

THESE DE DOCTORAT COTUTELLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Fatima HARISS**

Le 10 décembre 2021

Titre :

**Etude du rôle des Lymphocytes Intraépithéliaux innés  
dans la réponse immune protectrice contre  
*Cryptosporidium parvum***

---

Directeur de thèse : Dr. Bertrand MERESSE (PhD, HDR)

Co-Directeur de thèse : Pr. Mohamad EZZEDINE (PU, PhD)

---

**JURY**

Dr. Sonia LACROIX-LAMANDE

Président du jury

Dr. Nadine CERF-BENSUSSAN

Rapporteur

Dr. Gabriela CERTAD

Examineur

Pr. Mohamad MORTADA

Examineur

### **Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de :**

- Ecole doctorale Biologie Santé de LILLE (EDBSL)
- Bourse MOBILLEX (Mobilité de l'Université de LILLE)
- Financement SF3i
- Fondation HARIRI

### **Présentation poster en congrès national**

- From 3D culture to organoid : « Development of an *in vitro* model to study the role of intraepithelial lymphocytes ». 22 Septembre 2020 à la Faculté de Médecine Sorbonne, 105 bld de l'Hôpital, Paris.

### **Présentation orale en congrès national**

- SFM (Société Française de la Microbiologie): Etude du rôle des lymphocytes intraépithéliaux innés dans la réponse immune protectrice contre *Cryptosporidium parvum*. 23 Septembre 2021 à la Cité des Congrès à Nantes-France.

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

1. Hariss F., and Meresse, B. (2021). Comment on "ILC-1 drive intestinal epithelial and matrix remodeling." *Mucosal Immunol* 14, 279–281.
2. Hariss F et al. Innate intraepithelial lymphocytes protect from *Cryptosporidium* infection through a granzyme-dependent cytotoxicity mechanism. En cours de rédaction

## Remerciements

Je tiens à remercier mes membres du jury le Dr. Nadine CERF-BENSUSSAN, Dr. Sonia LACROIX-LAMANDE, Dr. Gabriela CERTAD et le Pr. Mohamad MORTADA de m'avoir honorée de participer à mon jury.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude et mes remerciements à l'encadrement exceptionnel du Docteur Bertrand MERESSE qui m'a dirigée durant ces 4 années de thèse, qui m'a soutenue, encouragée et surtout m'a fait progresser sur le plan scientifique. Merci Bertrand pour toutes tes remarques pertinentes, ta présence, tes idées précieuses et pour le temps que tu as consacré à me former. Nous avons subi de plein fouet toutes les contraintes qui auraient pu mettre en péril le déroulement de ma thèse notamment l'incendie du laboratoire et le covid19 qui ont mis en attente pendant 1 an notre activité de recherche. Merci d'avoir été présent pour me rassurer, pour m'épauler et me guider pour qu'on puisse atteindre l'objectif de la soutenance à temps. Je serais toujours reconnaissante envers toi et merci d'avoir toujours trouvé les bons mots pour aller de l'avant dans les moments compliqués.

Un grand merci au Professeur Mohamad EZZEDINE. Auprès de lui, j'ai eu plaisir à travailler, discuter et échanger sur les résultats, mais aussi sur les difficultés rencontrées. Merci pour votre temps et pour vos encouragements constants.

Un grand merci au Dr. Laurent DUBUQUOY de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche et qui m'a permis de réaliser une thèse et de m'intégrer au sein de cette belle famille qu'est l'U1286 INFINITE. Sur le plan personnel, merci Laurent pour ton aide au quotidien et de nous avoir aidé avec Mohamed pour garder la tête hors de l'eau dans les moments compliqués.

Une pensée particulière à mes collègues du 4ème EST: Pauline ZARNITSKY, Adeline PORCHERIE, Arnaud DENDOOVEN, Line WANDJI, Solenne DEZITTER, merci pour votre aide, votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur.

Un remerciement spécial pour Marie DELBEKE avec qui j'ai partagé le même bureau pendant cette aventure, merci de m'avoir formée et aidée dans les moments compliqués, merci pour ta disponibilité, ta bienveillance, ton soutien et tes conseils. Je n'oublierais pas tout ce que tu as fait pour moi. Je te serais toujours reconnaissante.

Je tiens à remercier Silvia SPECA qui m'a aidée dans les débuts de ma thèse et a été de bonne écoute et de bons conseils.

Un grand merci à Caroline DUBUQUOY qui n'a jamais manqué de m'envoyer des petits messages de soutien et d'encouragement. Merci pour ton aide, ton soutien et ta bonne humeur.

Un grand merci à Virginie CHAMEROY, Bernadette LEU, Caroline GAVELLE et Yamina BENALLAL pour leur aide et leur gentillesse.

Un grand merci à Madjid, Christophe, Cécile, Mathilde, Matthias et Eva pour leurs conseils et leur soutien.

Merci à tous les membres de la famille de l'unité U1286 qui ont contribué à faire de ces 4 années de thèse une agréable aventure.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du Dr VISCOGLIOSI à l'Institut Pasteur de Lille. Merci Nausicaa GANTOIS et Anthony MOURAY de m'avoir aidée dans la réalisation des expériences animales. Il m'est impossible d'oublier Karine GUYOT qui m'a donnée de son temps pour me former sur toute la partie *Cryptosporidium* et de m'accompagner pour résoudre les problèmes techniques rencontrés.

Un grand merci à Philippe PERSOONS d'avoir été présent et pour ces bons conseils.

Je tiens à remercier Antonino Bongiovanni et Meryem TARDIVEL de m'avoir formée et aidée pour la microscopie.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements au Professeur SABLONNIERE, à François DELECROIX et à Madame Marjorie VANDENHOVE qui ont été présents pour faciliter toutes les démarches administratives et financières de cette thèse.

Pour ma famille, mon père, ma mère, les prunelles de mes yeux, qui tiennent une place immense dans mon cœur, vous remercier en quelques phrases ne suffira jamais. Merci maman, papa d'avoir été toujours présents pour moi, de m'encourager, de me soutenir dans les moments difficiles. C'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie cette thèse à toi ma mère qui me dit toujours « tes études c'est ton arme dans la vie », je n'oublierai jamais cette phrase maman.

A mon grand frère Mohamad, ma fierté dans la vie. Merci à toi mon tendre frère, tu étais toujours présent à mes côtés même si on était loin. Tu prenais toujours de mes nouvelles, de l'avancement de ma thèse et tu m'encourageais à franchir les moments difficiles. Je te souhaite une belle vie avec notre douce belle-sœur Ola. Je vous aime.

A mon deuxième frère Mahmoud, mon âme sœur. Merci à toi mon soutien dans la vie qui me laisse changer d'air en plaisantant avec moi au téléphone et qui fait tout pour que je sois heureuse. Merci à toi et à ton aimable femme Zeinab, vous allez agrandir bientôt notre famille, je suis enthousiaste de voir votre petit bébé qui va venir illuminer notre vie.

Un grand merci à mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes cousines qui ont cherché à avoir en permanence de mes nouvelles.

Un grand merci à ma belle-famille, à mon beau-père Ghazi, qui a été toujours présent à côté de nous Mohamed et moi, je serai toujours reconnaissante envers toi. A ma belle mère qui prenait toujours de mes nouvelles et donne tout dans le but de nous voir heureux. Je n'oublierais jamais ton soutien. Une belle-mère comme toi mérite tout le bonheur du monde.

A mon beau-frère Bilal, merci d'avoir été présent à nos côtés, je te souhaite une vie pleine de succès avec ma belle-sœur Rayane.

A ma belle sœur Nour et mon beau-frère Ahmed, vous étiez toujours présents à nos côtés. Merci pour tous les moments inoubliables qu'on a partagé ensemble. Vous avez agrandi notre famille avec la naissance de notre petit « Rayen » qui quand j'ai besoin de sourire, il suffit de regarder ces vidéos pour me remonter le moral.

A toi mon Chéri Mohamed, mon plus grand soutien, je ne sais pas comment te remercier, tu prends tellement soin de moi. Merci pour ta tendresse, ton soutien qui me comble au quotidien. Merci de m'avoir écoutée et de me remonter le moral quand j'en avais besoin. Tu étais toujours là pour m'encourager et me pousser à aller de l'avant. Merci à toi mon homme qui a pris mon cœur et qui m'a supporté pendant cette aventure et qui m'a relevé après chaque déception. Merci d'avoir tout fait pour que je puisse rédiger dans les meilleures conditions cette thèse. Je ne sais pas ce que je ferais sans toi dans ma vie, tu as fait de ma vie un rêve et je ne pourrais jamais assez te remercier.

# Résumé

Les lymphocytes intraépithéliaux (LIE) résident entre les cellules épithéliales (CE) intestinales et sont donc les premières cellules immunitaires à entrer en contact avec les agents pathogènes. En plus de répondre rapidement à l'infection, ils régulent l'homéostasie intestinale et maintiennent la barrière épithéliale. Ces fonctions sont assurées par différentes sous-populations de lymphocytes T et innés. Les LIE innés ont été identifiés récemment. Ils sont majoritaires dans l'épithélium intestinal à la naissance et lorsque l'immunité adaptative est compromise. Leur rôle dans la réponse immunitaire contre les pathogènes intestinaux reste cependant peu étudié.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle des LIE innés dans l'infection à *Cryptosporidium*, un parasite opportuniste qui infecte l'épithélium intestinal. L'infection est bénigne chez les individus immunocompétents, mais peut être sévère chez les individus immunodéprimés et les enfants.

Pour étudier le rôle spécifique des LIE innés, nous avons développé un modèle *in vitro* qui consiste à co-cultiver des organoïdes intestinaux murins infectés par *C parvum* avec des LIE innés de souris RAG2<sup>-/-</sup>. Grâce à ce modèle original, nous avons démontré que les LIE innés contrôlent la prolifération du parasite et bien qu'ils sécrètent l'IFN- $\gamma$  en réponse à *C parvum*, cette sécrétion n'est pas suffisante pour inhiber la prolifération du parasite. L'effet protecteur des LIE innés est en fait médié par un mécanisme cytotoxique dépendant des granzymes. L'analyse du transcriptome a révélé que les CE infectées régulent négativement la serpinb9b, un inhibiteur de granzyme, et pourraient ainsi être plus sensibles aux attaques cytotoxiques.

Mots clés: LIE innés, *Cryptosporidium parvum*, organoïdes

# Abstract

Intraepithelial lymphocytes (IEL) reside between intestinal epithelial cells and thus are the first immune cells to contact intestinal pathogens. In addition to respond rapidly to infection, they regulate intestinal homeostasis and maintain the epithelial barrier. This wide range of functions is achieved by distinct subsets of T and innate lymphocytes. Innate IEL which share many features with NK/ILC1 cells have been identified recently. These cells dominate the gut epithelium at birth and when the adaptive immunity is compromised. Their role in the immune response against intestinal pathogens remains however poorly studied.

During my PhD thesis, I have investigated the role of innate IEL subsets in *Cryptosporidium* infection. *Cryptosporidium* is a common parasite that infects the gut epithelium. The infection is self-limiting in immunocompetent individuals, but it can be severe in immunocompromised individuals and children in whom innate IEL dominate.

To study the specific role of innate IEL, we have developed an *in vitro* model that consist to co-culture mice 3D intestinal organoids infected with *C. parvum* with innate IELs from RAG2<sup>-/-</sup> mice. Thanks to this original model, we demonstrated that innate IELs control parasite proliferation. We further showed that although innate IEL secrete IFN- $\gamma$  in response to *C. parvum* infection, the IFN- $\gamma$  secretion was not sufficient to inhibit parasite proliferation. The protective effect of innate IELs was in fact mediated by a cytotoxic, granzyme-dependent mechanism. Moreover, transcriptomic analysis revealed that infected epithelial cells down regulated *serpinb9b*, a granzyme inhibitor, and thus may be more sensitive to cytotoxic attack.

Keywords: Innate IELs, Organoids, *Cryptosporidium*

## Lieu des travaux de thèse:

INFINITE Inserm U1286  
Faculté de Médecine-Université de Lille  
Pôle recherche  
1 Place Verdun  
59045  
Lille  
France

## Table des matières

Liste des abréviations.....	11
I-Introduction .....	15
I-1-Contexte scientifique de l'étude.....	15
I-2-Généralités sur l'intestin.....	16
I-2-1- Anatomie de l'intestin .....	16
I-2-2- Le contenu de l'intestin .....	17
I-2-3- Organisation du système immunitaire intestinal .....	19
I-3- Les Lymphocytes intraépithéliaux .....	42
I-3-1-LIE conventionnels (LIEC).....	44
I-3-2-LIE non conventionnels (LIENC) .....	47
I-3-3-LIE innés .....	51
I-3-4-Evolution des LIE avec l'âge .....	55
I-4- <i>Cryptosporidium</i> .....	56
I-4-1-Généralités.....	56
I-4-2-Pathologie et épidémiologie.....	58
I-4-3-Cycle cellulaire de <i>Cryptosporidium</i> .....	59
I-4-4-Modèles d'études de l'infection par <i>Cryptosporidium</i> .....	61
I-4-5-Réponse immunitaire contre <i>Cryptosporidium</i> .....	63
II- But de la thèse.....	78
III-Matériels-méthodes.....	81
III-1-Animaux .....	81
III-2-Parasite et infection des cellules HCT8.....	81
III-3-Isolements des cryptes intestinales et culture des organoïdes intestinaux.....	81
III-4-Infection des organoïdes intestinaux par cassure .....	82
III-5-Microinjection des organoïdes intestinaux avec des oocystes de <i>C parvum</i> .....	82
III-6-Isolements des lymphocytes intraépithéliaux (LIE) .....	83
III-7-Co-culture des LIE avec les organoïdes.....	83
III-8-Infection <i>in vivo</i> des souris Rag2 <sup>-/-</sup> C57BL/6 .....	84
III-9-Quantification de la charge parasitaire par qPCR.....	84
III-10-Extraction de l'ARN et RT-qPCR .....	84
III-11-Microscopie confocale .....	85
III-12-Cytométrie en flux .....	85
III-13- Immunohistochimie .....	86
III-14-Quantification du taux d'IFN- $\gamma$ .....	86
III-15-Analyse transcriptomique.....	86



III-16-Analyse statistique.....	88
IV-Résultats .....	90
IV-1- Mise au point du modèle expérimental pour étudier <i>in vitro</i> le rôle des LIE dans l'infection par <i>C parvum</i> : Co-culture des LIE avec les organoïdes intestinaux murins infectés par <i>C parvum</i> .....	90
IV-2- Les LIE innés contrôlent l'infection à <i>C parvum</i> dans le modèle de co-culture.....	94
IV-3-L'IFN- $\gamma$ sécrété par les LIE innés n'est pas suffisant pour contrôler l'infection à <i>C parvum in vitro</i> .....	97
IV-4-La cytotoxicité contribue à la protection contre <i>C parvum</i> médiée par les LIE innés .....	101
IV-5-Etude transcriptomique par séquençage de la partie 3' des ARNm .....	103
V-Discussion .....	108
VI-Perspectives.....	114
VII- Conclusion générale.....	115
Références Bibliographiques.....	117
Annexe.....	138
Figure Supplémentaire .....	139
Tableaux supplémentaires .....	140
Commentaire.....	143

## Figures

<b>Figure 1</b> : Organisation de l'épithélium intestinal.....	17
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique du système immunitaire du tractus gastro-intestinal. ....	20
<b>Figure 3</b> : Structure des plaques de Peyer. ....	23
<b>Figure 4</b> : Développement des tissus lymphoïdes associés. ....	24
<b>Figure 6</b> : Répartition des cellules présentes dans la lamina propria au niveau de l'intestin.....	27
<b>Figure 7</b> Développement des ILC chez la souris. ....	34
<b>Figure 8</b> : Reconnaissance des pathogènes par les PRR.....	42
<b>Figure 9</b> : Cinétique de l'évolution des LIE avec l'âge. ....	56
<b>Figure 10</b> : Répartition de la cryptosporidiose dans le monde .....	59
<b>Figure 11</b> : Cycle biologique de <i>Cryptosporidium</i> . ....	60
<b>Figure 12</b> : Réponses immunitaires protectrices contre <i>Cryptosporidium</i> spp.. ....	64
<b>Figure 13</b> : Réponse immunitaire innée contre <i>C. parvum</i> . ....	69
<b>Figure 14</b> : Modèle expérimental de co-culture des LIE avec des organoïdes.....	83
<b>Figure 15</b> : Méthode de quantification de la charge parasitaire de <i>C parvum</i> par (RT)-qPCR.....	91
<b>Figure 16</b> : Mise au point de la microinjection dans les organoïdes intestinaux murins.....	92
<b>Figure 17</b> : Mise en évidence de la présence de LIE dans les organoïdes intestinaux après 24h de co-culture .....	94
<b>Figure 18</b> : Caractérisation et mise en évidence des populations de LIE innés dans les souris RAG2 <sup>-/-</sup> et dans les organoïdes infectés avec <i>C parvum</i> . ....	95
<b>Figure 19</b> : Mise en évidence de la présence des LIE innés de souris RAG2 <sup>-/-</sup> dans les organoïdes intestinaux et de la diminution de la charge parasitaire par RT-qPCR.....	97
<b>Figure 20</b> : Production d'IFN- $\gamma$ dans la phase précoce de l'infection.....	98
<b>Figure 21</b> : Fréquence des sous-populations de LIE innés de souris RAG2 <sup>-/-</sup> 24h après l'infection par <i>C parvum</i> .....	99
<b>Figure 22</b> : Evaluation du rôle antiparasitaire de l'IFN- $\gamma$ dans le modèle de co-culture.....	101
<b>Figure 23</b> : Etude du rôle de la cytotoxicité dans la protection contre <i>C parvum</i> médiée par les LIE innés. ....	103
<b>Figure 24</b> : Comparaisons des transcriptomes des co-cultures par séquençage de la partie 3' des ARNm.....	104
<b>Figure 25</b> : Analyse transcriptomique .....	106
<b>Figure 26</b> : Mécanisme hypothétique du rôle protecteur des LIE innés dans l'infection par <i>C parvum</i> . ....	116

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Expression des marqueurs des différentes sous populations d'ILC chez l'homme et la souris. ....	35
<b>Tableau 2</b> : Les différents types de CE et leurs sous-ensembles (Allaire et al., 2018).....	38
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques des différentes populations de LIE (McDonald et al., 2018).....	44
<b>Tableau s1</b> : Les gènes exprimés significativement différents entre les conditions organoïdes infectés versus non infectés.....	136
<b>Tableau s2</b> : Tableau d'enrichissement des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. ....	137
<b>Tableau s3</b> : Liste des amorces utilisés pour la quantification des gènes.....	137
<b>Tableau s4</b> : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.....	138

## Liste des abréviations

AR: Acide Rétinoïque

Ag: Antigène

Ahr: Aryl Hydrocarbon Receptor

Ac: Anticorps

AMP: Peptides Anti-Microbiens

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm : ARN Messenger

ARNr: ARN Ribosomal

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

CE: Cellules épithéliales

Cellule M: cellule Microfold

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

CCR: Chemokine Receptor

CCL: C-C Motif Chemokine Ligand

CXCL: C-X-C Motif Chemokine Ligand

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CD103: Intégrine alpha E

CT: nombre réel de cycles (qPCR)

DC: Cellule Dendritique

DTR: Récepteur à Toxine Diphtérique

DT: Toxine Diphtérique

DTT: Dithiothreitol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phénylindole

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

EAF: Epithélium Associé aux Follicules

Eomes: Eomesodermine

ECM: Matrice Extracellulaire  
EDTA: Acide Ethylènediaminetétraacétique  
Foxp3: Forkhead box P3  
FLI: Follicules Lymphoïdes Isolés  
GLM: Ganglions Mésentériques  
GATA3: Proteine de liaison GATA3  
GZMA: Granzyme A  
GZMB: Granzyme B  
HCT-8: Human ileocecal adenocarcinoma  
IgA: Immunoglobuline A  
IgG: Immunoglobuline G  
IL: Interleukine  
ILC: Cellules Lymphoïdes Innés  
IFN- $\gamma$ : Interferon gamma  
iNKT: Cellules T Naturel Killer Invariantes  
IE-ILC: Cellules Innées Lymphoïdes Intraépithéliales  
Id2: Inhibiteur de la liaison à l'ADN 2  
IESC: Cellules Souches Epithéliales Intestinales Pluripotentes  
KAR: Récepteurs Activateurs des cellules NK  
KIR: Récepteurs inhibiteurs des cellules NK  
KO: Knock Out  
LIE: Lymphocytes Intraépithéliaux  
LIEC: Lymphocytes Intraépithéliaux Conventionnels  
LIENC: Lymphocytes Intraépithéliaux Non conventionnels  
LT: Lymphocyte T  
LB: Lymphocyte B  
LT reg: Lymphocyte T Régulateur  
LTi: Cellules Inductrices de Tissu Lymphoïde  
MAdCAM-1: Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1  
MAIT: Cellules T Invariantes Associées aux Muqueuses  
MICA: MHC class I Chain-related Antigen  
MC: Milieu Conditionné

NOD: Nucleotid-Binding Oligomerization Domain proteins  
NK: Cellule Natural Killer  
NKR: Récepteur de cellules NK  
NFKB: Nuclear factor kappa-B ligand  
NO: Oxyde nitrique  
PRR: Pattern Recognition Receptor  
PAMPS: Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PP: Plaque de Peyer  
pIgA: Immunoglobuline Polymériques A  
PBS: Tampon Phosphate Salin  
ROR: RAR-related Orphan Receptor  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium  
RT: Temperature ambiante  
RT-qPCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase chain reaction  
SPP1: Ostéopontine  
SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise  
SVF: Sérum de Veau Fœtal  
sIgA: Immunoglobulines Sécrétoires de type A  
TLR: Toll like receptor  
TGF: Transforming Growth Factor  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TCR: T Cell Receptor  
T-bet: Transcription factor T-box  
WT: Wild Type

# Introduction

# I-Introduction

## I-1-Contexte scientifique de l'étude

Dans l'intestin, le système immunitaire est exposé à une grande variété d'antigènes provenant des pathogènes mais aussi de l'alimentation et du microbiote symbiotique. Dans ce contexte antigénique particulier et pour assurer efficacement sa fonction protectrice, anti-infectieuse, il s'organise en plusieurs compartiments (épithélium, lamina propria, ganglions mésentériques, Plaque de Peyer, ...) différenciables par leur localisation, leur fonction et leur composition en cellules immunitaires. Il évolue et s'adapte également aux modifications de l'environnement liées notamment à l'âge, la composition du microbiote et les habitudes alimentaires (*Introduction partie 1*).

Avec une surface de 30-40 m<sup>2</sup> chez l'homme (Helander and Fändriks, 2014), l'épithélium intestinal exposé à l'environnement abrite un très grand nombre de cellules immunitaires dénommées lymphocytes intraépithéliaux (LIE). Les LIE forment une population hétérogène dont la composition varie avec l'âge ; chez l'adulte immunocompétent elle est composée principalement par des lymphocytes T « conventionnels » et « non conventionnels » qui luttent contre les infections et participent à la réparation de l'épithélium. En revanche, chez le nouveau-né et l'individu immunodéficient (après greffe de moelle, souris RAG2<sup>-/-</sup> ...), l'épithélium intestinal est essentiellement peuplé par des lymphocytes innés. Le rôle des cellules immunitaires innées au cours d'une infection et/ou d'une agression de l'épithélium par un facteur environnemental est toutefois encore méconnu (*Introduction partie 2*).

Nous avons choisi d'étudier le rôle des cellules immunitaires innées de l'épithélium intestinal au cours de l'infection par le parasite *Cryptosporidium* pour plusieurs raisons : I) parce que le parasite a un tropisme pour l'épithélium intestinal II) parce que les nouveau-nés et les personnes immunodéficientes sont plus sensibles à l'infection ; ce qui nous a amené à nous interroger sur la capacité des LIE innés à lutter contre l'infection.

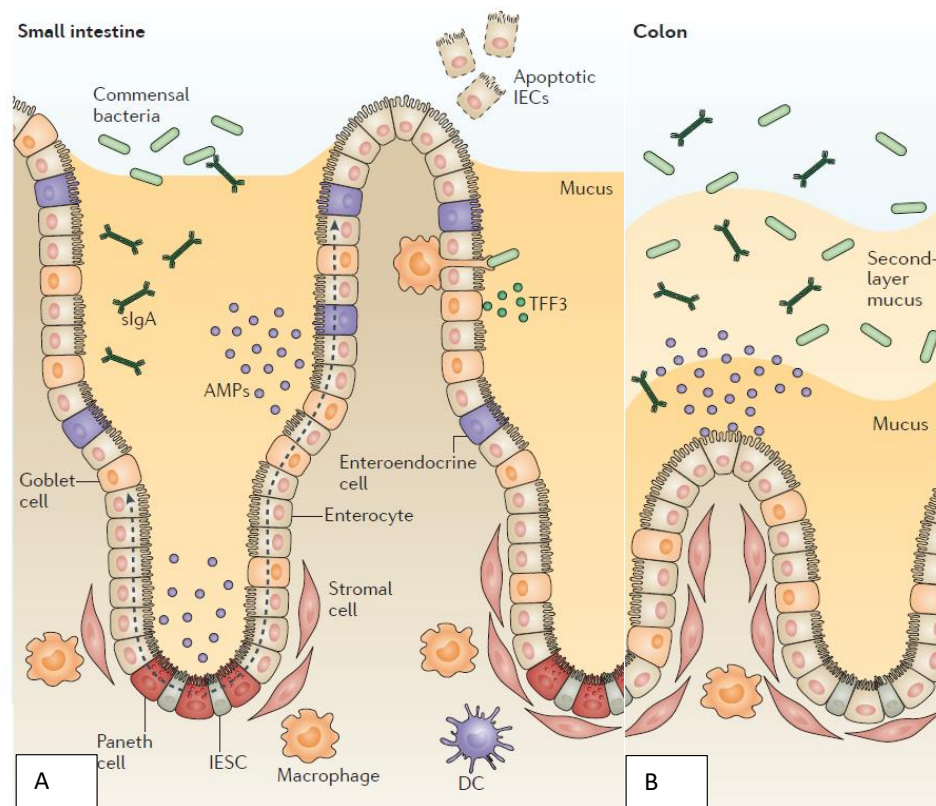
## I-2-Généralités sur l'intestin

### I-2-1- Anatomie de l'intestin

Du point de vue anatomique l'intestin est un segment du tube digestif. Chez la plupart des mammifères il se divise en deux parties : l'intestin grêle et le côlon. L'intestin grêle est la partie proximale située entre l'estomac et le gros intestin. C'est un organe multifonctionnel dont le rôle essentiel est d'absorber les nutriments. Il se divise en trois régions : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum est l'extrémité proximale de l'intestin grêle, où les aliments provenant de l'estomac sont combinés avec des sels biliaires et des enzymes du pancréas et du foie qui facilitent la digestion. L'absorption des nutriments s'effectue ensuite dans le jéjunum et l'iléon. Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse forme de longues villosités sous forme de doigts pour augmenter la surface de contact avec la lumière intestinale et favoriser ainsi l'absorption des nutriments (Figure 1A). Les cellules épithéliales (CE) produisent aussi des enzymes qui participent à la dégradation des protéines pour faciliter leur digestion. Le gros intestin ou côlon permet l'absorption de l'eau et des électrolytes ainsi que le stockage et l'évacuation des selles. Il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Au niveau du côlon se trouve une énorme diversité microbienne qui constitue la flore intestinale. En comparaison avec l'intestin grêle, la muqueuse du côlon est « plate », les villosités sont atrophiées mais les cryptes sont très développées (Figure 1B). Les cryptes sont des invaginations de l'épithélium dans la muqueuse, elles contiennent les CE souches responsables du renouvellement de l'épithélium et d'autres CE (caliciformes, colonocytes, ... voir ci-dessous) qui sécrètent des peptides antimicrobiens et/ou produisent le mucus. Ces dernières forment ainsi une barrière physico-chimique qui limite les contacts entre



l'épithélium et les bactéries ou pathogènes présents dans la lumière intestinale (Peterson and Artis, 2014).



**Figure 1** : Organisation de l'épithélium intestinal.

(A) Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse forme de longues villosités sous forme de doigts pour augmenter la surface de contact avec la lumière intestinale et favoriser ainsi l'absorption des nutriments. (B) Au niveau du côlon, la muqueuse est « plate », les villosités sont absentes mais les cryptes sont très développées (Peterson and Artis, 2014).

## I-2-2- Le contenu de l'intestin

A l'état physiologique, le contenu intestinal constitue un environnement complexe, riche en peptides et molécules provenant de l'alimentation et du microbiote. Ces molécules exogènes influencent l'homéostasie et la maturation du système immunitaire intestinal.

L'alimentation fournit notamment la vitamine A et le tryptophane (un acide aminé essentiel constituant de base des protéines) dont les métabolites ont de nombreux effets sur la réponse immunitaire (voir ci-dessous Chapitre GLM et LIE).

L'autre constituant principal du contenu luminal est le microbiote. Le microbiote intestinal contient un grand nombre et une grande diversité de microorganismes (bactéries, levures, virus et parasites) non pathogènes pour l'hôte en condition physiologique. Chez l'homme

adulte, il contient environ  $10^{13}$  bactéries dont la grande majorité réside dans le côlon et est anaérobies. Ces bactéries appartiennent à deux grandes familles, les Bactéroïdes et les Firmicutes mais il existe une vaste diversité au niveau des espèces (environ 150 à 400 espèces de bactéries par individu) (Schnupf et al., 2018).

L'hôte entretient une relation mutualiste avec son microbiote en générant un environnement immunitaire homéostatique qui favorise la colonisation de microbes bénéfiques (Schnupf et al., 2017). En retour, les bactéries contribuent aux fonctions digestives. Notamment, les bactéries facilitent le métabolisme des polysaccharides non digestibles et contribuent à la production de vitamines (Vitamine B5, B8, B12...) essentielles pour l'hôte (Sommer and Bäckhed, 2013). Le microbiote protège aussi l'hôte contre les pathogènes en limitant l'accès aux nutriments via des interactions antagonistes directes (Schnupf et al., 2017). Il joue aussi un rôle important dans la maturation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) et la réduction de la perméabilité intestinale (Sommer and Bäckhed, 2013). En particulier, il a été montré que le microbiote intestinal modulait la différenciation de sous-populations de cellules immunitaires et régulait ainsi les interactions homéostatiques entre l'hôte et le microbiote intestinal (Schnupf et al., 2017). Par exemple, la flore intestinale renforce la barrière intestinale en agissant sur la différenciation des cellules innées lymphoïdes ROR $\gamma$ t+NKp46+ impliquées dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la protection contre les infections (Sanos et al., 2009). D'autres bactéries comme les bactéries filamenteuses segmentées (SFB), sont plus pro-inflammatoires et stimulent la production des IgA (Talham et al., 1999) et la différenciation des lymphocytes Th17 (Gaboriau-Routhiau et al., 2009). Cette « maturation » de la réponse immune renforce les défenses contre des microbes plus agressifs comme *Citrobacter rodentium* chez la souris (Goto et al., 2014; Ivanov et al., 2009; Schnupf et al., 2017). De même, l'activation d'une sous-population de cellules dendritiques (DC) intestinale via leur Toll like receptor 5 (TLR5) par la flagelline de bactéries intestinales, stimule la production d'IgA sécrétées par les plasmocytes et la réponse immune Th17 (Uematsu et al., 2008).

A l'inverse, des composants de la flore intestinale peuvent activer des mécanismes immunitaires régulateurs. *Bacteroides fragilis*, par exemple possède un polysaccharide capsulaire A (PsA) capable d'induire la différenciation de lymphocytes T régulateurs (LTreg) qui produisent l'interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire (Round and

Mazmanian, 2010). De même le *Lactobacillus reuteri* qui métabolise le tryptophane en acide indole-3 est impliqué dans la différenciation d'une population régulatrice de lymphocytes T (LT) intraépithéliaux CD4+CD8+(Cervantes-Barragan et al., 2017) (voir ci-dessous chapitre LIE).

Les interactions entre le contenu luminal (alimentation et microbiote) et l'hôte sont donc complexes, à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elles conduisent à la mise en place de mécanismes régulateurs dès la naissance qui contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale.

### I-2-3- Organisation du système immunitaire intestinal

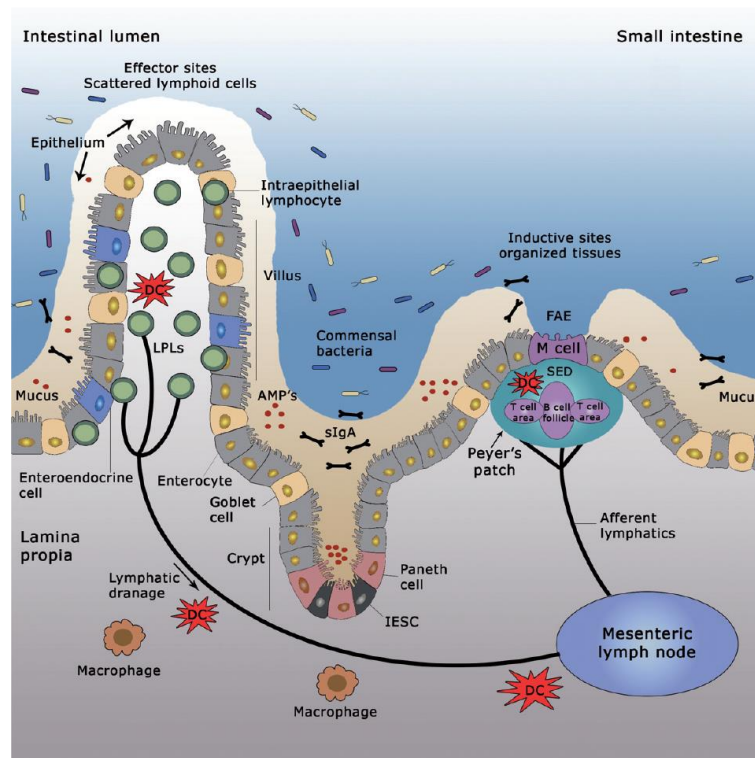
Le système immunitaire intestinal s'est adapté pour assurer la surveillance et la protection de cette grande interface entre l'hôte et l'environnement et pour faire face au vaste spectre d'antigènes intraluminaux « non pathogéniques » qui proviennent de l'alimentation et du microbiote. Il contient le plus grand nombre de cellules immunitaires et se divise en deux sites, où s'initie la réponse immunitaire (site inducteur) et s'effectue la réponse immune (site effecteur) (Mason et al., 2008).

#### I-2-3-1-Activation de la réponse immune adaptative dans l'intestin

En condition physiologique, les protéines alimentaires sont dégradées en acides aminés non immunogènes. Toutefois une petite fraction n'est pas complètement dégradée et peut servir d'antigène au système immunitaire. Ces antigènes qui atteignent l'épithélium intestinal peuvent être transportés par différentes voies en fonction de leurs propriétés, telles que la taille et la solubilité (Tordesillas and Berin, 2018). Ces différentes voies impliquent principalement des cellules épithéliales spécialisées : les cellules Microfold (cellules M), les entérocytes par la production d'exosomes (Mallegol et al., 2005; van Niel et al., 2001; Van Niel et al., 2003), les cellules caliciformes (McDole et al., 2012) et aussi des DC via leur dendrites qui passent entre les CE et arrivent dans la lumière intestinale (Ahluwalia et al., 2017). Les antigènes qui traversent l'épithélium intestinal via les cellules M ou les cellules caliciformes sont ensuite délivrés aux DC et/ou aux macrophages. Ces DC en présence de TGFβ et d'acide rétinoïque (AR) favorisent la différenciation des LT naïfs en LTreg Foxp3+ au niveau du ganglions lymphatiques mésentériques (GLM) (voir chapitre GLM). Dans ce contexte, et en absence de signaux pro-inflammatoires, la présentation de ces antigènes aux LT et B induit une réponse immunitaire « tolérogène » (Agace, 2008).

Des composants bactériens ou des bactéries complètes du microbiote intestinal peuvent aussi traverser l'épithélium via les cellules M par un mécanisme de transcytose. Ces antigènes (Ag) sont ensuite présentés par les DC qui stimulent principalement la production d'IgA par les lymphocytes B (LB) et la différenciation de LT reg et/ou Th17 (Lécuyer et al., 2014; Slack et al., 2014).

En revanche lors d'une infection par un microbe pathogène, une stimulation importante des PRR (pattern-recognition receptor), des récepteurs exprimés par les CE et d'autres cellules innées (Trinchieri and Sher, 2007), par les antigènes du pathogène PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) active des signaux de danger qui provoquent une inflammation et réorientent la réponse immunitaire induite par les DC et les macrophages en une réponse immunitaire spécifique anti-infectieuse. Celle-ci est associée à une augmentation de la production d'IgG spécifiques et à la différenciation de LT orientés Th1, Th2 et/ou Th17 en fonction de la nature de l'agresseur (Figure 2) (Ahluwalia et al., 2017).



**Figure 2 :** Représentation schématique du système immunitaire du tractus gastro-intestinal. Les cellules épithéliales intestinales et la couche de mucus forment une barrière biochimique et physique entre la lumière intestinale et le système immunitaire intestinal. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) est constitué des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), la lamina propria et l'épithélium. Les plaques de Peyer et la lamina propria sont drainées par les vaisseaux lymphatiques afférents qui vont au GLM. EAF : épithélium associé aux follicules ; Cellule M : cellule microfold ; SED : dôme sous-épithélial ; DC : cellule dendritique ; AMP : peptides antimicrobiens ; sIgA : IgA sécrétoires ; LPL : lymphocytes de la lamina propria ; IESC : cellules souches épithéliales intestinales (Ahluwalia et al., 2017).

### I-2-3-2-Sites inducteurs de la réponse immune

Les sites inducteurs incluent les ganglions mésentériques (GLM), les plaques de Peyer (PP) et les follicules lymphoïdes isolés (FLI). Ces formations favorisent la rencontre entre les antigènes, présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et les cellules immunitaires effectrices (principalement les LT et B).

#### **A- Les ganglions lymphatiques mésentériques (GLM)**

Les ganglions lymphatiques mésentériques (GLM) qui drainent l'intestin sont les plus gros ganglions lymphatiques du corps, vraisemblablement à cause d'une stimulation constante par un flot régulier et important d'antigènes provenant de la lumière intestinale. Les GLM recueillent les antigènes en partie grâce aux DC, essentiellement les DC CD103+, qui migrent depuis l'intestin via les lymphatiques afférents qui drainent la muqueuse intestinale et les PP. Les DC sont attirées par un mécanisme chimiotactique dépendant du récepteur CCR7 et des chimiokines CCL19 et CCL21 (Jang et al., 2006; Worbs et al., 2006). Les Ag peuvent aussi entrer dans le GLM sous une forme soluble ou d'exosome via la circulation sanguine et la lymphe. Ils sont alors rapidement capturés par les DC résidentes dans les GLM pour être présentés aux LT naïfs (Sixt et al., 2005). Une fois dans les GLM, les DC s'infiltrent dans la zone T et présentent ou cross-présentent les Ag et activent les réponses immunes spécifiques T et B. Les DC de l'intestin expriment l'enzyme RALDH2 (Enhanced Retinal Dehydrogenase 2) requis pour la génération du métabolite de la vitamine A et de l'AR ce qui induit l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et du récepteur à la chimiokine CCR9 sur les cellules T activées (Stagg, 2018). Les LT activés quittent ensuite les GLM par les lymphatiques efférents, rejoignent le sang périphérique à travers le canal thoracique et retournent dans la muqueuse intestinale par les vaisseaux de la lamina propria qui expriment MAdCAM-1, le ligand d' $\alpha 4\beta 7$  et attirés par la chimiokine CCL25, ligand de CCR9 produit par l'intestin (Agace, 2008).

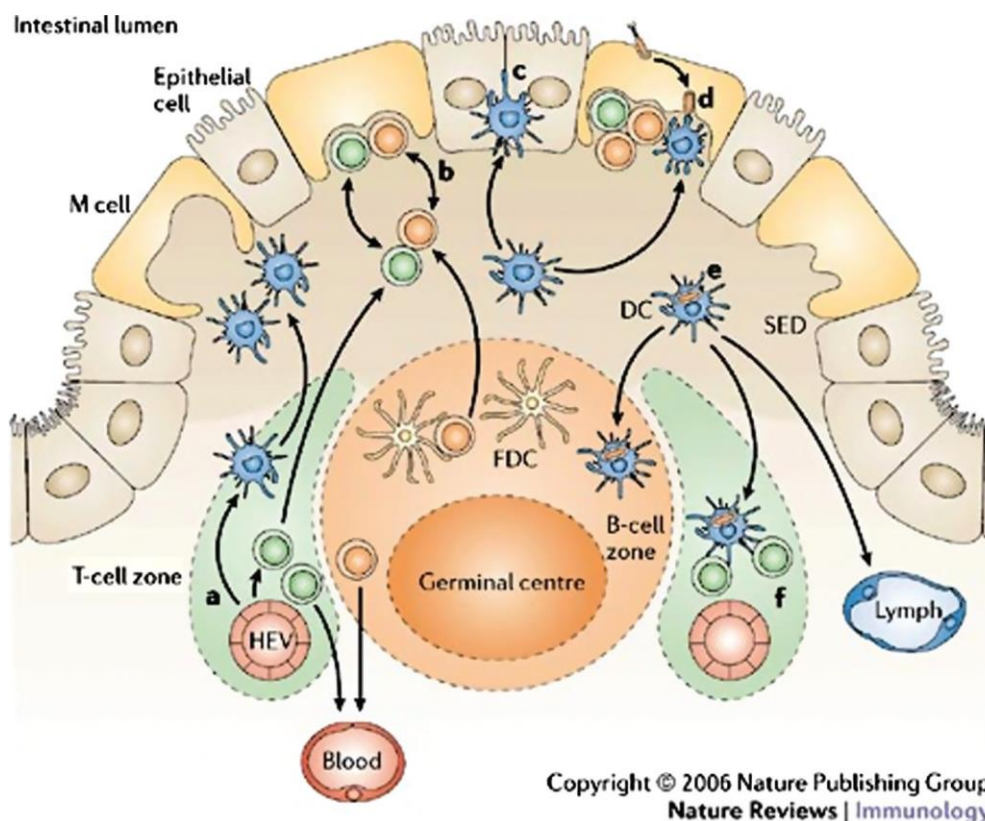
Il est intéressant de noter que le développement des GLM est programmé et ne dépend pas de signaux environnementaux sauf pour sa maturation. Il commence pendant l'embryogénèse dans un environnement stérile en absence de pathogènes (Buettner and Lochner, 2016).

## **B- Les plaques de peyer :**

Les plaques de peyer (PP) sont des agrégats de follicules lymphoïdes, situés au niveau de l'intestin grêle et plus spécifiquement au niveau de l'iléon du côté opposé au mésentère (Collins et al., 2012). Comme dans l'intestin grêle, le côlon présente des plaques de côlon qui sont l'équivalent des PP (Buettner and Lochner, 2016).

Ces PP sont constituées de plusieurs zones dont le follicule lymphoïde, la zone inter-folliculaire, la zone sous épithéliale et l'épithélium associé aux follicules (EAF) (Figure 3). Elles contiennent un grand nombre de follicules B (10 chez la souris et quelques centaines chez l'homme) séparé par des zones T plus petites et contiennent tout le temps des centres germinatifs, qui témoignent d'une stimulation immunitaire perpétuelle. La majorité des cellules immunitaires dans ces régions sont des LB, LT CD4+, LT CD8+, DC et macrophages. Une caractéristique qui différencie la zone EAF est la présence des cellules M (Reboldi and Cyster, 2016). Ces dernières sont responsables du transfert des antigènes viraux, bactériens, parasitaires de la lumière intestinale vers les différents follicules lymphocytaires ; ceci via des DC présentes dans la zone sous-épithéliale. Ces dernières induisent la réponse cellulaire de type B ou T envers les antigènes présentés (Collins et al., 2012).

Le développement des PP commence avant la naissance par l'activation des cellules inductrices de tissu lymphoïde (LTi) dans un environnement stérile en absence des pathogènes (Buettner and Lochner, 2016). Ce processus est induit par l'AR qui stimule les cellules mésenchymateuses à produire la chimiokine CXCL13, qui à leur tour favorisent la maturation des LTi. Ceux-ci induisent l'expression de plusieurs cytokines et molécules d'adhésion. Ce processus attire davantage de cellules immunitaires et provoque la formation des PP (Figure 4A) (Buettner and Lochner, 2016). La maturation de ces tissus est dépendante de la colonisation microbienne après la naissance (van de Pavert and Mebius, 2010)



**Figure 3** : Structure des plaques de Peyer.

Les PP contiennent un centre germinatif constitué de cellules B avec une petite population de cellules T CD4+ et de cellules dendritiques qui présentent des antigènes aux cellules B. La zone interfolliculaire contient des cellules T CD4+, des macrophages, des cellules dendritiques, avec peu de cellules B et de plasmocytes et de veinules endothéliales. La zone sous-épithéliale se trouve au-dessus du follicule (centre germinatif) et contient des cellules B, des cellules T, des cellules dendritiques et des macrophages (Collins et al., 2012).

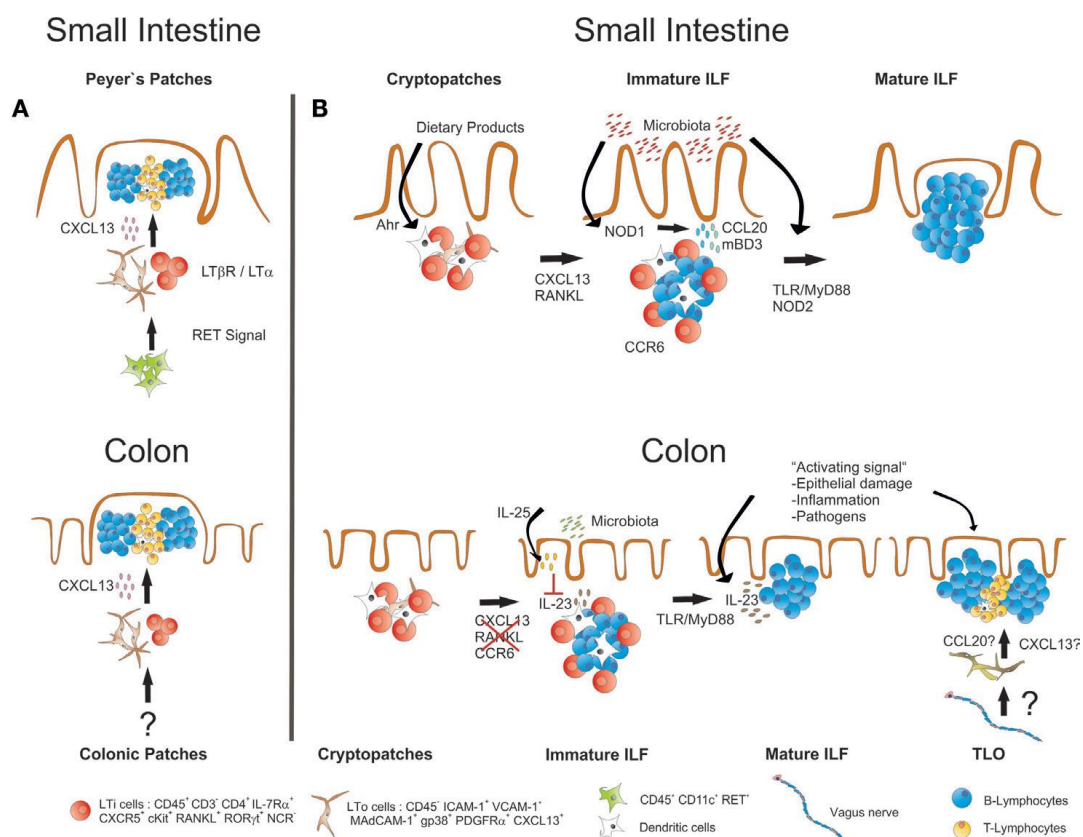
### **C- Les follicules lymphoïdes isolés (FLI)**

L'intestin grêle ainsi que le côlon présentent un grand nombre de structures lymphoïdes organisées désignées comme des tissus lymphoïdes intestinaux solitaires. Les FLI ressemblent aux PP mais ils sont plus petits et distribués tout le long de l'intestin (Newberry and Lorenz, 2005). Comme les PP, ils se localisent sous un dôme de CE contenant des cellules M, des cellules B mais la zone T est mal définie (Baptista et al., 2013). Les FLI constituent un point d'initiation de la réponse IgA spécifique d'Ag et pourraient être un site où la commutation de classe des LB se fait de manière T-indépendante (Tsuji et al., 2008). En condition physiologique, les IgA produites dans les FLI contribuent à la régulation du microbiote intestinal (Knoop and Newberry, 2012).

Les FLI peuvent également participer à la réponse immunitaire contre des pathogènes intestinaux spécifiques. À cet égard, il a été montré que chez les souris dépourvues de GLM et

de PP générées par traitement avec la lymphotoxine LT $\beta$ R-Ig ou anti-IL-7R $\alpha$  , nécessaire pour le développement des PP, mais pas des FLI, des réponses IgA spécifiques de *Salmonella typhimurium* pouvaient être induites lors d'une infection orale par ce pathogène (Buettner and Lochner, 2016).

Contrairement au GLM et aux PP, les FLI se forment après la naissance et s'accumulent sous forme de grappes de cellules de type LTi appelées cryptopatches dans le tissu conjonctif entre les cryptes intestinales. Les cryptopatches recrutent des lymphocytes et se développent en FLI (Buettner and Lochner, 2016). Chez la souris, les FLI se développent dans les 2 premières semaines de vie (Baptista et al., 2013). Leur développement est fortement conditionné par la présence du microbiote et la stimulation de récepteurs de l'immunité innée dans les CE (ex NOD1, TLR2/4, MyD88) ainsi que par l'alimentation via notamment l'activation du récepteur AhR (Figure 4B) (Buettner and Lochner, 2016)



**Figure 4 :** Développement des tissus lymphoïdes associés.

(A) La formation des PP commence avant la naissance par les cellules LTi dépendantes de l'expression de CXCL13. (B) Le développement de FLI dans l'intestin grêle et le côlon commence après la naissance avec le regroupement de cellules LTi IL-7R $\alpha$  + ROR $\gamma$ t + en cryptopatches. Le maintien et le développement ultérieur de ces structures en FLI requièrent une signalisation LT. Dans l'intestin grêle,

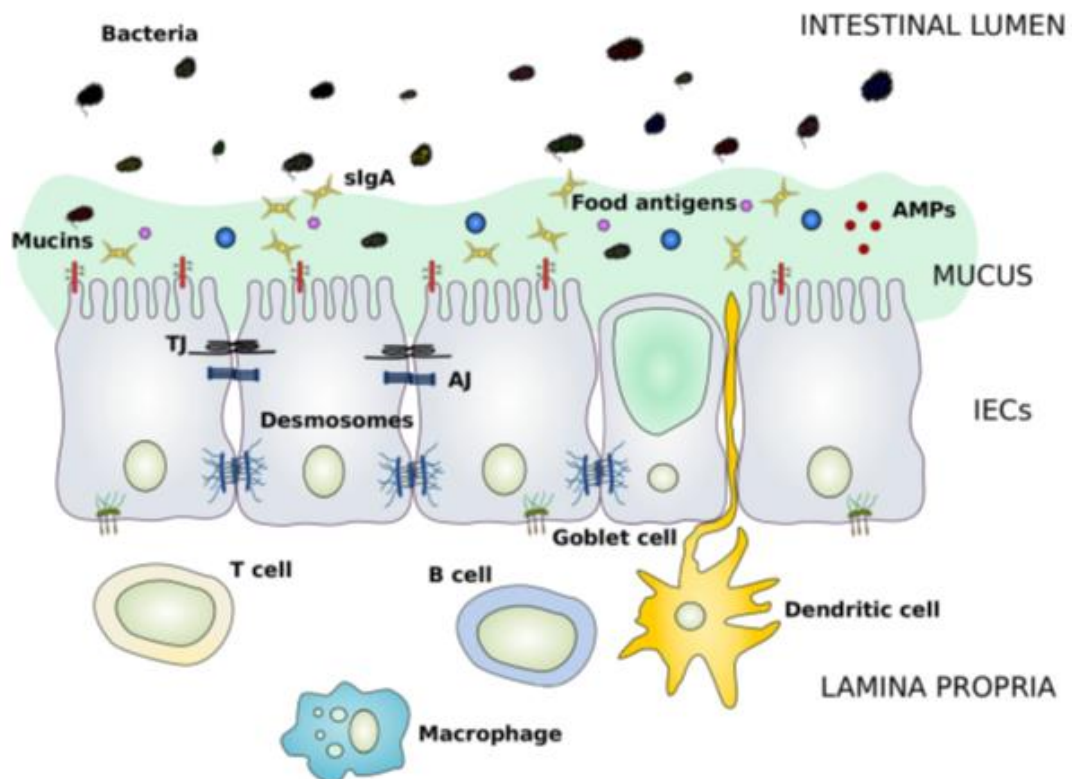


celle-ci se fait en passant par la voie AhR et l'expression de CXCL13, RANKL et CCR6 ; le microbiote commensal induit la formation et la maturation de FLI via l'activation de voies de signalisation (NOD1, NOD2, TLR et MyD88). Dans le côlon, la formation des FLI est indépendante de CXCL13, RANKL et CCR6. Le microbiote commensal inhibe la maturation des FLI en induisant la production d'IL-25 qui diminue la sécrétion d'IL-23, qui favorise spécifiquement la maturation des FLI dans le côlon. Les signaux associés à l'inflammation induisent également la formation et la maturation des FLI (Buettner and Lochner, 2016).

### I-3-3-3-Sites effecteurs de la réponse immunitaire intestinale

Après activation dans les sites inducteurs, les LT et B rejoignent leurs sites effecteurs où de concert avec les cellules immunitaires innées et adaptatives résidentes, ils participent à la détection et l'élimination des pathogènes et/ou au maintien de l'homéostasie intestinale. Au niveau du site effecteur les LT mémoires résidents induisent une réponse mémoire rapide et adaptée contre une réinfection (Th1, Th2 ou Th17) appuyés par les cellules de l'immunité innée. Ces dernières ont aussi un rôle important lors d'une primo-infection.

Le site effecteur est composé des cellules immunitaires distribuées au niveau de l'épithélium et de la lamina propria (Figure 5) (van Wijk and Cheroutre, 2009).



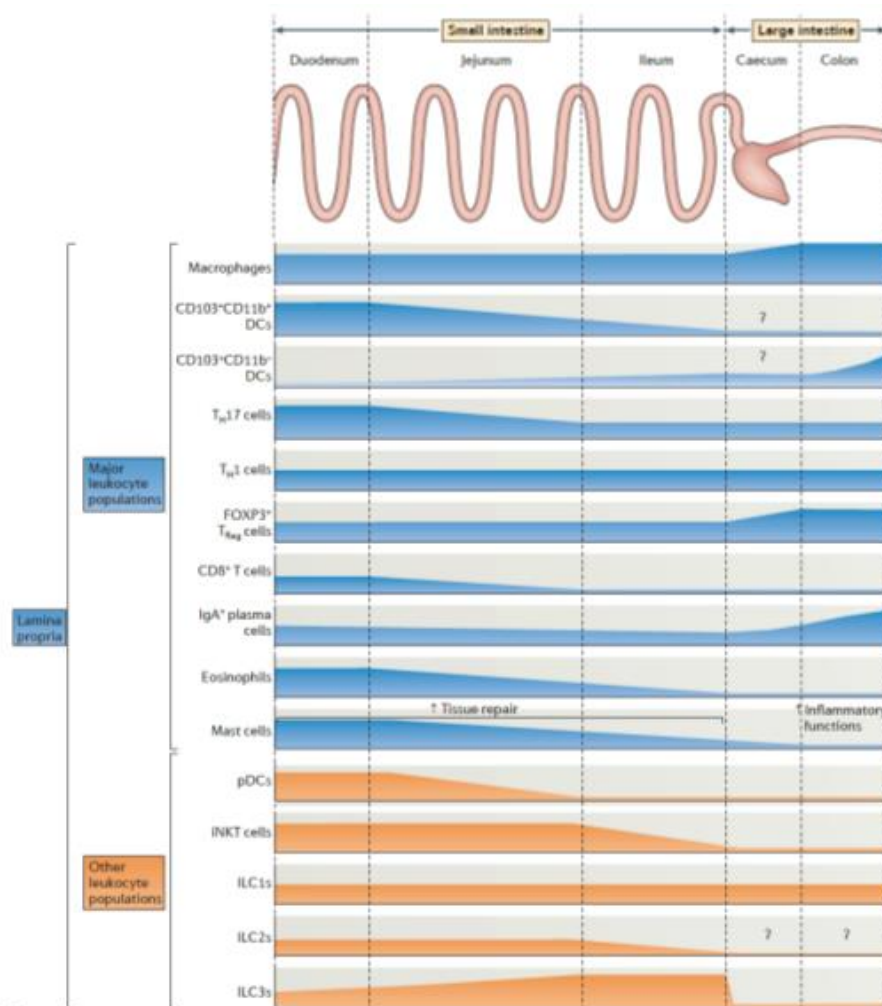
**Figure 5 :** Schéma représentatif des composants de l'épithélium intestinal et de la lamina propria. L'épithélium est composé des cellules épithéliales liées les unes aux autres par des jonctions serrées

avec des cellules immunitaires (lymphocytes intraépithéliaux). La lamina propria contient une diversité de cellules immunitaires innées et adaptatives (LB, LT, plasmocytes, macrophages, DC...) (Vancamelbeke and Vermeire, 2017).

### A- La lamina propria

La lamina propria (LP) est constituée d'une couche de tissu conjonctif qui se trouve sous l'épithélium intestinal (Ahluwalia et al., 2017). Au niveau de cette couche se logent différents types de cellules immunitaires (LT et B, DC, macrophages, éosinophiles, neutrophiles et mastocytes). Elle représente un point de connexion avec les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques (Figure 6). (Mowat and Agace, 2014)

Les lymphocytes sont des composants importants de la LP. Cette population regroupe des LT conventionnels effecteur/mémoire CD4+ et CD8+, des LTreg et des LB. Elle contient aussi des LT non-conventionnels NKT et MAIT et des lymphocytes innés (ILC) incluant les cellules tueuses naturelles (NK).



**Figure 6** : Répartition des cellules présentes dans la lamina propria au niveau de l'intestin (Mowat and Agace, 2014)

### a. Les lymphocytes de la lamina propria (LPL)

#### Les lymphocytes T

Comme dans le sang, les LT CD4<sup>+</sup> helper sont plus fréquents que les LT CD8<sup>+</sup> dans la LP (Mowat and Agace, 2014; van Wijk and Cheroutre, 2009). La plupart d'entre eux provient de la différenciation des LT naïfs activés dans le site induit (notamment les GLM) et dont la majorité devient des cellules mémoires effectrices capables de réagir afin d'empêcher la propagation du pathogène au compartiment systémique en cas d'infection ou de tempérer la réponse immune locale contre des antigènes du contenu luminal (van Wijk and Cheroutre, 2009). Ces LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> résident dans la muqueuse en tant que cellules mémoires effectrices à longue durée de vie. La rencontre avec leurs antigènes spécifiques au niveau de

l'intestin conduit à une expansion sélective des clones réactifs (van Wijk and Cheroutre, 2010). Les LT mémoires résidents agissent alors en « chef d'orchestre » et orientent la réponse immune pour qu'elle soit adaptée à une situation (infection, tolérance...) à laquelle ils ont déjà été confrontés. Ceci se fait principalement par la production de cytokines qui peuvent être de type Th1 (IFN- $\gamma$ ), principalement lors d'infection par des pathogènes intracellulaires, de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) en cas d'infection par des parasites, Th17 (IL-17, IL-22) contre des bactéries ou levures ... ou encore pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ ) ou à l'inverse anti-inflammatoire (IL-10, TGF $\beta$ ) pour les mécanismes de tolérance. Ces LT participent aussi à l'activation et à la différenciation des cellules B et à leur production d'immunoglobulines (IgG et IgA) et contribuent au recrutement des éosinophiles et des mastocytes aux tissus (Ahluwalia et al., 2017).

Les cellules T CD8+ effectrices résidentes au niveau du site effecteur quant à elles exercent aussi une fonction cytolytique par la sécrétion des molécules cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes, qui, grâce à leur capacité à former des pores dans les membranes cellulaires et à cliver les protéines, respectivement, conduisent à l'apoptose de la cellule cible (Ahluwalia et al., 2017).

Les cellules T reg naturelles ou induites sont enrichies dans la lamina propria et sont importantes dans l'homéostasie intestinale. En effet, ces cellules contrôlent l'auto-immunité, les allergies, les infections et les tumeurs en inhibant l'effet des lymphocytes T effecteurs (Ahluwalia et al., 2017). Les Tregs CD4+ naturels générés dans le thymus reconnaissent des auto-antigènes (Ahluwalia et al., 2017). Ces cellules sont caractérisées par l'expression de CD25 (récepteur d'IL-2a), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), GITR (glucocorticoid induit tumor récepteur du facteur de nécrose) et le facteur de transcription Foxp3. Les cellules T reg induites sont générées suite à l'activation des LT naïfs par les DC tolérogènes dans les GLM. Elles se divisent en trois populations : cellules Treg FoxP3+, Treg LAP+ et Tr1. En présence de TGF $\beta$  et AR, les cellules T naïves se différencient en Treg FOXP3+ qui expriment TCR, CD4, CD25, FoxP3, GITR et CTLA-4. La différenciation en Treg LAP+ reste mal définie, seul le rôle du TGF $\beta$  a été mis en évidence dans cette induction. Ces cellules sont TCR+, CD4+ et LAP+ (latency-associated peptide). La dernière sous population Tr1 se différencie suite à la sécrétion de l'IL-27 par les DC. Elles sont caractérisées par l'expression de TCR, CD4, CD49b et LAG-3 (lymphocyte activation gene 3) (Bertolini et al., 2021). L'ensemble de ces populations migre ensuite vers l'intestin (voir chapitre GLM). La suppression des fonctions effectrices des

lymphocytes par les Treg est médiée par la sécrétion des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$  (Westendorf et al., 2010).

### **Les lymphocytes B**

Les LB constituent une fraction non négligeable des LPL. Ces lymphocytes se différencient en cellules plasmocytaires au niveau de la LP et, en condition physiologique, produisent principalement des IgA polymériques (pIgA) (Cerutti, 2008, Mowat, 2003), un isotype majeur d'immunoglobuline trouvé sur les surfaces muqueuses et qui sert de première ligne de défense en bloquant l'accès et l'adhésion des agents pathogènes aux surfaces épithéliales (Johansen and Kaetzel, 2011; Macpherson et al., 2008; Mantis et al., 2011). Les IgA, liées par le récepteur polymère des immunoglobulines (pIgR), une glycoprotéine épithéliale présente sur la membrane basolatérale de la CE, sont activement transcytosées et libérées dans la lumière intestinale sous forme d'immunoglobulines sécrétoires (sIgA) (Johansen and Kaetzel, 2011). La production des IgA sécrétoires est dépendante du microbiote intestinal (Sommer and Bäckhed, 2013). Ces IgA sécrétoires sont des Ac neutralisants qui protègent contre la pénétration des antigènes luminaux, des micro-organismes et autres protéines étrangères dans l'intestin (Wershil and Furuta, 2008).

### **Les lymphocytes T non conventionnels**

Les LPL regroupent aussi une population de cellules T non conventionnelles qui expriment des formes de TCR invariant et qui ont une fonction dans l'immunité innée. Ces sous-populations comprennent les cellules T invariantes associées aux muqueuses CD3+CD161hiCD8 $\alpha\alpha$ + (ou CD4-CD8-) (cellules MAIT), ainsi que les cellules T naturel killer invariantes (cellules iNKT).

Les cellules MAIT se distinguent par l'expression d'un TCR invariant composé de la chaîne V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 chez l'homme et V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 chez la souris. Via leur TCR, les cellules MAIT reconnaissent les métabolites de la riboflavine (vitamine B2) d'origine bactérienne présentés par la protéine apparentée au CMH de classe I (MR1) hautement conservée (Le Bourhis et al., 2011). Les MAIT ont un phénotype de LT effecteurs, elles sont cytotoxiques et sont capables de sécréter rapidement des cytokines immunomodulatrices (IFN- $\gamma$ , IL-17). Les MAIT expriment aussi des récepteurs NK CD161 (NKR-P1) et le récepteur pour l'IL-18 (IL-18R $\alpha$ ). Ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées par des bactéries et jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les MAIT n'ont été décrites que dans le

jéjunum humain, où elles représentent 2 à 3 % des LIE et des cellules T de la lamina propria ; elles sont encore plus rares dans l'intestin de la souris (Le Bourhis et al., 2011).

Les iNKT expriment des récepteurs NK, dont NK1.1 chez la souris et ont un TCR composé de la chaîne  $\alpha$  invariante V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 généralement associée à une gamme limitée de chaînes TCR $\beta$ , principalement V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 2 chez la souris et d'une chaîne V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 TCR $\alpha$  appariée exclusivement avec V $\beta$ 11 chez l'homme (Dashtsoodol et al., 2019). Le TCR des NKT interagit avec CD1d, un antigène non-polymorphique du complexe majeur d'histocompatibilité de classe Ib. CD1d permet la présentation d'antigènes lipidiques et glycolipidiques endogènes ou exogènes tel l' $\alpha$ -galatosylcéramide. L'activation des iNKT conduit à une sécrétion importante de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ) et Th17 (IL-17). Ils participent à l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale. Ces cellules représentent 0.5% des LPL chez l'homme et chez la souris (Mowat and Agace, 2014).

#### **b. Les cellules de l'immunité innée**

La LP contient également un grand nombre de cellules innées capables de réagir rapidement (en quelques heures) à une infection. Contrairement à la réponse immune médiée par les LT mémoires cette réponse immune est aspécifique mais elle permet d'agir rapidement contre les pathogènes y compris ceux qui sont encore inconnus du système immunitaire adaptatif. La plupart de ces cellules sont aussi présentes et efficaces dès la naissance alors que le système immunitaire adaptatif est encore « immature ».

#### **Les lymphocytes innés (ILC)**

Les lymphocytes innés (ILC) sont la dernière population des LPL mais aussi des LIE qui a été découverte. Ces ILC sont des cellules résidentes dans l'intestin (Panda and Colonna, 2019; Vivier et al., 2018). Chez la souris, il a été montré qu'ils se développent à partir de précurseurs hématopoïétiques le long d'une voie nécessitant l'expression du répresseur transcriptionnel Id2 (inhibiteur de la liaison à l'ADN 2), du facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) et des signaux de cytokines via la chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma$ c) du récepteur de l'IL-2, l'IL-15, l'IL-7 et l'IL-21. Leur diversification en sous-ensembles distincts est orchestrée par des facteurs de transcription (Figure 7) et/ou par leur réponse distinctive aux cytokines, notamment IL-7 et IL-15 (Vivier et al., 2018). Les 3 principales populations d'ILC sont : les ILC-1, les ILC-2 et les ILC-3 (Tableau 1). Ces cellules jouent un rôle dans l'immunité intestinale,

dans l'inflammation mais aussi dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (Panda and Colonna, 2019; Vivier et al., 2018).

La première population d'ILC regroupe à la fois les cellules naturelles tueuses (NK) identifiées il y a plus de 40 ans et les ILC-1 caractérisées ces dernières années. Chez la souris les cellules NK se distinguent des ILC-1 par leur fonction cytotoxique impliquant la libération de granzymes et de perforine. Les ILC-1 n'ont pas ou peu de granules cytotoxiques mais ils produisent de plus grandes quantités d'IFN- $\gamma$  que les cellules NK (Bernink et al., 2013; Vonarbourg et al., 2010). Chez l'homme ces différences fonctionnelles sont toutefois moins évidentes car des ILC-1 cytotoxiques ont été décrites (Fuchs et al., 2013).

Les cellules NK expriment une large panoplie de récepteurs NK activateurs (KAR) et inhibiteurs (KIR), qui modulent leur réponse (Tableau 1). Chez la souris les principaux récepteurs exprimés à la surface des cellules NK sont CD16, NK1.1, NKp46, NKG2D, CD49b (DX5, anti-CD49b) (l'intégrine  $\alpha 2$ ), DNAM-1, CD244, CD94 & NKG2A/C/E, Ly49 (Di Santo, 2006; Lanier, 2008). Chez l'homme, les NK expriment ces mêmes récepteurs sauf ceux de la famille Ly49 qui n'existe pas et qui est remplacée par les KIR. Les NK humains expriment aussi NKp30 et NKp44 (Vivier et al., 2018).

L'expression de ces marqueurs varie toutefois en fonction des nombreuses sous populations qui constituent le groupe des cellules NK. Les cellules NK expriment aussi le récepteur à l'IL-15 (IL2Rb/CD122), une cytokine qui est importante pour leur survie car leur nombre est fortement diminué chez les souris déficientes pour l'IL-15 ou son récepteur (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998). L'IL-15 est aussi un puissant activateur des NK comme les interférons (IFN) de type I, l'IL-12 et l'IL-18 (Walzer et al., 2005).

Les facteurs de transcription Id2, Nfil3, Runx3, Tbx21 (T-bet), Eomesodermine (Eomes), Ets1 contribuent aussi à la différenciation et l'homéostasie des cellules NK (Figure7). Eomes n'est pas exprimé par les autres populations d'ILC (Serafini et al., 2015).

Grâce à leurs fonctions cytotoxiques, leur production d'IFN- $\gamma$  et l'expression de nombreux récepteurs capables d'évaluer l'état de stress des cellules infectées ou tumorales, les cellules NK jouent un rôle central dans la protection contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries ...) et le cancer.

Contrairement aux cellules NK, les ILC-1 n'expriment pas les NK inhibiteurs et CD49b (DX5) et n'ont pas ou peu de molécules cytotoxiques (granzymes, perforines) (Tableau 1)(Serafini et al., 2015). Leur développement dépend des mêmes facteurs de transcription que pour les cellules NK à l'exception d'Eomes (Figure7). Une partie des ILC-1 peut aussi provenir d'ILC-3 qui ont diminué leur expression de ROR $\gamma$ t et augmenté leur expression de T-bet (Klose et al., 2013).

Les ILC-1 produisent de grande quantité d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'IL-12 et ont ainsi un rôle essentiel dans les réponses immunes polarisées Th1. Il a été montré notamment que les ILC-1 participent à la protection contre le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). En effet, les souris déficientes pour Tbx21, qui possèdent des NK mais pas d'ILC-1, ne peuvent pas contrôler l'infection par *T. gondii* et l'injection d'ILC-1 dans des souris immunodéficientes (Rag2-/- $\gamma$ c-/-) protège contre le parasite (Klose et al., 2014). Cette protection pourrait être lié au recrutement des monocytes inflammatoires (Schulthess et al., 2012), un mécanisme décrit dans l'infection par *T. gondii* (Dunay et al., 2008). Une étude très récente, que nous avons commentée, a montré que les ILC-1 favorisent aussi le remodelage tissulaire par un mécanisme inattendu impliquant TGF- $\beta$ 1 et la métalloprotéinase MMP9 (Hariss and Meresse, 2021; Jowett et al., 2020). Au-delà, d'identifier un nouveau rôle pour les ILC-1, cette étude met en avant l'intérêt d'utiliser le modèle de co-culture avec les organoïdes intestinaux (Voir chapitre Modèles d'études de *Cryptosporidium* et résultats) pour étudier les fonctions spécifiques des cellules immunitaires.

Les ILC-2 présents chez l'homme et chez la souris jouent un rôle contre les pathogènes extracellulaires en sécrétant les cytokines de type Th2 notamment IL-5, IL-4, IL-9, IL-13 (Mjösberg and Spits, 2016; Panda and Colonna, 2019). Les ILC-2 de souris expriment CD90, c-Kit, Sca-1 et ST2 (une sous-unité d'IL-33R), IL-17RB (une sous-unité d'IL-25R), CD25 et ICOS. Chez l'homme, les ILC-2 expriment CD127, CD117, CD161 et le récepteur chimiotactique CRTH2 qui sert de récepteur de haute affinité pour la prostaglandine D2 (Tableau 1) (Mjosberg et al., 2011; Monticelli et al., 2011).

Les ILC-2 dépendent des facteurs de transcription GATA3 (Hoyler et al., 2012; Mjosberg et al., 2012) et ROR $\alpha$  (RAR-Related Orphan Receptor A) (Wong et al., 2012) pour leur différenciation et leur homéostasie. Le récepteur Notch1 a aussi été impliqué dans la différenciation de ces cellules *in vitro* et *in vivo* (Figure7) (Wong et al., 2012; Yang et al., 2013).



Les ILC-2 sont impliquées dans l'allergie, l'asthme (Lambrecht and Hammad, 2015), l'obésité (Brestoff et al., 2015) et le contrôle de parasites extracellulaires (Fallon et al., 2006; Neill et al., 2010). Il a été montré notamment que le transfert d'ILC-2 provenant de souris WT dans des souris IL25R<sup>&</sup>IL33R<sup>-/-</sup> ou IL-13<sup>-/-</sup> suffit à restaurer leurs défenses contre le parasite intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) en produisant de l'IL-13. Les ILC-2 expriment aussi des molécules du CMH-II qui participeraient aussi à l'élimination du parasite *N. brasiliensis* (Oliphant et al., 2014).

Le groupe des ILC-3 inclut des ILC-3 « classiques » et les cellules fœtales et néonatales responsables de la mise en place des tissus lymphoïdes («Lymphoid-tissue inducer » - LTI). Ces cellules ont des fonctions différentes mais elles ont été regroupées dans le même groupe parce qu'elles dépendent toutes les deux du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (RORC) (Figure 7).

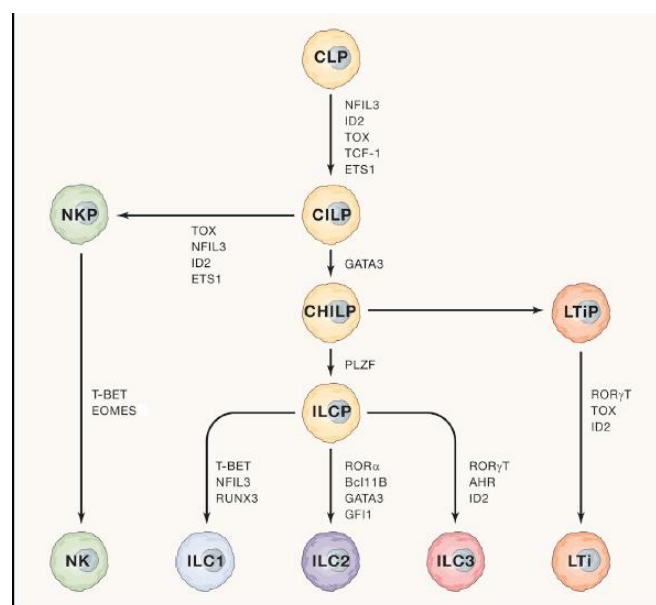
Les ILC-3, comme les LT CD4<sup>+</sup> Th17, produisent de l'IL-17 et de l'IL-22. Elles expriment Thy1, c-kit, IL7R $\alpha$ , IL23R, IL1R, TSLPR, IL15R (CD122) (Spits et al., 2013) et peuvent être séparées en deux populations distinctes sur la base de l'expression de CCR6 (Tableau 1) (Sawa et al., 2010). Les ILC-3 CCR6<sup>+</sup> sont majoritaires à la naissance mais les ILC-3 CCR6<sup>-</sup> le deviennent dans les 4 premières semaines de vie (Klose et al., 2013; Sawa et al., 2010). Les ILC-3 CCR6<sup>-</sup> expriment aussi le récepteur NK (NKp46) et produisent de l'IL-22 et de l'IFN- $\gamma$  mais pas ou peu d'IL-17 (Klose et al., 2013). Chez l'homme, les ILC-3 expriment comme chez la souris l'IL7R $\alpha$ , c-kit, IL23R, et CCR6 ainsi que les récepteurs NKp44 et NKp30 (Tableau 1) (Cella et al., 2009). Ils produisent aussi de l'IL-22 (Cella et al., 2009; Sonnenberg et al., 2012).

Les facteurs de transcriptions Id2, ROR $\gamma$ t et le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor) sont nécessaires pour la différenciation et le maintien des ILC-3 (Figure 7). L'alimentation et la flore sont importantes pour l'homéostasie de cette population car le nombre d'ILC-3 est fortement diminué dans les souris déficientes pour AhR (Kiss et al., 2011) et les souris sans germe (axéniques) (Sanos et al., 2009).

Les ILC-3 ont un rôle majeur dans le maintien de la barrière intestinale grâce à leur production d'IL-22. L'IL-22 induit la production de peptides antimicrobiens (ex : les  $\beta$ -défensines, RegIII $\beta$ , et RegIII $\gamma$  etc.) et de mucus (MUC1,3,10 et 13) par les CE (Spits and Cupedo, 2012). L'IL-22 stimule aussi la prolifération des CE et favorise ainsi la réparation et le renouvellement de l'épithélium intestinal en cas d'infection (Zhang et al., 2019). Il a été montré notamment que les ILC-3 NKp46<sup>+</sup>Ror $\gamma$ t<sup>+</sup> produisent de l'IL-22 en réponse à l'infection par *Citrobacter*

*rodentium* (une bactérie gram négative qui induit une colite chez la souris) (Sato-Takayama et al., 2008). Les ILC-3, sont « plastiques » et peuvent se différencier en ILC-1 pour produire de l'IFN- $\gamma$ . Ceci a été montré notamment chez la souris au cours de l'infection par *Salmonella typhimurium*, où la production d'IFN- $\gamma$  par les ILC-3 NKp46+T-bet+ permet de contrôler le pathogène (Klose et al., 2013). Enfin, les ILC-3 CCR6+ semblent aussi jouer un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie intestinale via l'expression du CMH-II car l'inhibition de l'expression de celui-ci spécifiquement dans les ILC-3 induit des lésions intestinales provoquées par l'activation de LT CD4+ spécifiques de la flore intestinale (Hepworth et al., 2015; Hepworth et al., 2013)

L'autre population d'ILC-3, les LTi, est caractérisée par l'expression d'IL7R $\alpha$  (Yoshida et al., 1999), c-kit, +/- CD4, Thy1 (Spits et al., 2013), CCR6 (Lugering et al., 2010), le ligand pour le récepteur activateur de NF $\kappa$ B (RANKL) (Rossi et al., 2007), CXCR5 (récepteur pour CXCL13) et l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7. Chez l'homme elles expriment aussi CD7 et CD161 mais pas CD4 (Cupedo et al., 2009). Les LTi produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Takatori et al., 2009) et aussi de la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ ), une protéine impliquée dans la mise en place des tissus lymphoïdes (Mebius et al., 1997). Les LTi sont nécessaires pour le développement des PP, des ganglions, et des FLI (Eberl and Littman, 2004; Eberl et al., 2004) (Chapitre développement du système inducteur).



**Figure 7** Développement des ILC chez la souris.

Les ILC se développent à partir des CILP (common innate lymphoid progenitors), qui elles-mêmes se différencient des CLP (common lymphoid progenitors). Les CILP sont à l'origine des cellules précurseurs des cellules NK (NKP) et des cellules CHILP (common helper innate lymphoid progenitors). Celles-ci,

donnent naissance aux LTiP (lymphoid tissu inducteur progenitors) qui généreront les LTi, et aux ILCP (innate lymphoid cell précurseurs) qui évoluent en ILC-1, ILC-2 ou ILC-3. Chaque étape de différenciation est dépendante de l'expression des facteurs de transcription indiqués : NFIL3 (nuclear factor IL-3 induction), Id2 (inhibitor of DNA binding 2), TOX (thymocyte selection-associated high mobility group box protein), TCF-1 (facteur de cellule T 1), ETS1 (homologue-1 du virus de l'érythroblastose aviaire E26), GATA3 (protéine de liaison GATA 3), PLZF (leucémie promyélocytaire à doigt de zinc), T-bet (facteur de transcription T-box), Eomes (Eomesodermin), RUNX3 (facteur de transcription 3 lié au runt), RORa (récepteur orphelin a lié au RAR), Bcl11b (lymphome/leucémie à cellules B 11B), Gfi1 (facteur de croissance indépendant 1), RORgt (récepteur orphelin lié à RAR gt) et AhR (récepteur d'hydrocarbure aryle)(Vivier et al., 2018).

**Tableau 1** : Expression des marqueurs des différentes sous populations d'ILC chez l'homme et la souris (Konya and Mjosberg, 2015).

	CD127 <sup>-</sup> ILC		CD127 <sup>+</sup> ILC1		ILC2		NCR <sup>-</sup> ILC3		NCR <sup>+</sup> ILC3	
	human	mouse	human	mouse	human	mouse	human	mouse	human	mouse
CCR6	-	-	+	-	+/-	-	-	+/-	+	-
CD4	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
CD7	ND	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND
CD25	ND	ND	-	-	+	+	+	+	-	ND
CD56	+	NA	-	NA	-	-	-	NA	+/-	NA
CD90	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	+
CD94	+	NA	-	NA	-	NA	-	-	-	+/-
CD103	+	-	-	-	-	-	ND	ND	-	ND
CD117	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+
CD127	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD161	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
CRTH2	-	ND	-	ND	+	+	-	ND	-	ND
ICOS	-	ND	-	ND	+	+	ND	-	+	-
IL-1bR	ND	ND	+	+	+	ND	+	+	+	+
IL-12RB	ND	ND	+	+	-	-	-	-	-	-
IL-23R	ND	ND	-	-	-	ND	+	+	+	+
NKp44	+	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+	NA
NKp46	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Sca1	NA	ND	NA	ND	NA	+	NA	+	NA	ND
ST2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

NCR<sup>+</sup> refers to NKp44<sup>+</sup> ILC3 in human and NKp46<sup>+</sup> ILC3 in mouse. Expression level of the cell surface markers is displayed as follows: + indicates high expression, - indicates no expression, +/- indicates bimodal expression. ND indicates that expression level is not defined and NA indicates that the marker is not applicable in the respective species.

## Les Macrophages

En plus des populations lymphoïdes, la LP abrite un grand nombre de macrophages (Bain and Mowat, 2014; Mowat and Agace, 2014). Ce sont les cellules phagocytaires les plus abondantes dans l'intestin, elles se caractérisent par l'expression des marqueurs tels que F4/80, CD64, l'intégrine CD11b et CXCR3. Elles maintiennent l'homéostasie de la muqueuse en capturant et en éliminant les pathogènes qui traversent la barrière épithéliale. Contrairement aux DC, les macrophages CXCR3<sup>+</sup> ne migrent pas dans les GLM pour induire l'activation des LT naïfs. Par contre, ils peuvent transmettre les Ag aux DC CD103<sup>+</sup> et induire une tolérance orale via les jonctions communicantes dépendantes de la connexine 43 (Mazzini et al., 2014). De plus, ces cellules expriment la molécule de CMH II ce qui leur permettent de présenter directement les Ag aux cellules T activées au niveau de la LP (Bain and Schridde, 2018). En plus ces cellules jouent un rôle important dans l'homéostasie intestinale en sécrétant des médiateurs solubles

comme l'IL-10 (Wang et al., 2019) ou le TNF $\alpha$  qui modulent l'inflammation, ou encore les cytokines IL-12 et IL-23 qui polarisent la réponse immune Th1 et Th17 respectivement.

### **Les cellules dendritiques (DC)**

Les DC, cellules spécialisées dans la présentation des Ag aux LT, sont aussi présentes dans la LP. Elles forment le lien entre la réponse adaptative et la réponse innée. Les DC captent les Ag au niveau de l'intestin soit directement dans la lumière intestinale par des extensions dendritiques transépithéliales (Persson et al., 2013) ou par le contact avec les cellules M ou les macrophages CXCR3+ (Stagg, 2018). Une fois chargées en Ag, ces cellules migrent dans les GLM et activent les LT et les LB (Agace, 2008; Stagg, 2018) (voir chapitre activation de la réponse immunitaire et GLM). Les DC comprennent les DC1 et DC2 qui peuvent être définies chez la souris et l'homme par l'expression du récepteur de chimiokine à motif X-C 1 (XCR1) ou de la protéine régulatrice du signal  $\alpha$  (SIRPa/CD172a), respectivement (Guilliams et al., 2014; Gurka et al., 2015). Chez la souris, les DC1 sont CD103+CD11b-, tandis que les DC2 comprennent les cellules CD103-CD11b+ et une population spécifique de l'intestin CD103+CD11b+ (Becker et al., 2014). Les deux populations CD11b+ sont étroitement apparentées : les DC CD103-CD11b+ donnent naissance aux cellules CD103+CD11b+ sous l'influence du TGF $\beta$  (Bain et al., 2017). Il y a plus de CD103+CD11b+ dans l'intestin grêle que dans le côlon (Denning et al., 2011). Des populations de DC équivalentes sont présentes dans l'intestin humain (Watchmaker et al., 2014) et sont souvent identifiées sur la base de l'expression de CD103 en conjonction avec SIRPa plutôt que CD11b. Toutes ces populations, majoritairement les DC CD103+, ont la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques pour interagir avec les cellules T (Cerovic et al., 2013; Jang et al., 2006).

### **B- L'épithélium intestinal**

L'épithélium intestinal constitue la première barrière qui protège l'organisme du contenu de la lumière intestinale. Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales liées les unes aux autres par des complexes moléculaires (jonctions) qui assurent son étanchéité. Cette surface est continuellement renouvelée par des cellules souches épithéliales intestinales pluripotentes (IESC pluripotentes) qui résident à la base des cryptes. La prolifération et la différenciation des IESC en CE matures sont régulées par de nombreux récepteurs membranaires et facteurs solubles produits et exprimés par les CE et/ou les cellules

immunitaires environnantes (Crosnier et al., 2006; van der Flier and Clevers, 2009). Le long de l'axe crypte-villosités de l'épithélium, les IESC donnent naissance à divers sous-ensembles de CE. Les cellules différenciées en phase terminale - à l'exception des cellules de Paneth - migrent vers l'axe crypte-villosités jusqu'à ce qu'elles disparaissent de la couche épithéliale. Pour que ce processus soit maintenu, les cellules souches épithéliales doivent pouvoir subir des cycles répétés de réplication et posséder la capacité d'auto-renouvellement continu (van der Flier and Clevers, 2009). La structuration et la distribution des unités de cryptes proliférantes dans l'intestin dépendent de la signalisation entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent. Un équilibre entre les signaux des protéines morphogénétiques osseuses et les antagonistes, tels que la noggin et le gremlin, offre une niche pour la prolifération des cellules souches (Crosnier et al., 2006). Les IESC s'appuient en outre sur la signalisation via les voies WNT- $\beta$ -caténine et Notch pour promouvoir l'auto-renouvellement et orienter la localisation des CE (van der Flier and Clevers, 2009).

En plus de ce barrage physique, l'épithélium sécrète dans la lumière intestinale de nombreuses molécules comme des mucines, des peptides antimicrobiens (AMP) et des IgA sécrétoires (sIgA) produites par les plasmocytes de la lamina propria qui limitent les contacts entre l'organisme et les microbes. Ces fonctions sont assurées par différents types de cellules épithéliales qui proviennent toutes d'une même cellule souche située au niveau des cryptes (Tableau 2) (Allaire et al., 2018).

**Tableau 2:** Les différents types de CE et leurs sous-ensembles (Allaire et al., 2018)

IEC subtype	Localization	Role	Subsets
Enterocyte	Small intestine (enterocyte) Colon (colonocyte)	Physical barrier Nutrient/water absorption Epithelial shedding Secrete antimicrobials	Differentiate as they migrate up the crypt axis Cells at apical tips metabolize microbial SCFAs → consume O <sub>2</sub> in colon Cells at the base of crypts ferment glucose to lactate and do not consume O <sub>2</sub>
Goblet cell	Small intestine Colon	Mucin secretion Goblet cell-associated passage Secrete antimicrobials	Sentinel goblet cells Detect and endocytosis bacterial products Are directly responsible for pathogen-induced compound mucus exocytosis
Paneth cell	Small intestine	Secrete antimicrobials Support the stem cell niche	
Tuft cell	Small intestine Colon	Helminth detection ILC2 expansion through production/secretion of IL-25	Tuft1: TSLP; Tuft2: CD45 Tuft cells develop differently depending on if they are located in the small intestine or colon
Enteroendocrine cell	Small intestine Colon	Secrete hormones	Enterochromaffin cells, G cells, K cells, I cells, S cells, and other
M cell	Small intestine (follicle-associated epithelium)	Antigen uptake	Inflammation-induced M cells Cholera toxin treatment causes M cells to form at villus tips

Les entérocytes et les colonocytes qui représentent la majorité des CE de l'intestin grêle et du côlon respectivement, jouent un rôle important dans la formation de cette barrière physique. Ils contribuent également à la formation de la protection biochimique en assurant le transport des sIgA et en sécrétant des AMP comme les défensines et des lectines de type C (RegIII). Toutefois, les AMP sont principalement produits par les cellules de Paneth, des cellules épithéliales dites « sécrétrices » qui sont localisées à la base des cryptes dans l'intestin grêle. Les autres cellules épithéliales sécrétrices sont les entéro-endocrines (entéro-chromaffines) spécialisées dans la production d'hormones qui assurent notamment la communication entre l'intestin et le système neuroendocrinien central et entérique et les cellules caliciformes qui sécrètent les principaux constituants du mucus (Mucine 2, TFF3, ...) (Peterson and Artis, 2014).

### **a. Détection des pathogènes par les CE**

En plus de sa fonction de barrière physico-chimique, la CE a un rôle central dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire locale. En effet, les CE expriment une variété de récepteurs innés (PRR) qui leur permettent de détecter les agents pathogènes, d'initier et d'orienter la réponse immunitaire de la muqueuse. Les PRR comprennent plusieurs familles, les membres des familles des récepteurs Toll-like (TLR), NOD-like receptor (NLR) et RIG-I-like receptor (RLR). Ces différentes familles fournissent des voies distinctes pour la reconnaissance de ligands microbiens ou de signaux endogènes associés à la pathogenèse (Figure 8) (Peterson and Artis, 2014). Au niveau basolatéral, la signalisation TLR initie une cascade de signalisation qui permet la translocation nucléaire de NFκB. Cela conduit à l'expression et à la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines, notamment TNF-α, IL-6, IL-8, IL-18 et CCL20, qui signalent et activent les cellules immunitaires (Abreu, 2010).

Alors que les TLR exprimés par les CE jouent un rôle clé dans la reconnaissance des pathogènes et de leurs produits, les réponses qu'ils suscitent visent principalement à maintenir les microbes à distance (sécrétion de mucines et production de peptides antimicrobiens) ou à recruter des cellules immunitaires (via des chimiokines) sur le site de l'infection (Ermund et al., 2013; Johansson et al., 2008). Lors de l'invasion directe des CE par des agents pathogènes intracellulaires, les entérocytes peuvent s'expulser physiquement de la muqueuse épithéliale. Ce processus implique l'activation des caspases inflammatoires. La caspase-1 est activée par le complexe de signalisation macromoléculaire appelé « inflammasome » exprimé sur les CE et qui se forme en réponse à diverses agressions cytoplasmiques PAMP et DAMP (damage-associated moléculaire pattern) (Lamkanfi and Dixit, 2017). Une fois que l'inflammasome est activé, cela déclenche le traitement et la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-18 ainsi que l'induction d'une forme spécialisée de mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose. Lors de l'activation de l'inflammasome des entérocytes, l'IL-18 et la prostaglandine E2 (PGE2) sont libérées de la cellule, entraînant la production ultérieure d'IFN-γ par les cellules immunitaires lymphoïdes et le recrutement de neutrophiles qui aide à éliminer les entérocytes du site d'infection (Knodler et al., 2014; Rauch et al., 2017). Les cellules M concentrées dans l'épithélium assurent aussi la présentation des

antigènes et de microorganismes aux cellules présentatrices d'antigènes (voir ci-dessus chapitre PP) (Mabbott et al., 2013).

#### **b. Interactions des CE avec les cellules immunitaires**

Les CE sont au centre de la réponse immunitaire dans la muqueuse grâce aux fonctions qui viennent d'être évoquées mais aussi via des interactions plus directes avec les cellules immunitaires hématopoïétiques. Elles contribuent à la fois au mécanisme « tolérogène » à l'état physiologique et aux processus inflammatoires lors d'une infection.

Notamment, les CE influencent les réponses immunitaires adaptatives cellulaires et humorales via leur interaction avec les cellules présentatrices d'antigène. Le TSLP (thymic stromal lymphopoietin), le TGF $\beta$  et l'AR sécrétés par les CE favorisent la production d'IL-10 et d'AR par les DC et les macrophages (Rimoldi et al., 2005; Taylor et al., 2009; Zeuthen et al., 2008) ce qui favorise la différenciation des LT naïfs en Treg. Les CE jouent également un rôle important dans l'induction d'une réponse immunitaire Th2 au niveau des sites muqueux lors d'une infection par les helminthes via leur sécrétion de TSLP et d'IL-25 (Saenz et al., 2010; Siracusa et al., 2011). Ces molécules sécrétées par les cellules tuft (von Moltke et al., 2016) et l'IL-33 par l'épithélium induisent la prolifération et l'activation des ILC-2 et l'élimination du parasite (Mjösberg et al., 2012; Neill et al., 2010; Price et al., 2010). A l'état basal, la stimulation des CE par le microbiote favorise la production d'IL-25 et agit sur les ILC-3 en diminuant leur production d'IL-22. Cela engendre une diminution de la production des peptides anti-microbiens par les CE et la diminution de la pression sur les bactéries commensales (Sawa et al., 2011).

Les CE agissent aussi sur la réponse humorale en induisant la production d'APRIL (proliferation-inducing ligand) et de BAFF (B cell-activation factor of the tumor necrosis factor family) par les DC via la signalisation TSLP, qui agit pour amplifier l'effet sur la stimulation des cellules B. En effet, la reconnaissance des motifs microbiens via des TLR présents sur les CE favorise la sécrétion du TSLP et par la suite l'augmentation de la production de BAFF et d'APRIL. Ces molécules stimulent l'expression d'AID (activation-induced cytidine deaminase), une enzyme associée à la maturation de l'affinité des immunoglobulines, activent les LB et induisent la sécrétion des IgA et IgG contre les pathogènes (He et al., 2007; Xu et al., 2007).

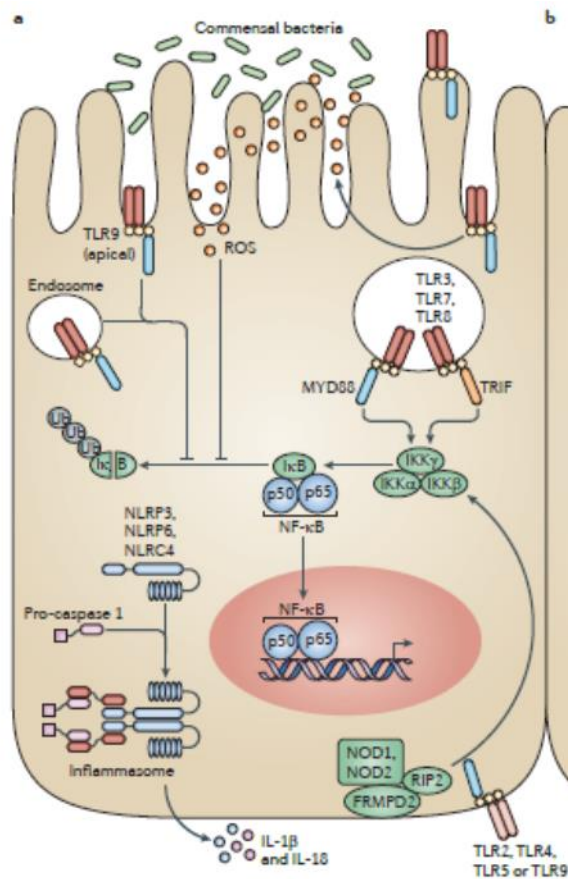
Les CE agissent aussi sur la maturation des cellules B naïves en plasmocytes sécrétant des IgA via la production d'oxyde nitrique (NO), d'IL-10 et d'AR, en conjonction avec la signalisation



TGF $\beta$  et l'activation des DC (Macpherson and Uhr, 2004; Mora and von Andrian, 2008; Mora et al., 2006).

Enfin les CE peuvent interagir directement avec des lymphocytes. Les CE dans tout l'intestin expriment de manière constitutive le CMH de classe I et principalement dans l'intestin grêle le CMH de classe II (Dahan et al., 2007). Le rôle de l'expression du CMH II à la surface de ces cellules reste toutefois mal connu. Récemment, il a été démontré que les cellules épithéliales Lgr5<sup>+</sup> murine expriment les molécules de CMH II et peuvent activer les LT naïfs comme les APC (Biton et al., 2018). Contrairement aux cellules professionnelles CPA, les CE n'expriment pas les molécules de costimulation classiques (CD80, CD86) nécessaires pour activer les LT naïfs. Les CE expriment cependant, un certain nombre de molécules non classiques du CMH de classe I qui permettent de transmettre des co-signaux d'activation. Ces molécules comprennent CD1d, le gène A/B lié à la chaîne du CMH de classe I (MICA/B) et la famille des ULBP chez l'homme ou Rae chez la souris, l'antigène leucocytaire humain-E (HLA-E) ou H2-Qa1 chez la souris, FcRn, MR1 et la protéine de liaison UL16. L'expression, constitutive ou induite, de ces molécules joue un rôle clé dans l'activation des populations de cellules T qui peuvent soit réguler soit favoriser l'inflammation (Dahan et al., 2007).

L'expression de ces molécules par les CE est un élément clé dans l'interaction avec les cellules immunitaires spécifiques de l'épithélium : les lymphocytes intraépithéliaux (LIE) (voir ci-dessous chapitre LIE). Les interactions entre les CE et les LIE sont impliquées dans l'immuno-surveillance anti-infectieuse et anti-tumorale et aussi dans la régulation de l'homéostasie entre le microbiote et elles-mêmes (voir ci-dessous chapitre LIE). Les CE, via la sécrétion de cytokines comme l'IL-15, l'IL-18 et le TGF $\beta$  agissent sur le maintien, le recrutement et l'activation des LIE (McDonald et al., 2018, Yu et al., 2006). Récemment, des travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de l'expression des molécules de la famille des butyrophilines (BTLN), exprimées à la surface des CE, dans la maturation et l'expansion d'une sous population de LIE TCR $\gamma\delta$  (Jandke et al., 2020; Mayassi et al., 2019) (voir ci-dessous chapitre LIE).



**Figure 8 :** Reconnaissance des pathogènes par les PRR.

Les motifs moléculaires associés aux microbes sont reconnus par les PRR, y compris les TLR, exprimés par les CE. Différents adaptateurs protéiques sont alors recrutés et engagent des voies de signalisation aboutissant à la translocation nucléaire de NFκB. D'autres récepteurs NLR exprimés par les CE forment des complexes d'inflammasome qui permettent l'activation de la caspase 1 et la production d'IL-18 (Peterson and Artis, 2014).

### I-3- Les Lymphocytes intraépithéliaux

Les cellules immunitaires assurent la surveillance, la protection et la réparation de l'épithélium intestinal et contribuent ainsi au maintien de son intégrité. En condition physiologique, la majorité de la population de cellules immunitaires qui peuplent l'épithélium intestinal est constituée de cellules lymphoïdes appelées : « lymphocytes intraépithéliaux » (LIE). Elle comprend des lymphocytes T et des cellules lymphoïdes innées mais pas de lymphocytes B.

Le nombre de LIE varie le long de l'intestin. Il est plus élevé dans l'intestin grêle avec 1 LIE pour 5 à 10 CE (Olivares-Villagómez and Van Kaer, 2010) alors que dans le côlon on compte environ

2 à 5 LIE pour 100 CE (Malamut et al., 2017) . Compte-tenu de l'énorme surface que représente l'épithélium, ces cellules représentent une quantité non négligeable de cellules immunitaires. Il a été rapporté que chez la souris les LIE représentent 50% de la totalité des cellules T de l'organisme (Cheroutre, 2004). Des expériences réalisées chez la souris, avec des animaux parabiotiques et des greffes d'intestin, ont montré que les LIE circulent très peu et se cantonnent au compartiment épithélial (Sugahara et al., 1999). Cette population constitue donc une population cellulaire résidente et spécifique à l'épithélium intestinal.

Bien qu'il s'agisse d'une population majoritairement lymphocytaire, la composition des LIE est très hétérogène et varie entre l'intestin grêle et le côlon, l'espèce et l'âge (Voir ci-dessous chapitre évolution des LIE avec l'âge). Dans l'intestin grêle des individus adultes, là où elle a été le plus étudiée, la population des LIE est majoritairement composée de LT CD8+. Dans le côlon en revanche, les LT CD4+ prédominent (Abadie et al., 2012). La quasi-totalité des LIE expriment l'intégrine alpha E (CD103) (Benmerah et al., 1994). Celle-ci forme, avec l'intégrine  $\beta 7$ , un récepteur hétérodimérique ( $\alpha E\beta 7$ ) qui se lie à l'E-cadhérine présente à la surface des CE et retient ainsi les LIE dans l'épithélium (Schön et al., 1999). En plus de CD103, les LIE qui expriment un TCR (T-LIE) expriment les marqueurs classiques des cellules activées, CD45RO (chez l'homme), CD44 (chez la souris) et CD69. Il a aussi été montré que les LIE ont une durée de vie longue et sont donc pour la plupart des lymphocytes résidents mémoires (Fan and Rudensky, 2016; Mueller and Mackay, 2016). En outre, comme beaucoup de LT CD8+ effecteurs mémoires, une grande partie d'entre eux exprime des récepteurs NK (NKG2D, NKG2A, CD94, NKp46/44 ...) associés à l'immunité innée (Tableau 3) (Abadie et al., 2012).

Malgré ces caractéristiques communes de lymphocytes mémoires résidents/effecteurs, il a été montré chez la souris que les LIE forment une population de cellules immunitaires très hétéroclites qui se compose principalement de deux groupes distincts de lymphocytes T dénommés « conventionnels » et « non conventionnels » et de cellules innées d'origine lymphoïdes (Cheroutre et al., 2011) .

Les LIE qui expriment un TCR se divisent en deux grands groupes : les LIE conventionnels (LIEC) et les LIE non conventionnels (LIENC). Cette classification se base sur des différences phénotypiques, fonctionnelles et sur l'ontogénie des cellules (Cheroutre and Lambolez, 2008).

**Tableau 3** : Caractéristiques des différentes populations de LIE (McDonald et al., 2018)

IEL subset	TCR repertoire	NK cell receptor repertoire	Ligands	Effector molecules
<i>Mouse</i>				
Unconventional TCR $\alpha\beta^+$ IEL	Diverse <sup>a</sup>	CD94, NKG2 family and LY49 family	MHC class I, MHC class II, non-classical MHC class I, RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
Unconventional TCR $\gamma\delta^+$ IEL	TCRV $\gamma 7$ -enriched	CD94, NKG2 family and LY49 family	BTNL1, BTNL6, RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
Conventional TCR $\alpha\beta^+$ IEL	Diverse <sup>a</sup>	None	MHC class I and MHC class II	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
ILC1	None	CD94, NKG2 family and LY49 family	RAE1, MULT1, H60a and Qa-1	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
CD8 $\alpha\alpha^+$ innate IEL	None	LY49E <sup>+</sup> or LY49E <sup>-</sup>	TL	IFN $\gamma$ and possibly others
<i>Human</i>				
Unconventional TCR $\alpha\beta^+$ IEL <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Unconventional TCR $\gamma\delta^+$ IEL	TCRV $\delta 1$ -enriched	CD94, NKG2 family and KIR family	CD1, MICA, MICB, ULBP and others and possibly BTNLs	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
Conventional TCR $\alpha\beta^+$ IEL	Diverse <sup>a</sup>	CD94, NKG2 family and KIR family	MHC class I, MHC class II, MICA, MICB and ULBP	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
ILC1	None	CD94, NKG2 family and KIR family	MICA, MICB and ULBP	IFN $\gamma$ , TNF and granzyme B
Intracellular CD3 <sup>+</sup> IEL	None	KIR family and others	ND	IFN $\gamma$ and possibly others

### I-3-1-LIE conventionnels (LIEC)

#### A-Origine, développement et maintien

Les lymphocytes T intraépithéliaux conventionnels (LIEC) de l'intestin, aussi appelés « type A », « induits » ou « périphériques » (McDonald et al., 2018), constituent la majorité des LIE chez l'homme et environ la moitié des LIE chez la souris (Tableau 3) (Mayassi and Jabri, 2018). Ils ont été nommés LT conventionnels parce que leur phénotype et leur développement sont similaires à ceux des LT effecteurs/mémoires du compartiment systémique. Comme la plupart des LT en périphérie, les LIEC expriment un TCR formé par les chaînes alpha et bêta (TCR $\alpha\beta$ ) combinées aux co-récepteurs CD8 $\alpha\beta$  (CD8) ou CD4. Dans l'intestin grêle, la population est constituée d'environ 90% de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et de 10% de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires alors que dans le côlon les proportions de LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> sont quasiment équivalentes. La proportion de celles-ci augmente avec l'âge suite à la reconnaissance des antigènes exogènes (Cheroutre et al., 2011).

De nombreuses données expérimentales, chez la souris et chez l'homme, ont démontré que les LIEC proviennent de LT naïfs circulants qui ont été stimulés dans les organes lymphoïdes secondaires de l'intestin (plaques de Peyer, ganglions mésentériques) par des

antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I ou II des DC intestinales. Leur spécificité est encore mal connue mais plusieurs études suggèrent qu'ils reconnaissent un large spectre d'antigènes, pouvant provenir de l'alimentation, du microbiote ou encore de pathogènes (Masopust et al., 2010; da Silva Menezes, 2003). Après activation ces LT rejoignent la circulation sanguine par le canal thoracique puis retournent préférentiellement dans l'intestin via les veinules post-capillaires de la muqueuse grâce aux molécules d'adressage induites lors de leur stimulation. L'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  a un rôle important dans ce processus dit de « homing ». Elle interagit avec son ligand MADCAM1 exprimé au niveau des vaisseaux sanguins de l'intestin et augmente l'adhésion des LT à la paroi endothéliale ce qui favorise leur extravasation du compartiment sanguin vers la muqueuse intestinale. Le récepteur aux chimiokines CCR9, dont le ligand CCL25 est constitutivement exprimé par les CE intestinales participe quant à lui à l'attraction de ces LT dans l'intestin grêle. L'augmentation de l'expression de ces deux récepteurs ( $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9) à la surface des LT activés dans l'intestin est stimulée par un facteur environnemental provenant de l'alimentation, l'AR. Comme indiqué ci-dessus (chapitre GLM), ce métabolite de la vitamine A est produit par les CE et les cellules stromales intestinales ainsi que par une sous population de DC particulièrement abondante dans l'intestin qui se caractérise par l'expression de l'intégrine CD103 et du récepteur CCR7 (Edele et al., 2008; Hammerschmidt et al., 2008; Iwata et al., 2004). Bien que la migration vers le côlon soit également dépendante de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , l'AR ne semble ni nécessaire ni suffisant pour induire la migration vers ce site (Cheroutre et al., 2011). La migration dans l'intestin n'est cependant pas restreinte aux LT activés localement. En effet, il a été montré que les LT stimulés par une infection virale en périphérie expriment transitoirement l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et peuvent alors migrer dans l'épithélium intestinal pour limiter l'entrée et/ou la diffusion du pathogène (Masopust et al., 2010).

Les LT expriment ensuite l'intégrine CD103 vraisemblablement sous l'influence du TGF $\beta$  synthétisé par les cellules épithéliales et sont ainsi retenus dans l'épithélium (El-Asady et al., 2005; Masopust et al., 2006). Ils acquièrent également des propriétés cytotoxiques, notamment grâce à l'IL-15 produit par les entérocytes. Cette cytokine stimule l'expression de récepteurs NK et celle de la sérine protéase granzyme B et maintient la survie des LIE en augmentant l'expression du facteur de survie Bcl-xL (Malamut et al., 2010). Le TGF $\beta$  et l'AR, conjointement avec une forte stimulation du TCR, contribuent aussi à l'activation du « programme cytotoxique » et induisent l'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  à la surface des

LIE. Ils sont essentiels pour la différenciation d'une sous population de LIEC, décrite récemment, caractérisée par la co-expression des molécules de costimulation CD4 et CD8 $\alpha\alpha$ +. Les LIEC CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + représentent moins de 10% des LIE chez l'homme et la souris mais ils ont des capacités régulatrices et participent au contrôle de l'inflammation dans l'intestin (voir ci-dessous) (Sujino et al., 2016). Ils se différencient à partir des LT CD4+ effecteurs ou régulateurs (Treg) qui migrent dans l'épithélium. Ces derniers subissent alors une véritable reprogrammation marquée par la diminution de l'expression du facteur de transcription THPOK, qui maintient le programme CD4 et par l'augmentation de l'expression de Runx3 et de T-bet qui contrôlent le programme CD8 cytotoxique (Reis et al., 2013). Les LIEC CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + provenant des Treg perdent également l'expression de FOXP3 (Bilate et al., 2016; Sujino et al., 2016).

Il a été montré récemment que la différenciation des LIEC CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + dépendait aussi de métabolites produits par le microbiote comme les indoles. Ceux-ci proviennent de la dégradation du tryptophane et activent la voie AhR (Récepteur d'hydrocarbure aryle (AhR), un facteur de transcription activé par un ligand qui régule l'immunité intestinale et l'inflammation) qui réprime l'expression de THPOK (Cervantes-Barragan et al., 2017).

## B-Fonction

Les LIEC jouent un rôle indispensable dans l'immunité protectrice de la muqueuse intestinale en tant qu'effecteurs mais aussi régulateurs. En tant que LT résidents mémoires, les LIEC protègent l'épithélium contre la réinfection de pathogènes de manière spécifique (dépendante du TCR) via la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , de TNF $\alpha$  (Mueller and Mackay, 2016) comme c'est le cas lors de l'infection par le *Reovirus*, *Toxoplasma gondii* (Lin et al., 2021) et *Cryptosporidium* (Bharhani et al., 2007; McDonald et al., 1996) (voir ci-dessous chapitre réponse adaptative contre *Cryptosporidium*) ou encore par des mécanismes de cytotoxicité impliquant les voies granzyme/perforine et/ou Fas/FasL (McDonald et al., 2018).

En résumé, les LIEC constituent une population de LT mémoires résidents majoritaire chez l'homme et dont le phénotype et les fonctions sont fortement façonnés par l'environnement intestinal.

## I-3-2-LIE non conventionnels (LIENC)

Les lymphocytes intraépithéliaux « non conventionnels » (LIENC) aussi appelés de « type B » ou « naturels » se différencient des LIEC par leur phénotype, leur développement et leur spécificité antigénique qui cible principalement des autoantigènes (McDonald et al., 2018). Ces LIE ont surtout été étudiés chez la souris car ils constituent la majorité des LIE alors que chez l'homme ils ne représentent que 10 à 20% des LIE totaux.

On distingue deux sous populations de LIENC : l'une exprime le TCR $\alpha\beta$  et l'autre le TCR $\gamma\delta$ . Les deux sont soit CD8 $\alpha$  soit n'expriment aucun des corécepteurs CD4 et CD8 $\alpha\beta$  (double négative ; DN). Leurs fréquences sont quasiment identiques chez la souris (environ 50% des LIENC) mais chez l'homme les LIENC TCR $\gamma\delta$  sont largement majoritaires. A l'inverse des LIEC, les LIENC sont également négatifs pour l'expression de CD2, CD5, CD28, antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA1; également connu sous le nom d'intégrine  $\alpha\beta 2$ ) et THY1 (Cheroutre et al., 2011). Ils expriment aussi des récepteurs NK comme Ly49, CD94 / NKG2A et 2B4 (Tableau 3) (Cheroutre et al., 2011; McDonald et al., 2018; Olivares-Villagómez and Van Kaer, 2018).

### I-3-2-1-Les LIENC CD8 $\alpha$ /DN TCR $\alpha\beta$

#### A-Origine, développement et maintien

Les LIENC CD8 $\alpha$ /DN TCR $\alpha\beta$  constituent 20 à 50% des LIE totaux chez la souris et moins de 1% chez l'homme (Van Kaer and Olivares-Villagómez, 2018). Plusieurs hypothèses ont été évoquées quant à l'origine des LIENC TCR $\alpha\beta$ . Il a d'abord été proposé que les LIENC TCR $\alpha\beta$  se développaient en dehors du thymus car contrairement aux LT classiques, la population est toujours présente chez les souris athymiques (Guy-Grand et al., 2003; Lin et al., 1994; Poussier et al., 1992). Cette hypothèse s'appuyait aussi sur l'observation que les LIENC TCR $\alpha\beta$  sont enrichis en cellules qui reconnaissent le super antigène du virus murin MMTV (mouse mammary tumour virus) alors que ces clones sont normalement éliminés dans le thymus par la sélection négative (Pobezinsky et al., 2012). Cette théorie a ensuite été réfutée par plusieurs travaux qui ont mis en évidence la présence de précurseurs thymiques des LIENC TCR $\alpha\beta$  chez la souris (Lambolez et al., 2006) et montré que ceux-ci ont un mode de sélection agoniste, comparable à celui des cellules NKT et des LT reg naturels (Leishman et al., 2002; Pobezinsky et al., 2012; Yamagata et al., 2004). Ce mécanisme opère lorsque le précurseur

thymique stimulé par un autoantigène reçoit un signal d'activation fort via son TCR et s'engage dans une voie de différenciation différente qui le protège de la mort par apoptose induite par le processus de sélection négative. Cette hypothèse a été étayée récemment par deux publications, dans lesquelles les TCR $\alpha\beta$  des LIENC et des LIEC isolés de l'intestin de souris ont été clonés et réexprimés dans des précurseurs thymiques. Ces travaux ont montré que les progéniteurs exprimant un TCR $\alpha\beta$  cloné à partir de LIENC généraient uniquement des LIENC alors que ceux qui exprimaient un TCR $\alpha\beta$  provenant de LIEC donnaient naissance à des LT naïfs circulants et des LIEC mais pas aux LIENC (Mayans et al., 2014; McDonald et al., 2014). L'ensemble de ces travaux prouvent que le TCR $\alpha\beta$  détermine la différenciation des LIE TCR $\alpha\beta$  en LIENC ou LIEC et confirment que ses deux populations utilisent des mécanismes de différenciations distinctes.

Une étude plus récente a mis en évidence la présence de deux précurseurs thymiques dénommés « type A » et « type B » qui se distinguent par l'expression du récepteur membranaire PD-1 et du facteur de transcription T-bet- (Ruscher et al., 2017). Les précurseurs PD-1+ T-bet (type A) donnent naissance à une population de LIE TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + enrichie en cellules auto-réactives et majoritairement dépendantes de l'expression de  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m) et des molécules du CMH I classique. Les précurseurs PD-1-T-bet+ (type B) génèrent des LIE TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + qui reconnaissent des molécules du CMH I non classique dépendantes de la  $\beta$ 2m comme la molécule CD1d et des molécules du CMH II (I-Ab) (Bilate et al., 2016; Ruscher et al., 2017).

Après leur différenciation, les progéniteurs TCR $\alpha\beta$ +DN quittent le thymus pour rejoindre l'épithélium intestinal. Cette étape est contrôlée par le récepteur à la sphingosine-1 phosphate (S1PR1) et par l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 (Ruscher et al., 2017). L'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  n'est quant à elle acquise qu'à l'entrée dans l'épithélium intestinal vraisemblablement sous l'influence du TGF- $\beta$  (Konkel et al., 2011; Ruscher et al., 2017).

La spécificité antigénique de LIE CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ + reste incertaine, mais compte-tenu de la grande cross-réactivité du TCR et de la faible modification de cette population chez les animaux germ-free, il a été proposé, qu'à la manière des cellules NK, ces LIE soient plus réactifs aux variations d'expression des molécules du CMH classique ou non classique qu'à la reconnaissance de peptides (McDonald et al., 2018).



La maturation et le maintien des LIE TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  dans l'épithélium intestinal dépendent de l'IL-15. La déficience en IL-15 ou en son récepteur IL-15- $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ) au niveau thymique n'affecte pas la population des LIE TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  au niveau intestinal ce qui signifie que l'IL-15 n'est pas requise au stade thymique. En revanche, la signalisation induite par l'IL-15 est cruciale pour la maturation et/ou la survie des LIE TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  dans l'intestin (Lai et al., 2008).

Chez l'homme, l'existence de cette population de LIE est encore mal établie. Une étude récente suggère l'existence d'une population équivalente aux LIE TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + murins. Cette population exprime à la fois la molécule CD8 $\alpha\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$  et est donc difficile à détecter chez l'homme (Verstichel et al., 2017). Toutefois leur parenté avec les LIE TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + murin reste encore à prouver.

### C- Fonction

Les LIE TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + expriment fortement des molécules impliquées dans le phénomène cytotoxique telles que l'expression à des niveaux élevés de granzyme, de ligand CD95 (CD95L; également connu sous le nom de FASL) et de CD69. L'expression de ces molécules donne aux LIENC TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + un puissant phénotype effecteur cytotoxique. Par contre, ces LIENC ont de faibles niveaux de production d'IFN- $\gamma$  (Cheroutre et al., 2011).

En plus de leur rôle cytotoxique, cette population a un possible rôle régulateur. En effet, la sécrétion d'IL-10 par les LIENC suite à leur transfert à des souris immunodéficientes favorise la protection contre la colite induite par transfert des TCD4 $^+$  CD45RB $^{\text{High}}$  (Poussier et al., 2002). De plus, les LIENC présentent plusieurs marqueurs qui leur permettent d'avoir un rôle régulateur, tels que le TGF- $\beta$ , l'activation des lymphocytes 3 (LAG-3), qui est impliquée dans la suppression immunitaire par les cellules T régulatrices, et la protéine de type fibrinogène 2 (Fgl-2), qui supprime la maturation des cellules dendritiques (Denning et al., 2007).

### I-3-2-2-Les LIENC TCR $\gamma\delta$ +

#### A- Origine, développement et maintien

Les LIE naturels TCR $\gamma\delta$ + représentent une fraction importante (environ 40 à 70 %) des LIE totaux chez la souris et environ 5 à 20 % chez les humains (Van Kaer and Olivares-Villagómez, 2018). Chez la souris ils expriment principalement CD8 $\alpha$  mais pas CD8 $\beta$  à l'inverse

des cellules TCR $\gamma\delta^+$  résidentes dans le tissu lymphoïde (Sheridan and Lefrançois, 2010). Chez l'homme la majorité n'exprime ni le complexe CD8 (CD8 $\alpha\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$ ) ni le CD4. Le répertoire TCR des LIÉ TCR $\gamma\delta^+$  est très limité, avec un sous-ensemble dominant V $\gamma$ 4 chez l'homme et un sous-ensemble dominant V $\gamma$ 7 chez la souris. En plus, ces cellules ne présentent pas de restriction du CMH (Hayday and Vantourout, 2013).

La spécificité et les modalités de reconnaissance antigénique des LIÉ TCR  $\gamma\delta^+$  sont encore mal connues. Les molécules du CMH ou des molécules apparentées au CMH (telles que les molécules de souris T10 et T22 ou les molécules de CD1c humaines) sont reconnues par le TCR  $\gamma\delta^+$  (Chien and Königshofer, 2007). Les TCR  $\gamma\delta$  se lient également à des antigènes non présentés au CMH, telles que les glycoprotéines virales (Cheroutre et al., 2011) ou aux complexes hétéromères d'ATPase (Scotet et al., 2005). La liaison à ces molécules pourrait refléter une réactivité croisée des TCR qui se lient également aux molécules liées au CMH ou une reconnaissance physiologique de déterminants hétérogènes, comme le mode de reconnaissance antigénique de type immunoglobuline (Adams et al., 2005). Les LIÉ TCR  $\gamma\delta$  peuvent aussi détecter des cellules stressées via leur expression des récepteurs NK (Bonneville et al., 2010).

La majorité des LIÉNC TCR $\gamma\delta^+$  est vraisemblablement d'origine thymique, mais une partie de la population est présente dans des souris athymiques ce qui suggère aussi une origine extra thymique (McDonald et al., 2018). Après la migration dans l'épithélium intestinal, certaines molécules jouent un rôle crucial dans le maintien et la rétention de cette population, notamment la voie AhR et l'IL-15. La déficience en AhR ou le manque de ses ligands affecte le maintien des LIÉNC TCR  $\gamma\delta^+$  (Cervantes-Barragan and Colonna, 2018). Récemment, plusieurs études ont mis en évidence le rôle central des membres de la famille des gènes de type butyrophiline (Butyrophilin-like protein/ BTNL). Butyrophilin-like protein 1 (BTNL1), BTNL4 et BTNL6 sont structurellement apparentées aux molécules co-stimulatrices de CD80 et inhibitrices de PD-L1 (Di Marco Barros et al., 2016). Elles sont exprimées à la surface des CE, et sont responsables de la maturation et de l'expansion des LIÉNC TCR $\gamma\delta^+$  localement (Rhodes et al., 2016). Les souris dépourvues d'expression de BTNL1 dans l'épithélium intestinal ont une perte sélective des LIÉNC TCRV $\gamma$ 7. BTNL1 coopère avec BTNL6 pour induire l'activation et l'expansion des LIÉNC TCRV $\gamma$ 7 (Di Marco Barros et al., 2016). Chez

l'homme, BTNL8 induit la reconstitution de la sous population de LIENC  $V\gamma 4^+/V\delta 1^+$  (Mayassi et al., 2019).

## B- Fonction

Les LIENC  $TCR\gamma\delta^+$  jouent un rôle important dans la réparation et la régulation de l'inflammation de l'épithélium intestinal. Les LIENC  $TCR\gamma\delta^+$  sécrètent des cytokines anti-inflammatoires dont le  $TGF\beta$  et la prothymosine  $\beta 4$  (Kapp et al., 2004). La sécrétion de ces cytokines notamment le  $TGF\beta$  est stimulée par l'activation du récepteur inhibiteur NK groupe 2, membre A (NKG2A) exprimé sur celles-ci (Bhagat et al., 2008; Jabri and Meresse, 2006). Les LIENC  $TCR\gamma\delta^+$  peuvent aussi limiter l'inflammation en produisant de l'IL-10 (Rhodes et al., 2008). Ils ont aussi un rôle important pour maintenir l'intégrité et la cicatrisation de l'épithélium intestinal en sécrétant le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) (Chen et al., 2002).

Les LIENC  $TCR\gamma\delta^+$  sont aussi cytotoxiques et peuvent contribuer à une immunité protectrice. Ils ont la capacité de tuer les cellules cibles via le TCR et/ou les récepteurs NK NKG2D (Cheroutre et al., 2011). Ils peuvent aussi tuer les cellules infectées, activées ou transformées, par des voies qui impliquent l'engagement de récepteurs induisant la mort, tels que le CD95 (également connu sous le nom de FAS) et les récepteurs de ligand induisant l'apoptose liés au TNF (TRAILR), et la libération d'effecteurs cytotoxiques molécules telles que la perforine et les granzymes (Dieli et al., 2001; Qin et al., 2009). La protection par les LIENC  $TCR\gamma\delta^+$  peut aussi être médiée par la production de peptides antimicrobiens tels que la régénération de la protéine dérivée des îlots 3 (REG3 $\gamma$ ) (Ismail et al., 2011).

En résumé, les LIENC  $CD8\alpha\alpha^+TCR\alpha\beta^+$  ou  $TCR\gamma\delta^+$  sont des cellules dont la maturation est indépendante de l'activation par des antigènes exogènes, contrairement aux LIENC. Ces cellules effectrices colonisent rapidement l'épithélium intestinal où elles assurent très tôt des fonctions régulatrices et d'immunosurveillance. Bien qu'elles expriment un TCR, ces cellules se rapprochent donc plus des cellules immunes innées que des LT effecteur/mémoire conventionnels.

## I-3-3-LIE innés

L'épithélium intestinal abrite aussi une population de cellules lymphoïdes innées (ILC). Cette population est hétérogène et comprend des ILC « classiques », comme les ILC-1 que l'on

retrouve aussi dans la LP et les autres compartiments (décrites ci-dessus chapitre LP) et des cellules innées spécifiques à l'épithélium, les LIE innés TCR- $\alpha$ CD3<sup>+</sup> (qui expriment uniquement les chaînes du complexe CD3 en intracellulaire).

### I-3-3-1-Les cellules innées lymphoïdes intraépithéliales (IE-ILC-1)

La présence de LIE innés semblables à des cellules NK a été rapporté il y a plus d'une vingtaine d'années (Guy-Grand et al., 1996, Eiras et al., 2000) mais la caractérisation précise de ces cellules est beaucoup plus récente (Ettersperger et al., 2016; Fuchs et al., 2013a; Van Kaer et al., 2014).

On distingue deux populations d'IE-ILC dans l'intestin. L'une est proche des ILC-1 (IE-ILC-1) décrites ci-dessus tandis que l'autre, qui semble être spécifique à l'épithélium intestinal, se différencie des ILC conventionnelles par son phénotype et son développement.

#### A- Phénotype des IE-ILC-1

Les IE-ILC sont semblables dans leur développement, phénotype et fonctions aux ILC-1 de la LP (décrites ci-dessus). Chez la souris, les IE-ILC-1 expriment les récepteurs de l'immunité : CD161, NKp46, CD160, CD94, NKG2D et le récepteur de l'IL-2/15 CD122. L'IL-15 n'est cependant pas nécessaire pour leur développement et leur survie contrairement aux ILC-1 de la LP. De façon surprenante pour des LIE, ces IE-ILC-1 n'expriment pas CD103<sup>+</sup> chez la souris alors qu'elles l'expriment chez l'homme (Fuchs et al., 2013). Leur développement dépend des facteurs de transcription requis pour les ILC-1 périphériques : T-bet et Id2 (Fuchs et al., 2013). Récemment, Van Acker et al ont mis en évidence une autre population d'IE-ILC-1 chez la souris. Ces IE-ILC-1 se distinguent par l'absence d'expression de NKp46 et par l'expression du récepteur NK Ly49E (NKp46-Ly49E<sup>+</sup>) et de CD103. Elles expriment aussi des niveaux intermédiaires de CD11b et CD11c mais ni c-kit ni NK1.1. Le développement des IE-ILC-1 NKp46-Ly49E<sup>+</sup> dépend des mêmes facteurs de transcription (T-bet, Id2) mais cette sous population a besoin d'IL-15 pour sa survie (Van Acker et al., 2017). Chez l'homme, les IE-ILC expriment NKp44 ou NKp46 et les facteurs de transcription T-bet et Eomes. Elles expriment également le récepteur CXCR6 (Fuchs et al., 2013). Ces cellules représentent moins de 1% des LIE chez la souris et l'homme adulte (Ettersperger et al., 2016; Fuchs et al., 2013b)

## B-Fonction des IE-ILC

Les fonctions des IE-ILC-1 sont encore méconnues. Toutefois, ces cellules produisent de grande quantité d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 et participent donc à l'activation et l'amplification de la réponse immunitaire Th1 (Fuchs et al., 2013a; the Immunological Genome Consortium et al., 2015). Les IE-ILC-1Ly49E+ contiennent aussi des granules cytotoxiques et expriment les granzymes A et B ainsi que la perforine mais contrairement aux cellules NK conventionnelles elles sont incapables de tuer les cellules YAC-1 in vitro (Van Acker et al., 2017).

## I-3-3-2-Les LIE innés TCR-iCD3+

### A- Phénotype des TCR-iCD3+

Les LIE TCR-iCD3+ (ou iCD3+CD103+CD8 $\alpha\alpha$ +/-) ont été découverts récemment grâce aux travaux des groupes de Olivares-Villagómez D (Van Kaer et al., 2014) et de N Cerf-Bensussan & B Meresse (Ettersperger et al., 2016). Comme toutes les cellules lymphoïdes innées, les LIE TCR-iCD3+ se caractérisent par l'absence de récepteur spécifique à l'antigène à leur surface (TCR-). Néanmoins, ces cellules innées ont des caractéristiques qui les rapprochent des LT. Chez l'homme, elles expriment en intracellulaire (iCD3+) toutes les chaînes du complexe CD3 (CD3 $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ ) nécessaires à la signalisation du TCR et chez la souris la chaîne CD3 $\gamma$ . Il a aussi été montré que les cellules humaines contiennent des réarrangements (productifs ou non) des gènes TCRA, TCRB, TCRG et TCRD qui codent pour les différentes chaînes du TCR (Ettersperger et al., 2016). Chez l'homme la population exprime de nombreux récepteurs NK, dont NKp46 et/ou NKp44 et NKG2D mais chez la souris NKp46 n'est pas présent. En revanche les LIE TCR-iCD3+ des 2 espèces expriment l'intégrine CD103. Chez la souris l'absence de NKp46 et l'expression de CD103 les distinguent des IE-ILC-1 (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014). L'analyse plus précise du phénotype membranaire des LIE TCR-iCD3+ murins a montré qu'ils sont aussi B220+, NK1.1int, CD244high, CD122+ (il2rb), CD11cint, GZMB+. Une sous population se distingue par l'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  chez l'homme comme chez la souris (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014). Chez la souris cette population a été caractérisée par Van Kaer et al. et a été nommée iCD8 $\alpha$ + (Van Kaer et al., 2014).

Les LIE TCR-iCD3+ expriment le facteur de transcription T-bet mais pas Eomes ce qui les distingue des cellules NK périphériques (Ettersperger et al., 2016). De plus,

contrairement aux ILC classiques les LIE TCR-iCD3<sup>+</sup> ne dépendent pas d'Id2 pour leur développement (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014), ni de Baft-3, un facteur de transcription essentiel pour le développement des DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> d'origine lymphoïde (Hildner et al., 2008; Van Kaer et al., 2014). Les LIE TCR-iCD3<sup>+</sup> se différencient à partir des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) via un mécanisme original impliquant la voie NOTCH, l'IL-15 et GZMB. La stimulation de la voie NOTCH initie le programme de développement des CLP en LT (expression du complexe CD3 et réarrangements des gènes du TCR) mais la présence d'IL-15 dans l'environnement induit l'expression de GZMB dans les progéniteurs. Cette sérine-protéase clive et inactive le récepteur NOTCH, ce qui interrompt précocement la différenciation des précurseurs en LT et génère ainsi des cellules innées avec des caractéristiques de LT (Ettersperger et al., 2016). Ce développement est opérant en l'absence d'un thymus fonctionnel et se déroule donc vraisemblablement directement dans l'épithélium intestinal au contact des CE qui expriment des récepteurs activateurs de la voie NOTCH et peuvent produire de l'IL-15 (Ettersperger et al., 2016). Les LIE TCR-iCD3<sup>+</sup> sont donc absents dans les souris IL-15<sup>-/-</sup>, RAG<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup> et GZMA et B KO et NOTCH KO. En revanche, ils sont présents chez les animaux Ahr<sup>-/-</sup>, T-bet<sup>-/-</sup> et IL-7<sup>-/-</sup> (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014).

## B- Fonction

Les cellules innées TCR-iCD3<sup>+</sup> représentent moins de 5% de la population de LIE à l'âge adulte. Toutefois, les LIE innés TCR-iCD3<sup>+</sup> sont les premières cellules lymphoïdes qui colonisent l'épithélium intestinal à la naissance ou après une greffe de moelle (Ettersperger et al., 2016). En outre, cette population est majoritaire chez le nouveau-né et l'individu greffé et/ou immunodéficient (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014). Il est donc tentant d'imaginer qu'elles aient un rôle important dans ces situations particulières. Le rôle et les fonctions de ces cellules restent toutefois encore mal définis.

Chez l'homme, il a été montré que ces LIE innés contiennent des granzymes et produisent de l'IFN- $\gamma$  (Ettersperger et al., 2016; Hùe et al., 2004). De plus, lorsqu'ils sont stimulés par l'IL-15, ils sont capables de tuer *in vitro* des CE via un mécanisme impliquant le récepteur NKG2D (Hùe et al., 2004). L'analyse du transcriptome des LIE TCR-iCD3<sup>+</sup> et iCD8 $\alpha$ <sup>+</sup> murins et humains (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014) a montré que ces cellules expriment des gènes tels que, la chimiokine à motif CC ligand 5 (CCL5), GZMB et A, spp1 (ostéopontine) associés

aux réponses immunes cytotoxiques et Th1. Chez la souris, la production d'IFN- $\gamma$  par les iCD8<sup>+</sup> est moins importante que celle des IE-ILC-1 mais une étude récente a mis en évidence un rôle coopératif entre les iCD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> et la survie des IE-ILC-1 NKp46<sup>+</sup> médiée par l'ostéopontine (Nazmi et al., 2019).

Enfin, il a aussi été montré que les LIE iCD8 $\alpha$ <sup>+</sup> murins ont la capacité de phagocyter des micro-organismes (*Citrobacter rodentium*, *Helicobacter pylori*) et de présenter leurs antigènes aux LT CD4<sup>+</sup>. Une carence en cellules iCD8 $\alpha$  entraîne une sensibilité accrue à la colonisation par *C. rodentium* (Van Kaer et al., 2014).

### I-3-4-Evolution des LIE avec l'âge

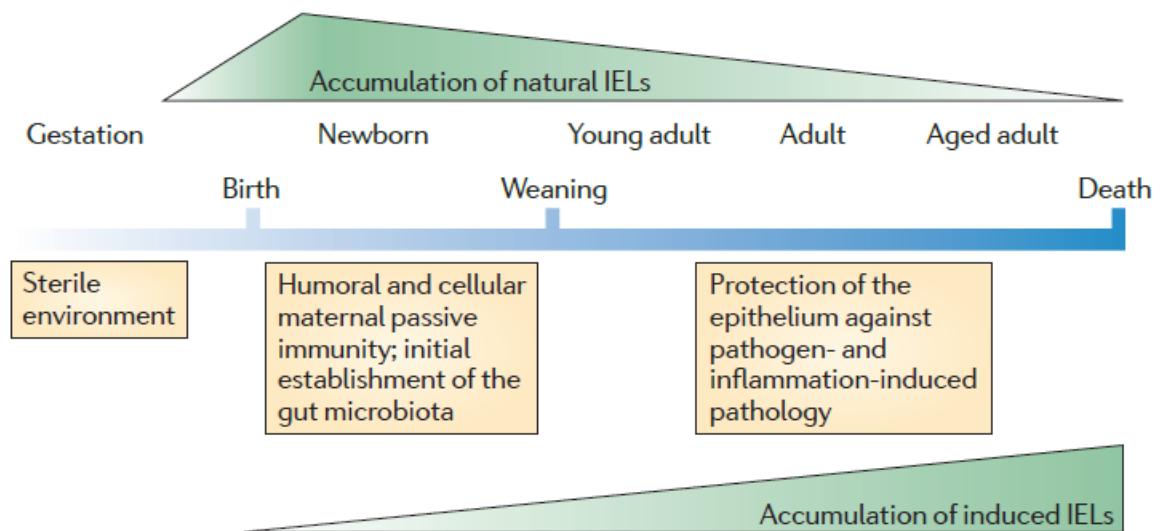
La composition de la population de LIE évolue en fonction de l'âge du sujet. Chez le nouveau-né (homme et souris) la population de LIE est principalement composée de LIE innés et de LIENC (Ettersperger et al., 2016; Latthe et al., 1994 et données non publiées N Cerf-Bensussan & B Meresse). Chez l'homme, les fréquences des LIE innés et des LIENC TCR $\gamma\delta$  diminuent progressivement après l'âge de 1 an et deviennent largement minoritaires à l'âge adulte par rapport à celle des LIEC TCR $\alpha\beta$ +CD8  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (Ettersperger et al., 2016 et données non publiées N Cerf-Bensussan & B Meresse). Chez la souris aussi, la fréquence des LIEC augmente avec l'âge pour rejoindre ou dépasser celle des LIENC (Figure 9)(Cheroutre et al., 2011). Cette évolution s'explique par le fait que les LIE innés et les LIENC ne dépendent pas ou peu des antigènes exogènes pour leur développement et leur différenciation. Ces cellules deviennent effectrices même dans un environnement stérile et sont présentes dans l'épithélium intestinal avant ou peu après la naissance (Ettersperger et al., 2016; Latthe et al., 1994).

Une étude récente montre qu'après une greffe de moelle, chez l'homme comme chez la souris, les premiers LIE qui colonisent l'épithélium intestinal sont des LIE innés, puis des LIENC. Les LIEC arrivent dans l'épithélium bien après ces deux populations (Ettersperger et al., 2016) données non publiées N Cerf-Bensussan & B Meresse).

Bien que les preuves directes fassent encore défaut, il est probable que l'accumulation précoce de LIENC et LIE innés fournisse un mécanisme de surveillance basé sur la détection d'auto-antigènes dont l'expression peut être modulée par un stress induit par un agent pathogène et/ou l'activation de signaux de danger. Avec le temps, et l'augmentation de l'exposition aux antigènes exogènes, la population de LIEC devient progressivement plus

importante que la population non conventionnelle, qui reste stable en nombres réels mais représente une population mineure de LIE à des stades ultérieurs de la vie (Figure 9) (Cheroutre et al., 2011). Celle-ci fournit un mode de protection différent, plus spécifique et basé sur la mémoire des antigènes.

En résumé, les LIEC sont rares au début de la vie, mais la population augmente régulièrement avec l'âge en réponse à l'exposition à des antigènes exogènes (Helgeland et al., 1997; Manzano et al., 2002; Steege et al., 1997; Umesaki et al., 1993)



**Figure 9** : Cinétique de l'évolution des LIE avec l'âge.

Les LIE acquièrent leur phénotype et leur localisation intestinale dans le thymus au cours de leur sélection. Les LIENC (naturels) sont stimulés en réaction à des antigènes du soi et peuplent le compartiment intestinal avant la naissance. Quant aux LIEC (induits), ils se différencient à partir de LT naïfs qui deviennent effecteurs après la rencontre avec des antigènes exogènes. Ils s'accumulent au fil du temps dans l'épithélium intestinal pour au final surpasser le nombre des LIENC (Cheroutre et al., 2011).

## I-4- *Cryptosporidium*

### I-4-1-Généralités

*Cryptosporidium* est un parasite intracellulaire obligatoire de la classe des coccidies, qui infecte et réalise son cycle de reproduction dans l'épithélium intestinal. La transmission de ce parasite se fait principalement par voie oro-fécale suite à la contamination hydrique et alimentaire par des matières fécales contenant des oocystes ou par contact direct homme-homme ou animal- homme.



Ce parasite est responsable de la cryptosporidiose, une maladie mondiale découverte chez la souris par Edward Ernst Tyzzer en 1910 (Tyzzer, 1910). *Cryptosporidium* a été ensuite identifié comme un agent pathogène pour l'humain en 1976 (White, 2010). Au début des années 1980, l'infection par *Cryptosporidium* a été reconnue comme l'un des principaux acteurs dans la survenue des diarrhées chroniques chez les patients atteints du SIDA et comme un pathogène responsable de différentes épidémies zoonotiques et hydriques provoquant des diarrhées notamment chez les enfants et pouvant être mortelles chez les nouveaux nés (Current et al., 1983, Sallon et al., 1988). Ce parasite peut infecter aussi bien le sujet immunocompétent et être responsable de diarrhées hydriques aiguës à subaigües spontanément résolutive. L'arsenal thérapeutique contre *Cryptosporidium* est très limité. Le nitazoxanide est le seul médicament approuvé par la Federal Drug Administration des États-Unis. Cependant, ce traitement n'est pas efficace chez les patients immunodéprimés et n'est pas approuvé chez les nourrissons de moins de 1 an (Abubakar et al., 2007, Rossignol, 2010).

Ce parasite infecte un grand nombre de vertébrés, y compris les mammifères, les reptiles, les oiseaux et les poissons (Kosek et al., 2001). Dans la nature, *Cryptosporidium* est présent sous forme d'oocystes infectieux à parois épaisses qui contaminent l'eau et les aliments par le biais des selles des animaux contaminés. Cette paroi lui permet de résister aux procédures de désinfection de routine telles que la chloration, ce qui rend difficile son élimination de l'environnement (Thomson et al., 2017, Smith et al., 2007). Ces observations ont conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à positionner ce parasite d'une part comme un agent pathogène de référence pour évaluer la qualité de l'eau (Pangasa et al., 2009) et d'autre part comme agent pathogène émergent qui constitue une menace pour la santé publique en 2006.

D'un point de vue vétérinaire, *Cryptosporidium* est un problème majeur dans l'industrie laitière car l'infection est extrêmement répandue chez les veaux laitiers nouveau-nés et peut provoquer une maladie mortelle.

Ce parasite est donc responsable non seulement d'un problème de santé publique mais aussi économique.

Aujourd'hui plus de 23 espèces de *Cryptosporidium* sont connues (Widmer et al.) Cinq espèces peuvent infecter l'homme : *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*. Toutefois, il est à noter que *C. hominis* et *C. parvum* sont responsables de la majorité des infections

humaines (Xiao, 2010). Certaines espèces ne se limitent pas qu'à une seule espèce d'hôte comme c'est le cas de *C parvum* qui peut aussi infecter la souris.

## I-4-2-Pathologie et épidémiologie

L'infection par *Cryptosporidium* compromet l'intégrité des cellules épithéliales. Celle-ci provoque une atrophie des villosités et une hyperplasie des cryptes ainsi que l'activation d'une réponse immune inflammatoire dans les zones touchées (Carey et al., 2004). L'inflammation et la destruction de l'épithélium sont à l'origine des principaux symptômes cliniques de la maladie (diarrhée, malabsorption).

La cryptosporidiose est observée dans le monde entier. Elle est la deuxième cause de diarrhée après le rotavirus chez les enfants âgés de 0 à 11 mois et la troisième cause pour les tranches d'âge entre 12 et 23 mois en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud (Lemieux et al., 2017). Elle dure généralement entre 7 et 14 jours mais peut aussi se prolonger chez des individus plus sensibles. Elle est associée à une morbidité et une mortalité infantiles très élevées par rapport aux autres causes existantes (Moore et al., 2010). En effet, *Cryptosporidium* est responsable d'environ 48 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans en 2016 (Khalil et al., 2018). La cryptosporidiose touche principalement les pays en voie de développement où les mesures d'hygiène sont souvent moins respectées (Figure 10). En effet, des études de méta-analyse ont montré que la prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* dans une population varie entre 1% et 3% dans les pays développés et jusqu'à 10% dans les pays du tiers monde. Cependant, ces chiffres sont très probablement sous-estimés à cause du dépistage non systématique de *Cryptosporidium* notamment chez les personnes ne présentant pas de forme grave, du fait que la plupart des laboratoires ne recherche pas systématiquement les cryptosporidies dans les échantillons de selles soumis à un examen parasitologique dit standard (Khalil et al., 2018) (Putignani and Menichella, 2010).

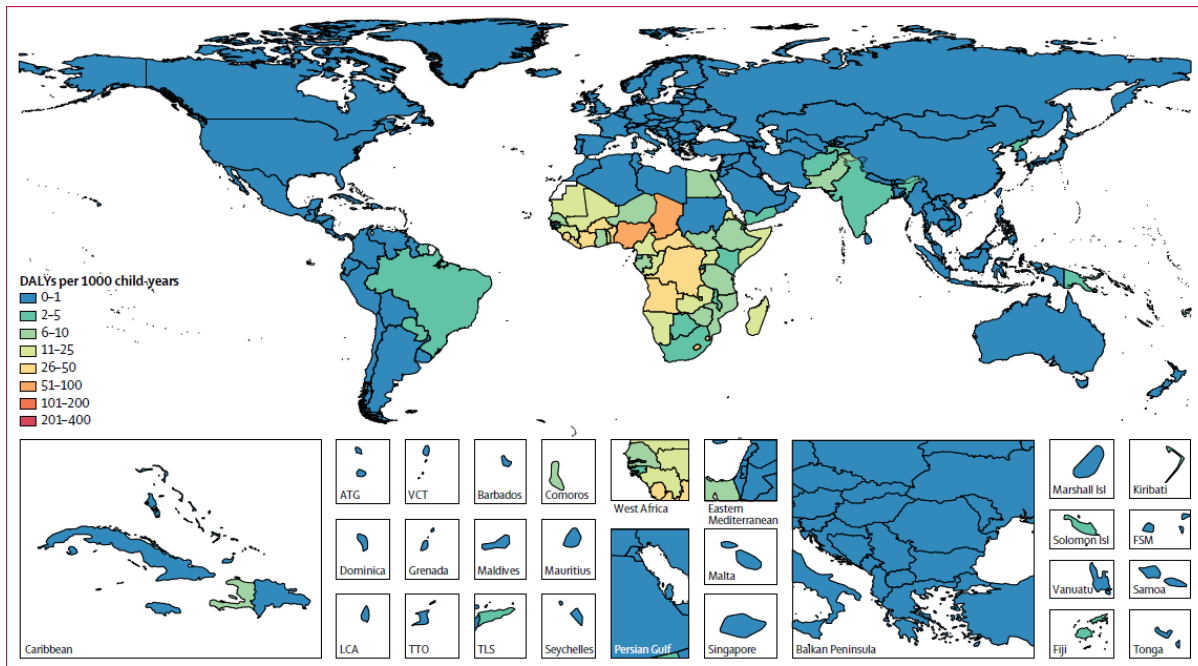


Figure 1: Acute DALYs per 1000 child-years associated with *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years in 2016  
 DALYs=disability-adjusted life-years. ATG=Antigua and Barbuda. VCT=Saint Vincent and the Grenadines. LCA=Saint Lucia. TTO=Trinidad and Tobago. TLS=Timor-Leste. FSM=Federated States of Micronesia.

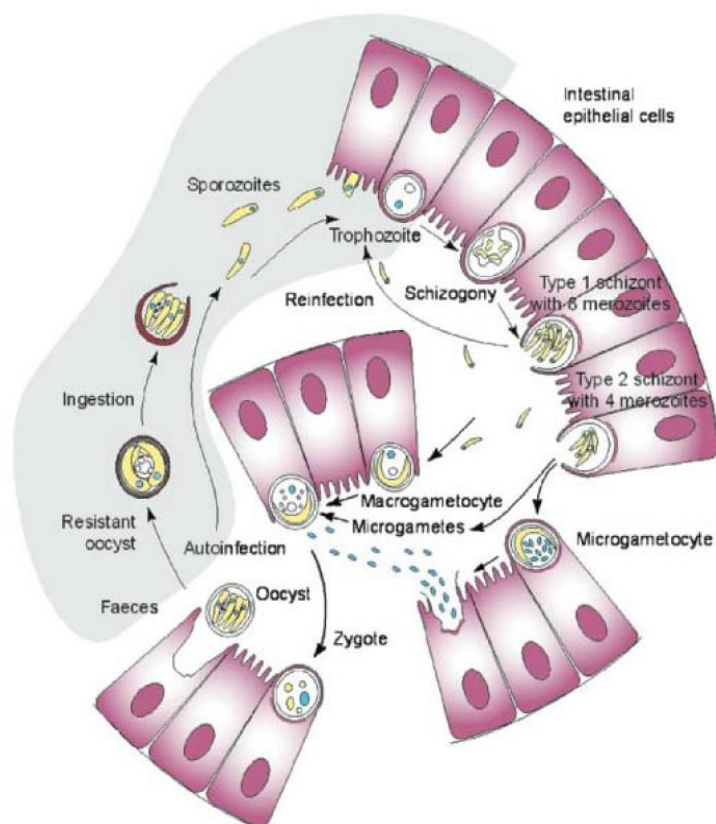
## Figure 10 : Répartition de la cryptosporidiose dans le monde

Toutefois la pathologie sévit toujours dans les pays industrialisés. En Europe, plusieurs épidémies d'origine hydrique et alimentaire de cryptosporidiose ont été signalées, reflétant ainsi la distribution généralisée de *Cryptosporidium* et son impact sur la santé publique (Kvac et al., 2021) (Lebbad et al., 2021). En France, plusieurs épidémies d'origine hydrique ont été signalées ces dernières années. Le réseau « Cryptosporidies ANOFEL » a montré qu'entre 2006 et 2009 plus de 407 cas de cryptosporidiose ont été diagnostiqués sur le territoire Français dont 18% concernant des enfants (Guyot et al., 2012). Une autre étude plus récente réalisée en 2020 par le Centre National de Référence - Laboratoire Expert Cryptosporidioses CNR-LE a également montré qu'entre 2017 et 2019 l'infection par *Cryptosporidium* atteignait principalement les jeunes enfants (<5 ans) et les jeunes adultes, en particulier à la fin de l'été. La plupart des patients était immunocompétent (60%) et les décès n'ont été signalés que chez les patients immunodéprimés (Costa et al., 2020).

### I-4-3-Cycle cellulaire de *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* a un cycle de vie monoxène (Figure 11). Il commence par l'ingestion par l'hôte des oocystes présents dans l'eau de boisson contaminée par les fèces d'animaux

infectés. Les oocystes sont très résistants dans l'environnement et constituent la forme infectante (Fayer, 2010). Ils sont responsables de la continuité, la survie et la dissémination du parasite. Après ingestion, les sporozoïtes sont ensuite libérés suite au désenkystement des oocystes dans la lumière intestinale par les enzymes digestives (trypsine) et les sels biliaries. Les sporozoïtes envahissent les cellules épithéliales par le pôle apical et forment une vacuole parasitophore où ils donnent naissance aux trophozoïtes. Ces derniers commencent le cycle asexué conduisant à la formation des schizontes de type I qui contiennent 8 mérozoïtes de forme allongée. Les mérozoïtes sont ensuite libérés de la vacuole parasitophore et peuvent soit infecter d'autres cellules épithéliales, soit entrer dans un cycle sexué en formant les schizontes de type II. Ceux-ci donnent les microgamètes et les macrogamètes, les formes sexuées. La fécondation de ces gamètes donne ensuite naissance à de nouveaux oocystes à parois fines qui initient une nouvelle infection ou à parois épaisses qui seront libérés dans les selles contaminant ainsi l'environnement et potentiellement d'autres hôtes (Smith et al., 2005).



**Figure 11 :** Cycle biologique de *Cryptosporidium*.

Les oocystes ingérés libèrent des sporozoïtes, qui envahissent l'iléon et se transforment en trophozoïtes puis en mérontes de type I, contenant des mérozoïtes de type I. Ces mérozoïtes libérés deviennent des mérontes de type II, qui libèrent des mérozoïtes de type II. Ces derniers se développent en gamètes indifférenciés qui se transforment en macro ou microgamètes. La fécondation de ces derniers donnent naissance à des nouveaux oocystes à parois épaisses rejetés dans les fèces et des oocystes à parois minces qui initient une nouvelle infection (Smith et al., 2005).

#### I-4-4-Modèles d'études de l'infection par *Cryptosporidium*

Il existe plusieurs espèces de *Cryptosporidium* qui infectent plus ou moins spécifiquement un grand nombre de vertébrés. A titre d'exemple, *C. parvum* qui infecte l'Homme peut aussi infecter d'autres espèces comme le porc (Sheoran et al., 2012), le veau (Schaefer et al., 2016) et la souris sous certaines conditions (voir ci-dessous) (Barakat et al., 2009; Korbel et al., 2011; Lantier et al., 2013). Cette capacité à infecter aussi bien l'Homme, que des animaux d'élevage et que la souris, l'animal de laboratoire « idéal », est (et a été) beaucoup utilisée pour étudier la réponse immune contre *Cryptosporidium*. La plupart des études *in vivo* qui décrivent la réponse immune contre *Cryptosporidium* proviennent donc de travaux réalisés chez des souris infectées par ce parasite.

Quelques études utilisent le parasite naturel de la souris, *C. muris* qui comme chez l'homme induit une infection transitoire chez l'animal adulte immunocompétent (McDonald et al., 1992). Néanmoins, l'infection par *C. muris* chez la souris affecte l'estomac alors que chez l'homme et la majorité des animaux d'élevage *Cryptosporidium* touche principalement l'intestin grêle (Xiao et al., 2004). Ce modèle pourrait donc être biaisé à cause du fait que ces 2 parties distinctes du tube digestif abritent des populations immunitaires différentes.

D'autres travaux, la majorité, utilisent *C. parvum* pour infecter la souris mais, contrairement à l'homme, les souris adultes immunocompétentes sont résistantes à l'infection. Les souris nouveau-nés et les souris adultes immunodéficientes (SCID, RAG-/-, ...) en revanche sont susceptibles à l'infection (Barakat et al., 2009; Laurent and Lacroix-Lamandé, 2017).

Ces modèles permettent donc d'évaluer le rôle de molécules ou de cellules de deux façons : soit en les neutralisant chez les souris WT pour tenter d'induire la sensibilité à l'infection (Ac neutralisant ou déplétant, délétion génétique ...) soit au contraire en les injectant aux animaux immunodéficients pour tenter de restaurer la résistance contre le parasite. Outre la possibilité que *C. parvum* n'active pas les mêmes réponses immunes chez la souris que chez l'homme, son hôte naturel, il est possible que certains mécanismes identifiés chez les animaux

immunodéficients soient influencés ou soient le résultat de la mise en place de mécanismes protecteurs compensatoires peu représentatifs de la situation naturelle.

Enfin, une étude récente montre que l'infection des souris par *C.tyzzeri* induit une infection transitoire chez l'animal adulte immunocompétent et provoque des lésions qui touchent principalement l'intestin grêle. Cette souche de *Cryptosporidium* présente une similarité génétique de 95-96% à *C.hominis* et *C.parvum* (Sateriale et al., 2019). Ce modèle semble donc mieux reproduire chez la souris l'infection observée chez l'homme et les animaux d'élevage.

Quoi qu'il en soit, il est difficile à partir de ces modèles *in vivo* d'étudier le rôle spécifique d'un type cellulaire car ces fonctions peuvent être influencées par et/ou confondues avec d'autres cellules.

Les modèles *in vitro* permettent d'analyser plus précisément les mécanismes impliqués au niveau de la cellule. De nombreux travaux ont notamment étudié les mécanismes de défense des CE lors de l'infection par différentes souches de *Cryptosporidium* à l'aide de lignées cellulaires (Caco2, HT29, Hct8) (Karanis and Aldeyarbi, 2011). Des co-cultures avec des cellules immunitaires ont également été réalisées pour étudier l'effet de celles-ci sur les cellules épithéliales infectées (Dann et al., 2005). Ces modèles ont aussi l'avantage de pouvoir étudier l'effet du parasite sur une cellule qui provient de l'espèce qu'il infecte naturellement (ex *C.parvum* avec des lignées de cellules humaines). Cependant, la plupart des lignées cellulaires utilisées dans ces expériences provient de tumeurs (Caco2, HT29, Hct8) et il n'est pas garanti que les mécanismes identifiés ne soient pas influencés par le processus de transformation. La mauvaise réplication du parasite dans ces lignées cellulaires montre en outre que les conditions d'infection ne sont pas optimales (Tandel et al., 2019).

Un modèle plus physiologique de culture *in vitro* a été développé à partir d'explants coliques de souris SCID adultes. Grâce à ce modèle l'infection par *C. parvum* peut être étudiée jusqu'à 27 jours. Cependant, ce modèle reproduit *in vitro* la complexité du modèle *in vivo* et n'est donc pas utilisable pour étudier le rôle spécifique de cellules (Baydoun et al., 2017).

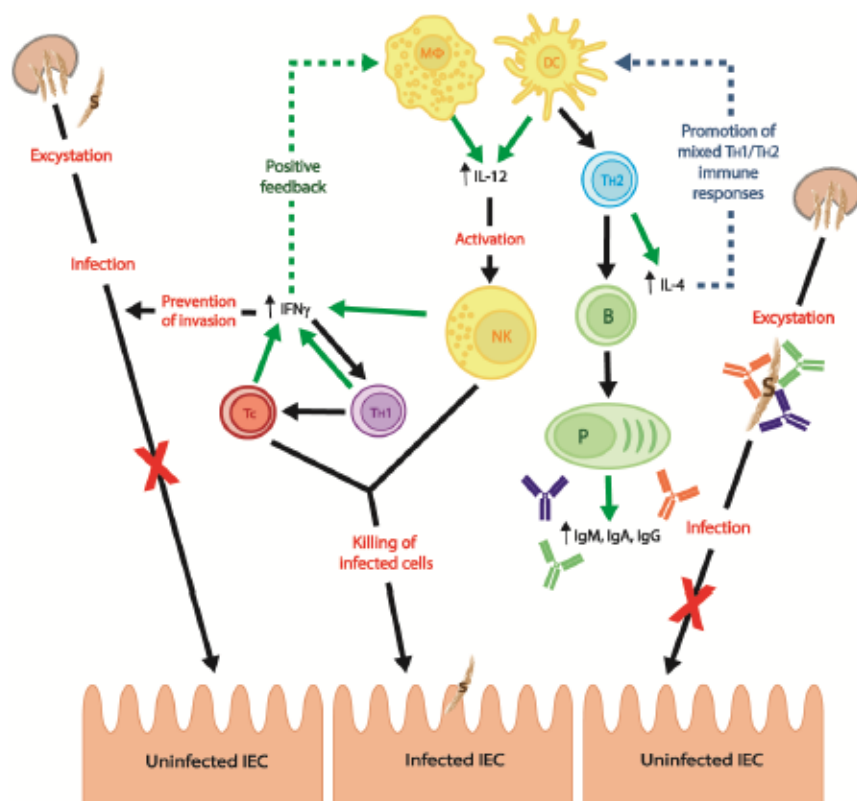
Enfin, les travaux récents de Hans Clevers ont conduit au développement d'organoïdes intestinaux. Les organoïdes intestinaux reproduisent *in vitro* un épithélium plus « physiologique » à partir des cellules souches (non transformées) isolées des cryptes de l'intestin. En effet, au cours de la dernière décennie un ensemble de travaux fondamentaux (Ootani et al., 2009; Sato et al., 2009) a établi les conditions pour la culture *ex vivo* et à long

terme de CE intestinales à partir de cellules souches intestinales LGR5+ (ISC) provenant de prélèvements murins et humains. Les ISC forment de manière autonome des structures en 3D auto-renouvelables (organoïdes) qui peuvent être propagées indéfiniment tout en conservant des profils transcriptionnels et épigénétiques spécifiques aux tissus (Blutt et al., 2018; Zachos et al., 2016). Ces structures génèrent des cellules épithéliales différenciées (par ex. entérocytes, cellules caliciformes, cellules de Paneth, cellules entéro-endocrines). La formation des organoïdes nécessite des cocktails de facteurs de croissance qui soutiennent la survie, l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches et une matrice extracellulaire (ECM) (souvent Matrigel), qui fournit un support et des signaux importants. Ce modèle s'est avéré être très utile pour étudier la régénération, le métabolisme et le transport dans les cellules épithéliales intestinales (Zachos et al., 2016) ainsi que leurs interactions avec les agents infectieux (Eriguchi et al., 2018). Les organoïdes ont aussi été utilisés en co-culture pour étudier les interactions entre les cellules immunitaires et l'épithélium intestinal. En 2016, Nozaki et al ont été les premiers à co-cultiver les organoïdes intestinaux avec des LIE créant ainsi un nouveau modèle pour étudier *in vitro* les fonctions de ces cellules immunitaires (Nozaki et al., 2016).

Au cours de ma thèse, le groupe de Hans Clevers a montré que les organoïdes 3D intestinaux humains peuvent être infectés par *C parvum* et qu'ils permettent le développement et la réalisation du cycle complet du parasite en générant des nouveaux oocystes capables de réinfecter les souris (Heo et al., 2018; Nikolaev et al., 2020; Zhang et al., 2016). L'ensemble de ces résultats a conforté notre choix d'utiliser les organoïdes pour développer notre modèle de co-culture destiné à étudier le rôle des LIE innés dans l'infection par *Cryptosporidium*.

#### I-4-5-Réponse immunitaire contre *Cryptosporidium*

L'immunité contre *Cryptosporidium* implique à la fois la réponse immunitaire adaptative et la réponse immune innée (Figure 12).



**Figure 12** : Réponses immunitaires protectrices contre *Cryptosporidium* spp..

Les lignes continues vertes montrent la libération de molécules, la ligne pointillée verte illustre une rétroaction positive, la ligne pointillée bleu foncé représente l'induction de réponses immunitaires mixtes, les lignes continues noires présentent la direction des effets et les mots rouges définissent les effets. MΦ = macrophage, DC = cellule dendritique, NK = cellule NK, TH1 = cellule T TH1, TH2 = cellule T TH2, Tc = cellule T cytotoxique, B = cellule B, P = plasmocyte, S = sporozoïte et IEC = cellule épithéliale intestinale (Lemieux et al., 2017).

## I-4-5-1-Réponse immunitaire adaptative dans la défense contre *Cryptosporidium*

### A- Rôle des LT CD4+ dans l'infection par *Cryptosporidium*

Le système immunitaire adaptatif joue un rôle primordial dans la défense immunitaire contre *Cryptosporidium*. De nombreux travaux chez l'homme et la souris ont mis en évidence le rôle crucial des lymphocytes T CD4+ producteurs d'IFN-γ dans la protection contre l'infection par *Cryptosporidium*. Chez l'homme, un grand nombre d'études rapporte que chez les individus atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), le risque d'infection par *Cryptosporidium* et la sévérité de l'infection varient en fonction du degré d'immunosuppression évalué par la lymphopénie T CD4+. Le risque de développer une cryptosporidiose est notamment significativement plus élevé chez les sidéens ayant des taux de LT CD4+ inférieurs à 100 cellules par microlitre de sang. De plus, alors que les patients



faiblement immunodéprimés (taux de LT CD4+ > 180 /  $\mu$ l) ne développent que des formes asymptomatiques ou associées à une diarrhée légère, ceux qui sont fortement immunodéprimés (taux de LT CD4+ <50 /  $\mu$ l) développent des infections chroniques et sévères (Lemieux et al., 2017). Une étude a aussi mis en évidence la présence de LT CD4+ mémoires spécifiques de *Cryptosporidium* dans le sang d'individus qui ont guéri de l'infection. Dans cet article, les clones de LT CD4+ spécifiques du parasite produisaient une grande quantité d'IFN- $\gamma$  et parfois de l'IL-4 ou de l'IL-5, ce qui suggère que la réponse immune protectrice est polarisée Th1 ou Th0 (Morales et al., 2004).

Chez les souris aussi, l'absence d'une réponse adaptative efficace augmente la sensibilité à l'infection. Les souris SCID (McDonald et al., 1992) et RAG-/- (Barakat et al., 2009) qui n'ont ni LT ni LB ainsi que les souris nude athymiques qui n'ont pas de LT (McDonald et al., 1992) développent une infection chronique et plus sévère. Cette hypersensibilité à *Cryptosporidium* est principalement due à l'absence des LT CD4+ car leur déplétion chez les souris immunocompétentes WT à l'aide d'un anticorps déplétant anti-CD4+ (Ungar et al., 1990, 1991) ou chez les souris déficientes pour le CMH II (CMH II-/-) (Aguirre et al., 1994) altère considérablement l'immunité contre *Cryptosporidium*. L'infection est en revanche pas ou peu affectée par l'absence de LT CD8+ chez les souris WT traitées avec un Ac anti-CD8+ (Ungar et al., 1990, 1991) et chez les animaux CMH I-/- (Aguirre et al., 1994) ou même par l'absence de LB induite par anti- $\mu$  (anti-microglobuline) (Taghi-Kilani et al. 1990) (voir ci-dessous). A l'inverse, les souris immunodéficientes SCID reconstituées avec une population de splénocytes déplétée en LT CD8+ mais enrichie en LT CD4+ résistent à l'infection par *C. parvum* et éliminent le parasite en quelques semaines (3-4 semaines) alors que celles qui sont reconstituées avec des splénocytes déplétés en LT CD4+ continuent à développer une infection chronique (Aguirre et al., 1994; McDonald et al., 1994). L'effet protecteur des LT CD4+ est en outre amélioré lorsque ceux-ci proviennent de souris donneuses préalablement infectées par le parasite (Kváč et al., 2011a; McNair and Mead, 2013). De façon intéressante, il a été montré que le transfert de LIE CD4+, provenant de souris infectées, restaure la résistance des souris SCID contre le parasite, ce qui indique que les LIE CD4+ participent à la protection contre *Cryptosporidium* (Culshaw et al., 1997).

Dans l'ensemble, ces données chez la souris montrent que les LT CD4+ ont un rôle central et qu'ils participent aussi bien à l'élaboration de la réponse immune protectrice lors de la primo-

infection par *Cryptosporidium* qu'au maintien d'une mémoire immunologique qui persiste en périphérie et dans l'épithélium intestinal.

Les modèles murins ont aussi largement contribué à décrypter le mécanisme protecteur médié par les LT CD4+. Celui-ci repose principalement sur leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$ . En effet, à l'instar de l'étude chez l'homme mentionnée ci-dessus, les LT CD4+ effecteurs/mémoires activés par l'infection produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  (Culshaw et al., 1997; McNair and Mead, 2013). Cette cytokine contribue majoritairement à leur effet protecteur car sa neutralisation à l'aide d'un Ac spécifique ou d'une manipulation génétique (LT CD4 provenant de souris IFN- $\gamma$  KO) abroge l'effet protecteur du transfert de LT CD4+ dans les souris immunodéficientes (Culshaw et al., 1997; Tessema et al., 2009).

Le rôle crucial de la réponse immune Th1 contre *Cryptosporidium* est aussi démontré par l'effet protecteur des cytokines IL-12 (Ehigiator et al., 2007; Urban et al., 1996) et IL-18 (Ehigiator et al., 2007) qui stimulent la production d'IFN- $\gamma$  et de la voie de signalisation STAT1 activée par l'IFN- $\gamma$  (Ehigiator et al., 2007). A noter, le traitement des souris déficientes pour l'IL-12 (IL-12p35 $^{-/-}$ ) avec de l'IL-18 recombinante rétablit la résistance à l'infection, ce qui suggère que ces deux cytokines ont des effets redondants et/ou compensatoires (Ehigiator et al., 2007). Si l'effet protecteur de l'IFN- $\gamma$  contre la cryptosporidiose est indéniable, son mode d'action reste toujours mal connu. L'IFN- $\gamma$  favoriserait l'élimination du parasite via la destruction des cellules infectées en stimulant la phagocytose, la dégranulation des neutrophiles et la libération des espèces réactives de l'oxygène (Lemieux et al., 2017). L'IFN- $\gamma$  semble aussi exercer un effet protecteur en stimulant la production de la cytokine proinflammatoire TNF $\alpha$  (Lacroix et al., 2001).

D'autres travaux ont aussi mis en évidence le rôle complémentaire ou synergique d'autres cytokines non associées au profil Th1. Des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5) (Lacroix et al., 2001; Morales et al., 2004; Robinson et al., 2001) et Th17 (IL-23, IL-17) (Zhao et al., 2016) sont notamment augmentées et influencent la réponse immune contre *Cryptosporidium*. En effet, la neutralisation de l'IL-4 ou de l'IL-5 avec des Ac augmente la sensibilité des souris à l'infection (Aguirre et al., 1998; Enriquez and Sterling, 1993) et le parasite persiste plus longtemps chez les souris déficientes pour l'IL-4 (IL-4 $^{-/-}$ ) que chez les animaux WT contrôles (Aguirre et al., 1998). Alors que la réponse immune Th1 est essentielle dans les phases initiales de l'infection

par *Cryptosporidium* pour contrôler la gravité de l'infection, la réponse immune Th2, plus tardive, accélère la résolution de l'infection (Aguirre et al., 1998).

L'IL-23, qui favorise la réponse immune Th17, augmente partiellement la protection des souris IL-12<sup>-/-</sup> contre *Cryptosporidium*. Dans ce modèle, l'effet de l'IL-23 est toutefois beaucoup plus faible que celui de l'IL-12 ou de l'IL-18, ce qui suggère un rôle significatif mais modéré de cette voie (Ehigiator et al., 2007). D'autres études sont toutefois nécessaires pour évaluer le véritable impact des LT Th2 et Th17 dans la défense contre *Cryptosporidium*.

## B- Rôle des LT CD8+ et de la réponse immune adaptative cytolytique contre *Cryptosporidium*

De nombreux travaux chez la souris montrent que les LT CD8+ ont un rôle limité voire négligeable dans l'infection contre *Cryptosporidium* comparativement à celui des LT CD4+ (Aguirre et al., 1994; Ungar et al., 1990, 1991).

Toutefois, quelques études ont mis en évidence une participation des LT CD8+ dans la défense contre *Cryptosporidium*. Notamment, chez l'homme, les macaques et les agneaux nouveaux nés, l'infection à *Cryptosporidium* a été corrélée à une augmentation du nombre des cellules T CD8+ (Singh et al., 2011, Olsen et al., 2015). Chez l'homme, il a également été montré que les LT CD8+ isolés du sang de patients infectés par *Cryptosporidium* produisent de l'IFN- $\gamma$  lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* avec des Ag de *Cryptosporidium* (Preidis et al., 2007). En outre, des lignées de LT CD8+ spécifiques de *Cryptosporidium* ont une activité cytotoxique *in vitro* contre la lignée de cellules épithéliales Caco2 infectées par *Cryptosporidium* via un mécanisme qui implique la libération de facteurs cytotoxiques, comme les granzymes, et à moindre mesure l'interaction Fas/FasL. (Pantenburg et al., 2010).

In-vivo, chez la souris, une étude montre aussi que la reconstitution de souris SCID avec des LT CD8+ activés, mais pas avec des LT CD8+ naïfs, réduit l'infection par *Cryptosporidium* (Kváč et al., 2011). L'ensemble de ces travaux suggère donc que les LT CD8+ contribuent aussi à l'immunité contre *Cryptosporidium* via des mécanismes de cytotoxicité et probablement aussi en participant à la production d'IFN- $\gamma$ .

## C- La réponse humorale contre *Cryptosporidium*

Bien que le rôle et les mécanismes de défense de la réponse immunitaire à médiation cellulaire soient bien décrits dans *Cryptosporidium*, le rôle de l'immunité humorale lors de

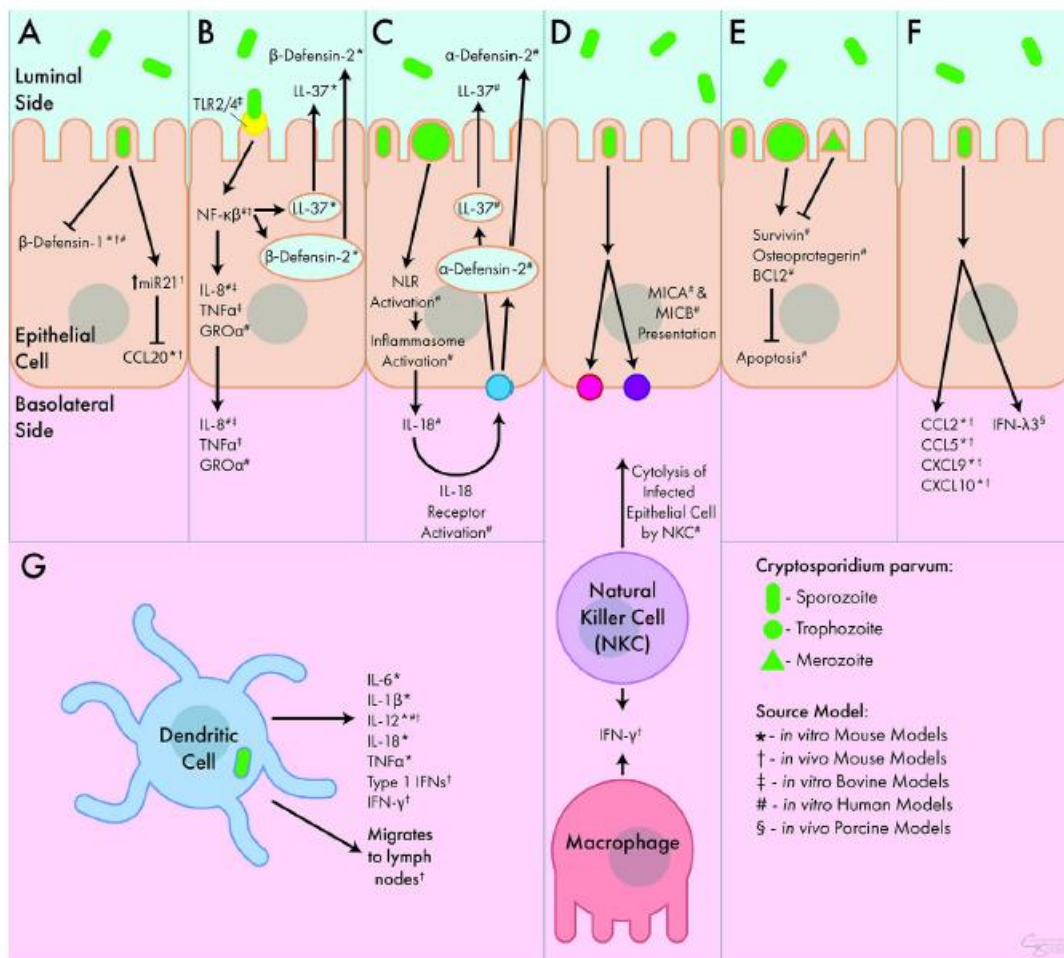
l'infection n'est pas complètement compris. Suite à l'infection par *Cryptosporidium*, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la production sérique d'anticorps IgM, IgG et IgA dirigés contre *Cryptosporidium* (Kassa et al., 1991) (Borad et al., 2012). Cette production d'anticorps spécifiques ne semble toutefois pas assez efficace pour lutter contre le parasite (Kassa et al., 1991, Mead, 2014). Le rôle limité de la réponse humorale est aussi démontré dans le modèle murin où, les souris dépourvues de lymphocytes B se remettent de l'infection par *Cryptosporidium* (Taghi-Kilani et al.1990).

Néanmoins, il est important de noter que les études sur l'implication de l'immunité humorale restent controversées dans la littérature. Des études ont montré un rôle protecteur contre *Cryptosporidium* chez des patients immunodéprimés traités avec du colostrum bovin hyperimmun (dérivé de vaches immunisées avec *C. parvum*) (Greenberg and Cello, 1996) (Steele et al., 2013) (Plettenberg et al., 1993), rôle contredit par d'autres études qui montrent l'inefficacité de cette approche dans la défense contre *Cryptosporidium* (Abubakar et al., 2007). D'autres travaux sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'implication de la réponse humorale dans la défense contre *Cryptosporidium*.

#### I-4-5-2-Réponse immunitaire innée contre *Cryptosporidium*

La réponse immune adaptative est essentielle pour l'élimination du parasite. Toutefois, une série d'études montre que des mécanismes de l'immunité innée interviennent aussi pour contrôler la diffusion du parasite principalement dans la phase précoce de l'infection et chez les individus immunodéprimés (incluant le nouveau-né) (Lemieux et al., 2017)

En effet, l'immunité innée est un médiateur essentiel de l'immunité adaptative via notamment l'activation des signaux de danger et des CPA (DC et macrophages). Elle engendre également une réponse immune protectrice rapide pendant les phases précoces de l'infection et assure une grande partie de l'immunité chez le nouveau-né et les individus immunodéprimés. Comprendre la réponse immunitaire innée induite par l'infection à *C. parvum* chez ses hôtes natifs est essentiel pour élaborer une stratégie pour limiter son impact sur la santé mondiale, l'agriculture et l'environnement (Figure 13)(Crawford and Kol, 2021).



**Figure 13 :** Réponse immunitaire innée contre *C. parvum*.

(A) *C. parvum* inhibe la libération des peptides antimicrobiens b-défensine-1 et CCL20. (B) L'activation des TLR par *C. parvum* conduit à la sécrétion luminaire des peptides antimicrobiens b-défensine-2 et LL-37 ainsi qu'à la sécrétion basolatérale d'IL-8, TNF $\alpha$ . (C) L'inflammasome est également activé par le parasite et mène à la libération basolatérale d'IL-18, qui provoque la sécrétion luminaire de défensine-2 et de LL-37. (D) La présentation de MICA et MICB conduit à la cytolysé des cellules épithéliales infectées par les cellules NK qui avec les macrophages agissent tous deux comme sources d'IFN- $\gamma$  pendant l'infection. (E) Le parasite inhibe l'apoptose via la survivine, l'ostéoprotégérine et le BCL2. (F) Suite à l'infection, les cellules épithéliales intestinales libèrent de nombreuses chimiokines et cytokines, notamment CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 et IFN-13. (G) Les DC interviennent aussi en libérant de l'IFN de type I, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ . Ils migrent vers les ganglions lymphatiques après une exposition au parasite. Interféron (IFN), Interleukine (IL-), Facteur de nécrose tumorale (TNF), Ligand de chimiokine CC (CCL), Ligand de chimiokine CXC (CXCL), Oncogène à croissance régulée (GRO), Récepteur Toll-Like (TLR), Nod-Like Récepteur (NLR), MicroARN 21 (miR21), Facteur Nucléaire (NF), Cathélicidine (LL-37), Complexe majeur d'histocompatibilité, Protéine liée à la chaîne (MIC) de classe I, Lymphome B-Lymphoma 2-Apoptosis Regulator (BCL2), Naturel Cellule tueuse (NKC) (Crawford and Kol, 2021).

## A- Réponse des cellules épithéliales intestinales

Les CE intestinales sont les premières cellules de l'organisme qui sont en contact avec le parasite. Elles sont nécessaires au parasite pour qu'il puisse effectuer son cycle

de réplication mais elles participent aussi à son élimination via divers mécanismes. Comme discuté dans le chapitre épithélium intestinal, les CE contribuent à la protection de l'organisme en formant une barrière physico-chimique et en délivrant des signaux d'alertes aux cellules immunitaires environnantes.

Un des premiers mécanismes de défense de l'épithélium en cas d'infection est l'élimination des CE infectées par induction de la mort cellulaire. Ce mécanisme, décrit pour de nombreux parasites, a pour effet de limiter la propagation de l'infection. Plusieurs études montrent que *Cryptosporidium* affecte les voies apoptotiques de la CE infectée (Chen et al., 1999; Mccole et al., 2000; Mele et al., 2004). Ces travaux montrent notamment, qu'*in vitro* l'infection par *Cryptosporidium* induit l'apoptose dans des lignées de CE intestinales (lignées HCT-8, Caco-2) (Mccole et al., 2000; Mele et al., 2004) et biliaires (lignée H-69) en quelques heures. Le mécanisme est encore mal caractérisé, mais il implique vraisemblablement l'interaction entre le récepteur Fas et son ligand FasL (Chen et al., 1999; Mele et al., 2004) via des voies à la fois autocrines et paracrines (par la sécrétion d'une forme soluble de FasL) (Chen et al., 1999). Une étude plus récente implique aussi une augmentation de la sécrétion de la cytokine pro-apoptotique TRAIL par les CE infectées (HCT-8) (Castellanos-Gonzalez et al., 2008). De façon intéressante, il a été montré que le parasite a un effet différent sur l'apoptose en fonction de son stade de développement. Les stades sporozoïtes et mérozoïtes induisent l'apoptose des CE alors que le stade trophozoïte l'inhibe (Mele et al., 2004). L'hypothèse est qu'au début de l'infection, les sporozoïtes induisent la mort de la cellule hôte qui défend l'organisme, puis le parasite évolue en trophozoïtes qui échappent au mécanisme de défense en inhibant l'apoptose des CE cibles et peut ainsi poursuivre son cycle de réplication. A la fin de l'infection, l'effet anti-apoptotique du parasite s'arrête et la cellule meurt (Liu et al., 2009; Mccole et al., 2000). Les mécanismes d'échappement impliquent l'activation de la voie NFkB qui contrôle des voies anti-apoptotiques de la cellule (Liu et al., 2009; Mele et al., 2004) et les facteurs de survie : BCL-2 et survivine (Liu et al., 2009; Mele et al., 2004). Le parasite induit aussi la sécrétion d'ostéoprotégérine (OPG) qui bloque les effets pro-apoptotiques de TRAIL et de TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) (Castellanos-Gonzalez et al., 2008). L'analyse du transcriptome des cellules HCT-8 infectées par *C parvum* montre en fait que l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire est modifiée par le parasite (Liu et al., 2009).

Les CE contribuent aussi à la défense contre *Cryptosporidium* en renforçant sa « barrière chimique » et en favorisant le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection. Des peptides antimicrobiens, tels que la cathélicidine LL-37 et les  $\beta$ -défensine-1 et 2 (Carryn et al., 2012, Giacometti et al., 1999) ainsi que des phospholipases (Carryn et al., 2012) sont produites par les CE au cours de l'infection par *Cryptosporidium*. Ces molécules ont un effet direct, lytique ou neutralisant sur le parasite (Carryn et al., 2012). Elles sont généralement sécrétées par les CE sous formes solubles dans la lumière intestinale mais certaines (LL-37,  $\beta$ -défensine-2) peuvent aussi être associées à des exosomes, produits par les CE, qui se lient au parasite (Hu et al., 2013). Récemment, le même groupe a montré que ces exosomes transportaient aussi d'autres molécules effectrices de l'hôte (HMGB1, ICAM1...) et du parasite (ARN : *cdg2-FLc-0170*, *cdg7-FLc-1000*...) et pouvaient ainsi stimuler la réponse immune systémique antiparasitaire (Wang et al., 2019). La sécrétion des peptides antimicrobiens, LL-37 et  $\beta$ -défensine-2 et celle des exosomes dépend en partie de l'activation du TLR4 et de la voie NFkB (Chen et al., 2005; Hu et al., 2013). L'IL-18 stimule aussi la production de LL-37 et de l'alpha-defensin 2 dans des lignées de CE humaines (HCT-8, HT-29) (McDonald et al., 2006).

Enfin, les CE exercent aussi leurs effets protecteurs contre *Cryptosporidium* en induisant l'expression de molécules impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Plusieurs études montrent notamment qu'après infection par le parasite les CE intestinales produisent des cytokines/alarmines proinflammatoires, telles que l'IL-18 (Choudhry et al., 2012; McDonald et al., 2006; Sateriale et al., 2021), l'IL-15 (Robinson et al., 2001) et les IFN de type I (IFN $\alpha/\beta$ ).

L'IL-18 joue un rôle majeur dans la défense contre *Cryptosporidium*. La délétion du gène de l'IL-18 chez la souris (IL-18 $^{-/-}$ ) (Ehigiator et al., 2007) ou le traitement d'animaux immunodéficients avec un Ac neutralisant anti-IL-18 (Bedi et al., 2015; Choudhry et al., 2012) augmentent la sensibilité à l'infection des souris nouveau-nés et adultes. A l'inverse le traitement de souris SCID (Bedi et al., 2015) ou IL12 KO (Ehigiator et al., 2007) avec de l'IL-18 recombinante protègent contre l'infection. Cette cytokine exerce une activité protectrice contre le parasite en stimulant la production de peptides antimicrobiens (Bedi et al., 2014; McDonald et al., 2006), la production d'IFN- $\gamma$  (Bedi et al., 2014; Choudhry et al., 2012) et la polarisation de la réponse immune Th1/Th2 (Tessema et al., 2009). Dans les CE, la sécrétion

d'IL-18 est induite par l'activation de l'inflammasome, via la voie du récepteur NLRP6 (NOD like receptor) et de la caspase-1 (Sateriale et al., 2021).

L'IL-15 produite par les CE renforce l'immunosurveillance médiée par les LIE dans l'intestin et protège l'organisme contre de nombreux pathogènes (Fehniger and Caligiuri, 2001). Son rôle dans la cryptosporidiose reste toutefois mal documenté. Une étude réalisée en hybridation in situ sur des coupes d'intestin humain montre une augmentation de l'ARNm de l'IL-15 chez les individus infectés pour la première fois par *C parvum*. L'augmentation était inversement corrélée à la charge parasitaire ce qui suggérait un effet protecteur (Robinson et al., 2001). Toutefois, le rôle de l'IL-15 dans la cryptosporidiose est ambiguë car une étude rapporte que la cytokine stimule la cytotoxicité des cellules NK contre les CE (HCT-8) infectées par *C parvum* (Dann et al., 2005) alors qu'une autre montre que les souris IL-15 KO ne sont pas plus sensibles à l'infection que les souris WT (Lantier et al., 2013).

Les CE, comme les DC (voir ci-dessous), produisent des IFN de type I pour lutter contre une infection (Beiting, 2014). Le rôle de ces cytokines a toutefois été très peu étudié dans le cadre de l'infection par *Cryptosporidium*. Une seule étude montre que chez la souris, l'infection des nouveau-nés par *C parvum* induit une augmentation rapide (en 24h) de l'expression des IFN- $\alpha$  et  $\beta$  et que la neutralisation de ces cytokines avec des Ac spécifiques augmente la charge parasitaire. Ces données ont également été confirmées *in vitro* avec des lignées de CE humaines (Caco-2) et murines (CMT-93) (Barakat et al., 2009).

En réponse à l'infection les CE sécrètent aussi un large panel de chimiokines (CXCL8, CXCL1, CCL2, CXCL10, CCL5) (Laurent and Lacroix-Lamandé, 2017, Lacroix-Lamandé et al., 2002) qui joue un rôle dans le recrutement des cellules immunitaires vers le site d'infection. Notamment, la sécrétion de CXCL8 et CXCL1 par les entérocytes infectés par *Cryptosporidium* favorise le recrutement des neutrophiles (Laurent et al., 1997). D'autres modèles d'études d'infection chez la souris ont aussi montré une induction importante de sécrétion de diverses chimiokines (CCL2, CXCL10, CCL5, CCL20). Ces chimiokines permettent le recrutement des cellules dendritiques et des monocytes.

Enfin, les microARN (miARN) des CE jouent aussi un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle et la modulation de la réponse immunitaire innée au *Cryptosporidium* (Chen et al., 2007) (Zhou et al., 2012). Des études ont montré que la variation de l'expression des



miARN était associée au changement de la charge parasitaire de *C. parvum* (Zhou et al., 2012) (Zhou et al., 2009).

## B- Rôle des monocytes/ macrophages contre *Cryptosporidium*

Les monocytes sont produits à partir de précurseurs situés dans la moelle osseuse. Ils circulent dans le sang puis se déplacent dans les tissus où ils se développent en monocytes inflammatoires ou en macrophages en fonction des signaux qu'ils reçoivent de l'environnement.

Les monocytes inflammatoires ne semblent pas avoir un rôle majeur dans la protection contre *Cryptosporidium*. En effet, chez les souris néonatales infectées par *C. parvum*, on observe une forte augmentation du nombre de monocytes inflammatoires Ly6c<sup>hi</sup> (> 60 fois) dans l'intestin au niveau de la lamina propria et de la zone sous-épithéliale. Leur recrutement dépend du récepteur CCR2, exprimé sur les monocytes et de son ligand, CCL2 dont l'expression est fortement augmentée dans les CE intestinales infectées (De Sablet et al., 2016) (Auray et al., 2007). Ce recrutement est diminué chez les souris CCR2 KO qui pourtant résistent à l'infection par *C. parvum* comme les souris WT (De Sablet et al., 2016). Les monocytes inflammatoires ne semblent donc pas avoir de rôle protecteur dans ce modèle murin. Au contraire, ils pourraient avoir un effet délétère en sécrétant les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  qui déstabilisent les jonctions entre les CE et augmentent ainsi la perméabilité intestinale (De Sablet et al., 2016).

A l'inverse, plusieurs études ont rapporté un rôle protecteur des macrophages dans l'infection contre *Cryptosporidium*. Une première étude suggère un rôle coopérateur entre les macrophages et les neutrophiles au cours de la phase précoce de l'infection chez la souris adulte. Elle montre que les souris immunodéficientes SCIDbg qui n'ont pas de LT de LB et de NK survivent à l'infection alors que les souris SCIDbg qui ont été déplétées en macrophages et en neutrophiles après une irradiation et un traitement avec des carraghénanes et un Ac anti-Ly6G (souris SCIDbgMN) meurent en moins de 16 jours (Takeuchi et al., 2008). La reconstitution de ces dernières avec des macrophages résidents et des neutrophiles exposés *in vivo* ou *in vitro* à *Cryptosporidium* restaure la résistance.

Une autre étude montre que la déplétion des macrophages par un traitement avec liposomes chargés en clodronate, médicament qui induit la mort cellulaire par apoptose des cellules phagocytaires, augmente l'infection chez les souris adultes RAG<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> en diminuant la

production d'IFN- $\gamma$  résiduelle. En absence de LT et de cellules NK, l'IFN- $\gamma$  serait sécrété par les macrophages péritonéaux stimulés par l'IL-18 et l'IL-12 (Choudhry et al., 2012).

Enfin, Lantier et ses collaborateurs ont montré que l'élimination des cellules CD11c<sup>+</sup>, une intégrine exprimée par les macrophages, chez les souris CD11c-DTR (récepteur à toxine diphtérique) traitées avec la toxine diphtérique (DT) après la naissance ou à l'âge adulte augmente la sensibilité à l'infection ce qui indique que ces cellules contribuent au mécanisme de défense quel que soit l'âge (Lantier et al., 2013).

L'ensemble de ces travaux ont mis donc en faveur d'un rôle important des macrophages dans l'infection contre *Cryptosporidium*, toutefois, les différents modèles expérimentaux utilisés dans ces études : clodronate et CD11c-DTR peuvent aussi affecter les fonctions d'autres cellules comme les DC. Du reste, l'étude de Lantier et al privilégie plutôt un rôle protecteur médié par les DC (Lantier et al., 2013). D'autres travaux ciblant plus spécifiquement les macrophages sont donc nécessaires pour conforter leur rôle.

### C- Rôle des cellules dendritiques

L'implication des DC dans la cryptosporidiose est mieux documentée que celle des macrophages. En effet, le fait que I) la déplétion soit plus efficace pour les DC CD103+CD11c<sup>+</sup> (85-90%) que pour les macrophages CD11c+CD64+CX3CR1<sup>int/hi</sup> (70%) chez les souris CD11c-DTR traitées avec la DT (Laurent and Lacroix-Lamandé, 2017) II) le nombre des DC CD103+ mais pas celui des macrophages CD11c+CD64+CX3CR1<sup>int/hi</sup> augmente de façon importante dans l'intestin des souris nouveau-nés infectés par *C parvum* III) l'amplification des DC CD103+ par un traitement avec le ligand de la Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3-L) augmente leur résistance à l'infection, plaident plutôt en faveur du rôle prépondérant des DC dans le mécanisme de protection (Lantier et al., 2013).

Ce travail est en outre confirmé par d'autres études qui montrent que le transfert de DC dans les souris CD11c-DTR adulte restaure la résistance à *Cryptosporidium* (Bedi et al., 2014) et que chez les souris Batf3 KO, un facteur de transcription essentiel au développement des DC CD103+, l'infection est plus sévère (Potiron et al., 2019). Cette dernière étude montre d'ailleurs que l'effet protecteur est principalement médié par les DC CD103+CD11b<sup>-</sup>, qui interviennent aussi bien dans la phase précoce de l'infection que dans la phase tardive lors de l'élimination du parasite (Potiron et al., 2019). Au début de l'infection et chez le nouveau-né les DC contribueraient à la production d'IL-12 et d'IFN de type I (IFN $\alpha/\beta$ ) et II (IFN- $\gamma$ ) (Barakat

et al., 2009; Lantier et al., 2013; Potiron et al., 2019). En outre, compte-tenu de leur rôle central dans l'activation et la polarisation des LT naïfs, les DC sont sans aucun doute essentielles pour établir la réponse immune adaptative spécifique contre *Cryptosporidium*.

#### D- Rôle des cellules innées lymphoïdes (les cellules NK)

Le groupe des ILC-1, qui inclut les cellules NK, participe à la protection de la muqueuse intestinale via la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et l'activation de mécanismes de cytotoxicité (Granzymes, perforine et FAS/FASL). Aujourd'hui, seul le rôle des cellules NK a été étudié dans l'infection par *Cryptosporidium* et reste controversé. La première étude qui suggère la participation des cellules NK dans l'infection par *Cryptosporidium* est une étude comparative dans laquelle la résistance à l'infection par *C parvum* a été comparée chez des souris adultes de différents fonds génétiques. Elle montre que les souris C57BL/6J-bgJ qui contiennent la mutation beige ont une charge parasitaire significativement plus élevée 7 jours après l'infection que tous les autres animaux testés (Enriquez and Sterling, 1991). Or, les souris C57BL/6J-bgJ ont un déficit sévère en cellules NK (Roder, 1979) qui pourrait diminuer leur résistance au parasite. Cette mutation aggrave aussi la susceptibilité des souris immunodéficientes SCID à l'infection par *C parvum* (Mead et al., 1991). Toutefois, la mutation beige induit aussi d'autres anomalies immunologiques qui affectent les cellules ou les mécanismes qui impliquent la libération de granules. Notamment, les granulocytes chez ces souris ont une activité bactéricide défectueuse (Gallin, et al., 1974), une réponse des lymphocytes T cytotoxiques altérée (Carlson et al., 1984) et un défaut des neutrophiles (Takeuchi et al., 1986) qui pourraient aussi perturber la défense contre *C parvum* (voir ci-dessus).

D'autres études *in vivo* chez la souris ont tenté d'étudier plus précisément le rôle des cellules NK au cours de l'infection, mais les conclusions de ces travaux se contredisent. En effet, plusieurs études rapportent que la déplétion des cellules NK par un traitement avec un Ac anti-Asialo-GM1 n'augmente pas la sensibilité à l'infection par *C parvum* chez les souris adultes WT ou immunodéficientes (SCID) (Rohlman et al., 1993; Ungar et al., 1991). Une étude plus récente montre que la déplétion des cellules NK NKp46+ chez les souris nouveau-nés transgéniques DTR-NKp46 n'augmente pas leur sensibilité à l'infection par *Cryptosporidium* (Lantier et al., 2013). A l'inverse, chez le nouveau-né WT, la déplétion des cellules NK avec un Ac anti-NK1.1 ralentit l'élimination du parasite (Korbel et al., 2011). Cette dernière étude met aussi en évidence une augmentation significative de l'expression de l'IFN- $\gamma$  et d'autres gènes

associés aux cellules NK et aux LT activés cytotoxiques, tels que la chaîne beta du récepteur à l'IL-2 (Il2rb), NK1.1 (Klrb1b), CD69 et GZMB, dans l'intestin grêle des souris WT et SCID après 5 jours d'infection (Korbel et al., 2011). Les travaux de Barakat et al sont aussi en faveur d'un rôle protecteur des cellules NK car ils montrent que les souris adultes et nouveau-nés RAG<sup>-/-</sup>, sans LT ni LB, sont plus résistantes à l'infection que les souris RAG<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> qui n'ont pas non plus de cellules NK (Barakat et al., 2009). L'absence de cellules NK dans les souris RAG<sup>-/-</sup>yc<sup>-/-</sup> est causée par la délétion de la chaîne yc qui compose le récepteur à l'IL-15, une cytokine essentielle pour le développement et le maintien de ces cellules (Fehniger and Caligiuri, 2001). A noter, dans cette étude la production d'IFN-γ dans l'intestin, en réponse à l'infection, était identique entre les deux lignées ce qui suggère que dans ce modèle les cellules NK ne contribuent pas significativement à la production d'IFN-γ.

La participation des cellules NK dans l'infection par *Cryptosporidium* a aussi été rapportée dans des études *in vitro* à partir de cellules humaines ou murines. Chez l'homme, il a été montré que les cellules NK circulantes activées par l'IL-15 étaient capables d'éliminer les CE HCT-8 infectées par *C. parvum*. Le mécanisme implique un mécanisme de cytotoxicité activé par l'interaction entre le récepteur NKG2D, présent à la surface des cellules NK, et son ligand MICA exprimé par les CE HCT-8 stressées par l'infection (Dann et al., 2005). Chez la souris, une étude rapporte que les splénocytes de souris SCID cultivés avec des sporozoïtes de *C. parvum* produisent de l'IFN-γ de manière dépendante de l'IL-12 mais que la déplétion des cellules NK avec un sérum anti-asialo-GM1 abroge l'expression de l'IFN-γ (McDonald et al., 2000).

Les résultats de ces différents travaux sont donc imprécis et contradictoires. Ils ne permettent pas de conclure définitivement ni sur le rôle que jouent ces cellules dans la cryptosporidiose ni sur les mécanismes impliqués : production d'IFN-γ ou cytotoxicité. De plus, une série de travaux récents montrent que l'épithélium des souris immunodéficientes n'est pas peuplé par les cellules NK « conventionnelles » qui sont étudiées dans les études mentionnées ci-dessus. Il abrite des cellules NK-like qui ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les cellules NK circulantes mais qui ont une ontologie différente (Ettersperger et al., 2016; Fuchs et al., 2013b; Van Kaer et al., 2014). Le rôle de cette population de LIE innés reste inexploré dans la cryptosporidiose. Pourtant, les LIE innés sont directement au contact des CE infectées et ils constituent la majorité des cellules immunitaires qui sont présentes dans l'épithélium intestinal chez les souris immunodéficientes SCID et RAG<sup>-/-</sup>. De plus, cette population hétérogène est constituée de cellules innées qui 1) sont capables de produire de

l'IFN- $\gamma$  et/ou des granzymes II) dépendent de l'IL-15 et/ou de l'IL-7 ; elles sont donc aussi absentes dans les souris RAG-/- $\gamma$ c-/- III) sont déplétées par un traitement anti-NK1.1 (voir chapitre LIE innés).

## II- But de la thèse

Les LIE sont les « sentinelles » de l'intestin car ils sont à l'interface entre l'organisme et l'environnement et participent à la surveillance, à la défense et au maintien de la barrière épithéliale. Ils forment une population hétérogène, évolutive et originale composée de cellules de l'immunité adaptative ou innée. Les travaux du Dr N. Cerf-Bensussan et de mon directeur de thèse, le Dr B. Meresse, ont contribué à caractériser une nouvelle population de LIE innés (LIE TCR-iCD3+) présente et majoritaire à la naissance ainsi que chez les individus immunodéficients. Ces LIE innés sont à l'origine du lymphome rare mais sévère qui complique la maladie coeliaque, une entéropathie induite par le gluten (Ettersperger et al., 2016), mais leur rôle physiologique est encore mal défini.

**Le but de ma thèse était donc de mieux caractériser les fonctions physiologiques des LIE innés en étudiant leur rôle dans la défense de l'organisme contre les pathogènes et en particulier contre *Cryptosporidium*.** Nous avons choisi ce parasite opportuniste car il infecte spécifiquement l'épithélium intestinal, de plus quelques études ont mis en évidence un effet protecteur des T-LIE (LIE TCR+) (Culshaw et al., 1997). Le rôle des LIE innés n'a en revanche jamais été étudié dans la cryptosporidiose. Pourtant, ces cellules sont majoritaires dans l'épithélium intestinal des jeunes enfants et des sujets immunodéficients qui sont les personnes qui ont le plus de risque de développer une cryptosporidiose sévère.

Il n'existe pas de marqueur typique des LIE innés, nous ne pouvions donc pas utiliser une méthode « classique » de déplétion pour étudier chez l'animal, les fonctions spécifiques de ces cellules. De plus, nous préférons éviter les modèles de transfert dans des animaux immunodéficients par crainte que les propriétés des LIE innés soient influencées et/ou masquées par les cellules immunitaires résiduelles. Pour étudier le rôle spécifique des LIE innés dans l'infection par *Cryptosporidium*, nous avons donc décidé de développer un modèle d'étude *in vitro* qui reproduit au mieux l'environnement de l'épithélium intestinal.

Le premier objectif de ma thèse était donc **de développer un nouveau modèle expérimental *in vitro* basé sur la co-culture de LIE avec des organoïdes intestinaux infectés par *Cryptosporidium*.**

Le deuxième objectif de ma thèse était d'exploiter notre modèle *in vitro* et analyser la réponse immune intraépithéliale *in vivo* chez les souris RAG<sup>-/-</sup> infectées **pour définir le rôle des LIE innés dans l'infection par *C parvum* et pour identifier les mécanismes de défense impliqués.**

# Matériels-méthodes



## III-Matériels-méthodes

### III-1-Animaux

Les souris WT C57BL/6 proviennent de la société Charles River et les souris Rag2-/- C57BL/6 femelles âgées de 8 semaines ont été obtenues à partir d'une colonie élevée à l'Institut Pasteur de Lille (France) et régulièrement contrôlées pour les agents pathogènes microbiens. Les animaux sont maintenus dans des conditions aseptiques avec de la nourriture et de l'eau à volonté.

### III-2-Parasite et infection des cellules HCT8

Les oocystes de *C parvum* IOWA ont été obtenus chez Waterborne™, Inc. (Nouvelle-Orléans, Louisiane). Les cellules HCT8 sont cultivées en milieu DMEM, SVF 10%, pénicilline/streptomycine (Gibco). Deux plaques 24 puits sontensemencées à raison de 250 000 cellules / puits. Les cellules sont laissées en culture jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 80%. Les cellules sont ensuite infectées avec des oocystes traités avec 0.025% de trypsine pH=2.4 (Sigma) pendant 20 minutes à 37 °C puis centrifugés 10 minutes à 2000 g. Les oocystes (5 000, 500, 50 ou 5 oocystes / 200 µl pour chaque puit) sont ensuite repris dans du milieu de désenkystement contenant du RPMI 1640 avec 2mM de L-glutamine (Gibco), 1% de sérum de veau foetal (Eurobio), 100 U/ml de pénicilline/ streptomycine (Gibco), 0.25mg/ml de Gentamicine (Gibco), 0.2mg/ml de Bile Bovine (Acros Organics), 1mg/ml de glucose (BioXtra), 0.25µg/ml d'acide folique (Alfa Aesar), 0.001mg/ml d'acide 4-aminobenzoïque (VWR), 8.75µg/ml d'acide L-Ascorbique (Sigma Aldrich) et 0.5µg/ml de Pantothenate de Calcium (Acros Organics).

### III-3-Isolements des cryptes intestinales et culture des organoïdes intestinaux

Les cryptes intestinales ont été isolées à partir des intestins grêles des souris C57BL/6 femelles âgées de 5 semaines comme cela a été décrit par Sato et al (Sato et al., 2011). Brièvement, les intestins grêles ont été prélevés et lavés avec du PBS 1X et de l'eau de javel 0.3%. Ils ont ensuite été rincés avec du PBS 1X puis ouverts longitudinalement et découpés en morceaux de 0,5 cm. Après un bref traitement avec une solution de PBS 1X contenant du DTT 10mM pour éliminer le mucus, les morceaux ont été incubés dans du PBS-EDTA 8mM sur glace en agitant vigoureusement pendant une heure. Les morceaux sont ensuite lavés avec du PBS

1X en secouant à l'aide d'une pipette de 10 ml. Le surnageant contenant les cryptes est recueilli.

Après vérification de la présence de cryptes au microscope, le surnageant a été filtré sur un filtre de 70 microns puis centrifugé pendant 5 min à 70g. Le culot a ensuite été resuspendu dans 5ml de milieu DMEM. Le nombre de cryptes a ensuite été compté et deux mille cinq cent à cinq mille cryptes ont été mises en culture dans 30µl de Matrigel (Corning®) dans des plaques de 24 puits avec du milieu conditionné (MC) (milieu DMEM contenant Wnt3a, R-spondin et Noggin sécrétés par la lignée LWRN (ATCC)).

Les organoïdes sont repiqués une fois par semaine en dissociant le matrigel pendant cinq minutes à 37°C avec une solution de 0.05% trypsine-EDTA (Gibco). Après centrifugation et lavage, le culot contenant les organoïdes est repris dans 30µl de Matrigel avec 600µl de MC.

#### III-4-Infection des organoïdes intestinaux par cassure

Les organoïdes ont tout d'abord été retirés du matrigel à l'aide d'une solution qui n'altère pas sa structure (Recovery solution, Corning), puis les parois des organoïdes ont été rompues de façon mécanique en les passant plusieurs fois à travers le cône d'une pipette. Les organoïdes ainsi ouverts ont ensuite été incubés avec les parasites désenkystés (incubation des oocystes avec du milieu de désenkystement (voir infection des HCT8) pendant 30 min à 37°C) pendant une demi-heure à 37°C puis cultivés dans du matrigel.

#### III-5-Microinjection des organoïdes intestinaux avec des oocystes de *C parvum*

Les organoïdes sont retirés du matrigel après 5 jours de culture puis remis en culture dans des boîtes IBIDI (ibitreat 35mm low) adaptées à la microinjection pendant 48h. Un capillaire en verre stérile de 15 µm de diamètre a été utilisé pour la micro-injection (Transfer tip eppendorf). Le capillaire a été chargé avec des oocystes (250 oocystes/µl) en suspension dans leur milieu de désenkystement (voir partie infection des cellules HCT8). 0.025 mg/ml de Fast green dye (Sigma) a été ajouté à la suspension de milieu afin de visualiser les organoïdes micro-injectés. Environ 200 nl de suspension ont été injectés dans chaque organoïde en utilisant le microinjecteur Leica DMI 4000B. Au total pour chaque condition d'expérience 10 à 15 organoïdes/dôme de matrigel sont micro-injectés.

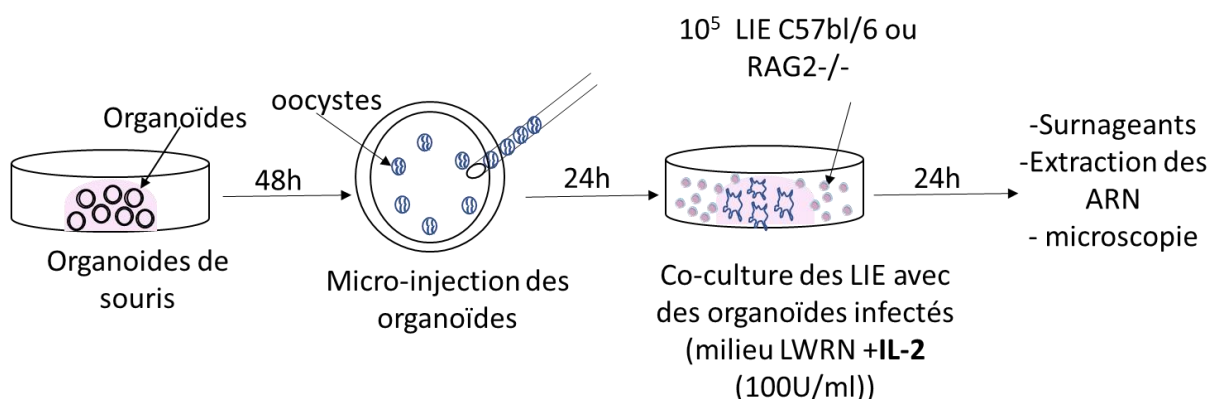
### III-6-Isolements des lymphocytes intraépithéliaux (LIE)

L'isolement des LIE murins a été réalisé selon la méthode détaillée par Schulthess et al., 2012. Brièvement, les intestins grêles de souris C57BL/6 ou Rag2<sup>-/-</sup> ont été prélevés et lavés avec du PBS 1X froid. La graisse mésentérique et les plaques de Peyer ont été retirées. Les intestins ont ensuite été ouverts longitudinalement puis coupés en morceaux de 0,5 cm et incubés dans 50ml de RPMI 1640 avec 2mM de L-glutamine (Gibco) contenant 10% de SVF (Eurobio) pendant deux heures à 37 °C sous agitation forte. Le surnageant est ensuite passé sur une colonne de laine de verre pour éliminer une partie des cellules épithéliales. Les cellules ont ensuite été séparées sur un gradient de Percoll (GE Healthcare) 40/80 %. L'anneau de LIE a ensuite été collecté, lavé et repris dans 1ml de RPMI-10% SVF. Les LIE isolés sont comptés à l'aide de la cellule de thomas.

### III-7-Co-culture des LIE avec les organoïdes

Les LIE innés isolés sont ajoutés ( $10^5$  LIE/ dôme d'organoïdes) dans le milieu infecté ou non en présence d'IL-2 (100U/ml) (Biotechne) ou d'IL-15 (20ng/ml) (Miltenyi), pendant 24 heures suivant l'infection. La co-culture est ensuite arrêtée après 48 heures d'infection soit 24 heures de co-culture avec les LIE (Figure 14).

L'activité de l'IFN- $\gamma$  est neutralisée avec un anticorps bloquant anti-IFN- $\gamma$  (10ng/ml) (eBioscience) et l'activité cytolytique est bloquée en utilisant l'aprotinine (2 $\mu$ g/ml) (Sigma).



**Figure 14** : Modèle expérimental de co-culture des LIE avec des organoïdes.

Les organoïdes sont retirés du matrigel à J5 et remis en culture pendant 48 heures. Ils sont ensuite infectés par micro-injection avec 40 à 50 oocystes/organoïde (200 nl à peu près). Après 24 heures d'infection,  $10^5$  LIE isolés sont ajoutés dans le milieu. L'infection est arrêtée après 24 h de coculture et des analyses de RT-qPCR et de microscopie sont effectuées.

### III-8-Infection *in vivo* des souris Rag2<sup>-/-</sup> C57BL/6

Les souris Rag2<sup>-/-</sup> C57BL/6 âgées de huit semaines ont été infectées par gavage oral avec  $5 \times 10^4$  oocystes de *C parvum* (souche IOWA) (n=15 infectés et n = 14 témoins). Après 24 heures, les souris sont sacrifiées et l'intestin grêle est prélevé. Un morceau d'intestin a été collecté pour quantifier le nombre de cellules immunitaires dans l'épithélium par immunohistochimie, un morceau pour mesurer la charge parasitaire et l'expression des cytokines par RT-qPCR. Le reste de l'intestin est récupéré pour isoler les LIE innés afin de mesurer l'expression des cytokines par RT-qPCR et caractériser les différentes populations des cellules immunitaires de l'épithélium par cytométrie en flux.

### III-9-Quantification de la charge parasitaire par qPCR

L'ADN des organoïdes infectés a été isolé à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin® Tissue suivant les instructions du constructeur. La détection de la présence de *C parvum* a été faite avec le kit Light cycler 480 probes master 2x avec les amorces (CRYPTO18S-F 5'CATGGATAACCGTGGTAAT 3' et CRYPTO18S-R 5'TACCCTACCGTCTAAAGCTG3') qui ciblent une portion de 178pb du gène codant pour l'ARNr18S et une sonde d'hydrolyse (CRYPTO18S-P1 FAM-5'CTAGAGCTAATACATGCGAAAAA3'-MGB-BH). Tous les échantillons ont été mesurés en duplicat. L'amplification a été réalisée avec un appareil PCR RotorGene 6000 (corbet, Qiagen). La normalisation a été faite par rapport au gène de la  $\beta$ -actine (For-actbmouse Eurogentec n°4639456 : 5'AGGCCAACCGTGAAAGATG 3' et Rev-actbmouse Eurogentec n°4639457 : 5' CTGAGAAGCTGGCCAAAGAGA 3') et une sonde d'hydrolyse (Probe-actbmouse Eurogentec n°4639457): HEX- 5' CCCAGGTCAGTATCCCGGGTAACC 3'-BHQ-1).

### III-10-Extraction de l'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été extrait à partir des dômes de matrigel contenant des organoïdes ou à partir des tissus d'intestins en utilisant le kit Nucleospin®RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon le protocole du fabricant. L'ADN complémentaire a été rétrotranscrit à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le kit Power SYBR Green PCR Master Mix sur le thermocycleur StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La charge parasitaire de *C parvum* a été quantifiée en utilisant la méthode  $\Delta\Delta C_t$  pour l'expression génique de l'ARN ribosomal 18s. Cp18S sens, 5'-TGCCTTGAATACTCCAGCATGG-3' ; Cp18S anti-sens, 5'-TACAAATGCCCCCAACTGTCC-3'.

L'expression des autres gènes a été quantifiée en utilisant la méthode  $\Delta$ Ct après normalisation avec le gène codant pour la  $\beta$ -actine (Tableau s3).

### III-11-Microscopie confocale

Les LIE innés isolés des souris Rag2<sup>-/-</sup> ont été marqués avec du Cell Trace CFSE 5 $\mu$ M (Invitrogen) pendant 20 min à 37°C. 100 000 LIE marqués ont été co-cultivés avec des organoïdes infectés ou non. Après 24h, les organoïdes sont fixés avec du paraformaldéhyde 4% (Microm microtech) pendant 30 min à RT. Les organoïdes sont ensuite perméabilisés avec du PBS 1X contenant 1% de triton (Sigma) pendant 15 min à RT. Après lavage, les organoïdes sont marqués avec du DAPI (Thermo Fisher) et de la phalloïdine Alexa Fluo 647 (Invitrogen) 1.65 $\mu$ M pendant 1h à RT. La co-culture est visualisée au microscope confocal Leica Sp8.

Les images confocales 3D ont été analysées à l'aide du logiciel Imaris 9.7 et de l'interface de programmation XT. Les surfaces des organoïdes ont été détectées à l'aide de l'outil Imaris Surfaces afin de déchiffrer leur limite externe. Les LIE, à proximité immédiate ont ensuite été comptés, à une distance de la surface de 30  $\mu$ m ou moins à l'aide de l'outil Imaris XT associé à MatLab."

### III-12-Cytométrie en flux

Les cellules isolées à partir des intestins grêles des souris Rag2<sup>-/-</sup> âgées de 8 semaines sont incubées avec l'anticorps anti-souris CD16/CD32 (mouse BD FC Block clone 2.4 G2 (BD Biosciences) pendant 10 min à 4°C suivi d'un lavage avec du PBS 1X 2% SVF. Les cellules sont ensuite marquées avec un mix d'anticorps pendant 20 min à 4°C à l'abri de la lumière (Tableau s4). Les cellules sont ensuite lavées et fixées avec une solution de lyse (BD Biosciences) 5 minutes à température ambiante puis lavées et reprises dans du PBS 1X. Les cellules sont ensuite passées au cytomètre LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson) et analysées avec le logiciel Diva.

Pour le marquage intracellulaire IFN- $\gamma$ , les cellules isolées sont stimulées avec le mélange Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (eBioscience) pendant 5h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X SVF 2%. Comme précédemment, les récepteurs aux Fc récepteurs sont bloqués et les cellules sont marquées avec un mix d'anticorps (CD45 FITC, CD8 $\alpha$  APC-CY7, CD103 Pe-Cy7, NKp46 BV421, CD3 BV711 et CD11c Pe-Cy5) (Biolegend). Après fixation dans le tampon CytoFix (BD Biosciences), les cellules sont lavées 2 fois avec du

permwash (BD Biosciences) qui sert aussi de perméabilisation. Puis incubées avec de l'anticorps anti IFN- $\gamma$  PE (Sony) pendant 30 min à 4°C. Ensuite, les cellules sont lavées 2 fois avec du permwash et une fois en PBS 1X, passées au cytomètre LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson) et analysées avec le logiciel Diva.

Pour le tri cellulaire, les LIE innés isolés sont bloqués avec 2.4 G2 pendant 10 min à 4°C et marqués après lavage avec un mix d'anticorps CD45 FITC (Sony), CD103 PeCy7 (Biolegend), NKp46 BV421 (Biolegend) pendant 20 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS 1X contenant 1% de SVF. Les cellules sont triées en 4 populations (CD45+CD103-NKP46-, en CD45+CD103+, CD45+NKP46+ et CD45+) sur un cytomètre ARIA SORP (Becton Dickinson).

### III-13- Immunohistochimie

Les échantillons d'iléon des souris infectées ou non, ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % puis inclus en paraffine et coupés au microtome en sections fines de quatre micromètres. Après démasquage des sites antigéniques et blocage des peroxydases endogènes, les coupes ont été incubées avec différents anticorps monoclonaux de lapins : CD3 $\gamma$  (AbCam) et CD8 $\alpha$  (Cell Signaling Technology) pendant la nuit à 4°C. Après lavages en TBS-Tween 0,05 %, les coupes ont été incubées pendant 30 minutes avec un kit de détection : « Immpress peroxidase Polymer anti rabbit IgG » (Vector). Après lavages en TBS-Tween 0.05%, le substrat de la peroxydase, à savoir la DAB (Cell Signaling Technology) est déposé pendant 5 minutes. Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée avant montage des lames dans un milieu aqueux. Les lames colorées ont été observées au microscope (Leica, Bensheim, Allemagne).

### III-14-Quantification du taux d'IFN- $\gamma$

La sécrétion d'IFN- $\gamma$  a été mesurée dans les surnageant des organoïdes infectés ou non, co-cultivés avec des LIE en utilisant le kit « Mouse IFN- $\gamma$  ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe set » (Biolegend).

### III-15-Analyse transcriptomique

#### Construction de librairies de séquençage

La génération de bibliothèque est initiée par l'amorçage oligo dT, à partir d'ARN total (entre 50 et 200 ng). L'amorce contient déjà des séquences de liaison compatibles Illumina

(lecture 2). Après la synthèse du premier brin, l'ARN est dégradé et la synthèse du second brin est initiée par amorçage aléatoire et une ADN polymérase. L'amorce aléatoire contient également des séquences de liaison 5' compatibles Illumina (lecture 1). A cette étape, des identifiants moléculaires uniques (UMI) sont introduits permettant l'élimination des doublons PCR lors de l'analyse. Après avoir obtenu la banque d'ADNc double brin, la banque est purifiée avec des billes magnétiques et amplifiée. Au cours de l'amplification de la bibliothèque, les codes à barres et les séquences nécessaires à la génération de clusters (index i7 en 3' et index i5 en 5') sont introduits en raison de séquences de liaison compatibles Illumina. Le nombre de cycle dépend de la quantité de départ, entre 14 cycles pour 200 ng d'ARN total et 16 cycles pour 50 ng d'ARN total. Si la quantité est inférieure à 50 ng, le nombre de cycle augmentera (par exemple pour 17ng, 17 cycles). La banque finale est purifiée et déposée sur une puce à ADN haute sensibilité pour être contrôlée sur le bioanalyseur Agilent 2100. La concentration de la banque et la distribution des tailles sont vérifiées.

### Séquençage

Chaque bibliothèque est regroupée de manière équimolaire et le pool final est également contrôlé sur le bioanalyseur Agilent 2100 et séquencé sur NovaSeq 6000 (Illumina) pendant 100 cycles. Différentes puces peuvent être utilisées pour le séquençage, cela dépend du nombre de librairies regroupées, l'objectif est d'obtenir un minimum de 25 millions de lectures par échantillon.

### Analyse des données transcriptomiques

Pour éliminer les régions de mauvaise qualité et le poly(A) des lectures, nous avons utilisé le programme fastp. Nous avons utilisé un score de qualité seuil de 20 et supprimé les séquences inférieures à 25 pb. Les alignements de lecture ont été effectués à l'aide du programme STAR avec le génome souris de référence (GRCm39) et les annotations du gène de référence (Ensembl). L'UMI (Unique Molecular Index) a permis de réduire les erreurs et les biais quantitatifs de PCR en utilisant fastp et umi-tools. Sur la base des alignements de lectures, nous avons compté le nombre de lectures par gène à l'aide de FeatureCount. D'autres programmes ont été réalisés pour le contrôle qualité des lectures et pour le workflow comme qualimap, fastp, FastQC et MulitQC. L'expression différentielle des gènes de l'ARN-seq a été réalisée avec le package R DESeq2. Le seuil pour le gène exprimé de manière différentielle était la valeur  $p \text{ padj (BH)} < 0,1$ .

### III-16-Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SD ou de médiane avec range. Un test de rang signé par paires appariées de Wilcoxon ou de t test a été utilisé pour toutes les comparaisons. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 5.0, San Diego, CA, USA) et statxact (version x). Le seuil de signification statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .



# Résultats

## IV-Résultats

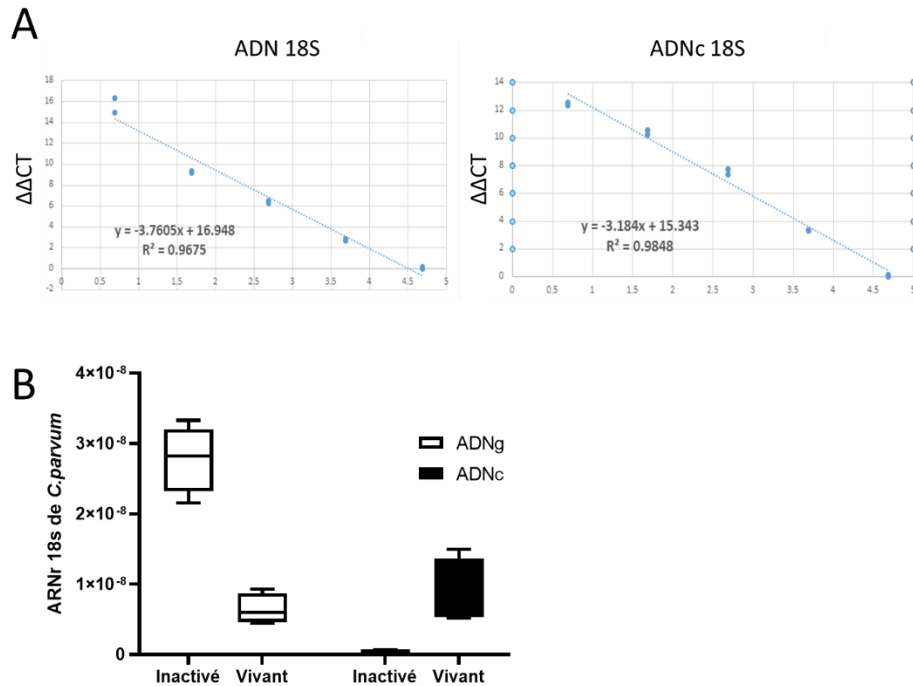
### IV-1- Mise au point du modèle expérimental pour étudier *in vitro* le rôle des LIE dans l'infection par *C parvum* : Co-culture des LIE avec les organoïdes intestinaux murins infectés par *C parvum*.

Nous avons développé un modèle expérimental original pour étudier *in vitro* le rôle spécifique des LIE dans l'infection par *Cryptosporidium*. Pour mimer au mieux les conditions *in vivo*, nous avons fait le choix de réaliser des expériences de co-culture avec des organoïdes intestinaux qui reproduisent le mieux les caractéristiques « physiologiques » de l'épithélium (diversité cellulaire, renouvellement, polarisation...). Pour des raisons pratiques (accès aux prélèvements et au parasite, problème d'histocompatibilité...), nous avons développé ce modèle à partir d'organoïdes intestinaux murins infectés par *C parvum*.

Pour réaliser ce modèle complexe nous avons été confrontés à plusieurs difficultés techniques:

#### 1 – La détection du parasite vivant

Pour évaluer l'effet des LIE sur le parasite nous avons dû mettre au point au laboratoire une méthode pour quantifier le plus précisément possible la présence de parasite vivant dans les organoïdes. Pour cela nous avons comparé deux méthodes de qPCR basées sur la quantification de l'ADN ou de l'ARN ribosomal 18S de *C parvum*. Du point de vue quantitatif, les 2 méthodes sont équivalentes car elles montrent une détection linéaire du gène ou de l'ARNr 18S en fonction de la quantité de parasite ( $R^2$ ) (Figure 15A). Pour nos expériences il était aussi important de détecter uniquement le parasite vivant. Pour tester cet aspect, des quantifications ont été réalisées sur du parasite vivant ou inactivé. Les résultats montrent une diminution de la détection de l'ARNr 18S (CT inactivé 31 vs CT activé 27) mais pas de l'ADN (CT inactivé 25 vs CT activé 27) (Figure 15B). Ces résultats nous ont amenés à choisir la quantification de l'ARNr 18S pour déterminer la charge parasitaire.



**Figure 15** : Méthode de quantification de la charge parasitaire de *C. parvum* par (RT)-qPCR. (A) comparaison de l'efficacité de la quantification de l'ARNr 18S de *Cryptosporidium* par qPCR à partir de l'ADN génomique (ADNg) ou de l'ARN (ADNc) isolé des cellules HCT8 infectées pendant 24h avec différentes concentrations d'oocystes de *C. parvum* (5 000, 500, 50 ou 5 oocystes). La quantification de l'ARNr 18s a été normalisée par rapport à la quantité de la  $\beta$ -actine présente dans l'échantillon. (B) Quantification de l'ARNr 18S de *C. parvum* à partir de l'ADNg ou de l'ARN isolé des oocystes vivants ou inactivés.

## 2 - Le mode d'infection des organoïdes intestinaux

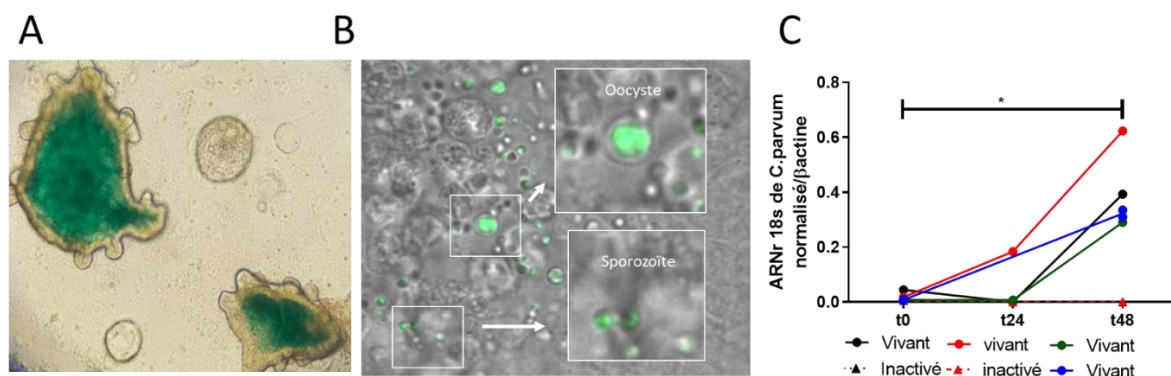
*Cryptosporidium* infecte les cellules épithéliales intestinales par le pôle apical, or dans le cas des organoïdes la lumière intestinale se trouve à l'intérieur de la structure 3D (Figure 14). Pour infecter les organoïdes intestinaux nous avons testé deux méthodes publiées : la cassure mécanique des organoïdes (à l'aide d'une pipette) et la micro-injection.

Après cassure mécanique, nous avons constaté une forte mortalité des organoïdes et peu de « reconstruction » des structures 3D. En outre nous n'avons pas détecté la présence du parasite dans les organoïdes restants par RT-qPCR 24, 48, 72 et 96 heures après l'infection (n=3) (données non montrées).

En revanche, la micro-injection d'une solution contenant le colorant Fast green avec ou sans parasite n'altère pas la viabilité et la croissance des organoïdes sur une période de 72h (Figure 16A). Le maintien de la coloration des organoïdes 24 à 48h après la micro-injection témoigne

de l'absence ou de la faible diffusion du contenu luminal vers l'extérieur de l'organoïde. Pour mettre en évidence la présence du parasite dans la lumière des organoïdes après micro-injection, nous avons marqué les oocystes avant leur désenkystement avec un traceur fluorescent Cell Trace pour pouvoir les visualiser par microscopie confocale. Les images obtenues confirment la présence d'oocystes dans les organoïdes micro-injectés et montrent aussi d'autres formes fluorescentes qui ressemblent à des sporozoïtes (forme en « virgule ») (Figure 16B).

Pour démontrer que le parasite se développe à l'intérieur de l'organoïde, nous avons ensuite micro-injecté des organoïdes avec les oocystes (environ 50 oocystes par organoïde) dans la solution de désenkystement et suivi l'évolution de la charge parasitaire par RT-qPCR aux temps 0, 24 et 48h après l'infection. Les résultats montrent une augmentation progressive de la charge parasitaire avec le temps. Après 24h et 48h d'infection, la charge parasitaire augmente et est en moyenne 3 fois (t24) et 23 fois (t48) ( $p < 0.004$ ) plus élevée qu'au moment de la micro-injection (t0). A l'inverse, lorsque le parasite est inactivé par un traitement par la chaleur (15 min 95°C) aucune augmentation de la charge parasitaire n'est observée (Figure 16C).



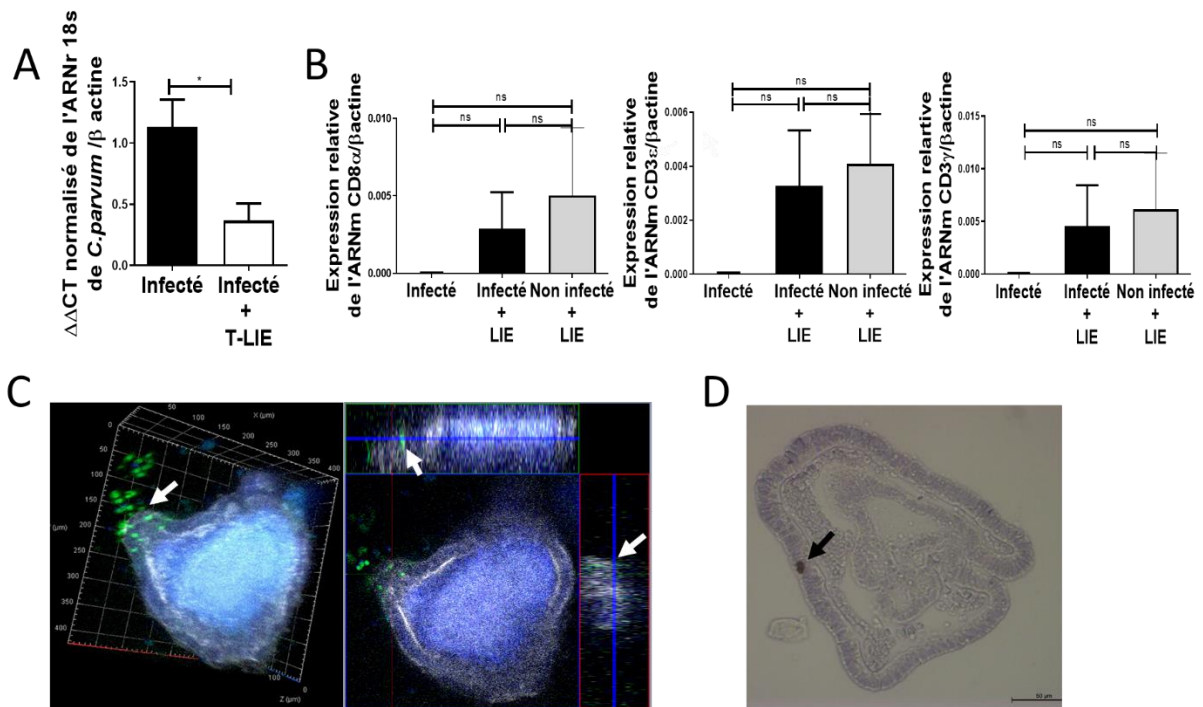
**Figure 16** : Mise au point de la microinjection dans les organoïdes intestinaux murins.

(A) Image de microscopie montrant des organoïdes microinjetés avec du colorant Fast green (vert). (grossissement x10) (B) Détection par microscopie spinning disk (zeiss) des oocystes et des sporozoïtes marqués au Cell trace (en vert) dans la lumière des organoïdes après micro-injection (grossissement x 40 ). (C) Quantification de l'ARNr 18S de *C. parvum* par RT-qPCR 24h après infection dans des organoïdes infectés avec le parasite vivant ou inactivé. Les résultats représentent les données regroupées à partir d'expériences indépendantes (n=4). Test de Wilcoxon matched-pairs signed rank \* ( $P < 0,05$ ).

### 3 – Co-culture des organoïdes infectés par *C parvum* avec les LIE

Nous avons mis au point les conditions de culture optimales en utilisant des LIE isolés à partir d'intestins grêles de souris C57Bl/6 WT adultes (6-8 semaines) et des organoïdes d'intestin grêle provenant de cette même lignée murine. Brièvement, environ 20 organoïdes étaient mis en culture dans un dôme de matrigel 48h avant l'infection. Puis un même nombre d'organoïdes par dôme (<10 organoïdes par dôme) était micro-injecté avec 40-50 oocystes de *C parvum* dans la solution de désenkystement. Vingt-quatre heures après l'infection,  $10^5$  LIE isolés le jour même étaient ajoutés dans le milieu, à l'extérieur du matrigel. L'effet des LIE sur l'infection était évalué le jour suivant (48h après l'infection) en mesurant la charge parasitaire par RT-qPCR. Les résultats montrent une diminution de la charge parasitaire dans les organoïdes infectés co-cultivés avec les T-LIE par rapport aux organoïdes infectés sans LIE (Figure 17A). Puisque les LIE étaient ajoutés à l'extérieur du matrigel, nous avons ensuite voulu mettre en évidence leur présence à l'intérieur des organoïdes. Pour cela, nous avons tout d'abord recherché l'expression des gènes CD3E, CD3G et CD8A par RT-qPCR dans les organoïdes isolés du matrigel. L'ARNm de ces 3 gènes exprimés par les T-LIE mais pas par les CE était détectable dans les organoïdes co-cultivés avec les T-LIE mais pas dans les organoïdes seuls (Figure 17B). Nous avons également confirmé la présence de LIE dans les organoïdes par microscopie confocale avec des LIE marqués au CellTrace (Figure 17C) et en microscopie optique sur des coupes en paraffine en utilisant un anticorps anti-CD3 $\gamma$  (Figure 17D).

L'ensemble de ces expériences ont permis de valider notre modèle de co-culture.



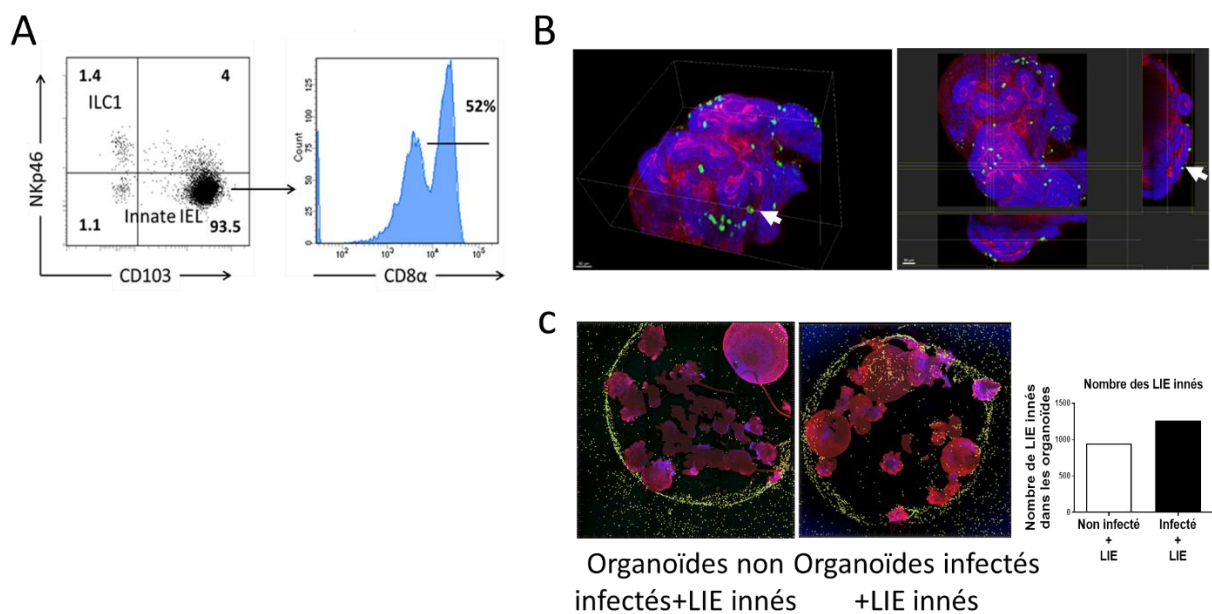
**Figure 17** : Mise en évidence de la présence de IIE dans les organoïdes intestinaux après 24h de co-culture. (A) Quantification de la charge parasitaire par RT-qPCR dans les organoïdes infectés en présence ou non de IIE isolés de souris WT C57BL/6 (n=3). (B) Quantification de l'expression des gènes codant pour CD8α, CD3γ et CD3ε par RT-qPCR (n=2) dans les organoïdes isolés du matrigel. Les médianes et les intervalles sont indiqués, (test de Wilcoxon matched-pairs signed rank) \* (P < 0,05). (C) Représentation en 3D réalisées par microscopie confocale. Les T- IIE marqués au Cell Trace (en vert) présents dans l'organoïde sont indiqués par une flèche, les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (en bleu) et l'actine à la phalloïdine (en blanc) (grossissement x10). (D) Marquage CD3γ par immunohistochimie d'un organoïde co-cultivé avec des T-IIE. La flèche indique la présence d'un IIE (grossissement x 20).

## IV-2- Les IIE innés contrôlent l'infection à *C parvum* dans le modèle de co-culture

Nous avons utilisé notre modèle *in vitro*, pour étudier le rôle des IIE innés dans l'infection par *C parvum*. Les organoïdes infectés ou non suivant le protocole ci-dessus ont été co-cultivés avec des IIE innés isolés de l'intestin grêle de souris immunodéficientes RAG2<sup>-/-</sup> C57BL/6 adulte. Chez ces souris qui n'ont ni LT ni LB, les cellules innées constituent la majorité de la population de IIE. L'analyse de cette population par cytométrie en flux montre que la majorité (>90%) des IIE innés exprime l'intégrine CD103 et la moitié d'entre eux exprime l'homodimère CD8α. Ces IIE innés représentent la population iCD3<sup>+</sup> qui comprend la sous population de IIE iCD8α<sup>+</sup> (Ettersperger 2016, Van Kaer 2015). On distingue également une

petite population de cellules NKp46+CD103- (1-2%) définie comme des IE-ILC-1 (Fuchs et al., 2013b) (Figure 18A).

Après 24h de co-culture avec les organoïdes infectés ou non par *C parvum*, nous avons pu confirmer par microscopie confocale que les LIE innés marqués avec le traceur Cell Trace migrent à travers le matrigel pour coloniser les organoïdes, comme les T-LIE (Figures 17C et D). La projection orthogonale des images confocales montrent en outre que les LIE innés s'attachent au pôle basal des CE comme dans l'intestin. Le nombre de LIE innés présents dans les organoïdes, mesuré à l'aide d'un comptage automatisé, était légèrement augmenté dans les organoïdes infectés par rapport aux organoïdes non infectés mais cette différence n'était pas significative (1260 vs 948) (Figure 18C). Cette analyse montre aussi qu'il y a en moyenne 70 LIE innés au contact des organoïdes infectés.



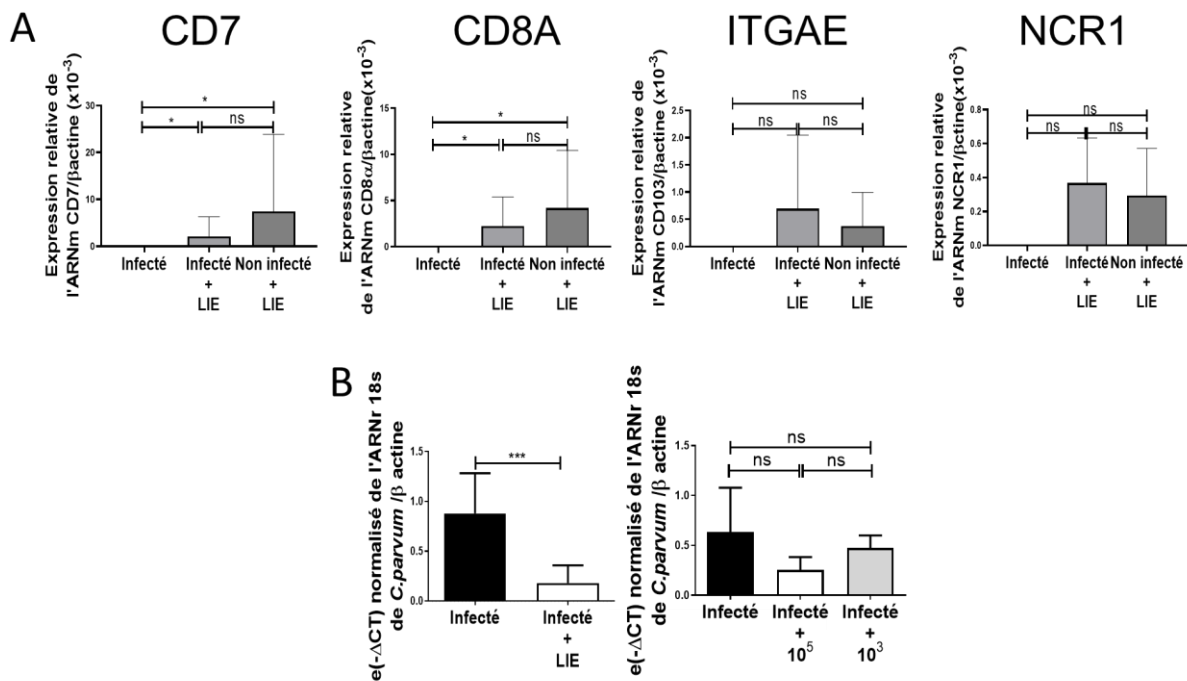
**Figure 18** : Caractérisation et mise en évidence des populations de LIE innés dans les souris RAG2<sup>-/-</sup> et dans les organoïdes infectés avec *C parvum*.

(A) Analyse par cytométrie en flux des LIE innés isolés de souris RAG2<sup>-/-</sup> après marquage avec des anticorps anti-CD3 $\gamma$ , anti-CD8 $\alpha$ , anti-CD45 et anti-NKp46. (B) Représentation en 3D et projection orthogonale d'un organoïde co-cultivé pendant 24h avec des LIE marqués au CellTrace (vert). Image de microscopie confocale (grossissement x25) avec une coloration des noyaux au DAPI (bleu) et de l'actine avec la phalloïdine (rouge). (C) Images de microscopie confocale qui montrent l'infiltration des LIE innés isolés des souris RAG2<sup>-/-</sup> dans les organoïdes infectés ou non par *C parvum* après 24h de co-culture (grossissement x2.5). Les LIE innés apparaissent en jaune, les noyaux en bleu et l'actine en rouge. L'histogramme indique le nombre absolu des LIE innés au contact des organoïdes.

Pour vérifier que les deux principales sous-populations de LIE innés (iCD3 $\gamma$ +CD103+CD8 $\alpha$ +/- et IE-ILC-1 NKp46+) étaient présentes dans les organoïdes, nous avons aussi recherché l'expression des gènes « signatures » (CD3G, ITGAE/CD103, CD8A et NCR1/NKp46) de ces cellules par RT-qPCR dans les organoïdes isolés du matrigel après la co-culture avec les LIE innés. Nous avons aussi utilisé CD7 comme un marqueur de la lignée lymphoïde (Cuneo et al., 1993). Tous les ARNm CD3G, ITGAE, CD8A, NCR1 et CD7 étaient détectables dans les organoïdes co-cultivés avec des LIE innés mais pas dans les organoïdes seuls. L'expression de tous ces ARNm était similaire dans les organoïdes co-cultivés avec les LIE innés, qu'ils aient été infectés ou non (Figure 19A). Ces données montrent donc que les 2 principales sous populations de LIE innés migrent dans les organoïdes en moins de 24h et indépendamment de l'infection.

Pour déterminer le rôle des LIE innés dans l'infection, nous avons ensuite mesuré la charge parasitaire dans les organoïdes infectés. Nous avons observé une diminution significative de la charge parasitaire de 3 fois ( $p=0.0008$ ) dans les organoïdes co-cultivés avec les LIE innés par rapport aux organoïdes seuls (Figure 19B). Cet effet semble diminuer lorsque l'on réduit le nombre de LIE innés dans la co-culture (Figure 19B). Les LIE innés sont donc capables d'empêcher le développement du parasite à l'intérieur de l'organoïde.





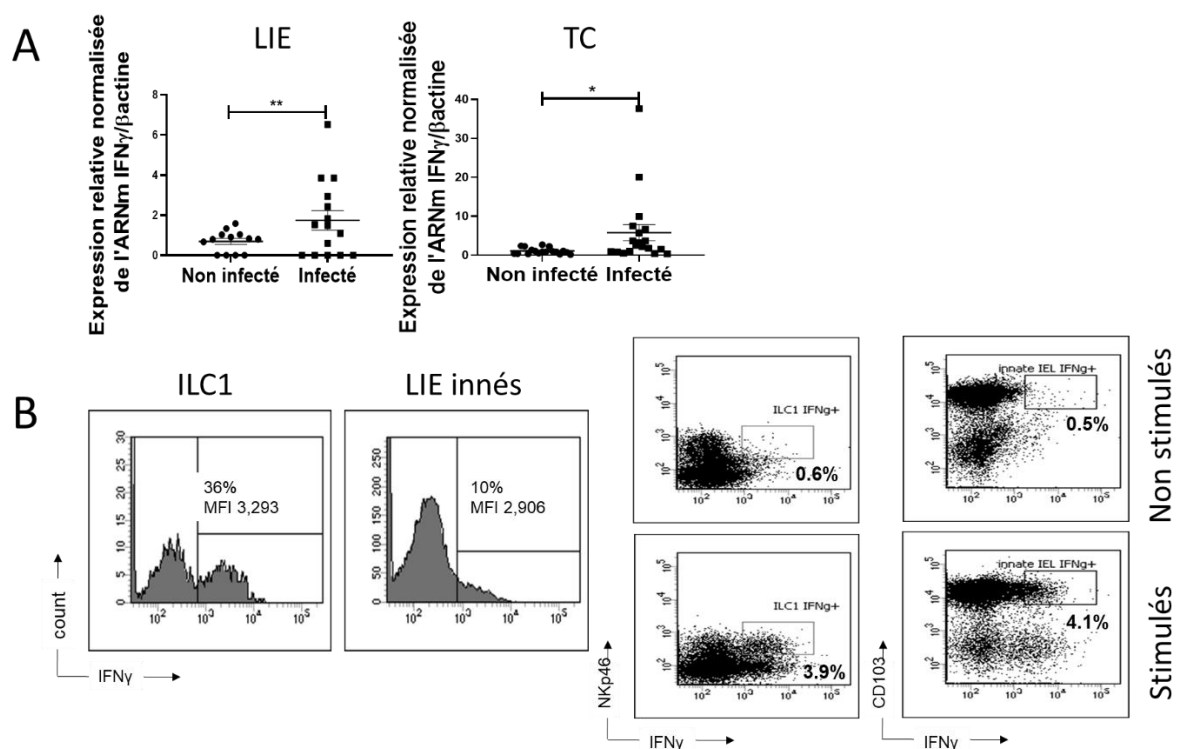
**Figure 19** : Mise en évidence de la présence des LIE innés de souris RAG2<sup>-/-</sup> dans les organoïdes intestinaux et de la diminution de la charge parasitaire par RT-qPCR. (A) Détection de l'expression de gènes exprimés par les LIE innés (CD7, CD8a, ITGAE et NCR1) dans les organoïdes isolés après 24h de co-culture (n=8). (B) Quantification de l'ARNr 18S de *C. parvum* dans les organoïdes infectés ou non et co-cultivés pendant 24h avec 105 LIE innés (n=8) (à gauche). La charge parasitaire a été mesurée en fonction du nombre de LIE innés (105 ou 103) dans la co-culture (n=2) (à droite). Les médianes et les intervalles sont représentés. Test de Wilcoxon matched-pairs signed rank, ns (non significatif), \* (P < 0,05) et \*\*\* (p<0.005).

## IV-3-L'IFN-γ sécrété par les LIE innés n'est pas suffisant pour contrôler l'infection à *C. parvum* *in vitro*

Nous avons ensuite recherché le mécanisme impliqué dans l'effet protecteur des LIE innés. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'IFN-γ car cette cytokine joue un rôle clé dans le contrôle de l'infection à *Cryptosporidium* chez les souris C57BL/6 immunocompétentes (Culshaw et al., 1997; McDonald and Bancroft, 1994) et les souris immunodéficientes RAG2<sup>-/-</sup> (Barakat et al., 2009).

En outre, nos propres expériences *in vivo*, montraient que la quantité d'ARNm d'IFN-γ était significativement augmentée dans les LIE innés isolés ainsi que dans l'intestin grêle total des souris RAG2<sup>-/-</sup> 24h après l'infection par *C. parvum* (Figure 20A). Les deux populations de LIE

innés iCD3y+CD103+CD8α+/- et IE-ILC-1 NKp46+ sont capables de produire de l'IFN-γ (Ettersperger et al., 2016; Fuchs et al., 2013b; Van Kaer et al., 2014) comme le montre l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de cette cytokine par les LIE innés de souris RAG2-/- stimulés *in vitro* avec un cocktail de stimulation (Figure 20B). Parmi les IE-ILC-1, la proportion de cellules qui produisent de l'IFN-γ est plus importante que chez les LIE iCD3y+CD103+CD8α+/- (36% vs 10%) et leur niveau de sécrétion est plus élevé (MFI : 3293 vs 2906) (Figure 20B). Toutefois les LIE iCD3y+CD103+CD8α+/- sont beaucoup plus fréquents dans l'épithélium intestinal que les IE-ILC-1 et ils contribuent donc vraisemblablement autant que les IE-ILC-1 à la production d'IFN-γ.

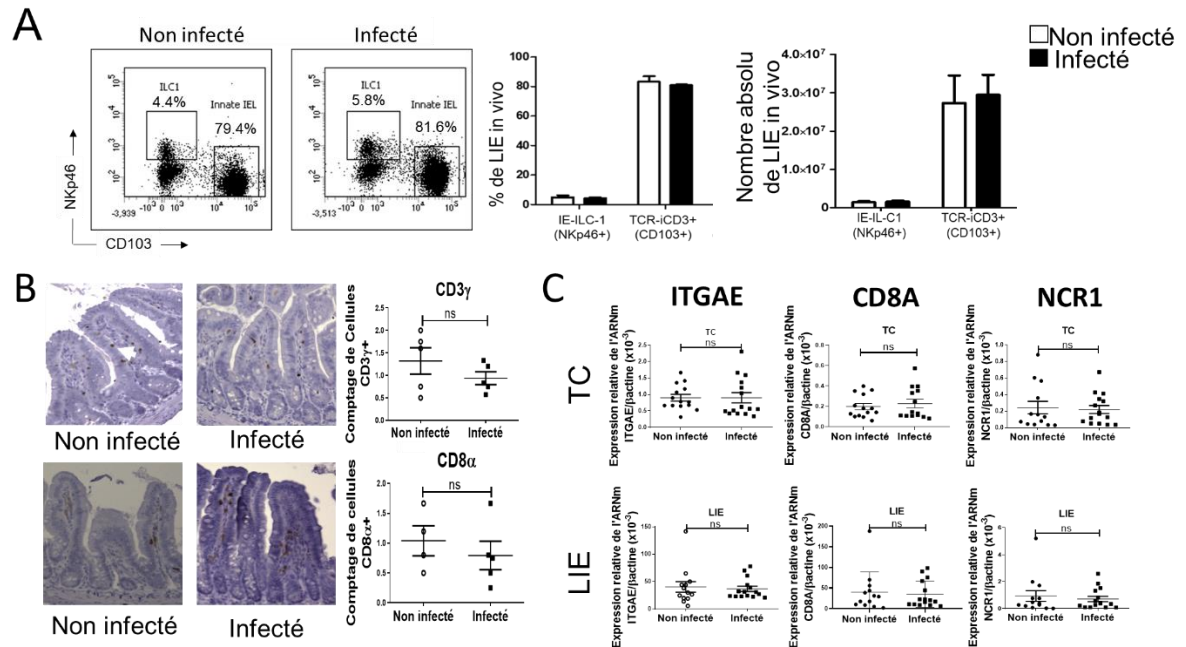


**Figure 20 :** Production d'IFN-γ dans la phase précoce de l'infection.

(A) Quantification par RT-qPCR de l'ARNm de l'IFN-γ dans les LIE innés isolés et dans l'intestin grêle total chez des souris RAG2-/- infectées pendant 24h par *C parvum* (n=15) ou non infectées (n=14). Les résultats ont été regroupés à partir de 3 expériences indépendantes. Les moyennes et les écarts sont représentés. Les significations statistiques sont indiquées (test de Wilcoxon matched-pairs signed rank)\* (P < 0,05) et \*\* (p<0.005). (B) Analyse par cytométrie en flux de la production d'IFN-γ par les différentes sous-populations de LIE innés stimulés ou non avec du PMA ionomycine. TC=tissu complet.

Cependant, aucun changement dans les principaux sous-ensembles de LIE innés présents dans l'épithélium intestinal de souris RAG2-/- n'a été observé 24h après infection (Figure 21A) par cytométrie en flux. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie (Figure 21B) et RT-

qPCR (Figure 21C). De plus, nous n'avons pas pu mesurer la production d'IFN- $\gamma$  de ces cellules *ex vivo* après l'infection. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'origine de l'augmentation d'IFN- $\gamma$  dans l'épithélium des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées.



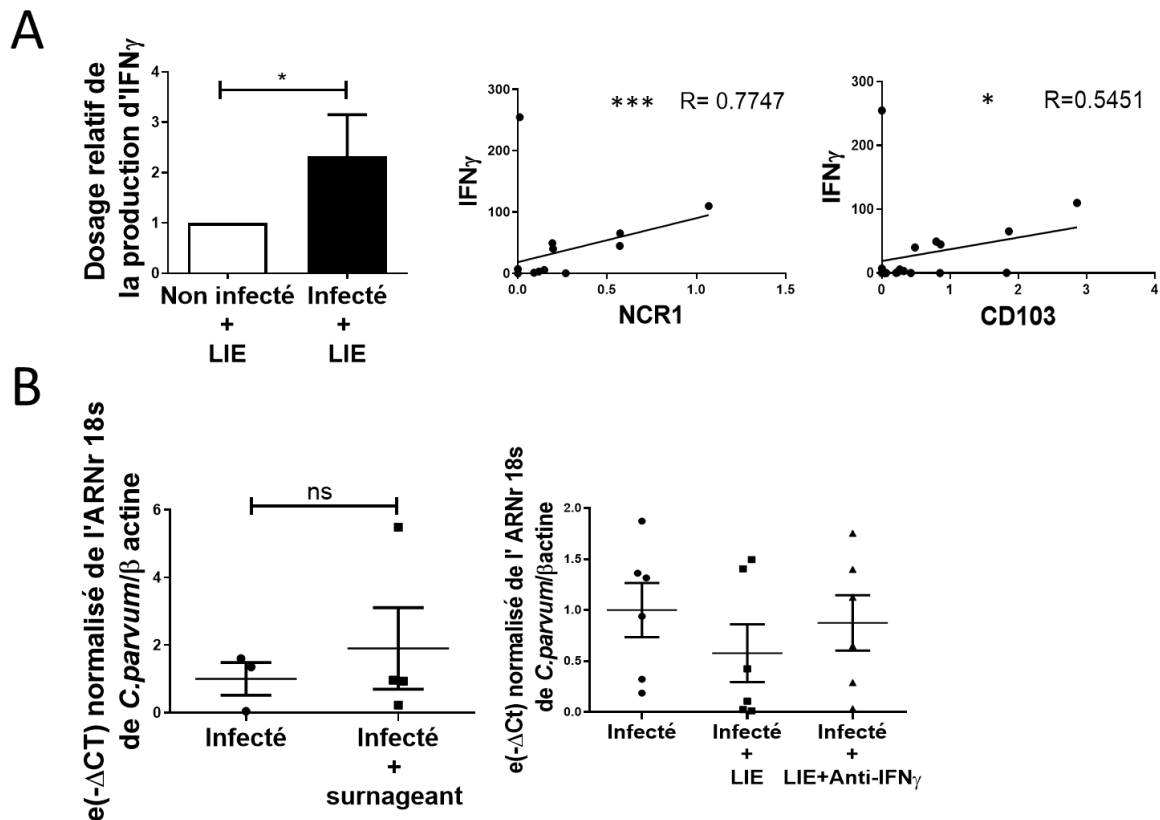
**Figure 21** : Fréquence des sous-populations de LIE innés de souris RAG2<sup>-/-</sup> 24h après l'infection par *C. parvum*. (A) Dot plots représentatifs et histogrammes indiquant les proportions de LIE TCR- $\alpha$ CD3<sup>+</sup> (CD103+NKp46<sup>-</sup>) et des IE-ILC1 (CD103-NKp46<sup>+</sup>) dans l'intestin grêle des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées ou non. (B) Immunohistochimie sur des coupes en paraffine d'iléon de souris RAG2<sup>-/-</sup> 24h après l'infection par *C. parvum*. En haut, marquages représentatifs du CD3 $\gamma$  (marron) et en bas du CD8 $\alpha$  (marron) (grossissement  $\times 20$ ). Histogramme indiquant le nombre moyen de LIE CD3 $\gamma$ <sup>+</sup> ou CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> par villosité (n=5). (C) Quantification des ARNm d'ITGAE, CD8A et NCR1 dans les LIE innés isolés ou dans l'intestin entier de souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées (n=15) ou non (n=14). Les moyennes et les valeurs individuelles sont affichées. Les résultats sont exprimés en unités relatives par rapport à l'ARNm de l'actine (moyenne  $\pm$  écart-type). Test de Wilcoxon matched-pairs signed rank.

Conformément aux résultats des expériences *in vivo*, nous avons aussi trouvé une augmentation significative de 2 fois ( $p=0.0211$ ) de la quantité d'IFN- $\gamma$  (mesurée par ELISA) dans les surnageants des co-cultures infectées comparativement à la condition non infectée (Figure 22A). La quantité d'ARNm d'IFN- $\gamma$  dans la co-culture était corrélée à celles de NCR1 ( $p<0.005$   $R=0.7747$ ) et CD103 ( $p=0.0125$   $R=0.5451$ ), qui témoignent de la présence dans les organoïdes des populations d'IE-ILC-1 et d' $\alpha$ CD3<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>/-, respectivement (Figure 22A).

Dans l'ensemble, ces résultats *in vivo* et *in vitro* montrent que l'IFN- $\gamma$  est sécrété rapidement, 24h après l'infection, par les LIE innés.

Pour déterminer si les LIE innés contrôlent l'infection via la production de l'IFN- $\gamma$ , nous avons ensuite réalisé une première série d'expériences où nous avons récupéré le surnageant des co-cultures de LIE innés RAG2-/- avec les organoïdes infectés, et nous les avons transférés à des cultures d'organoïdes infectés afin de voir si l'IFN- $\gamma$  contenu dans ce milieu était capable de diminuer la charge parasitaire. Les résultats ne montrent aucun effet de ces surnageants sur la charge parasitaire (Figure 22B) et plaident contre un rôle majeur de cette cytokine. Cependant, il est possible que l'IFN- $\gamma$  dans le milieu de culture soit trop dilué pour avoir un effet sur le parasite. En effet, la cytokine ne pourrait être efficace contre le parasite que si elle est libérée à proximité de sa cellule cible où sa quantité doit être ponctuellement plus élevée.

Pour évaluer plus précisément le rôle de l'IFN- $\gamma$  produit par les LIE innés dans le modèle de coculture, nous avons bloqué l'action de cette cytokine avec un anticorps neutralisant anti-IFN- $\gamma$ . Nous avons pu observer que la charge parasitaire était comparable entre les organoïdes infectés co-cultivés avec des LIE innés en présence et en absence d'Ac anti-IFN- $\gamma$  (Figure 22B). De façon surprenante, nos résultats *in vivo* et *in vitro* montrent que bien que l'IFN- $\gamma$  soit produit rapidement par les LIE innés en réponse à l'infection par *C parvum*, ce mécanisme n'explique pas l'effet protecteur rapide de ces cellules.



**Figure 22** : Evaluation du rôle antiparasitaire de l'IFN- $\gamma$  dans le modèle de co-culture.

(A) Dosages ELISA de la quantité d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants des organoïdes infectés ou non par *C parvum* et co-cultivés pendant 24h avec des LIE innés isolés de souris RAG2-/- (à gauche) (n=4). Corrélation entre les niveaux d'expression des gènes codant pour l'IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), NKp46 (NCR1) et CD103 (ITGAE) mesuré par RT-qPCR (à droite) (n=8). (B) A gauche, quantification de l'ARNr 18S de *C parvum* dans des organoïdes infectés traités ou non avec des surnageants provenant de co-cultures d'organoides infectés et de LIE innées (qui contiennent de l'IFN- $\gamma$ ). A droite, la charge parasitaire a été mesurée dans les organoïdes infectés et co-cultivés avec des LIE innés en présence ou non d'un anticorps neutralisant anti-IFN- $\gamma$  (n=2). Test de spearman pour l'étude de corrélation et test de Wilcoxon matched-pairs signed rank pour la quantification de la charge parasitaire. Ns (non significatif), \*(p<0.05) et \*\*\*(p<0.0005).

## IV-4-La cytotoxicité contribue à la protection contre *C parvum* médiée par les LIE innés

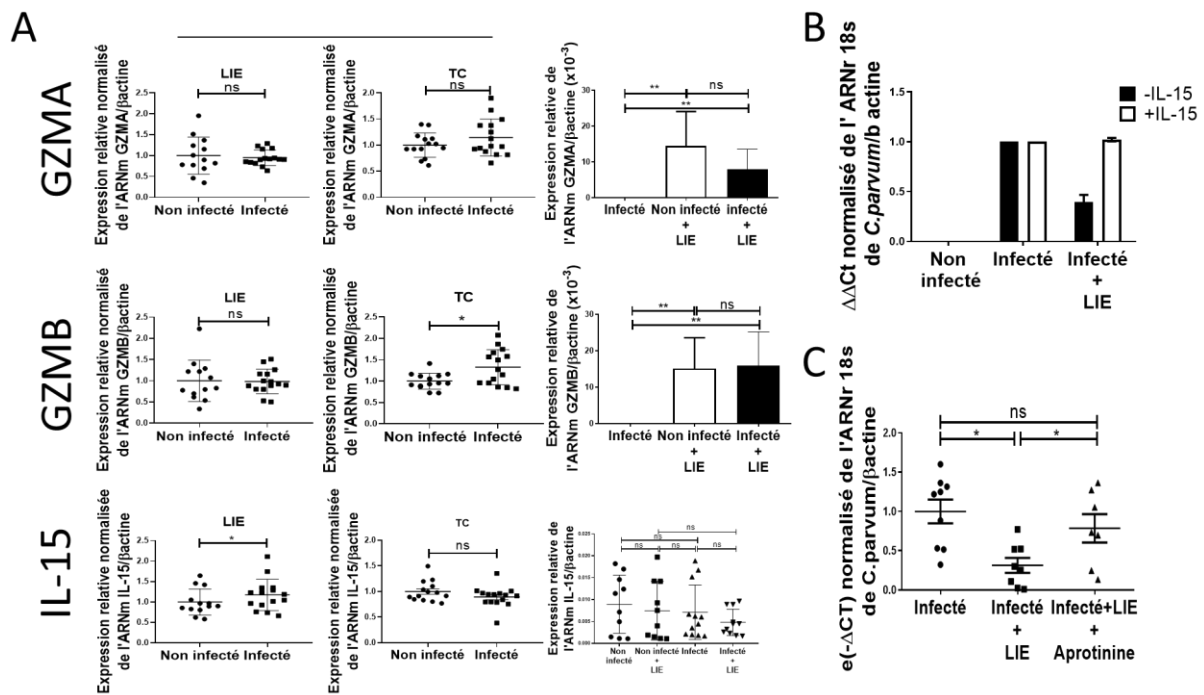
Puisque l'IFN- $\gamma$  ne semble pas avoir d'effet prépondérant dans la protection rapide médiée par les LIE innés, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de cytotoxicité. En effet, les LIE innés, en particulier les LIE iCD3+CD103+CD8a+/- (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014), expriment des granzymes (A et B) et la perforine et ont une activité cytotoxique.

*In vivo*, nous n'avons pas observé de différence d'expression de GZMA (granzyme A) et GZMB (granzyme B) par RT-qPCR dans les LIE isolés des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées par *C parvum* versus les souris non infectées. En revanche, la quantité d'ARNm de GZMB mesurée dans l'intestin total était significativement augmentée dans la condition infectée (Figure 23A). Les quantités d'ARNm de granzyme A (1000 vs 1.5 p=0.9) et de granzyme B (300 vs 2 p=0.8) étaient cependant significativement plus élevées dans l'épithélium par rapport à l'ensemble du tissu intestinal (Figure s1), ce qui témoigne d'un fort enrichissement en cellules cytotoxiques dans ce compartiment. Nous avons également étudié l'expression de l'IL-15, car cette cytokine est connue pour augmenter l'activité cytotoxique des LIE (Meresse et al., 2004) et des cellules NK contre les CE infectées par *Cryptosporidium* (Dann et al., 2005). Nous avons trouvé une augmentation significative de la quantité d'ARNm d'IL-15 dans les LIE isolés des souris RAG2<sup>-/-</sup> mais pas dans l'intestin total des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées (Figure 23A).

Dans notre modèle expérimental de co-culture, les ARNm des granzymes A et B étaient détectables uniquement dans les conditions de co-culture avec les LIE innés ce qui confirme que ces enzymes sont bien produites par les cellules immunitaires et non pas par l'épithélium. Cependant, en accord avec les résultats *in vivo*, aucune différence d'expression des granzymes n'a été observée dans les co-cultures infectées ou non par le parasite (Figure 23A). Les quantités d'ARNm d'IL-15 étaient similaires dans les organoïdes co-cultivés ou non avec les LIE innés, ce qui confirme que la cytokine n'est pas produite par les LIE mais plutôt par les CE (Fehniger and Caligiuri, 2001). Contrairement à la situation *in vivo*, l'infection n'augmentait pas l'expression de l'IL-15 dans les organoïdes (Figure 23A). Toutefois, la régulation de l'expression de l'IL-15 est complexe et n'est pas toujours corrélée à la quantité d'ARNm (Fehniger and Caligiuri, 2001), nous avons donc testé son effet sur l'infection en ajoutant de l'IL-15 recombinante dans la co-culture. Nos résultats montrent que la diminution de la charge parasitaire médiée par les LIE innés n'est pas accentuée en présence d'IL-15 (Figure 23B).

Pour évaluer plus directement le rôle de la cytotoxicité dans le mécanisme de protection médié par les LIE innés, nous avons ensuite utilisé l'aprotinine pour inhiber l'effet toxique des granzymes (Costain et al., 2001; Nakajima and Henkart). Les résultats montrent que la charge parasitaire est significativement diminuée dans les co-cultures de LIE innés avec des organoïdes infectés comparativement aux charges parasitaires mesurées dans les organoïdes infectés seuls et dans les co-cultures de LIE innés avec des organoïdes infectés en présence

d'aprotinine (Figure 23C). Ces résultats suggèrent que les LIE innés contrôlent l'infection par un mécanisme de cytotoxicité.

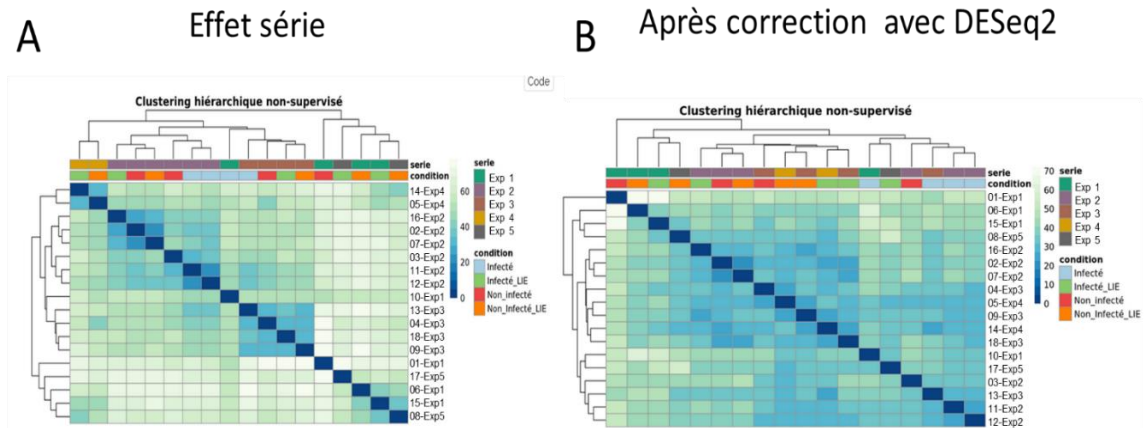


**Figure 23** : Etude du rôle de la cytotoxicité dans la protection contre *C parvum* médiée par les LIE innés. (A) Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour les granzymes A (GZMA) et B (GZMB) et l'IL-15 (IL-15) dans les LIE innés isolés des intestins grêle de souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées (n=15) ou non (n=14) (partie de droite) et dans les organoïdes infectés ou non co-cultivés avec des LIE innés (n=6) (partie de gauche). Quantification de l'ARNr 18S de *C parvum* dans les organoïdes infectés ou non par *C parvum* et co-cultivés ou non avec des LIE innés en présence ou non d'IL-15 (B) ou d'aprotinine (inhibiteur de granzymes) (C). Les résultats sont exprimés en unités relatives (moyennes  $\pm$  écart-type), et les statistiques ont été réalisées avec un test de Wilcoxon matched-pairs signed rank. ns, non significatif, \*( $p < 0.05$ ) et \*\*(<math>p < 0.005) TC=tissu complet.

## IV-5-Etude transcriptomique par séquençage de la partie 3' des ARNm

En plus de cette étude ciblant les 2 principaux mécanismes de défense utilisés par les LIE innés, nous avons réalisé une analyse globale du transcriptome des co-cultures par séquençage de la partie 3' des ARNm. Les buts de cette approche sans a priori étaient de nous mettre sur la piste de mécanismes originaux et/ou de renseigner sur l'implication des voies étudiées (IFN- $\gamma$  et cytotoxicité). Nous avons analysé les transcriptomes dans les 4 conditions : 1) organoïdes infectés + LIE innés (n=5) 2) organoïdes infectés seuls (n=4) 3) organoïdes + LIE innés (n=5) 4) organoïdes seuls (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par la plateforme de

génomique fonctionnelle et structurale. Une classification hiérarchique non-supervisée a d'abord mis en évidence une grande diversité entre les échantillons provenant des différentes expériences (Figure 24A) qui a ensuite été corrigée grâce à un algorithme adapté du programme DESeq2 (Figure 24B).



**Figure 24 :** Comparaisons des transcriptomes des co-cultures par séquençage de la partie 3' des ARNm. (A) Classification hiérarchique non supervisée pour les conditions expérimentales : 1- organoïdes seuls (non-infecté) (n=4), 2 – organoïdes infectés (infectés) (n=4), 3 – co-culture organoïdes avec LIE innés (non\_infecté\_LIE) (n=5), 4 - co-culture organoïdes infectés avec LIE innés (infecté\_LIE) (n=) sans (A) ou avec la correction de « l'effet série » par l'algorithme de DESeq2 (B).

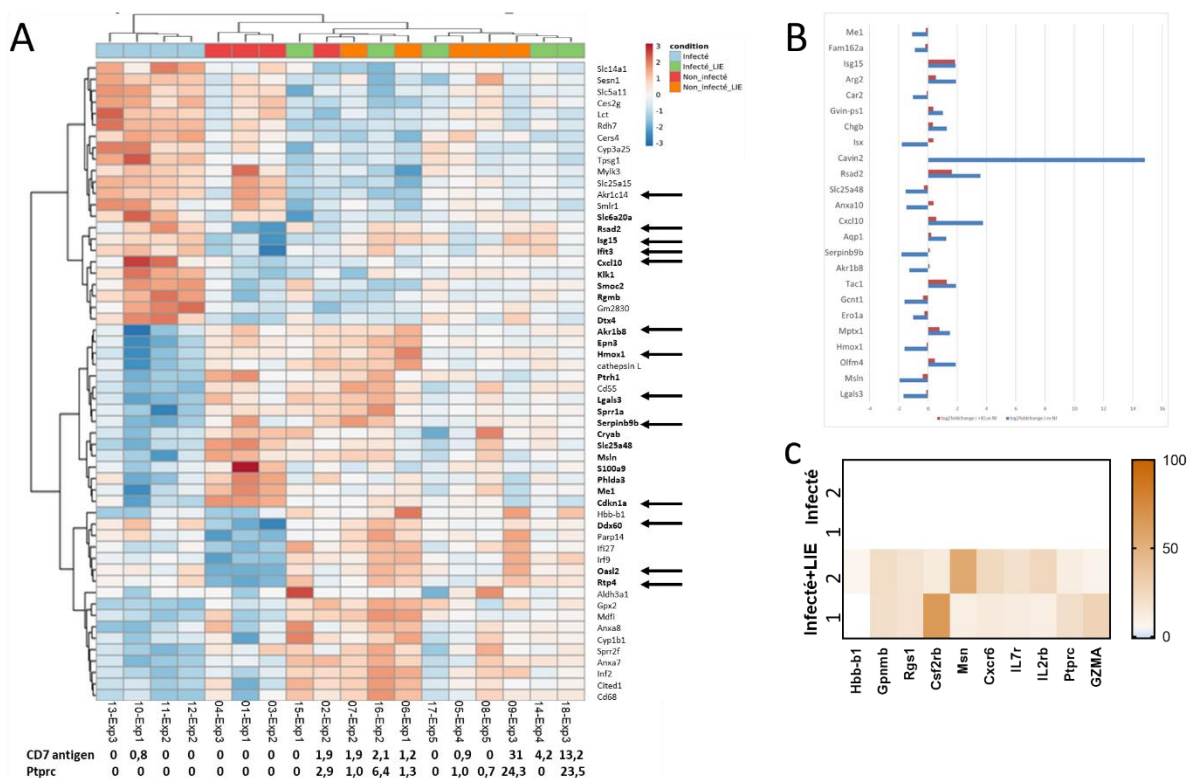
Après correction la classification hiérarchique non-supervisée montre une répartition en 2 groupes, le premier comprenant les échantillons infectés et le second toutes les autres conditions. Au sein de ce deuxième groupe, la majorité des échantillons organoïdes non infectés et organoïdes non infectés avec les LIE innés se regroupe en 2 sous-clusters dans lesquels se répartissent les échantillons organoïdes non infectés co-cultivés avec les LIE innés (Figure 25A). Cette première analyse indique que le transcriptome des LIE innés co-cultivés avec les organoïdes infectés est plus proche de celui des organoïdes seuls non infectés que des infectés. Ce résultat est en accord avec la baisse de la charge parasitaire observée dans cette condition expérimentale. Une différence d'expression significative ( $p$ -valeur ajustée  $< 0,1$ ,  $FC > 1,5$ ) a été observée pour 27 gènes entre les conditions organoïdes seuls infectés ou non (Figure 25A-Tableau s1). Ce groupe de gènes est principalement enrichi en gènes impliqués dans la réponse immunitaire effectrice (GO 0002252, 0051607, 0009615, 0002684, 00197487) (Tableau s2 annexe). Notamment, l'expression de la chimiokine CXCL10 impliquée dans le recrutement des monocytes/macrophages, des LT, des NK et des DC était augmentée avec l'infection alors que celle de la Serpinb9b qui inhibe l'action des endopeptidases, dont



celle des granzymes (Kaiserman and Bird, 2010) était diminuée. Pour tenter d'identifier les gènes des LIE innés modulés par l'infection, nous avons comparé les transcriptomes des co-cultures de LIE innés en présence d'organoïdes infectés ou non. Dans ces conditions aucune différence significative n'a été observée. Ce résultat, en accord avec la classification hiérarchique non-supervisée, confirme que le transcriptome de la condition LIE innés co-cultivés avec des organoïdes infectés est très proche de la condition non infectée. L'analyse n'a donc pas réussi à mettre en évidence le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans l'effet anti-parasitaire des LIE innés. Compte-tenu du petit nombre de LIE innés qui infiltrent les organoïdes dans la co-culture (voir ci-dessus), et du fait que la méthode de séquençage est moins performante que la RT-qPCR pour évaluer l'expression des gènes il était possible que l'échec de cette approche soit attribuable à un problème de sensibilité. Pour tester cette possibilité nous avons donc recherché dans la liste des ARNm détectés au séquençage ceux qui témoignaient de la présence des LIE innés dans l'échantillon (CD8A, NCR1, ITGAE, CD7, ptpcr/CD45). Alors qu'ils étaient détectables par RT-qPCR, les ARNm de CD8A, NCR1, ITGAE n'ont été séquencés dans aucun des prélèvements (données non montrées). Un petit nombre de séquences codantes pour le CD7 et le CD45 étaient détectables dans une partie des échantillons contenant des LIE (expériences 2 et 3) (Figure 25A). Ceci montre que le transcriptome des LIE innés est « noyé » dans celui des CE et est donc difficile à étudier par cette approche. Nous avons tenté « d'optimiser » l'analyse transcriptomique en analysant uniquement les échantillons des expériences 2 et 3 de façon appariée pour s'affranchir de l'effet « expérience ». Malgré le petit nombre d'échantillon analysé, des différences d'expression ont été trouvées pour 24 gènes en comparant les transcriptomes des organoïdes infectés ou non (Figure 25B). Neuf d'entre eux, y compris les gènes CXCL10 et Serpinb9b, étaient significativement différents dans la première analyse. Toutefois, comme dans la première étude, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les co-cultures de LIE innés avec les organoïdes infectés ou non. De même, l'expression des 24 gènes dérégulés par l'infection dans les organoïdes seuls se normalisait en présence de LIE innés (Figure 25B). Enfin, pour mieux définir la signature génétique des LIE innés infiltrés dans les organoïdes nous avons recherché tous les gènes qui, comme CD7 et ptpcr, sont absents dans les conditions organoïdes seuls et présents dans les cocultures (Figure 25C). La liste des gènes trouvés inclut des gènes qui d'après l'analyse transcriptomique de Van Kaer (Van Kaer et al., 2014) sont exprimés par les LIE d'iCD3 $\gamma$ +CD103+CD8a+/- (GZMA, Il2rb, Cxcr6, Rgs1), les IE ILC-1 (Il7r, Il2rb,

Cxcr6) et les DC (Hbb-bs, Csf2rb, Msn). Ces résultats doivent bien sûr être considérés avec beaucoup de prudence. Toutefois, ils tendent à confirmer nos résultats en RT-qPCR montrant un recrutement non spécifique des différentes sous populations de LIE innés dans les organoïdes (Figure 19A) y compris de LIE innés GzmA+ cytotoxiques.

En résumé, l'ensemble de nos résultats montrent pour la première fois que les LIE innés participent à la réponse immune protectrice contre *C parvum* via un mécanisme de cytotoxicité. Ils mettent aussi en avant les difficultés, les avantages et les limites expérimentales du modèle de co-culture avec les organoïdes intestinaux.



**Figure 25 :** Analyse transcriptomique

(A) Heatmap représentant les gènes différemment exprimés entre les différentes conditions (infecté, infecté+LIE, non infecté et non infecté +LIE). Les 27 gènes dont l'expression est significativement différente entre les conditions organoïdes infectés versus organoïdes non infectés sont indiqués en gras. Les flèches indiquent les gènes impliqués dans la réponse immunitaire (GO 0002252, 0051607, 0009615, 0002684, 00197487). (B) Analyse comparative des transcriptomes après élimination des échantillons des co-cultures dans lesquels les gènes « signatures » de la présence de LIE CD7 et Ptprc n'étaient pas détectables. L'histogramme indique les quantités de transcrits différemment exprimés dans les organoïdes infectés ou non et les organoïdes infectés co-cultivés avec des LIE innés. Les résultats sont exprimés sous la forme  $\log_2(i+IELvs NI)$  (histogramme rouge) et  $\log_2(ivs NI)$  (Histogramme bleus). I=infecté, NI=non infecté et i+IELs=infecté+LIE). (C) Heat map représentant les gènes qui sont détectés dans les conditions de coculture avec les LIE et absents dans les conditions « organoïdes seuls ».

# Discussion

## V-Discussion

Les LIE se localisent à l'interface entre l'hôte et l'environnement et de ce fait ils occupent une position stratégique dans l'organisme. Avec les CE, ils constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. On leur attribue souvent le rôle de « cellules sentinelles » car elles patrouillent dans l'épithélium et participent à la surveillance, à la défense et au maintien/réparation de cette barrière. Bien que la population de LIE soit constituée en majorité de cellules d'origine lymphoïde, elle est très hétérogène et peut être divisée en 3 grandes sous populations : les LIEC, les LIENC et les LIE innés en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et de leur ontogénèse. A la naissance les LIE innés et les LIENC sont majoritaires puis sont progressivement remplacés par des LT mémoires (LIEC) éduqués par un environnement antigénique qui s'enrichit avec l'âge (Cheroutre et al., 2011). Les LIE innés sont aussi plus nombreux chez les individus immunodéficients (Ettersperger et al., 2016). L'ensemble de ces observations fait penser que les LIE innés compensent l'immaturité et/ou l'absence de LIEC. Cependant, si le rôle protecteur, anti-infectieux des LIEC est très bien documenté celui des LIE innés reste à démontrer.

*Pourquoi les LIE innés ?* La caractérisation des LIE innés est récente, ce qui explique qu'il n'y ait que peu d'informations sur leurs fonctions. De ce fait, on a tendance à attribuer aux LIE innés, les fonctions d'autres cellules similaires mieux décrites dans le compartiment systémique, comme les cellules NK. Les LIE innés, et en particulier les LIE TCR-iCD3+, ont pourtant des caractéristiques et une origine singulière qui influencent certainement leurs fonctions. En montrant que les LIE innés empêchent la prolifération de *Cryptosporidium*, mon travail de thèse contribue à démontrer le rôle protecteur de ces cellules.

*Pourquoi Cryptosporidium ?* Outre les aspects sanitaires et économiques (infection des animaux d'élevage), nous avons choisi d'étudier le rôle des LIE innés dans la cryptosporidiose à cause du tropisme du parasite. En effet, *Cryptosporidium* est un parasite intestinal qui infecte et réalise tout son cycle de réplication au contact des CE. Les LIE sont donc les cellules immunitaires les plus proches du parasite et des CE infectées. Plusieurs études ont d'ailleurs mis en évidence le rôle protecteur des T-LIEC CD4+ spécifiques du parasite (Culshaw et al., 1997). Toutefois, chez le nouveau-né et les individus immunodéficients et dans la phase précoce de l'infection (en cas de première infection) ces LT CD4+ n'ont pas ou peu d'effet

(Korbel et al., 2011); nous avons donc voulu déterminer si les LIE innés pouvaient assurer la défense de l'organisme dans ces situations particulières. Nous nous sommes aussi interrogés sur les capacités des LIE innés à reconnaître et à éliminer le parasite car cette population est majoritaire chez l'enfant et les personnes immunodéficientes qui sont pourtant les individus qui risquent le plus de développer une cryptosporidiose sévère (Ettersperger et al., 2016).

*Comment ? Avantages et limites du modèle organoïde.* Il existe de nombreux modèles expérimentaux pour étudier la réponse immunitaire contre *Cryptosporidium* (voir chapitre modèles d'études de l'infection par *Cryptosporidium*). Toutefois aucun d'entre eux ne permet d'étudier spécifiquement le rôle des différentes sous populations de LIE innés à l'exception des systèmes *in vitro* de co-cultures. Nous avons donc décidé de développer un modèle expérimental original en co-cultivant les LIE innés avec des organoïdes intestinaux plutôt qu'avec des lignées tumorales de CE (Caco2, HT29, Hct8...) pour reproduire au mieux le contexte physiologique. En effet, outre le fait que les organoïdes proviennent de cellules souches non transformées, ils conservent des profils transcriptionnels et épigénétiques spécifiques de l'espèce et des tissus dont ils proviennent (Intestin grêle, côlon, embryon, tissu inflammatoires) (Blutt et al., 2018; Zachos et al., 2016). Nos résultats montrent que *C parvum* est capable de se développer à l'intérieur des organoïdes intestinaux murins (Figure 17C) et confirment (valident) ainsi le modèle décrit par le groupe de Hans Clevers réalisé chez l'humain (Heo et al., 2018b). Nous confirmons également que l'infection induit une modification du transcriptome des organoïdes toutefois en comparant nos résultats (analyses 1 et 2) avec ceux de Heo et al, nous n'avons pas trouvé de gène en commun. Ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation d'organoïdes d'espèces différentes. Quoiqu'il en soit nous avons constaté un enrichissement de gènes impliqués dans la défense contre les pathogènes.

A l'instar de Nozaki et al (Nozaki et al., 2016), nous avons co-cultivé les organoïdes intestinaux murins avec des T-LIE de souris WT C57BL/6. Le protocole que nous utilisons est toutefois différent de celui qui a été développé par cette équipe. La principale différence entre les deux protocoles concerne la façon d'ajouter les LIE dans la co-culture. Dans notre protocole, les LIE sont déposés à l'extérieur de la matrice de matrigel et viennent d'eux même coloniser les organoïdes alors qu'avec la méthode de Nozaki et al, les organoïdes extraits du matrigel sont ajoutés aux LIE puis l'ensemble est réintégré dans le matrigel. Nous avons fait ce choix car nous avons constaté une forte mortalité des organoïdes avec le protocole de Nozaki et al., en particulier lorsqu'ils étaient infectés par *C parvum*. Notre méthode est donc moins «

stressante » pour les organoïdes. En revanche, nous maîtrisons moins bien le nombre de LIE au contact des CE. Nous avons cependant prouvé par plusieurs techniques différentes (Imagerie confocale, IHC, RT-qPCR) que les T-LIE et les LIE innés migrent à travers le matrigel et colonisent les organoïdes qu'ils soient infectés ou non (Figure 18B). De plus, nous avons également retrouvé par RT-qPCR la signature génétique des différentes sous populations de LIE innées dans les organoïdes en co-culture ce qui montre que cette migration n'est pas sélective (Figure 19A). Néanmoins, avec cette technique le nombre de LIE qui atteint les organoïdes est relativement faible (en moyenne 70 LIE innés / organoïde). Ce nombre de LIE était suffisant pour affecter le développement du parasite mais insuffisant pour l'exploration des mécanismes médiés par les LIE avec une approche globale de séquençage de la partie 3' des ARNm. Pour perfectionner notre modèle, nous envisageons d'augmenter le nombre de LIE dans la co-culture (actuellement  $10^5$  cellules) et de tester d'autres matrices que le matrigel.

*Les LIE innés (et les T LIE naïfs) empêchent le développement de C parvum dans les organoïdes intestinaux murins-* Nous avons montré, grâce au modèle de co-culture, que les LIE innés isolés de souris RAG2<sup>-/-</sup> adultes diminuent la charge parasitaire dans les organoïdes infectés par *C parvum* (Figure 20B). Les LIE innés ont donc un rôle protecteur dans la cryptosporidiose.

Ce résultat semble paradoxal compte-tenu du fait que cette population est majoritaire dans l'épithélium intestinal des individus qui sont le plus à risque de développer des cryptosporidioses sévères (nouveau-nés et personnes greffées et/ou immunodéficientes). Toutefois, ce résultat ne semble pas si aberrant au regard des données chez la souris. En effet, il est clairement démontré chez la souris que le système immunitaire adaptatif (en particulier les LT CD4<sup>+</sup>) est essentiel pour neutraliser et éliminer le parasite et que, comme chez l'homme, les animaux chez qui ce système est altéré (SCID, Rag<sup>-/-</sup>...) ou immature (WT nouveau-né) sont plus sensibles à l'infection (McDonald and Bancroft, 1994; McDonald et al., 1992). Cependant, il est aussi bien établi que chez les souris immunodéficientes des mécanismes innés contribuent aussi à limiter la diffusion du parasite. Ainsi les souris immunodéficientes RAG2<sup>-/-</sup> sont plus résistantes à l'infection que les souris RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> qui n'ont pas d'ILC (cellules NK comprises) (Barakat et al., 2009) ni de LIE innés TCR- $\alpha$ CD3<sup>+</sup> (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014).

*Quelle sous population de LIE innés protège contre l'infection par C parvum ?* – La population de LIE innés que nous avons utilisée pour démontrer l'effet protecteur contre *C parvum* est

hétérogène. Elle est majoritairement constituée de LIE TCR-iCD3+CD8 $\alpha$ +/- et de IE-ILC-1 NKp46+, nettement moins nombreux (Figure 19A). De plus, comme discuté ci-dessus toutes ces populations sont détectables dans les organoïdes intestinaux infectés par *C parvum*. Nos travaux ne permettent donc pas encore de déterminer quelle sous population protège contre le parasite. Pour résoudre cette question nous avons prévu de refaire des expériences de co-culture avec des cellules innées RAG2-/- triées par cytométrie en flux. L'étude du mécanisme impliqué semble toutefois nous orienter sur un rôle prépondérant des LIE innés TCR-iCD3+ cytotoxiques (discuté ci-dessous).

Quel(s) mécanisme(s) est(sont) impliqué(s) dans l'effet protecteur des LIE innés ? – Les deux principaux mécanismes d'action des LIE innés impliquent la production d'IFN- $\gamma$ , principalement par les IE-ILC-1 (Fuchs et al., 2013) et la cytotoxicité médiée par les LIE TCR-iCD3+ (Ettersperger et al., 2016). Nous nous sommes d'abord intéressés au rôle de l'IFN- $\gamma$  car plusieurs études ont mis en évidence un effet protecteur de cette cytokine chez les animaux immunodéficients (Barakat et al., 2009; Hayward et al., 2000) et le nouveau-né (Lacroix et al., 2001). Nos résultats *in vivo*, chez les souris adultes RAG2-/- infectées par *C parvum* pendant 24h, montrent une augmentation significative de l'ARNm de l'IFN- $\gamma$  dans l'intestin total et dans les LIE innés isolés (Figure 19B). Cette observation indique que les LIE innés sont activés rapidement après l'infection et qu'ils participent à la production d'IFN- $\gamma$ . Nous avons également confirmé ce résultat *in vitro* par ELISA en montrant une augmentation d'IFN $\gamma$  dans les surnageants des co-cultures de LIE innés avec les organoïdes infectés (Figure 22A). Néanmoins, le transfert du surnageant contenant l'IFN- $\gamma$  à des organoïdes infectés n'était pas suffisant pour diminuer la charge parasitaire. De plus, l'ajout d'un Ac neutralisant anti-IFN- $\gamma$  dans le milieu de culture n'inhibait pas l'effet antiparasitaire des LIE innés (Figure 22B). L'ensemble de ces données montre donc que les LIE innés sécrètent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'infection par *C parvum* mais cette production de cytokine n'explique pas l'effet protecteur rapide de ces cellules que l'on observe dans notre modèle *in vitro*. Toutefois, ces résultats n'excluent pas la possibilité que l'IFN- $\gamma$  produit par les LIE innés a un effet protecteur à plus long terme *in vivo*.

Nos données confirment aussi que parmi les LIE innés, les IE-ILC-1 NKp46+ sont celles qui produisent le plus d'IFN- $\gamma$  (Fuchs et al., 2013). Néanmoins, les LIE TCR-iCD3+, produisent aussi cette cytokine et compte-tenu de leur nombre bien plus élevé que celui des IE-ILC-1 (environ 10 fois), leur contribution à la production d'IFN- $\gamma$  n'est certainement pas négligeable (Figure

20B). Ces deux populations pourraient donc assurer ensemble la production d'IFN- $\gamma$  dans l'épithélium. Cette redondance pourrait expliquer qu'*in vivo* la déplétion des cellules NKp46+ (NK et IE-ILC-1) chez des souris nouveau-nés NKp46-DTR affecte peu la quantité d'IFN- $\gamma$  produite dans l'intestin des animaux infectés par *C parvum* et n'augmente pas la sensibilité au parasite (Lantier et al., 2013). A l'inverse la production d'IFN- $\gamma$  par les IE-ILC-1 (ou d'autres types cellulaires), chez les souris nouveaux-nés IL-15-/- qui n'ont pas de cellules NK ni de LIE TCR-iCD3+ (Ettersperger et al., 2016) pourrait protéger contre l'infection par *C parvum* (Lantier et al., 2013). L'hypothèse d'un possible mécanisme compensatoire entre ces 2 populations de LIE inné est aussi étayée par l'étude de Korb et al qui montre que la déplétion des cellules NK1.1 qui comprend les cellules NK, NKT mais aussi les LIE-ILC-1 (Fuchs et al., 2013) et les LIE TCR-iCD3+ (Ettersperger et al., 2016; Van Kaer et al., 2014) par un traitement avec un Ac déplétant rend cette fois les souris nouveau-nées plus sensibles à l'infection (Korb et al., 2011). Quoiqu'il en soit l'ensemble de ces travaux illustre bien la complexité des modèles expérimentaux *in vivo*.

Puisque la synthèse d'IFN- $\gamma$  n'expliquait pas l'effet protecteur des LIE innés observé dans notre système de co-culture, nous avons étudié le rôle des mécanismes de cytotoxicité. Il est en effet bien établi que les LIE innés, notamment la sous population TCR-iCD3+, contiennent des granzymes A et B et de la perforine et peuvent avoir une activité cytotoxique contre les CE (Ettersperger et al., 2016; Hüb et al., 2004; Van Kaer et al., 2014). Conformément à ces travaux, nos données *in vivo*, montrent que les LIE innés isolés de souris RAG2-/- expriment fortement les granzymes A et B. En outre, nos résultats montrent aussi une augmentation significative de l'expression de granzyme B dans l'intestin grêle de souris RAG2-/- 24h après infection (Figure 23A), ce qui tend à confirmer les observations d'autres études chez les souris WT et SCID (Korb et al., 2011) et chez l'agneaux (Olsen et al., 2015). Toutefois, à l'exception des travaux de Dann et al. qui montrent que les cellules NK humaines activées par l'IL-15 lysent les cellules épithéliales HCT-8 infectées par *C parvum* (Dann et al., 2005), il n'existe pas à notre connaissance de preuve directe démontrant l'effet protecteur des mécanismes de cytotoxicité médiés par les granzymes dans l'infection par *Cryptosporidium*.

Pour évaluer leur rôle dans notre modèle, nous avons d'abord tenté de stimuler la cytotoxicité des LIE innés en ajoutant de l'IL-15 dans le milieu de culture car il a été montré que l'IL-15 augmente la synthèse des granzymes dans les T LIE et les LIE innés et qu'elle stimule leur cytotoxicité (Hüb et al., 2004; Meresse et al., 2004). Nous avons en outre observé une



augmentation précoce (24h après infection) de la quantité d'ARNm d'IL-15 dans l'épithélium intestinal des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectées par *C parvum* (Figure 23A). Ces expériences n'ont cependant pas mis en évidence d'effet significative de l'IL-15 sur la charge parasitaire ce qui suggère que la cytokine n'intervient pas dans le mécanisme de protection des LIE innés contre *C parvum*. Toutefois, il est encore possible que la quantité d'IL-15 endogène, produite par les CE, soit déjà optimale et que par conséquent l'ajout d'IL-15 recombinante n'est aucun d'effet. Pour pouvoir confirmer ou infirmer le rôle de l'IL-15, il faudrait donc étudier l'effet de l'IL-15 produites par les CE en utilisant des Ac neutralisant la cytokine ou son récepteur ou en utilisant des organoïdes intestinaux de souris IL-15<sup>-/-</sup>.

Nous avons ensuite testé l'implication des granzymes dans notre système en ajoutant dans la co-culture de l'aprotinine, une molécule qui inhibe l'activité des granzymes A et B (Costain et al., 2001; Nakajima and Henkart). Le traitement avec l'aprotinine inhibe presque totalement l'effet protecteur des LIE innés contre *C parvum* (Figure 23C), ce qui indique que la cytotoxicité contribue largement à l'élimination du parasite dans les organoïdes. Néanmoins, il sera nécessaire de confirmer ce résultat en ciblant plus spécifiquement le mécanisme de cytotoxicité car l'aprotinine inhibe de nombreuses sérines protéases et peut donc aussi agir sur d'autres enzymes que les granzymes A et B. Nous envisageons donc d'utiliser des LIE innés isolés de souris déficientes pour la production de perforine (perforin<sup>-/-</sup>) et/ou pour la libération des granules de sécrétion (souris beige) (Roder, 1979) pour confirmer ce résultat important. En revanche, nous ne pourrions pas utiliser les LIE innés des souris déficientes pour les granzymes A et B car elles sont dépourvues de LIE TCR- $\alpha$ CD3<sup>+</sup> (Ettersperger et al., 2016).

Enfin, l'analyse transcriptomique a mis en évidence une diminution significative de l'expression de la Serpinb9b dans les organoïdes infectés par *C parvum* (Figure 25) et une diminution marquée mais non significative de la serpinb9 (donnée non montrée). Les deux gènes présentent environ 80% d'homologie. Ce résultat est particulièrement intéressant car la serpinb9b et la serpinb9 sont des inhibiteurs endogènes naturels des sérines protéases et notamment des granzymes. La serpinb9b agirait plus spécifiquement sur la granzyme M alors que la serpinb9 inhibe la granzyme B (Bots et al., 2005). Ces serpines protègent les cellules cytotoxiques des effets néfastes des granzymes qu'elles expriment (Bots et al., 2005; Hirst et al., 2003) et elles augmentent la résistance des cellules cibles à « l'attaque » des granzymes sécrétées par les lymphocytes cytotoxiques (Bots et al., 2005; Jiang et al., 2020). Une étude par Bots et al montre notamment que l'inhibition de l'expression des serpinb9b (SPI-CI) et b9

(SPI-6) dans une lignée de CE intestinale de souris (CMT-93) avec des ARN interférents, rend ces cellules plus sensibles à la cytolysse par les cellules NK et les LT cytotoxiques (Bots et al., 2005). On peut donc supposer que les CE infectées par *C. parvum* sont plus sensibles à la réponse cytotoxique des LIE innés car elles diminuent l'expression de serpinb9. De la même manière que la CE infectée par *Cryptosporidium* cherche à se suicider en activant des mécanismes pro-apoptotiques (Castellanos-Gonzalez et al., 2008), il est tentant d'imaginer qu'au cours de l'infection la CE se rend plus sensible aux mécanismes de défenses cytotoxiques médiés par les LIE innés. Les perspectives à court terme de ce travail sont donc I) de confirmer la diminution de l'expression des serpinines b9b et b9 *in vitro* et *in vivo* par d'autres méthodes (RT-qPCR, Western blot) et II) d'évaluer l'impact sur la charge parasitaire de la diminution de ces serpinines dans les CE. Cet aspect pourra être étudié *in vitro* grâce au modèle expérimental que nous avons développé. Les organoïdes (cellules souches) seront transfectés avec un vecteur d'expression codant pour la Serpinb9b et/ou b9 afin de limiter la diminution de son expression lors de l'infection. Si notre hypothèse est exacte le maintien de l'expression des Serpinb9b et b9 devrait rendre les CE infectées plus résistantes aux granzymes et devrait donc empêcher la diminution de la charge parasitaire induite les LIE innés cytotoxiques.

## VI-Perspectives

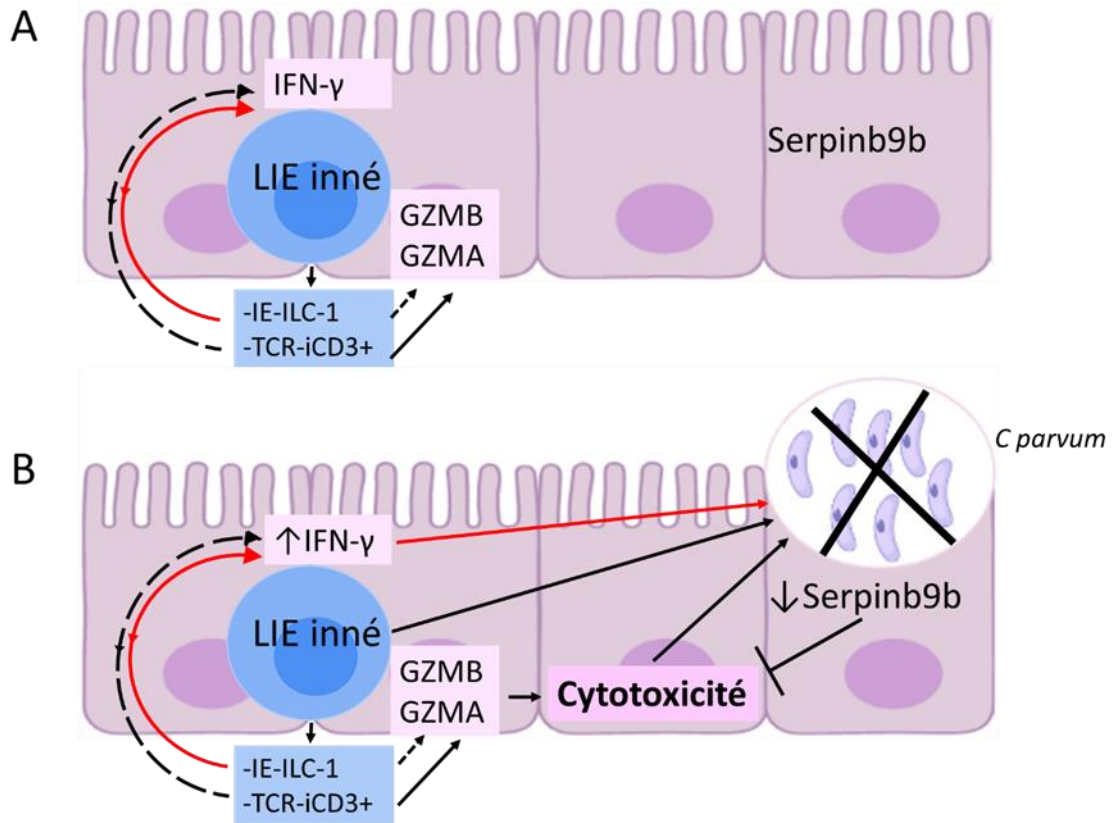
Les perspectives à court terme de ce travail sont donc de I) perfectionner notre modèle *in vitro*, pour cela nous envisageons d'augmenter le nombre de LIE dans la co-culture et de tester d'autres matrices que le matrigel, II) déterminer quelle sous population protège contre le parasite. Pour résoudre cette question nous avons prévu de refaire des expériences de co-culture avec des cellules innées RAG2<sup>-/-</sup> triées par cytométrie en flux, III) confirmer ou infirmer le rôle de l'IL-15 produit par les CE en utilisant des Ac neutralisant la cytokine ou son récepteur ou en utilisant des organoïdes intestinaux de souris IL-15<sup>-/-</sup>, IV) cibler plus spécifiquement le mécanisme de cytotoxicité. Pour cela, nous envisageons d'utiliser des LIE innés isolés de souris déficientes pour la production de perforine (perforin<sup>-/-</sup>) et/ou pour la libération des granules de sécrétion (souris beige) (Roder, 1979), V) confirmer la diminution de l'expression des serpinines b9b et b9 *in vitro* et *in vivo* par d'autres méthodes (RT-qPCR, Western blot), VI) évaluer l'impact sur la charge parasitaire de la diminution de ces serpinines dans les CE. Pour

cela, les organoïdes (cellules souches) seront transfectés avec un vecteur d'expression codant pour la Serpinb9b et/ou b9 afin de limiter la diminution de son expression lors de l'infection.

Nos perspectives à plus long terme sont premièrement développer le modèle de co-culture à partir de cellules humaines pour pouvoir confirmer le rôle protecteur des LIE innés dans la cryptosporidiose chez l'homme. Deuxièmement nous chercherons de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à renforcer les fonctions cytolytiques des LIE et/ou à augmenter la sensibilité des CE aux mécanismes de cytotoxicité.

## VII- Conclusion générale

Au cours de ma thèse, j'ai développé un modèle expérimental innovant, à partir d'organoïdes intestinaux infectés et co-cultivés avec des LIE. Grâce à ce modèle, nous avons pu démontrer que les LIE innés, qui sont majoritaires chez les individus qui risquent de développer une cryptosporidiose sévère, participent à l'élimination du parasite via un mécanisme de cytotoxicité médié par les granzymes. Nous avons aussi montré que l'expression de la serpinb9b, un inhibiteur naturel de granzyme, diminue dans les CE infectées par *C parvum*, ce qui pourrait augmenter leur sensibilité au mécanisme de cytotoxicité médié par les LIE innés et ainsi favoriser leur élimination. D'autres travaux seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.



**Figure 26 :** Mécanisme hypothétique du rôle protecteur des LIE innés dans l'infection par *C parvum*.  
 A) avant infection, les 2 populations (IE-ILC-1 et TCR-iCD3+) sont présentes. Les LIE innés sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , cette cytokine peut être produite par les deux sous populations de LIE innés. Ces cellules notamment les LIE innés TCR-iCD3+ expriment des granzymes (GZMA, GZMB). Les cellules épithéliales non infectées expriment la serpinb9b, un inhibiteur endogène des sérines protéases. B) après infection, la fréquence des 2 sous populations de LIE innés reste inchangée. La présence de LIE innés limite le développement de *C parvum*. L'infection par *C parvum* induit une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LIE innés. De plus, les LIE innés ont une activité cytotoxique contre les cellules infectées et ainsi empêche l'expansion du parasite. L'infection induit aussi une baisse de l'expression de la serpinb9b dans les cellules épithéliales infectées, ce qui les rendrait plus sensibles aux granzymes sécrétées par les LIE innés et favoriserait leur élimination.

## Références Bibliographiques

- Abadie, V., Discepolo, V., and Jabri, B. (2012). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol* 34, 551–566.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Abubakar, I., Aliyu, S.H., Arumugam, C., Hunter, P.R., and Usman, N.K. (2007). Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* CD004932.
- Adams, E.J., Chien, Y.-H., and Garcia, K.C. (2005). Structure of a  $\gamma\delta$  T Cell Receptor in Complex with the Nonclassical MHC T22. *Science*.
- Agace, W.W. (2008). T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends in Immunology* 29, 514–522.
- Aguirre, S.A., Mason, P.H., and Perryman, L.E. (1994). Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 62, 697–699.
- Aguirre, S.A., Perryman, L.E., Davis, W.C., and McGuire, T.C. (1998). IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: analysis of CD4+ $\alpha$  beta+IFN- $\gamma$ + and CD4+ $\alpha$  beta+IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. *J Immunol* 161, 1891–1900.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2017a). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52, 1185–1193.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2017b). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol* 52, 1185–1193.
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., and Vallance, B.A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology* 39, 677–696.
- Auray, G., Lacroix-Lamandé, S., Mancassola, R., Dimier-Poisson, I., and Laurent, F. (2007). Involvement of intestinal epithelial cells in dendritic cell recruitment during *C. parvum* infection. *Microbes and Infection* 9, 574–582.
- Bain, C.C., and Mowat, A.Mcl. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* 260, 102–117.
- Bain, C.C., and Schridde, A. (2018). Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Front. Immunol.* 9, 2733.
- Bain, C.C., Montgomery, J., Scott, C.L., Kel, J.M., Girard-Madoux, M.J.H., Martens, L., Zangerle-Murray, T.F.P., Ober-Blöbaum, J., Lindenbergh-Kortleve, D., Samsom, J.N., et al. (2017). TGF $\beta$ R signalling controls CD103+CD11b+ dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun* 8, 620.

- Baptista, A.P., Olivier, B.J., Goverse, G., Greuter, M., Knippenberg, M., Kusser, K., Domingues, R.G., Veiga-Fernandes, H., Luster, A.D., Lugering, A., et al. (2013). Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal Immunol* 6, 511–521.
- Barakat, F.M., McDonald, V., Di Santo, J.P., and Korb, D.S. (2009). Roles for NK Cells and an NK Cell-Independent Source of Intestinal Gamma Interferon for Innate Immunity to *Cryptosporidium parvum* Infection. *IAI* 77, 5044–5049.
- Baydoun, M., Vanneste, S.B., Creusy, C., Guyot, K., Gantois, N., Chabe, M., Delaire, B., Mouray, A., Baydoun, A., Forzy, G., et al. (2017). Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as an in vitro model of cryptosporidiosis: Proof of concept. *Sci Rep* 7, 17288.
- Becker, M., Güttler, S., Bachem, A., Hartung, E., Mora, A., Jäkel, A., Hutloff, A., Henn, V., Mages, H.W., Gurka, S., et al. (2014). Ontogenic, Phenotypic, and Functional Characterization of XCR1(+) Dendritic Cells Leads to a Consistent Classification of Intestinal Dendritic Cells Based on the Expression of XCR1 and SIRP $\alpha$ . *Front Immunol* 5, 326.
- Bedi, B., McNair, N.N., and Mead, J.R. (2014). Dendritic cells play a role in host susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunology Letters* 158, 42–51.
- Bedi, B., McNair, N.N., Förster, I., and Mead, J.R. (2015a). IL-18 cytokine levels modulate innate immune responses and cryptosporidiosis in mice. *J Eukaryot Microbiol* 62, 44–50.
- Bedi, B., McNair, N.N., Förster, I., and Mead, J.R. (2015b). IL-18 cytokine levels modulate innate immune responses and cryptosporidiosis in mice. *J Eukaryot Microbiol* 62, 44–50.
- Beiting, D.P. (2014). Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened. *Trends in Parasitology* 30, 491–498.
- Benmerah, A., Badrichani, A., Ngohou, K., Mégarbané, B., Bègue, B., and Cerf-Bensussan, N. (1994). Homotypic aggregation of CD103 ( $\alpha\beta 7$ )<sup>+</sup> lymphocytes by an anti-CD103 antibody, HML-4. *European Journal of Immunology* 24, 2243–2249.
- Bhagat, G., Naiyer, A.J., Shah, J.G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T.C., Green, P.H.R., and Manavalan, J.S. (2008). Small intestinal CD8<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ +NKG2A<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J. Clin. Invest.* 118, 281–293.
- Bharhani, M.S., Grewal, J.S., Pepller, R., Enockson, C., London, L., and London, S.D. (2007). Comprehensive phenotypic analysis of the gut intra-epithelial lymphocyte compartment: perturbations induced by acute reovirus 1/L infection of the gastrointestinal tract. *International Immunology* 19, 567–579.
- Bilate, A.M., Bousbaine, D., Mesin, L., Agudelo, M., Leube, J., Kratzert, A., Dougan, S.K., Victora, G.D., and Ploegh, H.L. (2016). Tissue-specific emergence of regulatory and intraepithelial T cells from a clonal T cell precursor. *Sci Immunol* 1, eaaf7471.
- Biton, M., Haber, A.L., Rogel, N., Burgin, G., Beyaz, S., Schnell, A., Ashenberg, O., Su, C.-W., Smillie, C., Shekhar, K., et al. (2018). T Helper Cell Cytokines Modulate Intestinal Stem Cell Renewal and Differentiation. *Cell* 175, 1307-1320.e22.
- Blutt, S.E., Crawford, S.E., Ramani, S., Zou, W.Y., and Estes, M.K. (2018). Engineered Human Gastrointestinal Cultures to Study the Microbiome and Infectious Diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 5, 241–251.

- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010).  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467–478.
- Borad, A.J., Allison, G.M., Wang, D., Ahmed, S., Karim, M.M., Kane, A.V., Moy, J., Hibberd, P.L., Ajjampur, S.S.R., Kang, G., et al. (2012). Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 86, 214–222.
- Bots, M., Kofschoten, I.G.M., Bres, S.A., Rademaker, M.T.G.A., de Roo, G.M., Krüse, M., Franken, K.L.M.C., Hahne, M., Froelich, C.J., Melief, C.J.M., et al. (2005). SPI-1 and SPI-6 cooperate in the protection from effector cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 105, 1153–1161.
- Buettner, M., and Lochner, M. (2016). Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon. *Front. Immunol.* 7.
- Carlson, G.A., Marshall, S.T., and Truesdale, A.T. (1984). Adaptive immune defects and delayed rejection of allogeneic tumor cells in beige mice. *Cell Immunol* 87, 348–356.
- Carryn, S., Schaefer, D.A., Imboden, M., Homan, E.J., Bremel, R.D., and Riggs, M.W. (2012). Phospholipases and cationic peptides inhibit *Cryptosporidium parvum* sporozoite infectivity by parasitocidal and non-parasitocidal mechanisms. *J Parasitol* 98, 199–204.
- Castellanos-Gonzalez, A., Yancey, L.S., Wang, H., Pantenburg, B., Liscum, K.R., Lewis, D.E., and White, Jr., A.C. (2008). *Cryptosporidium* Infection of Human Intestinal Epithelial Cells Increases Expression of Osteoprotegerin: A Novel Mechanism for Evasion of Host Defenses. *J INFECT DIS* 197, 916–923.
- Cerovic, V., Houston, S.A., Scott, C.L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A.M., and Milling, S.W.F. (2013). Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* 6, 104–113.
- Cerutti, A. (2008). Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol* 1, 8–10.
- Cervantes-Barragan, L., and Colonna, M. (2018). AHR signaling in the development and function of intestinal immune cells and beyond. *Semin Immunopathol* 40, 371–377.
- Cervantes-Barragan, L., Chai, J.N., Tianero, M.D., Di Luccia, B., Ahern, P.P., Merriman, J., Cortez, V.S., Caparon, M.G., Donia, M.S., Gilfillan, S., et al. (2017). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T cells. *Science* 357, 806–810.
- Chen, X.M., Gores, G.J., Paya, C.V., and LaRusso, N.F. (1999). *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am J Physiol* 277, G599–608.
- Chen, X.-M., O'Hara, S.P., Nelson, J.B., Splinter, P.L., Small, A.J., Tietz, P.S., Limper, A.H., and LaRusso, N.F. (2005). Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kappaB. *J Immunol* 175, 7447–7456.
- Chen, X.-M., Splinter, P.L., O'Hara, S.P., and LaRusso, N.F. (2007). A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* 282, 28929–28938.
- Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W.L., and Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14338–14343.

- Cheroutre, H. (2004). Starting at the Beginning: New Perspectives on the Biology of Mucosal T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 217–246.
- Cheroutre, H., and Lambolez, F. (2008). The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 20, 185–191.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 11, 445–456.
- Chien, Y., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by  $\gamma\delta$  T cells. *Immunological Reviews* 215, 46–58.
- Choudhry, N., Petry, F., van Rooijen, N., and McDonald, V. (2012). A protective role for interleukin 18 in interferon  $\gamma$ -mediated innate immunity to *Cryptosporidium parvum* that is independent of natural killer cells. *J Infect Dis* 206, 117–124.
- Collins, J.K., Cashman, S., Morgan, J., and O’Sullivan, G.C. (2012). The Gastrointestinal Immune System: Recognising Microbes in the Gut. *Annals of Gastroenterology* 16.
- Costa, D., Razakandrainibe, R., Valot, S., Vannier, M., Sautour, M., Basmaciyan, L., Gargala, G., Viller, V., Lemeteil, D., Ballet, J.-J., et al. (2020). Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms* 8.
- Costain, D.J., Guha, A.K., Liwski, R.S., and Lee, T.D.G. (2001). Murine hypodense eosinophils induce tumour cell apoptosis by a granzyme B-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother* 50, 293–299.
- Crawford, C.K., and Kol, A. (2021). The Mucosal Innate Immune Response to *Cryptosporidium parvum*, a Global One Health Issue. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 689401.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7, 349–359.
- Culshaw, R.J., Bancroft, G.J., and McDonald, V. (1997). Gut intraepithelial lymphocytes induce immunity against *Cryptosporidium* infection through a mechanism involving gamma interferon production. *Infect Immun* 65, 3074–3079.
- Cuneo, A., Ferrant, A., Michaux, J.-L., Boogaerts, M., Demuynck, H., Bosly, A., Doyen, C., Carli, M.G., Piva, N., Castoldi, G., et al. (1993). Clinical Review on Features and Cytogenetic Patterns in Adult Acute Myeloid Leukemia with Lymphoid Markers. *Leukemia & Lymphoma* 9, 285–291.
- Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B., and Weinstein, W.M. (1983). Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med* 308, 1252–1257.
- Dahan, S., Roth-Walter, F., Arnaboldi, P., Agarwal, S., and Mayer, L. (2007). Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev* 215, 243–253.
- Dann, S.M., Wang, H.-C., Gambarin, K.J., Actor, J.K., Robinson, P., Lewis, D.E., Caillat-Zucman, S., and White, A.C. (2005a). Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *J Infect Dis* 192, 1294–1302.



Dann, S.M., Wang, H.-C., Gambarin, K.J., Actor, J.K., Robinson, P., Lewis, D.E., Caillat-Zucman, S., and White, A.C. (2005b). Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *J Infect Dis* *192*, 1294–1302.

Dashtsoodol, N., Bortoluzzi, S., and Schmidt-Supprian, M. (2019). T Cell Receptor Expression Timing and Signal Strength in the Functional Differentiation of Invariant Natural Killer T Cells. *Front Immunol* *10*, 841.

Denning, T.L., Granger, S., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., Zhang, W., Honey, K., Rasmussen, J.P., Cheroutre, H., Rudensky, A.Y., et al. (2007). Mouse TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD8 $\alpha\alpha$  Intraepithelial Lymphocytes Express Genes That Down-Regulate Their Antigen Reactivity and Suppress Immune Responses. *J Immunol* *178*, 4230–4239.

Denning, T.L., Norris, B.A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., Karp, C.L., and Pulendran, B. (2011). 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* *187*, 733–747.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournié, J.J., Krensky, A.M., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Caccamo, N., Sireci, G., and Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T lymphocytes. *J Infect Dis* *184*, 1082–1085.

Di Marco Barros, R., Roberts, N.A., Dart, R.J., Vantourout, P., Jandke, A., Nussbaumer, O., Deban, L., Cipolat, S., Hart, R., Iannitto, M.L., et al. (2016). Epithelia Use Butyrophilin-like Molecules to Shape Organ-Specific  $\gamma\delta$  T Cell Compartments. *Cell* *167*, 203-218.e17.

Dunay, I.R., DaMatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1+ Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* *29*, 306–317.

Edele, F., Molenaar, R., Gütle, D., Dudda, J.C., Jakob, T., Homey, B., Mebius, R., Hornef, M., and Martin, S.F. (2008). Cutting Edge: Instructive Role of Peripheral Tissue Cells in the Imprinting of T Cell Homing Receptor Patterns. *J Immunol* *181*, 3745–3749.

Ehigiator, H.N., McNair, N., and Mead, J.R. (2007). *Cryptosporidium parvum*: The contribution of Th1-inducing pathways to the resolution of infection in mice. *Experimental Parasitology* *115*, 107–113.

Eiras, Leon, Camarero, Lombardia, Roldan, Bootello, and Roy, G. (2000). Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Contain a CD3<sup>+</sup> CD7<sup>+</sup> Subset Expressing Natural Killer Markers and a Singular Pattern of Adhesion Molecules. *Scandinavian Journal of Immunology* *52*, 1–6.

El-Asady, R., Yuan, R., Liu, K., Wang, D., Gress, R.E., Lucas, P.J., Drachenberg, C.B., and Hadley, G.A. (2005). TGF- $\beta$ -dependent CD103 expression by CD8<sup>+</sup> T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* *201*, 1647–1657.

Enriquez, F.J., and Sterling, C.R. (1991). *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J Protozool* *38*, 100S-102S.

Enriquez, F.J., and Sterling, C.R. (1993). Role of CD4<sup>+</sup> TH1- and TH2-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)* *40*, 307–311.

- Eriguchi, Y., Nakamura, K., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Takahashi, S., Hashimoto, D., Teshima, T., Ayabe, T., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2018). Essential role of IFN- $\gamma$  in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI Insight* 3.
- Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., and Hansson, G.C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G341–G347.
- Ettersperger, J., Montcuquet, N., Malamut, G., Guegan, N., Lopez-Lastra, S., Gayraud, S., Reimann, C., Vidal, E., Cagnard, N., Villarese, P., et al. (2016). Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. *Immunity* 45, 610–625.
- Fan, X., and Rudensky, A.Y. (2016). Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* 164, 1198–1211.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97, 14–32.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71, 241–260.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013a). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of cytokine responsive interferon- $\gamma$ -producing cells. *Immunity* 38, 769–781.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013b). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- $\gamma$ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677–689.
- Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M.G., Laufer, T.M., Ignatowicz, L., and Ivanov, I.I. (2014). Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity* 40, 594–607.
- Greenberg, P.D., and Cello, J.P. (1996). Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13, 348–354.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571–578.
- Gurka, S., Hartung, E., Becker, M., and Kroczeck, R.A. (2015). Mouse Conventional Dendritic Cells Can be Universally Classified Based on the Mutually Exclusive Expression of XCR1 and SIRP $\alpha$ . *Front Immunol* 6, 35.

- Guy-Grand, D., Azogui, O., Celli, S., Darche, S., Nussenzweig, M.C., Kourilsky, P., and Vassalli, P. (2003). Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 197, 333–341.
- Guyot, K., Sarfati, C., and Derouin, F. (2012). Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *feuilles deBiologie* 9.
- Hammerschmidt, S.I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Förster, R., and Pabst, O. (2008). Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2483–2490.
- Hariss, F., and Meresse, B. (2021). Comment on "ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodeling." *Mucosal Immunol* 14, 279–281.
- Hayday, A., and Vantourout, P. (2013). A Long-Playing CD about the  $\gamma\delta$  TCR Repertoire. *Immunity* 39, 994–996.
- Hayward, A.R., Chmura, K., and Cosyns, M. (2000). Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J Infect Dis* 182, 1001–1004.
- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812–826.
- Helander, H.F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689.
- Helgeland, L., Brandtzaeg, P., Rolstad, B., and Vaage, J.T. (1997). Sequential development of intraepithelial gamma delta and alpha beta T lymphocytes expressing CD8 alpha beta in neonatal rat intestine: requirement for the thymus. *Immunology* 92, 447–456.
- Heo, I., Dutta, D., Schaefer, D.A., Iakobachvili, N., Artegiani, B., Sachs, N., Boonekamp, K.E., Bowden, G., Hendrickx, A.P.A., Willems, R.J.L., et al. (2018a). Modelling *Cryptosporidium* infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat Microbiol* 3, 814–823.
- Heo, I., Dutta, D., Schaefer, D.A., Iakobachvili, N., Artegiani, B., Sachs, N., Boonekamp, K.E., Bowden, G., Hendrickx, A.P.A., Willems, R.J.L., et al. (2018b). Modelling *Cryptosporidium* infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat Microbiol* 3, 814–823.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.
- Hirst, C.E., Buzza, M.S., Bird, C.H., Warren, H.S., Cameron, P.U., Zhang, M., Ashton-Rickardt, P.G., and Bird, P.I. (2003). The Intracellular Granzyme B Inhibitor, Proteinase Inhibitor 9, Is Up-Regulated During Accessory Cell Maturation and Effector Cell Degranulation, and Its Overexpression Enhances CTL Potency. *J Immunol* 170, 805–815.
- Hu, G., Gong, A.-Y., Roth, A.L., Huang, B.Q., Ward, H.D., Zhu, G., LaRusso, N.F., Hanson, N.D., and Chen, X.-M. (2013). Release of Luminal Exosomes Contributes to TLR4-Mediated Epithelial Antimicrobial Defense. *PLoS Pathog* 9, e1003261.

- Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* *21*, 367–377.
- Ismail, A.S., Severson, K.M., Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Yu, X., Benjamin, J.L., Ruhn, K.A., Hou, B., DeFranco, A.L., Yarovinsky, F., et al. (2011). Intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 8743–8748.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.-Y. (2004). Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity* *21*, 527–538.
- Jabri, B., and Meresse, B. (2006). NKG2 receptor-mediated regulation of effector CTL functions in the human tissue microenvironment. *Curr Top Microbiol Immunol* *298*, 139–156.
- Jandke, A., Melandri, D., Monin, L., Ushakov, D.S., Laing, A.G., Vantourout, P., East, P., Nitta, T., Narita, T., Takayanagi, H., et al. (2020). Butyrophilin-like proteins display combinatorial diversity in selecting and maintaining signature intraepithelial  $\gamma\delta$  T cell compartments. *Nat Commun* *11*, 3769.
- Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.-G., et al. (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* *176*, 803–810.
- Jiang, L., Wang, Y.-J., Zhao, J., Uehara, M., Hou, Q., Kasinath, V., Ichimura, T., Banouni, N., Dai, L., Li, X., et al. (2020). Direct Tumor Killing and Immunotherapy through Anti-SerpineB9 Therapy. *Cell* *183*, 1219–1233.e18.
- Johansen, F.-E., and Kaetzel, C.S. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* *4*, 598–602.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *PNAS* *105*, 15064–15069.
- Jowett, G.M., Norman, M.D.A., Yu, T.T.L., Rosell Arévalo, P., Hoogland, D., Lust, S.T., Read, E., Hamrud, E., Walters, N.J., Niazi, U., et al. (2020). ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodelling. *Nat Mater*.
- Kaiserman, D., and Bird, P.I. (2010). Control of granzymes by serpins. *Cell Death Differ* *17*, 586–595.
- Kapp, J.A., Kapp, L.M., McKenna, K.C., and Lake, J.P. (2004).  $\gamma\delta$  T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology* *111*, 155–164.
- Karanis, P., and Aldeyarbi, H.M. (2011). Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int J Parasitol* *41*, 1231–1242.

- Kassa, M., Comby, E., Lemeteil, D., Brasseur, P., and Ballet, J.J. (1991). Characterization of anti-Cryptosporidium IgA antibodies in sera from immunocompetent individuals and HIV-infected patients. *J Protozool* 38, 179S-180S.
- Khalil, I.A., Troeger, C., Rao, P.C., Blacker, B.F., Brown, A., Brewer, T.G., Colombara, D.V., De Hostos, E.L., Engmann, C., Guerrant, R.L., et al. (2018). Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from Cryptosporidium infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. *The Lancet Global Health* 6, e758–e768.
- Knodler, L.A., Crowley, S.M., Sham, H.P., Yang, H., Wrande, M., Ma, C., Ernst, R.K., Steele-Mortimer, O., Celli, J., and Vallance, B.A. (2014). Noncanonical Inflammasome Activation of Caspase-4/Caspase-11 Mediates Epithelial Defenses against Enteric Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe* 16, 249–256.
- Knoop, K.A., and Newberry, R.D. (2012). Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. *Front Immunol* 3, 84.
- Konkel, J.E., Maruyama, T., Carpenter, A.C., Xiong, Y., Zamarron, B.F., Hall, B.E., Kulkarni, A.B., Zhang, P., Bosselut, R., and Chen, W. (2011). Control of the development of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF- $\beta$ . *Nat Immunol* 12, 312–319.
- Korbel, D.S., Barakat, F.M., Di Santo, J.P., and McDonald, V. (2011). CD4<sup>+</sup> T cells are not essential for control of early acute Cryptosporidium parvum infection in neonatal mice. *Infect Immun* 79, 1647–1653.
- Kosek, M., Alcantara, C., Lima, A.A., and Guerrant, R.L. (2001). Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect Dis* 1, 262–269.
- Kváč, M., Kodádková, A., Sak, B., Květoňová, D., Jalovecká, M., Rost, M., and Salát, J. (2011a). Activated CD8<sup>+</sup> T cells contribute to clearance of gastric Cryptosporidium muris infections. *Parasite Immunol* 33, 210–216.
- Kváč, M., Kodádková, A., Sak, B., Květoňová, D., Jalovecká, M., Rost, M., and Salát, J. (2011b). Activated CD8<sup>+</sup> T cells contribute to clearance of gastric Cryptosporidium muris infections. *Parasite Immunol* 33, 210–216.
- Kvac, M., Myskova, E., Holubova, N., Kellnerova, K., Kicia, M., Rajskey, D., McEvoy, J., Feng, Y., Hanzal, V., and Sak, B. (2021). Occurrence and genetic diversity of Cryptosporidium spp. in wild foxes, wolves, jackals, and bears in central Europe. *FOLIA PARASIT* 68.
- Lacroix, S., Mancassola, R., Naciri, M., and Laurent, F. (2001). *Cryptosporidium parvum* -Specific Mucosal Immune Response in C57BL/6 Neonatal and Gamma Interferon-Deficient Mice: Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Protection. *Infect Immun* 69, 1635–1642.
- Lacroix-Lamandé, S., Mancassola, R., Naciri, M., and Laurent, F. (2002). Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after Cryptosporidium parvum infection. *Infect Immun* 70, 2090–2099.
- Lai, Y.-G., Hou, M.-S., Hsu, Y.-W., Chang, C.-L., Liou, Y.-H., Tsai, M.-H., Lee, F., and Liao, N.-S. (2008). IL-15 does not affect IEL development in the thymus but regulates homeostasis of putative precursors and mature CD8 alpha alpha<sup>+</sup> IELs in the intestine. *J Immunol* 180, 3757–3765.

- Lambolez, F., Arcangeli, M.-L., Joret, A.-M., Pasqualetto, V., Cordier, C., Di Santo, J.P., Rocha, B., and Ezine, S. (2006). The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nat. Immunol.* *7*, 76–82.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2017). The inflammasome turns 15. *Nature* *548*, 534–535.
- Lantier, L., Lacroix-Lamandé, S., Potiron, L., Metton, C., Drouet, F., Guesdon, W., Gnahoui-David, A., Vern, Y.L., Deriaud, E., Fenis, A., et al. (2013). Intestinal CD103+ Dendritic Cells Are Key Players in the Innate Immune Control of *Cryptosporidium parvum* Infection in Neonatal Mice. *PLOS Pathogens* *9*, e1003801.
- Latthe, M., Terry, L., and Macdonald, T.T. (1994). High frequency of CD8 $\alpha\alpha$  homodimer-bearing T cells in human fetal intestine. *European Journal of Immunology* *24*, 1703–1705.
- Laurent, F., and Lacroix-Lamandé, S. (2017a). Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol* *47*, 711–721.
- Laurent, F., and Lacroix-Lamandé, S. (2017b). Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* *47*, 711–721.
- Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T.C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M., and Kagnoff, M.F. (1997). *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun* *65*, 5067–5073.
- Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., and Lantz, O. (2011). Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* *32*, 212–218.
- Lebbad, M., Winiiecka-Krusnell, J., Stensvold, C.R., and Beser, J. (2021). High Diversity of *Cryptosporidium* Species and Subtypes Identified in Cryptosporidiosis Acquired in Sweden and Abroad. *Pathogens* *10*, 523.
- Lécuyer, E., Rakotobe, S., Lengliné-Garnier, H., Lebreton, C., Picard, M., Juste, C., Fritzen, R., Eberl, G., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., et al. (2014). Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity* *40*, 608–620.
- Leishman, A.J., Gapin, L., Capone, M., Palmer, E., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2002). Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 $\alpha\alpha$ (+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* *16*, 355–364.
- Lemieux, M.W., Sonzogni-Desautels, K., and Ndao, M. (2017a). Lessons Learned from Protective Immune Responses to Optimize Vaccines against Cryptosporidiosis. *Pathogens* *7*, 2.
- Lemieux, M.W., Sonzogni-Desautels, K., and Ndao, M. (2017b). Lessons Learned from Protective Immune Responses to Optimize Vaccines against Cryptosporidiosis. *Pathogens* *7*.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous Stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Cell* *147*, 629–640.

- Lin, C.-H., Chen, M.-C., Lin, L.-L., Christian, D.A., Min, B., Hunter, C.A., and Lu, L.-F. (2021). Gut epithelial IL-27 confers intestinal immunity through the induction of intraepithelial lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20210021.
- Lin, T., Matsuzaki, G., Kenai, H., and Nomoto, K. (1994). Progenies of fetal thymocytes are the major source of CD4-CD8<sup>+</sup> alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes early in ontogeny. *Eur J Immunol* 24, 1785–1791.
- Liu, J., Deng, M., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., and Enomoto, S. (2009). Biphasic Modulation of Apoptotic Pathways in *Cryptosporidium parvum* -Infected Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun* 77, 837–849.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6, 666–677.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.-E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1, 11–22.
- Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.-J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., et al. (2010). IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest* 120, 2131–2143.
- Malamut, G., Meresse, B., and Cellier, C. (2017). Intraepithelial lymphocytes: impact in gastroenterology. *19*, 8.
- Mallegol, J., van Niel, G., and Heyman, M. (2005). Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 35, 11–16.
- Mantis, N.J., Rol, N., and Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 4, 603–611.
- Manzano, M., Abadía-Molina, A.C., García-Olivares, E., Gil, A., and Rueda, R. (2002). Absolute Counts and Distribution of Lymphocyte Subsets in Small Intestine of BALB/c Mice Change during Weaning. *The Journal of Nutrition* 132, 2757–2762.
- Mason, K.L., Huffnagle, G.B., Noverr, M.C., and Kao, J.Y. (2008). Overview of Gut Immunology. In *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, G.B. Huffnagle, and M.C. Noverr, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–14.
- Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2006). Cutting Edge: Gut Microenvironment Promotes Differentiation of a Unique Memory CD8 T Cell Population. *J Immunol* 176, 2079–2083.
- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., et al. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 207, 553–564.
- Mayans, S., Stepniak, D., Palida, S., Larange, A., Dreux, J., Arlian, B., Shinnakasu, R., Kronenberg, M., Cheroutre, H., and Lambolez, F. (2014).  $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4-CD8 $\alpha\beta$ - intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities. *Immunity* 41, 207–218.

Mayassi, T., and Jabri, B. (2018). Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol* *11*, 1281–1289.

Mayassi, T., Ladell, K., Gudjonson, H., McLaren, J.E., Shaw, D.G., Tran, M.T., Rokicka, J.J., Lawrence, I., Grenier, J.-C., van Unen, V., et al. (2019). Chronic Inflammation Permanently Reshapes Tissue-Resident Immunity in Celiac Disease. *Cell* *176*, 967–981.e19.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity* *40*, 248–261.

Mccole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F., and Kagnoff, M.F. (2000). Intestinal Epithelial Cell Apoptosis following *Cryptosporidium parvum* Infection. *68*, 4.

McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.

McDonald, V., and Bancroft, G.J. (1994). Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasite Immunol* *16*, 315–320.

McDonald, B.D., Bunker, J.J., Ishizuka, I.E., Jabri, B., and Bendelac, A. (2014). Elevated T Cell Receptor Signaling Identifies a Thymic Precursor to the TCR $\alpha\beta$ +CD4–CD8 $\beta$ – Intraepithelial Lymphocyte Lineage. *Immunity* *41*, 219–229.

McDonald, B.D., Jabri, B., and Bendelac, A. (2018). Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 514–525.

McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, M., and Bancroft, G.J. (1992). Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun* *60*, 3325–3331.

McDONALD, V., Robinson, H.A., Kelly, J.P., and Bancroft, G.J. (1994). *Cryptosporidium mudis* in Adult Mice: Adoptive Transfer of Immunity and Protective Roles of CD4 versus CD8 Cells. *62*, 6.

Mcdonald, V., Robinson, H.A., Kelly, J.P., and Bancroft, G.J. (1996). Immunity to *Cryptosporidium muris* Infection in Mice Is Expressed through Gut CD4 $\alpha$  Intraepithelial Lymphocytes. *INFECT. IMMUN.* *64*, 7.

McDonald, V., Smith, R., Robinson, H., and Bancroft, G. (2000). Host immune responses against *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol* *6*, 75–91.

McDonald, V., Pollok, R.C.G., Dhaliwal, W., Naik, S., Farthing, M.J.G., and Bajaj-Elliott, M. (2006). A potential role for interleukin-18 in inhibition of the development of *Cryptosporidium parvum*. *Clin Exp Immunol* *145*, 555–562.

McNair, N.N., and Mead, J.R. (2013). CD4+ effector and memory cell populations protect against *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection* *15*, 599–606.

Mead, J.R. (2014). Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. *Hum Vaccin Immunother* *10*, 1505–1513.

Mead, J.R., Arrowood, M.J., Sidwell, R.W., and Healey, M.C. (1991). Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J Infect Dis* *163*, 1297–1304.



Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., and Pozio, E. (2004). *Cryptosporidium parvum* at Different Developmental Stages Modulates Host Cell Apoptosis In Vitro. *Infect Immun* 72, 6061–6067.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raullet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. (2004). Coordinated Induction by IL15 of a TCR-Independent NKG2D Signaling Pathway Converts CTL into Lymphokine-Activated Killer Cells in Celiac Disease. *Immunity* 21, 357–366.

Mjösberg, J., and Spits, H. (2016). Human innate lymphoid cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138, 1265–1276.

Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J.J., Peters, C.P., Blom, B., te Velde, A.A., Fokkens, W.J., van Drunen, C.M., and Spits, H. (2012). The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 649–659.

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225.

Moore, S.R., Lima, N.L., Soares, A.M., Oriá, R.B., Pinkerton, R.C., Barrett, L.J., Guerrant, R.L., and Lima, A.A.M. (2010). Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. *Gastroenterology* 139, 1156–1164.

Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2008). Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol* 1, 96–109.

Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U.H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer’s patch dendritic cells. *Nature* 424, 88–93.

Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.-Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157–1160.

Morales, M.A.G., Mele, R., Ludovisi, A., Bruschi, F., Tosini, F., and Pozio, E. (2004). *Cryptosporidium parvum*-Specific CD4 Th1 Cells from Sensitized Donors Responding to Both Fractionated and Recombinant Antigenic Proteins. *INFECT. IMMUN.* 72, 5.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331–341.

Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685.

Mueller, S.N., and Mackay, L.K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 79–89.

Nakajima, H., and Henkart, P.A. Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. 8.

Nazmi, A., Hoek, K.L., Greer, M.J., Piazuelo, M.B., Minato, N., and Olivares-Villagómez, D. (2019). Innate CD8 $\alpha\alpha$  cells promote ILC1-like intraepithelial lymphocyte homeostasis and intestinal inflammation. *PLoS One* 14, e0215883.

Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370.

Newberry, R.D., and Lorenz, R.G. (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev* 206, 6–21.

van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.

Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., Elci, B., Brandenburg, N., Kolotuev, I., Gjorevski, N., et al. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature* 585, 574–578.

Nozaki, K., Mochizuki, W., Matsumoto, Y., Matsumoto, T., Fukuda, M., Mizutani, T., Watanabe, M., and Nakamura, T. (2016). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J Gastroenterol* 51, 206–213.

Olivares-Villagómez, D., and Van Kaer, L. (2010). TL and CD8 $\alpha$ : Enigmatic partners in mucosal immunity. *Immunology Letters* 134, 1–6.

Olivares-Villagómez, D., and Van Kaer, L. (2018). Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends in Immunology* 39, 264–275.

Olsen, L., Åkesson, C.P., Storset, A.K., Lacroix-Lamandé, S., Boysen, P., Metton, C., Connelley, T., Espenes, A., Laurent, F., and Drouet, F. (2015a). The early intestinal immune response in experimental neonatal ovine cryptosporidiosis is characterized by an increased frequency of perforin expressing NCR1(+) NK cells and by NCR1(-) CD8(+) cell recruitment. *Vet Res* 46, 28.

Olsen, L., Åkesson, C.P., Storset, A.K., Lacroix-Lamandé, S., Boysen, P., Metton, C., Connelley, T., Espenes, A., Laurent, F., and Drouet, F. (2015b). The early intestinal immune response in experimental neonatal ovine cryptosporidiosis is characterized by an increased frequency of perforin expressing NCR1+ NK cells and by NCR1- CD8+ cell recruitment. *Vet Res* 46, 28.

Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q.T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I.L., Capecchi, M.R., et al. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* 15, 701–706.

Panda, S.K., and Colonna, M. (2019). Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. *Front. Immunol.* 10, 861.

Pangasa, A., Jex, A.R., Campbell, B.E., Bott, N.J., Whipp, M., Hogg, G., Stevens, M.A., and Gasser, R.B. (2009). High resolution melting-curve (HRM) analysis for the diagnosis of cryptosporidiosis in humans. *Molecular and Cellular Probes* 23, 10–15.

Pantenburg, B., Castellanos-Gonzalez, A., Dann, S.M., Connelly, R.L., Lewis, D.E., Ward, H.D., and Clinton White, A. (2010). Human CD8+ T Cells Clear *Cryptosporidium parvum* from Infected Intestinal Epithelial Cells. *Am J Trop Med Hyg* 82, 600–607.

van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 10, 664–674.

Persson, E.K., Scott, C.L., Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2013). Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol* 43, 3098–3107.

- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014a). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014b). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* *14*, 141–153.
- Plettenberg, A., Stoehr, A., Stellbrink, H.J., Albrecht, H., and Meigel, W. (1993). A preparation from bovine colostrum in the treatment of HIV-positive patients with chronic diarrhea. *Clin Investig* *71*, 42–45.
- Pobezinsky, L.A., Angelov, G.S., Tai, X., Jeurling, S., Van Laethem, F., Feigenbaum, L., Park, J.-H., and Singer, A. (2012). Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* *13*, 569–578.
- Potiron, L., Lacroix-Lamandé, S., Marquis, M., Levern, Y., Fort, G., Franceschini, I., and Laurent, F. (2019). Batf3-Dependent Intestinal Dendritic Cells Play a Critical Role in the Control of *Cryptosporidium parvum* Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *219*, 925–935.
- Poussier, P., Edouard, P., Lee, C., Binnie, M., and Julius, M. (1992). Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J Exp Med* *176*, 187–199.
- Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D., and Julius, M. (2002). A Unique Subset of Self-specific Intraintestinal T Cells Maintains Gut Integrity. *J Exp Med* *195*, 1491–1497.
- Preidis, G.A., Wang, H.-C., Lewis, D.E., Castellanos-Gonzalez, A., Rogers, K.A., Graviss, E.A., Ward, H.D., and White, A.C. (2007). Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* gp15. *Am J Trop Med Hyg* *77*, 583–585.
- Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Eisley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11489–11494.
- Putignani, L., and Menichella, D. (2010). Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* *2010*.
- Qin, G., Mao, H., Zheng, J., Sia, S.F., Liu, Y., Chan, P.-L., Lam, K.-T., Peiris, J.S.M., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2009). Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis* *200*, 858–865.
- Rauch, I., Deets, K.A., Ji, D.X., von Moltke, J., Tenthorey, J.L., Lee, A.Y., Philip, N.H., Ayres, J.S., Brodsky, I.E., Gronert, K., et al. (2017). NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. *Immunity* *46*, 649–659.
- Reboldi, A., and Cyster, J.G. (2016). Peyer's patches: Organizing B cell responses at the intestinal frontier. *Immunol Rev* *271*, 230–245.
- Reis, B.S., Rogoz, A., Costa-Pinto, F.A., Taniuchi, I., and Mucida, D. (2013). Mutual expression of Runx3 and ThPOK regulates intestinal CD4+ T cell immunity. *Nat Immunol* *14*, 271–280.

- Rhodes, D.A., Reith, W., and Trowsdale, J. (2016). Regulation of Immunity by Butyrophilins. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 151–172.
- Rhodes, K.A., Andrew, E.M., Newton, D.J., Tramonti, D., and Carding, S.R. (2008). A subset of IL-10-producing  $\gamma\delta$  T cells protect the liver from *Listeria*-elicited, CD8<sup>+</sup> T cell-mediated injury. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2274–2283.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* *6*, 507–514.
- Robinson, P., Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Lewis, D.E., Shahab, I., Lahoti, S., and White, A.C. (2001). EXPRESSION OF IL-15 AND IL-4 IN IFN- $\gamma$ -INDEPENDENT CONTROL OF EXPERIMENTAL HUMAN CRYPTOSPORIDIUM PARVUM INFECTION. *Cytokine* *15*, 39–46.
- Roder, J.C. (1979). The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function. *J Immunol* *123*, 2168–2173.
- Rohlman, V.C., Kuhls, T.L., Mosier, D.A., Crawford, D.L., and Greenfield, R.A. (1993). Cryptosporidium parvum infection after abrogation of natural killer cell activity in normal and severe combined immunodeficiency mice. *J Parasitol* *79*, 295–297.
- Rossignol, J.-F. (2010). Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol* *124*, 45–53.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 12204–12209.
- Ruscher, R., Kummer, R.L., Lee, Y.J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2017). CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> Intraepithelial Lymphocytes Arise from Two Major Thymic Precursors. *Nat Immunol* *18*, 771–779.
- Sablet, T. de, Potiron, L., Marquis, M., Bussi re, F.I., Lacroix-Lamandé, S., and Laurent, F. (2016). Cryptosporidium parvum increases intestinal permeability through interaction with epithelial cells and IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  released by inflammatory monocytes. *Cellular Microbiology* *18*, 1871–1880.
- Saenz, S.A., Siracusa, M.C., Perrigoue, J.G., Spencer, S.P., Urban, J.F., Tocker, J.E., Budelsky, A.L., Kleinschek, M.A., Kastelein, R.A., Kambayashi, T., et al. (2010). IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature* *464*, 1362–1366.
- Sallon, S., Deckelbaum, R.J., Schmid, I.I., Harlap, S., Baras, M., and Spira, D.T. (1988). Cryptosporidium, malnutrition, and chronic diarrhea in children. *Am J Dis Child* *142*, 312–315.
- Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). ROR $\gamma$  and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46<sup>+</sup> cells. *Nat Immunol* *10*, 83–91.
- Sateriale, A., Šlapeta, J., Baptista, R., Engiles, J.B., Gullicksrud, J.A., Herbert, G.T., Brooks, C.F., Kugler, E.M., Kissinger, J.C., Hunter, C.A., et al. (2019). A Genetically Tractable, Natural Mouse Model of Cryptosporidiosis Offers Insights into Host Protective Immunity. *Cell Host & Microbe* *26*, 135-146.e5.
- Sateriale, A., Gullicksrud, J.A., Engiles, J.B., McLeod, B.I., Kugler, E.M., Henao-Mejia, J., Zhou, T., Ring, A.M., Brodsky, I.E., Hunter, C.A., et al. (2021). The intestinal parasite *Cryptosporidium* is controlled by an enterocyte intrinsic inflammasome that depends on NLRP6. *Proc Natl Acad Sci USA* *118*.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.

Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H.J., Langa, F., Santo, J.P.D., and Eberl, G. (2010). Lineage Relationship Analysis of ROR $\gamma$ t+ Innate Lymphoid Cells. *Science*.

Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2011). ROR $\gamma$ t+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol* 12, 320–326.

Schaefer, D.A., Betzer, D.P., Smith, K.D., Millman, Z.G., Michalski, H.C., Menchaca, S.E., Zambriski, J.A., Ojo, K.K., Hulverson, M.A., Arnold, S.L.M., et al. (2016). Novel Bumped Kinase Inhibitors Are Safe and Effective Therapeutics in the Calf Clinical Model for Cryptosporidiosis. *J Infect Dis* 214, 1856–1864.

Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P.J., and Cerf-Bensussan, N. (2017). Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Current Opinion in Microbiology* 35, 100–109.

Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., and Cerf-Bensussan, N. (2018). Modulation of the gut microbiota to improve innate resistance. *Curr Opin Immunol* 54, 137–144.

Schön, M.P., Arya, A., Murphy, E.A., Adams, C.M., Strauch, U.G., Agace, W.W., Marsal, J., Donohue, J.P., Her, H., Beier, D.R., et al. (1999). Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J. Immunol.* 162, 6641–6649.

Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darche, S., Bègue, B., Ruemmele, F., Combadière, C., Di Santo, J.P., Buzoni-Gatel, D., et al. (2012). Interleukin-15-Dependent NKp46+ Innate Lymphoid Cells Control Intestinal Inflammation by Recruiting Inflammatory Monocytes. *Immunity* 37, 108–121.

Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillat, S., Estève, J.-P., et al. (2005). Tumor Recognition following V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Receptor Interactions with a Surface F1-ATPase-Related Structure and Apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71–80.

Sheoran, A., Wiffin, A., Widmer, G., Singh, P., and Tzipori, S. (2012). Infection With *Cryptosporidium hominis* Provides Incomplete Protection of the Host Against *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis* 205, 1019–1023.

Sheridan, B.S., and Lefrançois, L. (2010). Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 513–521.

da Silva Menezes, J. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *International Immunology* 15, 447–455.

Singh, I., Carville, A., and Tzipori, S. (2011). Cryptosporidiosis in Rhesus Macaques Challenged During Acute and Chronic Phases of SIV Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27, 989–997.

- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Hill, D.A., Kim, B.S., Headley, M.B., Doering, T.A., Wherry, E.J., Jessup, H.K., Siegel, L.A., Kambayashi, T., et al. (2011). TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 477, 229–233.
- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., and Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19–29.
- Slack, E., Balmer, M.L., and Macpherson, A.J. (2014). B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol Rev* 260, 50–66.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B., and Grimason, A.M. (2005). Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21, 133–142.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., and Tait, A. (2007). Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology* 149, 29–40.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11, 227–238.
- Stagg, A.J. (2018). Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front. Immunol.* 9, 2883.
- Steege, J.C.A.T., Buurman, W.A., and Forget, P.-P. (1997). The Neonatal Development of Intraepithelial and Lamina Propria Lymphocytes in the Murine Small Intestine. *Dev Immunol* 5, 121–128.
- Steele, J., Sponseller, J., Schmidt, D., Cohen, O., and Tzipori, S. (2013). Hyperimmune bovine colostrum for treatment of GI infections: a review and update on Clostridium difficile. *Hum Vaccin Immunother* 9, 1565–1568.
- Sugahara, Shimizu, Yoshida, Aiba, Yamagiwa, Asakura, and Abo (1999). Extrathymic derivation of gut lymphocytes in parabiotic mice. *Immunology* 96, 57–65.
- Sujino, T., London, M., Hoytema van Konijnenburg, D.P., Rendon, T., Buch, T., Silva, H.M., Lafaille, J.J., Reis, B.S., and Mucida, D. (2016). Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4<sup>+</sup> T cells controls gut inflammation. *Science* 352, 1581–1586.
- Taghi-Kilani, R., Sekla, L., and Hayglass, K.T. The role of humoral immunity in Cryptosporidium spp. infection. *Studies with B cell-depleted mice.* 7.
- Takeuchi, D., Jones, V.C., Kobayashi, M., and Suzuki, F. (2008). Cooperative role of macrophages and neutrophils in host Antiprotozoan resistance in mice acutely infected with Cryptosporidium parvum. *Infect Immun* 76, 3657–3663.
- Takeuchi, K., Wood, H., and Swank, R.T. (1986). Lysosomal elastase and cathepsin G in beige mice. Neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice selectively lack lysosomal elastase and cathepsin G. *J Exp Med* 163, 665–677.
- Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* 67, 1992–2000.

- Tandel, J., English, E.D., Sateriale, A., Gullicksrud, J.A., Beiting, D.P., Sullivan, M.C., Pinkston, B., and Striepen, B. (2019). Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nat Microbiol* 4, 2226–2236.
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med* 206, 655–667.
- Tessema, T.S., Dauber, E., and Petry, F. (2009). Adoptive transfer of protective immunity from *Cryptosporidium parvum*-infected interferon- $\gamma$  and interleukin-12-deficient mice to naive recipients. 7.
- the Immunological Genome Consortium, Robinette, M.L., Fuchs, A., Cortez, V.S., Lee, J.S., Wang, Y., Durum, S.K., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2015). Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* 16, 306–317.
- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., and Innes, E.A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 48.
- Tordesillas, L., and Berin, M.C. (2018). Mechanisms of Oral Tolerance. *Clinic Rev Allerg Immunol* 55, 107–117.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7, 179–190.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* 29, 261–271.
- Tyzzar, E.E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res* 23, 487-510.3.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9, 769–776.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., and Okada, Y. (1993). Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 79, 32–37.
- Ungar, B.L., Burris, J.A., Quinn, C.A., and Finkelman, F.D. (1990). New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect Immun* 58, 961–969.
- Ungar, B.L., Kao, T.C., Burris, J.A., and Finkelman, F.D. (1991). *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J Immunol* 147, 1014–1022.
- Urban, J.F., Fayer, R., Chen, S.J., Gause, W.C., Gately, M.K., and Finkelman, F.D. (1996). IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J Immunol* 156, 263–268.
- Van Acker, A., Gronke, K., Biswas, A., Martens, L., Saeys, Y., Filtjens, J., Taveirne, S., Van Ammel, E., Kerre, T., Matthys, P., et al. (2017). A Murine Intestinal Intraepithelial NKp46-Negative Innate Lymphoid Cell Population Characterized by Group 1 Properties. *Cell Reports* 19, 1431–1443.

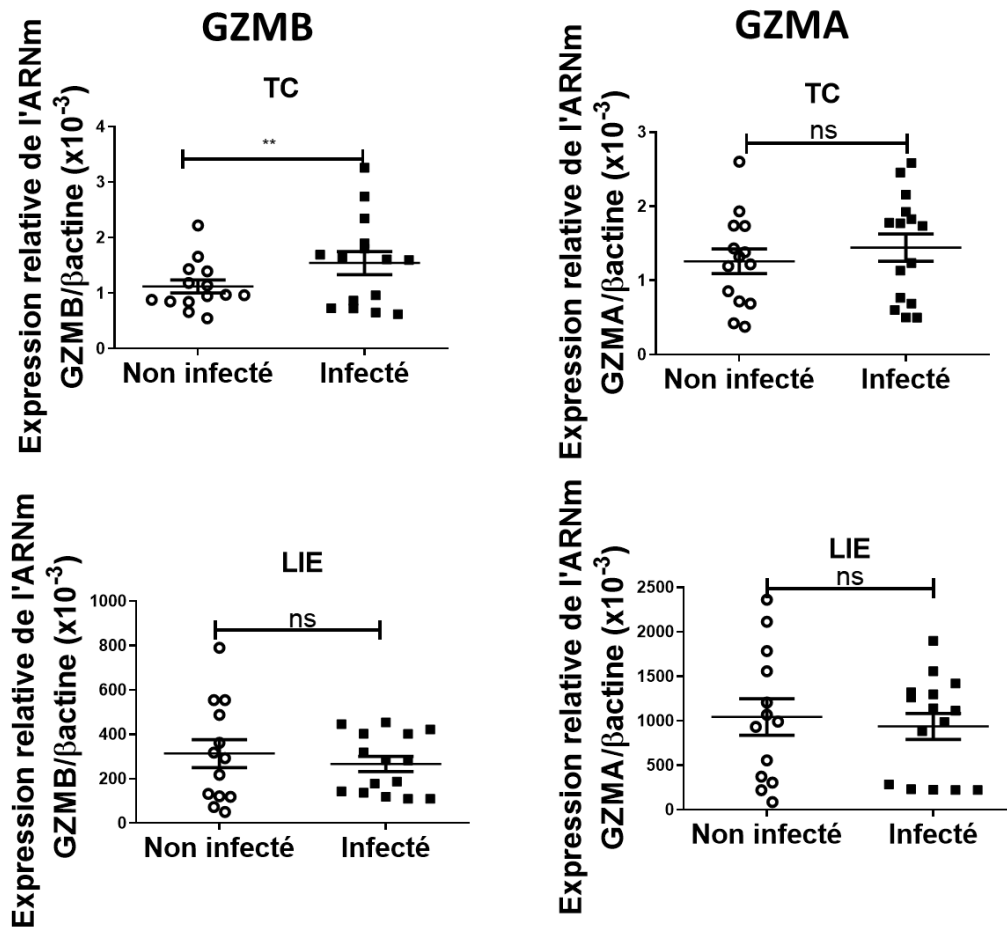
- Van Kaer, L., and Olivares-Villagómez, D. (2018). Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. *J.I.* 200, 2235–2244.
- Van Kaer, L., Scott Algood, H.M., Singh, K., Parekh, V.V., Greer, M.J., Piazuolo, M.B., Weitkamp, J.-H., Matta, P., Chaturvedi, R., Wilson, K.T., et al. (2014). CD8 $\alpha$  innate-type lymphocytes in the intestinal epithelium mediate mucosal immunity. *Immunity* 41, 451–464.
- Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugière, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 52, 1690–1697.
- Vancomelbeke, M., and Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11, 821–834.
- Verstichel, G., Vermijlen, D., Martens, L., Goetgeluk, G., Brouwer, M., Thiault, N., Van Caeneghem, Y., De Munter, S., Weening, K., Bonte, S., et al. (2017). The Checkpoint for Agonist Selection precedes Conventional Selection in Human Thymus. *Sci Immunol* 2, eaah4232.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258.
- Wang, S., Ye, Q., Zeng, X., and Qiao, S. (2019). Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Journal of Immunology Research* 2019, 1–8.
- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol* 15, 98–108.
- Wershil, B., and Furuta, G. (2008). 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, S380–S383.
- Westendorf, A.M., Fleissner, D., Hansen, W., and Buer, J. (2010). T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 11–18.
- White, A.C. (2010). Cryptosporidiosis and the ears of the hippopotamus. *Clin Infect Dis* 50, 1373–1374.
- Widmer, G., Carmena, D., Kváč, M., Chalmers, R.M., Kissinger, J.C., Xiao, L., Sateriale, A., Striepen, B., Laurent, F., Lacroix-Lamandé, S., et al. Update on *Cryptosporidium* spp.: highlights from the Seventh International Giardia and Cryptosporidium Conference. *Parasite* 27, 14.
- van Wijk, F., and Cheroutre, H. (2009). Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin Immunol* 21, 130–138.
- van Wijk, F., and Cheroutre, H. (2010). Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 6, 559–566.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519–527.



- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* *124*, 80–89.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., and Upton, S.J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev* *17*, 72–97.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* *8*, 294–303.
- Yamagata, T., Mathis, D., and Benoist, C. (2004). Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat Immunol* *5*, 597–605.
- Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K., and Yoshikai, Y. (2006). MyD88-dependent signaling for IL-15 production plays an important role in maintenance of CD8 alpha alpha TCR alpha beta and TCR gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* *176*, 6180–6185.
- Zachos, N.C., Kovbasnjuk, O., Foulke-Abel, J., In, J., Blutt, S.E., de Jonge, H.R., Estes, M.K., and Donowitz, M. (2016). Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology\*. *Journal of Biological Chemistry* *291*, 3759–3766.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* *123*, 197–208.
- Zhang, X., Liu, S., Wang, Y., Hu, H., Li, L., Wu, Y., Cao, D., Cai, Y., Zhang, J., and Zhang, X. (2019). Interleukin-22 regulates the homeostasis of the intestinal epithelium during inflammation. *Int J Mol Med* *43*, 1657–1668.
- Zhang, X.-T., Gong, A.-Y., Wang, Y., Chen, X., Lim, S.-Y.S., Dolata, C.E., and Chen, X.-M. (2016). *Cryptosporidium parvum* infection attenuates the ex vivo propagation of murine intestinal enteroids. *Physiol Rep* *4*.
- Zhao, G.H., Fang, Y.Q., Ryan, U., Guo, Y.X., Wu, F., Du, S.Z., Chen, D.K., and Lin, Q. (2016). Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum*-infected mice. *Parasitol Res* *115*, 879–887.
- Zhou, R., Hu, G., Liu, J., Gong, A.-Y., Drescher, K.M., and Chen, X.-M. (2009). NF-kappaB p65-dependent transactivation of miRNA genes following *Cryptosporidium parvum* infection stimulates epithelial cell immune responses. *PLoS Pathog* *5*, e1000681.
- Zhou, R., Gong, A.-Y., Eischeid, A.N., and Chen, X.-M. (2012). miR-27b targets KSRP to coordinate TLR4-mediated epithelial defense against *Cryptosporidium parvum* infection. *PLoS Pathog* *8*, e1002702.
- Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells - PubMed.
- Persistent changes in circulating and intestinal  $\gamma\delta$  T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease - PubMed.

# Annexe

Figure Supplémentaire



**Figure s1** : Enrichissement de l'expression de GZMB et GZMA dans les LIE isolés des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectés.

Expression des gènes codant pour GZMB et GZMA par RT-qPCR dans l'intestin total et les LIE innés isolés des souris RAG2<sup>-/-</sup> infectés (n=15) ou non (n=14). Les résultats sont regroupés à partir de 3 expériences indépendantes et les significations statistiques sont indiquées (test de Wilcoxon Wilcoxon matched-pairs signed rank) comparaison ns, non significative, \*(p<0.05). TC=tissu complet, GZM (granzyme).

## Tableaux supplémentaires

**Tableau s1** : Les gènes exprimés significativement différents entre les conditions organoïdes infectés versus non infectés (27 gènes) ( $p < 0.1$ )

Symbole	Nom du gène
Slc25a48	Solute carrier family 25, member 48
Rgmb	Repulsive guidance molecule family member B
Hmox1	Heme oxygenase 1
Lgals3	Lectin, galactose binding, soluble 3
Serpinb9b	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9b
Rsad2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2
Cxcl10	Mhemokine (C-X-C motif) ligand 10
Msln	Mesothelin
Dtx4	Deltex 4, E3 ubiquitin ligase
Sprr1a	Small proline-rich protein 1A
Akr1b8	Aldo-keto reductase family 1, member B8
Rtp4	Receptor transporter protein 4
Pthr1	Peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
Epn3	Epsin 3
Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2
Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
Ddx60	DExD/H box helicase 60
Me1	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic
Phlda3	Pleckstrin homology like domain, family A, member 3
Slc16a6	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6
Cryab	Crystallin, alpha B
Klk1	Kallikrein 1
Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier

**Tableau s2** : Tableau d'enrichissement des gènes impliqués dans la réponse immunitaire

Identité des voies	Description	Gènes
GO:0002252	immune effector	hmox1/ Lgals3/ serpinb9b/ Rsad2/ Cxcl10/ Rtp4/ Oasl2/ Ddx60/ Ifit3/ Isg1)
GO:0051607	defense response to virus	Rsad2/ Cxcl10/ Rtp4/ Oasl2/ Ddx60/ Ifit3/ Isg15
GO:0009615	response to virus	Rsad2/ Cxcl10/ Rtp4/ Oasl2/ Ddx60/ Ifit3/ Isg15
GO:0002684	positive regulation of immune system process	hmox1/ Lgals3/ Rsad2/ Cxcl10/ Cdkn1a/ Ddx60/ Isg15
GO:0019748	secondary metabolic process	Akr1b8/ Cited1/ Akr1c14/ Cyp1b1

**Tableau s3** : Liste des amorces utilisés pour la quantification des gènes par RT-qPCR

Gène		Sens	Anti-sens
Beta-actine	B-actine	5'-CCTTCTTGGGTATGGAATCCT-3'	5'-CTTTACGGATGTCAACGTCAC-3'
Interféron gamma	IFN $\gamma$	5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3'	5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC-3'
Granzyme A	GZMA	5'-GCTGGCGCTTTGATTGAAAA-3'	5'-ACTTAGATCTCTTTCCACGTT-3'
Granzyme B	GZMB	5'-CAGCAAGTCATCCCTATGGT-3'	5'-TACTCTTCAGCTTTAGCAGCAT-3'
Interleukine 15	IL-15	5'-ATGTTTCATCAACACGTCCTGACT-3'	5'-GCAGCAGGTGGAGGTACCTTAA-3'
CD8 alpha	CD8 $\alpha$	5'-TTTACATCTGGGCACCCTTG-3'	5'-CTTTCGGCTCCTGTGGTAG-3'

Intégrine alpha E	ITGAE	5'- GACAAAGACTCAGGACCACAC- 3'	5'-GGCCACGGTTACATTTTCTTT-3'
Antigen CD7 de cellule T	CD7	5'- CACGGTTGTGGTGAAAGAAAA- 3'	5'-CCGGTGAAGAAGAAGCCTAC-3'
Natural cytotoxicity triggering receptor 1	NCR1	5'- GATCAACACTGAAAAGGAGACT- 3'	5'-TGACACCAGATGTTACCCGA-3'

**Tableau s4** : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Anticorps	Clone	Couleur	Marque
CD45	30-f11	FITC	Sony
CD8 $\alpha$	53-6.7	APC-Cy7	Biolegend
CD103	2E7	PeCy7	Biolegend
NK1.1	PK136	BV510	Biolegend
NKp46	29A1.4	BV421	Biolegend
CD11c	N418	PeCy5	Biolegend
HLA-DR	AF6-120.1	APC	Biolegend
CD64	X54-5/7.1	PE	BD Biosciences

# Commentaire

Comment on “ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodeling”

Fatima Hariss<sup>1</sup> and Bertrand Meresse <sup>1</sup>

Type 1 Innate lymphoid cells (ILC1) accumulate in the inflamed mucosa of patients with Crohn's disease (CD) but their role in CD pathogenesis remains poorly known. In a recent issue of Nature materials, Jowett et al. (*Nat. Mat.* 2020) used a coculture model with intestinal organoids to show that ILC1 could promote intestinal epithelial growth and tissue remodeling through an unexpected mechanism that involves the transforming growth factor 1 (TGF- $\beta$ 1) and the metalloproteinase MMP9.

## ORGANOIDS, A « NEW » TOOL TO DISSECT PATHOLOGICAL IMMUNE RESPONSES IN A DISH

Over these past few years, organoid cultures have blown dust off *in vitro* studies. This is particularly true for the gut, where intestinal organoid culture has progressively replaced the traditional immortalized cell line-based systems (Caco-2, HT29-MTX...) and provides a more physiological model to investigate development and functions of the gut epithelium.<sup>1</sup> The methodology initially developed by H. Clevers' group,<sup>2</sup> uses *Lgr5+* intestinal stem-cells (ISC) isolated from murine small intestinal crypts to recreate 3D crypt-villus structures (or organoid) that possess self-renewing capacity and generate differentiated epithelial cells (e.g., enterocytes, goblet cells, Paneth cells, enteroendocrine cells). Alternatively, induced pluripotent cells (iPS) generated from somatic cells can be differentiated into specific organ cell types *in vitro*. Intestinal organoids generated from human iPS create a more complex tissue containing both epithelial and mesenchymal lineages.<sup>3</sup> Organoid formation requires cocktails of growth factors that support survival, self-renewal and differentiation of stem cells and an extracellular matrix (ECM) (often Matrigel), that provides a scaffold as well as signal cues important for cell attachment and development into 3D structures. These so called « mini-guts » are attractive platforms for modeling gut epithelium development, but also to study regeneration, metabolism and transport in intestinal epithelial cells<sup>4</sup> as well as their interactions with infectious agents. Intestinal organoids are also useful for disease modeling as they can recapitulate *in vitro* genetic and epigenetic traits that influence pathological mechanisms. For example, it has been shown that the expression of several genes involved in antimicrobial defense (i.e., *LYZ*, *PLA2G2A*), epithelial secretory (i.e., *ZG16*, *CLCA1*) and absorptive functions (i.e., *AQP8*, *MUC12*) remains deregulated in colonic organoids from patients with ulcerative colitis (UC) but not from control individuals, indicating that organoids retain epigenetic imprinting.<sup>5</sup> Finally, the organoid model provides a reductionist epithelial environment that can be enriched with other cell types in order to study their interactions in physiological and pathological contexts (e.g., infection, inflammation). This coculture model appears to be particularly helpful to

dissect the pathogenic role of subsets of immune cells that infiltrate inflamed tissues. As an example, it has allowed to demonstrate that IFN- $\gamma$  produced by T cells provokes epithelial damage by inducing Paneth cell death and loss of *Lgr5+* ISC, a phenomenon observed in graft-versus-host disease, *Toxoplasma gondii* infection and autoimmune enteropathy.<sup>6</sup>

## ANOTHER ARROW IN THE QUIVER OF ILC1: INTESTINAL ILC1 PRODUCES TGF- $\beta$ 1 AND PARTICIPATES IN TISSUE REMODELING IN CD

The recent article of Jowett and colleagues is one novel example of the interest of the organoid model to study pathological and protective mechanisms mediated by immune cells.<sup>1</sup> In this study, the authors have investigated the role of ILC1 in CD and discovered their unexpected contribution to intestinal epithelial and matrix remodeling.

ILCs form a family of lymphocytes that, unlike T and B cells, lack surface expression of antigen-specific receptors. In the past decade, ILCs have attracted considerable interest and their development and functional properties have been extensively reviewed.<sup>7</sup> Three distinct ILC populations (i.e., ILC1, ILC2 and ILC3) have been described that have distinct patterns of cytokine production and functions mirroring that of differentiated CD4 T helper (Th) cells.<sup>7</sup> Type 1 ILCs have been defined by their capacity to produce IFN- $\gamma$ . They include the conventional NK cells and T-bet dependent non-cytotoxic ILC1. In addition, owing to the plasticity of ILCs, ILC1 can also arise from either ex-ILC2 or ex-ILC3 which down regulate *GATA3* or *ROR $\gamma$ t* respectively and turn on expression of T-bet, and IFN- $\gamma$  production. A protective role of ILCs has been demonstrated in many infectious models, notably at the early phase of infection. Conversely, ILCs may bolster or sustain pathological inflammation. Accordingly, ILC1 that arise from ILC3 expand in the inflamed intestinal mucosa during CD and are thought to participate in CD pathogenesis through their secretion of IFN- $\gamma$ .<sup>8</sup> The effects of ILC1 accumulation in the intestinal mucosa of CD patient remain however incompletely understood (Fig. 1).



Received: 25 September 2020 Revised: 4 November 2020 Accepted: 5 November 2020

Published online: 4 February 2021

© The Author(s) 2021

SPRINGER NATURE  SOCIETY FOR MUCOSAL IMMUNOLOGY

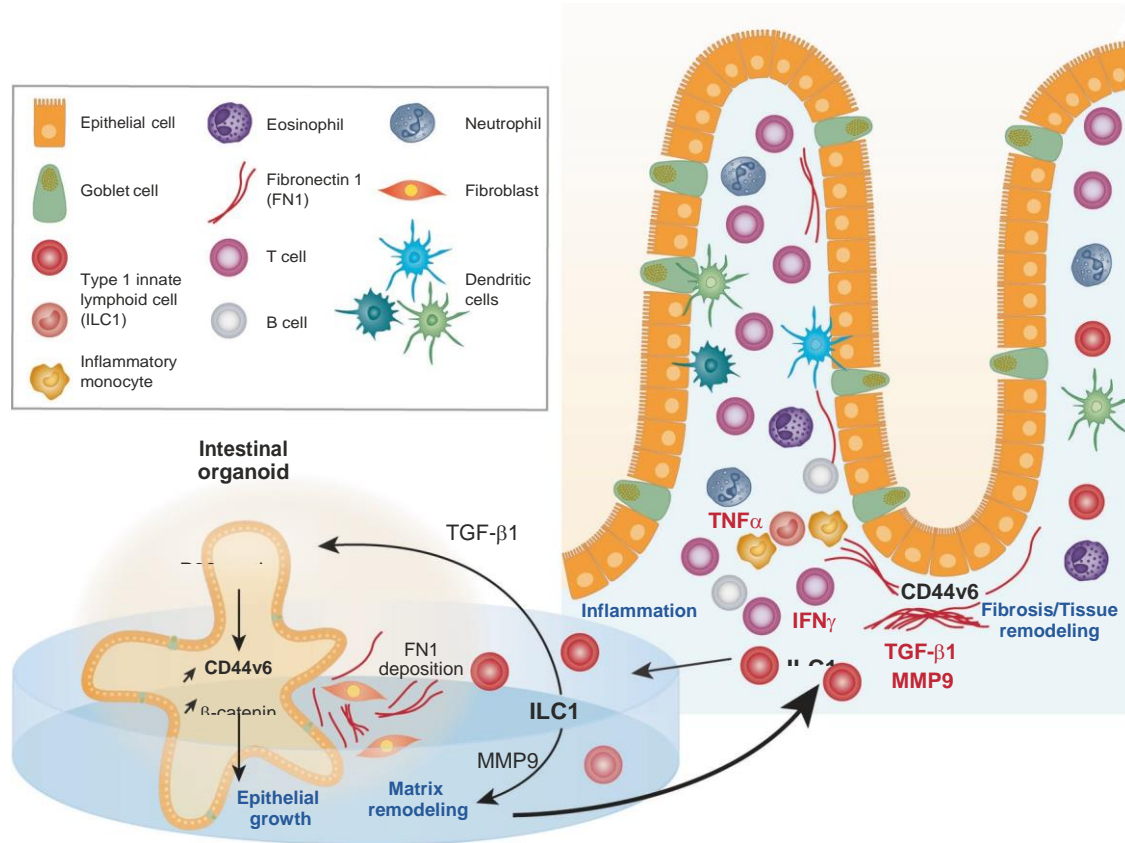


Fig. 1 ILC1 influences intestinal epithelial growth and tissue remodeling through the secretion of TGF-β1. Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease of unknown cause. The pathological immune response is complex as it involves many cell types including inflammatory monocytes, neutrophils, dendritic cells, T and B cells as well as ILCs. The specific role in CD pathogenesis of each of them remains however unclear. Using a coculture model of intestinal organoids with ILC1 Jowett et al reveals an unexpected role of ILC1 in intestinal epithelial growth and tissue remodeling through a mechanism that involves TGF-β1 rather than IFN-γ. They show that TGF-β1 secreted by ILC1 stimulates the expression of the transmembrane glycoprotein CD44v6 on intestinal epithelial cells through the activation of the p38γ kinase and stabilizes β-catenin to promote the growth of intestinal organoids. The authors further show that ILC1 also increase CD44v6 expression on fibroblasts, degrade the MMP-sensitive matrix and drive fibronectin 1 deposition in fibroblast-rich, peri-organoid regions. Altogether these data show that ILC1 not only promote TH1-polarization in the inflamed mucosa but also participate to tissue remodeling and fibrosis in CD.

Here, Jowett and colleagues took advantage of the organoid coculture model to decipher the impact of *lamina propria* ILC1 on the gut epithelium. By combining the coculture model with transcriptome analysis, they show an unexpected role of ILC1 in intestinal epithelial growth and tissue remodeling through a mechanism that involves TGF-β1 rather than IFN-γ (Fig. 1). Indeed, while ILC1 were expected to have deleterious effects on intestinal epithelial cells through their production of IFN-γ, Jowett et al show that murine intestinal organoids cultured for 4 days with murine intestinal ILC1 have enlarged CD44+ crypt buds indicating faster growing. They further show that ILC1 specifically stimulate expression of the CD44 variant 6 (CD44v6), a transmembrane glycoprotein mainly expressed in proliferative normal (e.g., intestinal crypts) and

pathological (e.g., cancerous tumor, inflamed mucosa in IBD) tissues. CD44v6 is also known to influence cell proliferation and, as shown in a recent study, to stimulate epithelial migration and proliferation as well as wound healing in the murine model of DSS-induced colitis and in IBD.<sup>9</sup> Moreover, Jowett et al observed in ILC1-organoid cocultures accumulation of epithelial β-catenin that colocalized with CD44v6 and evidence of activation of the Wnt/β-catenin pathway. Since Wnt/β-catenin signaling is crucial for stem cell renewal and because CD44 and Wnt/β-catenin pathways positively regulate each other in the gut, the authors hypothesize that ILC1 may thereby create a positive CD44v6/β-catenin feedbackloop, which promotes epithelial cell growth. Jowett et al. further

reveal the unforeseen capacity of activated ILC1 to secrete TGF- $\beta$ 1, an anti-inflammatory cytokine that also influences cell growth and differentiation. They also demonstrate that TGF- $\beta$ 1 secreted by ILC1 is responsible for CD44v6 upregulation and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in intestinal epithelial cells by adding a neutralizing antibody to the coculture. Based on the use of pirfenidone, a p38 $\gamma$  inhibitor, the authors conclude that TGF- $\beta$ 1 induces CD44v6 expression and stabilizes  $\beta$ -catenin through a noncanonical pathway involving the p38 $\gamma$  kinase. Of note however, this antifibrotic drug is a rather weak and unselective p38 inhibitor and further investigations will be useful to confirm this pathway. Importantly, the secretion of TGF- $\beta$ 1 by ILC1 and its impact on CD44v6 expression and epithelial growth

were recapitulated in a humanized coculture model in which freshly isolated intestinal ILC1 from IBD patients were cultured with human intestinal organoids (Fig. 1). Here, Jowett et al. used iPS-derived gut organoids that they generated from a skin-fibroblast-derived human iPS line (KUTE-4) in order to compare the effect of ILC1 isolated from inflamed and uninfamed tissues of patients with IBD with a standardized gut epithelium. Thereby, they could show that ILC1 from inflamed tissues proliferate and accumulate more in coculture and have a stronger effect on CD44v6 expression than ILC1 isolated from the uninfamed mucosa. Since iPS-derived gut organoids contain both epithelial and mesenchymal cells, the authors could show that ILC1 also increase CD44v6 expression on fibroblasts and, thus, that ILC1 also participate in

mesenchymal remodeling. Since expression of ECM-remodeling genes and metalloproteinase (MMP)-dependent degradation of the matrigel were enhanced in coculture with ILC1, Jowett et al. further studied the impact of ILC1 on ECM. To do so, they replaced “classical” matrigel by a homemade hydrogel matrix, which allowed precise quantification of ILC1-mediated matrix degradation and stiffening. Using this new matrix, they could demonstrate that ILC1 do not only degrade the MMP-sensitive matrix but also drive fibronectin 1 deposition in fibroblast-rich, peri-organoid regions (Fig. 1).

## CONCLUSIONS

To date, the physiological and pathological functions of ILC1 have been exclusively associated with their capacity to produce high amount of IFN- $\gamma$ . The study by Jowett and colleagues highlights a new function for intestinal ILC1 in tissue remodeling through TGF- $\beta$ 1 secretion. Further studies will be important to define whether this function of ILC1 is restricted to pathological inflammation and fibrosis in diseases such as IBD or is more generally involved in tissue repair alike IL-22 produced by ILC3 or IL-13 and AREG secreted by ILC2. Beyond this interesting finding, this study provides a novel elegant demonstration of the usefulness of the organoid coculture model to identify and study the specific role of immune cells in the

pathogenesis of complex immune disorders.

## ACKNOWLEDGEMENTS

BM is supported by the « région Hauts-de-France ».

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FH and BM wrote the manuscript.

## ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

## REFERENCES

1. Jowett, G. M. et al. ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodelling. *Nat. Mat.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0783-8>
2. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265 (2009).
3. Spence, J. R. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109 (2011).
4. In, J. G. et al. Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host–pathogen interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 633–642 (2016).
5. Dotti, I. et al. Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 66, 2069–2079 (2017).
6. Eriguchi, Y. et al. Essential role of IFN- $\gamma$  in T cell-associated intestinal inflammation. (2018). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121886>
7. Vivier, E. et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell* 174, 1054–1066 (2018).
8. Spits, H., Bernink, J. H. & Lanier, L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat. Immunol.* 17, 758–764 (2016).
9. Kelm, M. et al. Targeting epithelium-expressed sialyl Lewis glycans improves colonic mucosal wound healing and protects against colitis. *JCI Insight* 5, e135843 (2020).



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing,

adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

