP *et al.*, "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces," *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 546–558, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2008.02.017.
- [113] N. C et al., "c-Maf-dependent T reg cell control of intestinal T H 17 cells and IgA establishes host-microbiota homeostasis," Nat. Immunol., vol. 20, no. 4, pp. 471–481, Apr. 2019, doi: 10.1038/S41590-019-0316-2.
- [114] N. MF, "Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease," Nat. Immunol., vol. 20, no. 8, pp. 970–979, Aug. 2019, doi: 10.1038/S41590-019-0415-0.
- [115] L. MO, S. S, and F. RA, "Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms," *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 455–471, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2006.07.011.
- [116] M. JC, L. D, and R. AY, "Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor," *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 441–454, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2006.07.012.
- [117] L. MO, W. YY, and F. RA, "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation," *Immunity*, vol. 26, no. 5, pp. 579– 591, May 2007, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2007.03.014.
- [118] W. JJ *et al.*, "Integrin αvβ8-Mediated TGF-β Activation by Effector Regulatory T Cells Is
 Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation," *Immunity*, vol. 42, no. 5, pp. 903–915, May 2015, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2015.04.012.
- [119] K. K, Q. SW, Y. M, B. K, L. WI, and B. RS, "An FcRn-dependent role for anti-flagellin immunoglobulin G in pathogenesis of colitis in mice," *Gastroenterology*, vol. 137, no. 5, 2009, doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.07.059.
- [120] M. JC et al., "Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy," Cell, vol. 178, no. 6, pp. 1493-1508.e20, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.CELL.2019.08.008.

- [121] T. K and J. SC, "Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels," J. Exp. Med., vol. 206, no. 10, pp. 2253–2269, Sep. 2009, doi: 10.1084/JEM.20082553.
- [122] C. CM *et al.*, "Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration," *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 299–302, Jul. 2006, doi: 10.1038/NATURE04882.
- W. Ouyang, O. Beckett, R. A. Flavell, and M. O. Li, "An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance," *Immunity*, vol. 30, no. 3, p. 358, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.02.003.
- [124] G. B. MR *et al.*, "T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 11, pp. 2991–2999, Nov. 2009, doi: 10.1002/EJI.200939427.
- [125] E. MA *et al.*, "VISTA is a checkpoint regulator for naïve T cell quiescence and peripheral tolerance," *Science*, vol. 367, no. 6475, Jan. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.AAY0524.
- [126] S. Girel, "Modélisation de la Réponse Immunitaire T-CD8 : Analyse Mathématique et Modèles Multiéchelles," Nov. 2018, Accessed: Sep. 14, 2021. [Online]. Available: https://hal.archivesouvertes.fr/tel-01941850.
- [127] G. GF, R. Z, and B. JI, "Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors
 CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands," *Trends Immunol.*, vol. 23, no. 8, pp. 408–413, Aug. 2002, doi: 10.1016/S1471-4906(02)02282-2.
- [128] S. A et al., "Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice," Science, vol. 261, no. 5121, pp. 609–612, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.7688139.
- [129] E. M. Bertram, P. Lau, and T. H. Watts, "Temporal Segregation of 4-1BB Versus CD28-Mediated Costimulation: 4-1BB Ligand Influences T Cell Numbers Late in the Primary Response and Regulates the Size of the T Cell Memory Response Following Influenza Infection," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 8, pp. 3777–3785, Apr. 2002, doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.8.3777.
- [130] G. JM, K. V, K. SL, and S. AS, "Coordinate regulation of T cell activation by CD2 and CD28," J. Immunol., vol. 164, no. 7, pp. 3591–3595, Apr. 2000, doi: 10.4049/JIMMUNOL.164.7.3591.
- [131] H. J, G. LA, T. K, van L. RA, S. TN, and B. J, "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity," *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 5, pp. 433–440, 2000, doi: 10.1038/80877.

- [132] C. L and F. DB, "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition," Nat. Rev. Immunol., vol. 13, no. 4, pp. 227–242, Apr. 2013, doi: 10.1038/NRI3405.
- [133] Z. M *et al.*, "Molecular mechanisms of programmed cell death-1 dependent T cell suppression: relevance for immunotherapy," *Ann. Transl. Med.*, vol. 5, no. 19, pp. 1–9, Oct. 2017, doi: 10.21037/ATM.2017.06.11.
- [134] K. GA, T. S, T. LJ, S. J, and M.-K. K, "Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection," *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 5, pp. 637–650, Sep. 2005, doi: 10.1084/JEM.20050821.
- [135] J. J. Obar and L. Lefrançois, "Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation," Int. Immunol., vol. 22, no. 8, pp. 619–625, Aug. 2010, doi: 10.1093/INTIMM/DXQ053.
- [136] J. SC and M. D, "Understanding Subset Diversity in T Cell Memory," *Immunity*, vol. 48, no. 2, pp. 214–226, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2018.02.010.
- [137] D. RW, B. LM, and S. SL, "T cell memory," Annu. Rev. Immunol., vol. 16, pp. 201–223, 1998, doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.16.1.201.
- [138] S. KS, K. WC, J. SC, and L. L, "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo," *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 5, pp. 426–432, 2000, doi: 10.1038/80868.
- [139] K. SM, T. JT, W. EJ, K. BT, S. CD, and A. R, "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1191–1198, Dec. 2003, doi: 10.1038/NI1009.
- [140] J. NS *et al.*, "Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor," *Immunity*, vol. 27, no. 2, pp. 281–295, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2007.07.010.
- [141] T. W. Hand, M. Morre, and S. M. Kaech, "Expression of IL-7 receptor α is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 28, pp. 11730–11735, Jul. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0705007104.
- [142] S. Sarkar, V. Kalia, W. N. Haining, B. T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed, "Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates," J. Exp. Med., vol. 205, no. 3, pp. 625–640, Mar. 2008, doi: 10.1084/JEM.20071641.
- [143] H. JS, J. X, B.-R. J, X. HH, L. WJ, and H. JT, "Constitutive expression of IL-7 receptor alpha does not support increased expansion or prevent contraction of antigen-specific CD4 or CD8 T cells

following Listeria monocytogenes infection," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 5, pp. 2855–2862, Mar. 2008, doi: 10.4049/JIMMUNOL.180.5.2855.

- [144] Y. Y, B. FM, K. V, and S. S, "Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 400–408, Jul. 2015, doi: 10.1038/CMI.2014.48.
- Y. S *et al.*, "Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation," *Immunity*, vol. 39, no. 5, pp. 833–845, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.10.007.
- [146] K. M et al., "The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells," Nat. Immunol., vol. 15, no. 4, pp. 373–383, 2014, doi: 10.1038/NI.2834.
- [147] J. Godec *et al.*, "Inducible RNAi in vivo reveals that the transcription factor BATF is required to initiate but not maintain CD8+ T-cell effector differentiation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 2, pp. 512–517, Jan. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1413291112.
- W. D *et al.*, "The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation," *Immunity*, vol. 48, no. 4, pp. 659-674.e6, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2018.03.028.
- [149] F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions," *Nat. 1999 4026763*, vol. 402, no. 6763, pp. 34–38, Dec. 1999, doi: 10.1038/35005534.
- [150] Y. CY *et al.*, "The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1221–1229, Dec. 2011, doi: 10.1038/NI.2158.
- [151] I. AM et al., "Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin," Nat. Immunol., vol. 6, no. 12, pp. 1236–1244, Dec. 2005, doi: 10.1038/NI1268.
- [152] R. RL *et al.*, "Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties," *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 296–308, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.05.014.
- [153] W. EJ et al., "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets," Nat. Immunol., vol. 4, no. 3, pp. 225–234, Mar. 2003, doi: 10.1038/NI889.

- [154] H. KM, K. M, S. C, S. M, W. H, and B. DH, "Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1453–1464, Jun. 2006, doi: 10.1002/EJI.200635874.
- [155] G. C *et al.*, "The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis," *Immunity*, vol. 45, no. 6, pp. 1270–1284, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.10.018.
- [156] J. Niessl *et al.*, "Identification of resident memory CD8+ T cells with functional specificity for SARS-CoV-2 in unexposed oropharyngeal lymphoid tissue," *Sci. Immunol.*, Sep. 2021, doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABK0894.
- [157] M. D and S. JM, "The integration of T cell migration, differentiation and function," Nat. Rev. Immunol., vol. 13, no. 5, pp. 309–320, May 2013, doi: 10.1038/NRI3442.
- [158] W. T *et al.*, "Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 95, no. 2, pp. 215–224, Feb. 2014, doi: 10.1189/JLB.0313180.
- [159] M. LK et al., "The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin," Nat. Immunol., vol. 14, no. 12, pp. 1294–1301, Dec. 2013, doi: 10.1038/NI.2744.
- [160] R. SJ et al., "The collagen binding alpha1beta1 integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous influenza infection," *Immunity*, vol. 20, no. 2, pp. 167–179, 2004, doi: 10.1016/S1074-7613(04)00021-4.
- [161] L. K. Mackay *et al.*, "Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention," *J. Immunol.*, vol. 194, no. 5, pp. 2059–2063, Mar. 2015, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1402256.
- B. Slütter, L. L. Pewe, P. Lauer, and J. T. Harty, "Cutting Edge: Rapid Boosting of Cross-Reactive Memory CD8 T Cells Broadens the Protective Capacity of the Flumist Vaccine," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 8, pp. 3854–3858, Apr. 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1202790.
- [163] M. LK *et al.*, "Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes," *Science*, vol. 352, no. 6284, pp. 459–463, Apr. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAD2035.
- [164] S. CN, L. JY, A. KG, M. D, H. KA, and J. SC, "Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 12, pp. 1285–1293, Dec. 2013, doi: 10.1038/NI.2745.

- [165] M. LK *et al.*, "T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate," *Immunity*, vol. 43, no. 6, pp. 1101–1111, 2015, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2015.11.008.
- [166] M. SR, W. JJ, W. H, and K. JE, "Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN-γ Production," J. Immunol., vol. 195, no. 1, pp. 203–209, Jul. 2015, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1402975.
- [167] D. Q, L. Y, C. C, W. H, D. Y, and X. R, "The Emerging Epigenetic Role of CD8+T Cells in Autoimmune Diseases: A Systematic Review," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. APR, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00856.
- [168] J. C. Lee *et al.*, "Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 10, pp. 4170–4179, Oct. 2011, doi: 10.1172/JCI59255.
- [169] G. M *et al.*, "Transcription and DNA Methylation Patterns of Blood-Derived CD8 + T Cells Are Associated With Age and Inflammatory Bowel Disease But Do Not Predict Prognosis," *Gastroenterology*, vol. 160, no. 1, pp. 232-244.e7, Jan. 2021, doi: 10.1053/J.GASTRO.2020.08.017.
- P. CO and K. TS, "The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 688–697, Jul. 2015, doi: 10.1038/NM.3883.
- [171] C. S *et al.*, "CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8 + T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin," *Immunity*, vol. 46, no. 2, pp. 287–300, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2017.01.009.
- [172] M. B, M. G, and C.-B. N, "Celiac disease: an immunological jigsaw," *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 907–919, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.06.006.
- [173] M. Allez *et al.*, "T cell clonal expansions in ileal Crohn's disease are associated with smoking behaviour and postoperative recurrence," *Gut*, vol. 68, no. 11, pp. 1961–1970, Nov. 2019, doi: 10.1136/GUTJNL-2018-317878.
- [174] D. Corridoni *et al.*, "Single-cell atlas of colonic CD8+ T cells in ulcerative colitis," *Nat. Med.* 2020 269, vol. 26, no. 9, pp. 1480–1490, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-1003-4.
- [175] C. J. David and J. Massagué, "Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018 197*, vol. 19, no. 7, pp. 419–435, Apr.

2018, doi: 10.1038/s41580-018-0007-0.

- [176] T. MA and S. D, "TGF-β activation and function in immunity," Annu. Rev. Immunol., vol. 32, pp. 51–82, 2014, doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120257.
- [177] S. M *et al.*, "Latent TGF-β structure and activation," *Nature*, vol. 474, no. 7351, pp. 343–351, Jun. 2011, doi: 10.1038/NATURE10152.
- [178] D. Q. Tran, J. Andersson, R. Wang, H. Ramsey, D. Unutmaz, and E. M. Shevach, "GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-β on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 32, pp. 13445–13450, Aug. 2009, doi: 10.1073/PNAS.0901944106.
- [179] T. Oida and H. L. Weiner, "TGF-β Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e15523, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0015523.
- [180] W. R, Z. J, D. X, S. M, L. C, and S. TA, "GARP regulates the bioavailability and activation of TGFβ," *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 1129–1139, Mar. 2012, doi: 10.1091/MBC.E11-12-1018.
- [181] J. P. Edwards, H. Fujii, A. X. Zhou, J. Creemers, D. Unutmaz, and E. M. Shevach, "Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF-β1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation," J. Immunol., vol. 190, no. 11, pp. 5506–5515, May 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1300199.
- [182] R. IB and R. DB, "Regulation of the Bioavailability of TGF-β and TGF-β-Related Proteins," Cold Spring Harb. Perspect. Biol., vol. 8, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A021907.
- [183] H. XZ et al., "Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin," J. Cell Biol., vol. 133, no. 4, pp. 921– 928, 1996, doi: 10.1083/JCB.133.4.921.
- [184] M. JS *et al.*, "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis," *Cell*, vol. 96, no. 3, pp. 319–328, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80545-0.
- [185] M. D et al., "The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMPdependent activation of TGF-beta1," J. Cell Biol., vol. 157, no. 3, pp. 493–507, Apr. 2002, doi: 10.1083/JCB.200109100.

- [186] J. Zhu, K. Motejlek, D. Wang, K. Zang, A. Schmidt, and L. F. Reichardt, "β8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos," *Development*, vol. 129, no. 12, p. 2891, 2002, Accessed: Sep. 15, 2021. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC2710098/.
- [187] C. A and B. AN, "Structural Basis of Intracellular TGF-β Signaling: Receptors and Smads," Cold Spring Harb. Perspect. Biol., vol. 8, no. 11, Nov. 2016, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022111.
- [188] H. AP, M. TD, and S. TA, "Structural Biology and Evolution of the TGF-β Family," Cold Spring Harb. Perspect. Biol., vol. 8, no. 12, 2016, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022103.
- [189] D. C. G, P. PL, D. Y, and O.-M. MD, "Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding," J. Mol. Biol., vol. 328, no. 5, pp. 1173–1183, May 2003, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00360-7.
- [190] M. J, "TGF-beta signal transduction," Annu. Rev. Biochem., vol. 67, pp. 753–791, 1998, doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.753.
- [191] S. Y and M. J, "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus," *Cell*, vol. 113, no. 6, pp. 685–700, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
- [192] J. Massagué, J. Seoane, and D. Wotton, "Smad transcription factors," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 23, pp. 2783–2810, Dec. 2005, doi: 10.1101/GAD.1350705.
- [193] C. BM et al., "Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling," Mol. Cell, vol. 15, no. 5, pp. 813–823, Sep. 2004, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2004.07.016.
- [194] C.-H. Heldin and A. Moustakas, "Signaling Receptors for TGF-β Family Members," Cold Spring Harb. Perspect. Biol., vol. 8, no. 8, p. a022053, Aug. 2016, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022053.
- [195] M. AC *et al.*, "Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-β signaling," *Cell*, vol. 147, no. 3, pp. 565–576, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.08.050.
- [196] Y. Zhang, X.-H. Feng, and R. Derynck, "Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-β-induced transcription," *Nat. 1998 3946696*, vol. 394, no. 6696, pp. 909–913, Aug. 1998, doi: 10.1038/29814.
- [197] K. Y, C. CR, and M. J, "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells," *Mol. Cell*, vol. 11,

no. 4, pp. 915–926, Apr. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00109-6.

- [198] C. M et al., "Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation," Science, vol. 315, no. 5813, pp. 840–843, Feb. 2007, doi: 10.1126/SCIENCE.1135961.
- [199] X.-H. Feng, Y. Zhang, R.-Y. Wu, and R. Derynck, "The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGF-β-induced transcriptional activation," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 14, p. 2153, Jul. 1998, doi: 10.1101/GAD.12.14.2153.
- [200] R. Janknecht, N. J. Wells, and T. Hunter, "TGF-β-stimulated cooperation of Smad proteins with the coactivators CBP/p300," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 14, p. 2114, Jul. 1998, doi: 10.1101/GAD.12.14.2114.
- [201] P. C, J. L, and M. J, "Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP," J. Biol. Chem., vol. 273, no. 36, pp. 22865–22868, Sep. 1998, doi: 10.1074/JBC.273.36.22865.
- [202] de C. MP, P. E, and R. AB, "Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer," J.
 Natl. Cancer Inst., vol. 92, no. 17, pp. 1388–1402, Sep. 2000, doi: 10.1093/JNCI/92.17.1388.
- [203] K. Kahata *et al.*, "Regulation of transforming growth factor-β and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5," *Genes to Cells*, vol. 9, no. 2, pp. 143–151, Feb. 2004, doi: 10.1111/J.1365-2443.2004.00706.X.
- [204] S. Ross, E. Cheung, T. G. Petrakis, M. Howell, W. L. Kraus, and C. S. Hill, "Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription," *EMBO J.*, vol. 25, no. 19, p. 4490, Oct. 2006, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601332.
- [205] C. CR, K. Y, S. PM, and M. J, "E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression," *Cell*, vol. 110, no. 1, pp. 19–32, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00801-2.
- [206] W. Y *et al.*, "Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor-β-Smad pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 41, pp. 35456–35465, Oct. 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.236794.
- [207] L. RS, W. D, and M. J, "Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF," *EMBO J.*, vol. 20, no. 1–2, pp. 128–136, Jan. 2001, doi: 10.1093/EMBOJ/20.1.128.

- [208] L. K, "Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 14, no. 1, pp. 65–70, 2004, doi: 10.1016/J.GDE.2003.11.003.
- [209] K. Luo *et al.*, "The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFβ signaling," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 17, p. 2196, Sep. 1999, doi: 10.1101/GAD.13.17.2196.
- [210] C. SB, N. R, and S. E, "A domain necessary for the transforming activity of SnoN is required for specific DNA binding, transcriptional repression and interaction with TAF(II)110," *Oncogene*, vol. 17, no. 19, pp. 2505–2513, Nov. 1998, doi: 10.1038/SJ.ONC.1202177.
- [211] Z. YE, "Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022129.
- [212] D. R, M. BP, and S. KY, "Signaling pathway cooperation in TGF-β-induced epithelialmesenchymal transition," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 31, pp. 56–66, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.CEB.2014.09.001.
- [213] X. Yan, X. Xiong, and Y.-G. Chen, "Feedback regulation of TGF-β signaling," Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)., vol. 50, no. 1, pp. 37–50, Jan. 2018, doi: 10.1093/ABBS/GMX129.
- [214] S. S, O. SA, and L. MO, "Regulation of the Immune Response by TGF-β: From Conception to Autoimmunity and Infection," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A022236.
- [215] Z. N and B. MJ, "TGF-β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 7, pp. 667–673, Jul. 2012, doi: 10.1038/NI.2319.
- [216] M. J. McCarron, M. Irla, A. Sergé, S. M. Soudja, and J. C. Marie, "Transforming Growth Factor-beta signaling in αβ thymocytes promotes negative selection," *Nat. Commun. 2019 101*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-13456-z.
- [217] P. JH *et al.*, "Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 257–264, Mar. 2010, doi: 10.1038/NI.1840.
- [218] O. W, O. SA, M. Q, B. MR, Z. J, and L. MO, "TGF-β cytokine signaling promotes CD8+ T cell development and low-affinity CD4+ T cell homeostasis by regulation of interleukin-7 receptor α expression," *Immunity*, vol. 39, no. 2, pp. 335–346, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.07.016.
- [219] L. Y, Z. P, L. J, K. AB, P. S, and C. W, "A critical function for TGF-beta signaling in the

development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 632–640, Jun. 2008, doi: 10.1038/NI.1607.

- [220] M. T *et al.*, "Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNAbinding inhibitor Id3," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 86–95, Jan. 2011, doi: 10.1038/NI.1965.
- [221] D. JM *et al.*, "iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 6, pp. 1365–1378, Jun. 2009, doi: 10.1084/JEM.20090127.
- [222] T. DA and M. J, "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 369–380, 2005, doi: 10.1016/J.CCR.2005.10.012.
- [223] L. Gorelik, P. E. Fields, and R. A. Flavell, "Cutting Edge: TGF-β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 9, pp. 4773–4777, Nov. 2000, doi: 10.4049/JIMMUNOL.165.9.4773.
- [224] L. Gorelik, S. Constant, and R. A. Flavell, "Mechanism of Transforming Growth Factor β– induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation," J. Exp. Med., vol. 195, no. 11, p. 1499, Jun. 2002, doi: 10.1084/JEM.20012076.
- [225] C. W et al., "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3," J. Exp. Med., vol. 198, no. 12, pp. 1875–1886, Dec. 2003, doi: 10.1084/JEM.20030152.
- [226] B. E *et al.*, "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells," *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 235–238, May 2006, doi: 10.1038/NATURE04753.
- [227] V. M, H. RJ, A. CJ, L. RM, and S. B, "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells," *Immunity*, vol. 24, no. 2, pp. 179– 189, Feb. 2006, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2006.01.001.
- [228] D. V et al., "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells," Nat. Immunol., vol. 9, no. 12, pp. 1347–1355, 2008, doi: 10.1038/NI.1677.
- [229] L.-L. P et al., "Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection," Immunity, vol. 39, no. 4, pp. 744–757, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.07.020.

- [230] S. S, M. MM, and F. RA, "Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells," *Immunity*, vol. 31, no. 1, pp. 131–144, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.04.020.
- [231] R. El-Asady *et al.*, "TGF-β–dependent CD103 expression by CD8+ T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 10, p. 1647, May 2005, doi: 10.1084/JEM.20041044.
- [232] K. SG, P. J, C. JY, U. B, and K. CH, "Complementary roles of retinoic acid and TGF-β1 in coordinated expression of mucosal integrins by T cells," *Mucosal Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 66–82, Jan. 2011, doi: 10.1038/MI.2010.42.
- [233] Z. N and B. MJ, "Transforming growth factor-β signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention," *Immunity*, vol. 39, no. 4, pp. 687–696, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.08.019.
- [234] S. N. Christo *et al.*, "Discrete tissue microenvironments instruct diversity in resident memory T cell function and plasticity," *Nat. Immunol. 2021 229*, vol. 22, no. 9, pp. 1140–1151, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41590-021-01004-1.
- [235] G. Monteleone *et al.*, "Phase I Clinical Trial of Smad7 Knockdown Using Antisense
 Oligonucleotide in Patients With Active Crohn's Disease," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 4, p. 870, 2012, doi: 10.1038/MT.2011.290.
- [236] B. MW, R. G, and P. DK, "Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 110, no. 4, pp. 975–984, 1996, doi: 10.1053/GAST.1996.V110.PM8613031.
- [237] H. JR *et al.*, "Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis," *Science*, vol. 280, no.
 5366, pp. 1086–1088, May 1998, doi: 10.1126/SCIENCE.280.5366.1086.
- [238] J. N. Hahn, V. G. Falck, and F. R. Jirik, "Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice," J. Clin. Invest., vol. 121, no. 10, pp. 4030–4042, Oct. 2011, doi: 10.1172/JCI45114.
- [239] K. BG et al., "Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer," Nature, vol. 441, no. 7096, pp. 1015–1019, Jun. 2006, doi: 10.1038/NATURE04846.
- [240] I. H et al., "Disruption of Smad4 expression in T cells leads to IgA nephropathy-like manifestations," PLoS One, vol. 8, no. 11, Nov. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0078736.

- [241] I. S, H. Y, and K. K, "TGF-β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota," *J. Gastroenterol.*, vol. 52, no. 7, pp. 777–787, Jul. 2017, doi: 10.1007/S00535-017-1350-1.
- [242] D. S et al., "Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase," Cell, vol. 121, no. 1, pp. 87–99, Apr. 2005, doi: 10.1016/J.CELL.2005.01.033.
- [243] D. S *et al.*, "FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination," *Cell*, vol. 136, no. 1, pp. 123–135, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2008.10.051.
- [244] A. E, R. RA, G. T, D. S, and H. CS, "Recruitment of TIF1γ to chromatin via its PHD fingerbromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities," *Mol. Cell*, vol. 43, no. 1, pp. 85–96, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2011.05.020.
- [245] W. He, D. C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. S. Moore, and J. Massagué,
 "Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1γ and Smad4 Branches of the TGFβ Pathway," *Cell*,
 vol. 125, no. 5, pp. 929–941, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.CELL.2006.03.045.
- [246] S. Zhang *et al.*, "Reversing SKI–SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation," *Nat. 2017 5517678*, vol. 551, no. 7678, pp. 105–109, Oct. 2017, doi: 10.1038/nature24283.
- [247] G. AD, Z. S, W. Y, X. H, C. TA, and W. YY, "A critical role for transcription factor Smad4 in T cell function that is independent of transforming growth factor β receptor signaling," *Immunity*, vol. 42, no. 1, pp. 68–79, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.12.019.
- [248] C. VS *et al.*, "SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing noncanonical TGF-β signaling," *Nat. Immunol.*, vol. 18, no. 9, pp. 995–1003, Aug. 2017, doi: 10.1038/NI.3809.
- [249] X. Wang *et al.*, "Febrile Temperature Critically Controls the Differentiation and Pathogenicity of T Helper 17 Cells," *Immunity*, vol. 52, no. 2, pp. 328-341.e5, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2020.01.006.
- [250] L. de F. Caldeira, H. H. Borba, F. S. Tonin, A. Wiens, F. Fernandez-Llimos, and R. Pontarolo, "Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease patients: A systematic review and meta-analysis," *PLoS One*, vol. 15, no. 9, p. e0238910, Sep. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0238910.
- [251] K. Hazel and A. O'Connor, "Emerging treatments for inflammatory bowel disease:,"

https://doi.org/10.1177/2040622319899297, vol. 11, Feb. 2020, doi: 10.1177/2040622319899297.

- [252] C.-O. KO, C. KE, F. FA, and C. RK, "A State-of-the-Art Review of New and Emerging Therapies for the Treatment of IBD," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 25, no. 5, pp. 820–830, Apr. 2019, doi: 10.1093/IBD/IZY327.
- [253] M. G. Laukoetter, P. Nava, and A. Nusrat, "Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease.," World J. Gastroenterol., vol. 14, no. 3, pp. 401–7, Jan. 2008.
- [254] M. Lee and E. B. Chang, "Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues," *Gastroenterology*, vol. 160, no. 2, pp. 524–537, Jan. 2021, doi: 10.1053/j.gastro.2020.09.056.
- [255] J. A. Barnard, G. J. Warwick, and L. I. Gold, "Localization of transforming growth factor β isoforms in the normal murine small intestine and colon," *Gastroenterology*, 1993, doi: 10.1016/0016-5085(93)90011-Z.
- [256] M. O. Li and R. A. Flavell, "TGF-β: A Master of All T Cell Trades," *Cell*. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.025.
- [257] J. Massagué and D. Wotton, "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.," EMBO J., vol. 19, no. 8, pp. 1745–54, Apr. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.8.1745.
- [258] A. Nakao et al., "Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling," Nature, 1997, doi: 10.1038/39369.
- [259] E. Agricola, R. A. Randall, T. Gaarenstroom, S. Dupont, and C. S. Hill, "Recruitment of TIF1γ to Chromatin via Its PHD Finger-Bromodomain Activates Its Ubiquitin Ligase and Transcriptional Repressor Activities," *Mol. Cell*, 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.020.
- [260] S. Dupont *et al.*, "FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGFβ Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination," *Cell*, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2008.10.051.
- [261] V. S. Cortez *et al.*, "SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF-β signaling," *Nat. Immunol.*, vol. 18, no. 9, pp. 995–1003, Aug. 2017, doi: 10.1038/ni.3809.
- [262] G. Monteleone, R. Caruso, and F. Pallone, "Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases," World J Gastroenterol, vol. 18, no. 40, pp. 5664–5668, 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i40.5664.
- [263] B.-G. Kim et al., "Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal

cancer," Nature, vol. 441, no. 7096, pp. 1015–1019, Jun. 2006, doi: 10.1038/nature04846.

- [264] P. P. Lee *et al.*, "A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival," *Immunity*, vol. 15, no. 5, pp. 763–774, Nov. 2001, doi: 10.1016/S1074-7613(01)00227-8.
- [265] J. M. Doisne *et al.*, "iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-β signaling," *J. Exp. Med.*, 2009, doi: 10.1084/jem.20090127.
- [266] A. Di Gu, S. Zhang, Y. Wang, H. Xiong, T. A. Curtis, and Y. Y. Wan, "A Critical Role for Transcription Factor Smad4 in T Cell Function that Is Independent of Transforming Growth Factor β Receptor Signaling," *Immunity*, 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.019.
- [267] S. Tanaka *et al.*, "Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells," *J. Exp. Med.*, 2018, doi: 10.1084/jem.20170779.
- [268] M. O. Li, S. Sanjabi, and R. A. A. Flavell, "Transforming Growth Factor-β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms," *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 455–471, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.011.
- [269] J. C. Marie, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky, "Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor-β Receptor," *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 441–454, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.012.
- [270] J. L. Round and S. K. Mazmanian, "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease," *Nature Reviews Immunology*. 2009, doi: 10.1038/nri2515.
- [271] S. P. Spencer, G. K. Fragiadakis, and J. L. Sonnenburg, "Pursuing Human-Relevant Gut Microbiota-Immune Interactions," *Immunity*. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.002.
- [272] C. Mamalaki *et al.*, "Positive and Negative Selection in Transgenic Mice Expressing a T-Cell Receptor Specific for Influenza Nucleoprotein and Endogenous Superantigen," *Dev. Immunol.*, vol. 3, no. 3, pp. 159–174, 1993, doi: 10.1155/1993/98015.
- [273] L. Bartholin *et al.*, "Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TβRI/ALK5 receptor," *Genesis*, vol. 46, no. 12, pp. 724–731, Dec. 2008, doi: 10.1002/dvg.20425.
- [274] C. D. Surh and J. Sprent, "Homeostasis of Naive and Memory T Cells," *Immunity*, vol. 29, no. 6.

pp. 848-862, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.002.

- [275] L. Belarif *et al.*, "IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease," *J. Clin. Invest.*, vol. 129, no. 5, pp. 1910–1925, May 2019, doi: 10.1172/JCI121668.
- [276] F. Cruz-Guilloty *et al.*, "Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 1, pp. 51–59, Jan. 2009, doi: 10.1084/jem.20081242.
- [277] D. Wang, H. Diao, A. J. Getzler, S. Crotty, A. W. Goldrath, and M. E. Pipkin Correspondence, "The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation," *Immunity*, vol. 48, pp. 659-674.e6, 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.028.
- [278] M. Zamisch *et al.*, "The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3 up-regulation during CD8 T cell differentiation in the thymus," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 12, pp. 2685–2699, Nov. 2009, doi: 10.1084/jem.20092024.
- [279] M. W. Babyatsky, G. Rossiter, and D. K. Podolsky, "Expression of transforming growth factors α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, 1996, doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8613031.
- [280] D. A. Thomas and J. Massagué, "TGF-β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance," *Cancer Cell*, 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.10.012.
- [281] M. P. Davenport, N. L. Smith, and B. D. Rudd, "Building a T cell compartment: how immune cell development shapes function," *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0332-3.
- [282] N. L. Smith *et al.*, "Developmental Origin Governs CD8 + T Cell Fate Decisions during Infection," *Cell*, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.05.029.
- [283] T. Bergsbaken and M. J. Bevan, "Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8+ T cells responding to infection," Nat. Immunol., vol. 16, no. 4, pp. 406–414, Mar. 2015, doi: 10.1038/ni.3108.
- [284] B. Wu et al., "The SKI proto-oncogene restrains the resident CD103+CD8+ T cell response in viral clearance," Cell. Mol. Immunol., 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0495-7.
- [285] K. M, K. A, and K. P, "Modulation of bone morphogenic protein signaling in T-cells for cancer

immunotherapy," J. Immunotoxicol., vol. 11, no. 4, pp. 319–327, Oct. 2014, doi: 10.3109/1547691X.2013.864736.

- [286] M. A. Cortez *et al.*, "Bone morphogenetic protein 7 promotes resistance to immunotherapy," *Nat. Commun. 2020 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18617z.
- [287] P. CE, N. FJ, and H. CS, "Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 23, pp. 9041–9054, Dec. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.23.9041-9054.2000.
- [288] F. Sanchez-Muñoz, A. Dominguez-Lopez, and J. K. Yamamoto-Furusho, "Role of cytokines in inflammatory bowel disease," *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 27, p. 4280, Jul. 2008, doi: 10.3748/WJG.14.4280.
- [289] R. W et al., "A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease," *Gut*, vol. 55, no. 8, pp. 1138–1144, 2006, doi: 10.1136/GUT.2005.079434.
- [290] A. B. Thomson, M. Gupta, and H. J. Freeman, "Use of the tumor necrosis factor-blockers for Crohn's disease," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 35, p. 4823, 2012, doi: 10.3748/WJG.V18.I35.4823.
- [291] G.-R. V et al., "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses," *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 677–689, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.08.020.
- [292] R. B *et al.*, "Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors," *Science*, vol. 359, no. 6371, pp. 91–97, Jan. 2018, doi: 10.1126/SCIENCE.AAN3706.
- [293] T. Ichinohe *et al.*, "Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 13, pp. 5354–5359, Mar. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1019378108.
- [294] T. Tanoue *et al.*, "A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity," *Nat. 2019 5657741*, vol. 565, no. 7741, pp. 600–605, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0878-z.
- [295] S. WJ et al., "Etrolizumab for the Treatment of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease: An

Overview of the Phase 3 Clinical Program," *Adv. Ther.*, vol. 37, no. 7, pp. 3417–3431, Jul. 2020, doi: 10.1007/S12325-020-01366-2.

- [296] B. Dai *et al.*, "Dual targeting of lymphocyte homing and retention through α4β7 and αEβ7 inhibition in inflammatory bowel disease," *Cell Reports Med.*, vol. 2, no. 8, p. 100381, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.XCRM.2021.100381.
- [297] K. E *et al.*, "T cell-associated α4β7 but not α4β1 integrin is required for the induction and perpetuation of chronic colitis," *Mucosal Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 1354–1365, Nov. 2014, doi: 10.1038/MI.2014.22.