



**HAL**  
open science

# Etude physiopathologique de la réponse immunitaire au cours de la thrombopénie immunologique (purpura thrombopénique immunologique)

Sylvain Audia

► **To cite this version:**

Sylvain Audia. Etude physiopathologique de la réponse immunitaire au cours de la thrombopénie immunologique (purpura thrombopénique immunologique). Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS073 . tel-00687984

**HAL Id: tel-00687984**

**<https://theses.hal.science/tel-00687984>**

Submitted on 16 Apr 2012

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
UFR des Sciences de la Vie, Terre et Environnement

THESE  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline: Sciences de la Vie

Par  
Sylvain Audia

Le 17 Décembre 2010

ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE  
AU COURS DE LA THROMBOPENIE IMMUNOLOGIQUE  
(PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE)

Directeur de thèse  
Pr Bernard Bonnotte

Membres du Jury  
Godeau Bertrand, PU-PH, président du jury  
Girodon François, PH, PhD, titulaire d'une HDR, examinateur  
Grosbois Bernard, PU-PH, rapporteur  
Lambotte Olivier, PU-PH, rapporteur  
Martin Laurent, PU-PH, examinateur

# REMERCIEMENTS

A notre Directeur de Thèse,

**Monsieur le Pr Bonnotte**, vous nous faites l'honneur de nous accompagner dans notre carrière médicale et scientifique depuis quelques années maintenant. Trouvez ici le témoignage de notre profonde admiration, vous qui avez su allier une carrière médicale et scientifique exemplaire. En espérant rester digne de votre confiance et poursuivre nos travaux à vos côtés.

Aux membres du Jury,

**Monsieur le Pr Godeau**, vous nous faites une nouvelle fois l'honneur de juger notre travail. Nous avons pu profiter de vos connaissances par nos lectures et restons admiratifs du travail que vous effectuez notamment dans le cadre des cytopénies auto-immunes.

**Monsieur le Pr Grosbois**, nous vous remercions d'avoir accepté de juger notre travail. Nous connaissons votre rigueur médicale et scientifique par nos lectures et les interventions orales auxquelles nous avons eu la chance d'assister.

**Monsieur le Pr Lambotte**, nous sommes honorés de confier ce travail à votre jugement. Nous n'avons pas eu le plaisir de bénéficier de votre enseignement mais sommes admiratifs de l'étendue de vos travaux de recherche.

**Monsieur le Pr Martin**, nous vous remercions d'avoir accepté de participer à notre jury. Nous espérons que les années à venir verront l'aboutissement de nos projets communs.

**Monsieur le Dr Girodon**, nous sommes ravis que vous acceptiez de juger notre travail. Vos remarques et critiques permettront sans doute d'élaborer des collaborations futures.

**A Joan,**

Pour ton soutien permanent et ton amour, passés, présents et futurs.

**A Salomé,**

Pour ton sourire et la joie de te voir grandir.

**A mes parents, à mon frère,**

Pour votre soutien et votre accompagnement.

**A Danielle et Michel,**

Pour votre soutien et votre disponibilité.

**A ma famille,**

Même si le temps nous sépare vous êtes dans mon cœur.

**A mes amis,**

Pour vos encouragements et les moments de détente.

**A mes collègues,**

Pour votre enseignement, votre soutien, votre regard critique et votre participation à notre travail.

**A l'équipe,**

Maxime, merci pour ton aide précieuse, tes critiques toujours constructives, tes relectures attentives et ton amitié.

Julien, à notre amitié.

Jennifer, à ton sourire et ton dynamisme.

Malika, à ton aide et ta bonne humeur.

Daniela, à ton soutien.

Nona, thank you for your help and your relevant comments.

Marion, à ton aide précieuse, ta gentillesse et ton entrain.

## RESUME

La thrombopénie immunologique ou purpura thrombopénique immunologique (PTI) est une maladie auto-immune rare responsable d'une destruction périphérique immunologique des plaquettes associée à une production médullaire inadaptée. Dans la première partie de ce travail, nous exposons les connaissances actuelles de sa physiopathologie ainsi que certaines données concernant la réponse immunitaire T, le rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg), l'implication de la rate dans la réponse immunitaire ainsi que les modes d'action d'une thérapeutique anti-lymphocytaire B, le rituximab. Dans une seconde partie, nous rapportons les résultats obtenus chez 40 patients atteints de PTI. Nous avons montré que le taux des Treg circulants  $CD4^+CD25^{High}Foxp3^+$  est similaire chez les patients et les témoins, avec une élévation de leur taux chez les sujets répondeurs aux traitements. A l'inverse, il existe un déficit quantitatif en Treg au sein de la rate des patients. L'analyse des sous-populations lymphocytaires B spléniques a montré une augmentation du taux de lymphocytes B de la zone marginale chez les patients. Concernant les mécanismes d'action du rituximab, nous avons montré qu'une déplétion lymphocytaire B sanguine et splénique n'est pas suffisante pour obtenir une rémission, et que les plasmocytes ne sont pas sensibles à cette thérapeutique. Par ailleurs, nous proposons un mécanisme d'échappement à ce traitement. En effet, nous avons montré que les patients résistants au RTX présentent une élévation du ratio Th1/Treg spléniques. Chez ces sujets non répondeurs, nous avons également observé une élévation du ratio lymphocytes T  $CD8^+/CD4^+$ , au sein de la rate, suggérant une participation des lymphocytes T cytotoxiques dans la physiopathologie du PTI.

Ces résultats ouvrent donc de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie du PTI, notamment la possible implication des lymphocytes B de la zone marginale et le défaut de contrôle de la réponse immunitaire splénique par les Treg. Concernant le rituximab, son action sur la réponse immunitaire ne semble pas se limiter à une déplétion lymphocytaire B qui n'est pas suffisante pour obtenir une rémission. Un mécanisme d'échappement ou de résistance à cette thérapeutique passe par une orientation Th1 et une probable implication des lymphocytes T  $CD8^+$ .

Mots-clés : thrombopénie immunologique, purpura thrombopénique immunologique, lymphocytes T régulateurs, réponse immunitaire T, lymphocytes B de la zone marginale, rate, rituximab.

## ABSTRACT

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease responsible for a peripheral immune destruction of platelets associated with an inappropriate bone marrow production. In this work, we first review the mechanisms involved in the pathogenesis of ITP. We also focus on the T cell immune response, highlighting the key role of regulatory T cells (Treg) in peripheral tolerance. The implication of the spleen in the immune response and the effects of rituximab, a B cell depleting therapy, are discussed. Then, our results obtained from 40 ITP patients are reported. Despite the fact that  $CD4^+CD25^{\text{High}}\text{Foxp3}^+$  circulating Treg levels are similar between patients and controls, a significant increase is observed in responder patients. In the spleen, the rate of Treg is lower in ITP patients. Analyses of the spleens also reveal an increase in the level of marginal zone B cells in ITP. Rituximab is responsible for a complete depletion of both circulating and splenic B cells, which is not sufficient to achieve a response. Moreover, plasma cells are still observed after treatment. An increase in the Th1/Treg ratio in the spleen of non responder patients after rituximab infusion could trigger an escape to this therapy. The involvement of  $CD8^+$  T cells in the pathogenesis of ITP is highlighted by the increase in the  $CD8^+/CD4^+$  ratio in the spleen after rituximab.

New fields in the understanding of the pathogenesis of ITP are opened with these results, particularly by showing a quantitative deficiency in splenic Treg and the possible involvement of marginal zone B cells. Regarding rituximab effect on the immune response, we demonstrate on the one hand that complete circulating and splenic B cell depletion is not sufficient to achieve remission, and on the other hand that Th1 response and increase in  $CD8^+$  T cells level may represent an escape to this treatment.

Keywords: immune thrombocytopenia, regulatory T cells, T immune response, marginal zone B cells, spleen, rituximab

# TABLE DES MATIERES

|   |            |
|---|------------|
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>2</b>   |
| <b>RESUME</b> .....   | <b>4</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>5</b>   |
| <b>TABLE DES MATIERES</b> .....   | <b>6</b>   |
| <b>Liste des Tableaux</b> .....   | <b>7</b>   |
| <b>Liste des Figures</b> .....  | <b>8</b>   |
| <b>Liste des Annexes</b> .....  | <b>9</b>   |
| <b>ABREVIATIONS</b> .....   | <b>10</b>  |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | <b>13</b>  |
| <br>  |            |
| 1. LA THROMBOPENIE IMMUNOLOGIQUE (PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE) .....   | 13         |
| <br>  |            |
| 1.1. Définition.....  | 13         |
| 1.2. Physiopathologie de la thrombopénie immunologique: données actuelles ..... | 15         |
| <br>  |            |
| 1.2.1. Destruction périphérique des plaquettes.....                             | 15         |
| 1.2.2. Défaut de production médullaire.....                                     | 19         |
| 1.2.3. Implications des facteurs génétiques et environnementaux.....            | 20         |
| <br>  |            |
| 2. POLARISATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE T ET LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....    | 24         |
| <br>  |            |
| 2.1. Polarisation Th1, Th2, Th17.....   | 24         |
| 2.2. Lymphocytes T régulateurs.....   | 26         |
| <br>  |            |
| 2.2.1. Définition des lymphocytes T régulateurs.....                            | 26         |
| 2.2.2. Caractéristiques fonctionnelles .....                                    | 35         |
| 2.2.3. Origine et homéostasie .....   | 39         |
| 2.2.4. Circulation des Treg.....  | 42         |
| 2.2.5. Rôle en pathologie humaine: auto-immunité, oncologie et infections.....  | 44         |
| <br>  |            |
| 2.3. Autres lymphocytes régulateurs.....  | 45         |
| <br>  |            |
| 2.3.1. Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> Régulateurs.....                          | 45         |
| 2.3.2. Lymphocytes B régulateurs.....   | 48         |
| <br>  |            |
| 3. UN ORGANE LYMPHOÏDE SECONDAIRE PARTICULIER: LA RATE .....                    | 51         |
| <br>  |            |
| 3.1. Développement et anatomie splénique .....                                  | 51         |
| 3.2. Réponse immunitaire splénique.....   | 52         |
| <br>  |            |
| 3.2.1. Rappels sur la lymphopoïèse B .....                                      | 52         |
| 3.2.2. Réponses folliculaire et extrafolliculaire spléniques .....              | 55         |
| <br>  |            |
| 4. THERAPEUTIQUE ANTI-CD20: LE RITUXIMAB .....                                  | 59         |
| <br>  |            |
| 4.1. Généralités .....  | 59         |
| 4.2. Le rituximab au cours du PTI:.....   | 62         |
| <br>  |            |
| <b>RESULTATS</b> .....  | <b>63</b>  |
| <b>DISCUSSION</b> .....   | <b>99</b>  |
| <b>PERSPECTIVES</b> .....   | <b>142</b> |
| <b>CONCLUSION</b> .....   | <b>145</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....  | <b>146</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....  | <b>163</b> |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Protéines impliquées dans les fonctions suppressives des Treg.....                            | 39 |
| Tableau 2: Récepteurs et chémokines impliqués dans le trafic des Treg.....                               | 42 |
| Tableau 3: Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> Régulateurs induits spécifiques d'antigènes chez l'homme ..... | 46 |



## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Physiopathologie du PTI.....                                  | 22 |
| Figure 2: Différentes réponses immunitaires T .....                     | 23 |
| Figure 3: Facteur de transcription Foxp3.....                           | 28 |
| Figure 4: Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.....        | 37 |
| Figure 5: Genèse thymique des lymphocytes T régulateurs.....            | 40 |
| Figure 6: Architecture splénique.....                                   | 50 |
| Figure 7: Maturation lymphocytaire B et architecture folliculaire ..... | 53 |
| Figure 8: Réponse folliculaire et extrafolliculaire splénique .....     | 58 |
| Figure 9: Mode d'action du rituximab .....                              | 59 |

# LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Article «Increase of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma. A Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+CD25+ T lymphocytes” ..... 164

Annexe 2: Publications personnelles ..... 137

## ABREVIATIONS

- Ac: Anticorps
- ADCC: *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)
- ADP: Adénosine DiPhosphate
- Ag: Antigène
- Aire: *Auto-immune regulator* (gène régulateur de l'auto-immunité)
- AID: *Activation Induced cytidine Deaminase* (cytidine désaminase induite par l'activation)
- AMP: Adénosine Monophosphate
- AP-1: *Activating Protein 1* (protéine activatrice 1)
- APECED: *Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy* (polyendocrinopathie auto-immune, infections à *Candida* et dystrophie ectodermique)
- ARN: Acide RiboNucléique
- ATP: Adénosine Triphosphate
- aTreg: Lymphocytes T régulateurs activés
- 
- BAFF: *B-cell Activating Factor of the TNF Family* (facteur de la famille du TNF activateur des lymphocytes B)
- BCMA: *B-Cell Maturation Antigen* (antigène de maturation des lymphocytes B)
- 
- CagA: *Cytotoxin associated Antigen* (antigène associé à la cytotoxine)
- CCR/CXCR: *Chemokine Receptor* (Récepteur de chémokines)
- CD: *Cluster of Differentiation* (Groupe de différenciation)
- CDC: Cytotoxicité Dépendante du Complément
- CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CMV: Cytomégalovirus
- CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes
- cTEC: *cortical Thymic Epithelial Cell* (cellules épithéliales thymiques corticales)
- CTLA-4: *Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen-4* (Antigène-4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques)
- 
- DC: Cellules Dendritiques
- 
- EBV: Epstein Barr Virus
- E-NTDase: EctoNucléosides Triphosphate Diphosphonucléotidase
- 
- FcR: Récepteur du fragment commun des immunoglobulines
- Foxp3: *Forkhead/winged-helix box protein 3*
- 
- G-CSF: *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (facteur de stimulation des polynucléaires neutrophiles)
- GITR: *Glucocorticoid-Induced TNF-Receptor family related protein/gene* (gène ou protéine de la famille du récepteur au TNF induite par les glucocorticoïdes)
- GM-CSF: *Granulocyte and Monocyte Colony Stimulating Factor* (facteur de stimulation des polynucléaires neutrophiles et monocytes)
- GP: Glycoprotéine
- 
- HAT: Histone Acétyl Transférase
- HDAC: Histone Désacétylase
- HLA: *Human Leucocyte Antigen* (Antigènes leucocytaires humains, CMH)

HPA: *Human Platelet Antigen* (Antigènes Plaquettaires Humains)

ICAM-1: *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* (molécule d'adhésion intercellulaire 1)

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IgIV: Immunoglobulines polyvalentes IntraVeineuses

I-κB: Inhibiteur-κB

IL: Interleukine

IPEX: *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy and Enterocolopathy X-linked syndrome* (Syndrome de dysfonction immunitaire, polyendocrinopathies et enterocolopathies, lié à l'X)

ITAM : motif activateur dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*)

ITIM : motif inhibiteur dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*)

iTreg: Lymphocyte T régulateurs induits

LAG-3: *Lymphocyte Activation Gene-3* (gène d'activation lymphocytaire 3)

LB: Lymphocyte B

LES: Lupus Erythémateux Systémique

LPS: Lipopolysaccharide

LT: Lymphocyte T

MAI: Maladie Auto-Immune

MAIPA: *Monoclonal Antibodies Immobilization of Platelet Antigens* (Immobilisation des antigènes plaquettaires par anticorps monoclonal)

mTEC: *medullar Thymic Epithelial Cell* (cellules épithéliales thymiques médullaires)

NFAT: *Nuclear Factor Activator Transcriptor* (facteur nucléaire activateur de transcription)

NF-κB: *Nuclear Factor-κB* (facteur nucléaire κB)

NK: cellules *Natural Killer*

NR: Non Réponse

NTP: Nucléoside Triphosphate

nTreg: Lymphocytes T régulateurs naturels ou constitutifs

PALS: *PeriArteriolar Lymphoid Sheath* (manchon lymphocytaire periartériolaire)

PMA: phorbol 12-myristate 23-acetate

PR: Polyarthrite Rhumatoïde

PTI: Purpura Thrombopénique Immunologique / Thrombopénie Immunologique

RC: Réponse Complète

RORγt: *Retinoic acid-related Orphan Receptor-gamma t*

RP: Réponse Partielle

rTreg: Lymphocytes t régulateurs quiescents (*resting Treg*)

RTX: Rituximab

SEP: Sclérose en Plaque

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription* (transducteur du signal et activateur de transcription)

TACI: *Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor* (activateur transmembranaire modulant le calcium et interagissant avec les ligands de la cyclophiline)

TCR: Récepteur des Cellules T

TFH: *T Follicular Helper* (lymphocytes T auxiliaires folliculaires)

TGF- $\beta$ : *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (Facteur de Croissance Transformant- $\beta$ )

TNF: *Tumor Necrosing Factor* (Facteur de Nécrose Tumorale)

TPO: Thrombopoïétine

Treg: Lymphocytes T régulateurs

TSLP: *Thymic Stromal Lymphopoietin* (lymphopoïétine stromale thymique)

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (molécule d'adhésion des cellules vasculaires)

VHC: Virus de l'Hépatite C

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLA-4: *Very Late Activation antigen-1* (Antigène d'activation tardive)

VPM: Volume Plaquettaire Moyen

# INTRODUCTION

## 1. La thrombopénie immunologique (purpura thrombopénique immunologique)

### 1.1. Définition

La thrombopénie immunologique (purpura thrombopénique immunologique / PTI) est une maladie auto-immune (MAI) plurifactorielle, caractérisée par une destruction accélérée des plaquettes d'origine immunologique et une production médullaire inadaptée (Gernsheimer, 2009).

La **définition du PTI** a été précisée récemment (Rodeghiero *et al*, 2009). Tout d'abord, le terme de purpura thrombopénique idiopathique (*Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*, ITP) a été requalifié par ThromboPénie Immunologique (*Immune ThrombocytoPenia*, ITP) compte tenu de l'absence fréquente de purpura au cours de la pathologie, un tiers des patients pouvant être asymptomatique (Frederiksen & Schmidt, 1999), et du caractère immunologique de la destruction plaquettaire.

Le seuil de plaquettes en dessous duquel le diagnostic doit être évoqué est  $100\ 000/\text{mm}^3$  et doit être interprété selon l'origine ethnique, puisqu'il n'est pas rare d'observer un chiffre de plaquettes inférieur à  $150\ 000/\text{mm}^3$  chez les sujets d'origine asiatique, et dans certaines circonstances physiologiques, notamment la grossesse, où une diminution du chiffre plaquettaire en dessous de  $150\ 000/\text{mm}^3$  est fréquent (Boehlen *et al*, 2000).

Sont définis comme secondaires les PTI liés à une pathologie sous jacente (MAI: lupus érythémateux systémique (LES) par exemple, virale: VIH par exemple) ou à une exposition médicamenteuse (Rodeghiero *et al*, 2009). En l'absence de cause retrouvée, on parle de PTI primaire.

Les différentes phases chronologiques de la maladie ont également été renommées. On parle de PTI nouvellement diagnostiqué au cours des 3 premiers mois suivant le diagnostic, de PTI persistant entre 3 et 12 mois et de PTI chronique après 1 an d'évolution. Le terme de réfractaire doit être réservé aux thrombopénies persistantes après splénectomie, chez des patients présentant des manifestations hémorragiques sévères ou à haut risque de saignement (Rodeghiero *et al*, 2009).

La mise en route d'un traitement doit être envisagée lorsque le taux de plaquettes est inférieur à  $30\ 000/\text{mm}^3$  ou en cas de saignement quel que soit le chiffre plaquettaire. La réponse au

traitement est définie par un taux de plaquettes supérieur à 30 000/mm<sup>3</sup> avec au moins doublement du taux mesuré avant initiation de la thérapeutique. On parle de réponse complète (RC) si le taux s'élève au-dessus de 100 000/mm<sup>3</sup>. La non réponse (NR) est définie par un taux de plaquettes restant inférieur à 30 000/mm<sup>3</sup> ou lorsque l'augmentation n'atteint pas le double du taux avant traitement (Rodeghiero *et al*, 2009).

Concernant les **données épidémiologiques**, on évalue le taux d'incidence du PTI entre 1,6 et 6,6/100000/an, selon la région géographique étudiée, Etats-Unis ou Europe (Frederiksen & Schmidt, 1999; Gernsheimer, 2008).

La prévalence ajustée à l'âge, est estimée à 9,5/100000. La prévalence des PTI chroniques, définis dans cette étude par une thrombopénie objectivée par deux prélèvements réalisés à six mois d'intervalle, est plus basse, estimée à 4,5/100000 (Segal & Powe, 2006).

Le taux de mortalité due à une hémorragie est évalué entre 1 et 3 % par an, avec une mortalité à 5 ans pouvant atteindre 47 % chez les patients de plus de 60 ans contre 2,2 % chez les moins de 40 ans (Cohen *et al*, 2000).

La **présentation clinique** est variable d'un individu à l'autre, d'un caractère asymptomatique à la présence de manifestations hémorragiques diverses (purpura pétéchial, ecchymoses, hématomes, hémorragies).

Actuellement, la **prise en charge thérapeutique** est relativement bien codifiée. Sur la base de recommandations d'experts (Godeau & Bierling, 2008; Godeau & Michel, 2010; Godeau *et al*, 2007), l'escalade thérapeutique est la suivante:

- **En première ligne**, les corticoïdes *per os* (prednisone) à la dose de 1mg/kg pendant 3 semaines associés ou non à 1 à 3 bolus de méthylprednisolone constituent le traitement de référence. En cas de risque hémorragique important, idéalement évalué par un score (Khellaf *et al*, 2005), il faut associer un traitement par immunoglobulines intraveineuses (IgIV), plus rapidement efficaces que les bolus de méthylprednisolone (Godeau *et al*, 2002). La dexaméthasone forte dose (40 mg/j pendant 4 jours) est une alternative qui donne également un bon taux de réponse (Cheng *et al*, 2003). Les IgIV peuvent être avantageusement remplacées par un sérum anti-D chez les patients Rhésus positif non

splénectomisés, thérapeutique d'utilisation plus courante aux Etats-Unis qu'en Europe (Aledort *et al*, 2007).

- **En deuxième ligne**, chez les patients présentant un PTI chronique, c'est-à-dire évoluant depuis plus d'un an, la splénectomie devra être proposée (Kojouri *et al*, 2004). En cas de contre indication ou de refus du patient, les agonistes du récepteur de la thrombopoïétine, romiplostim pour l'instant en France et très prochainement eltrombopag, ont une indication (Bussel *et al*, 2008; Bussel *et al*, 2009). Une autre alternative efficace, le rituximab (RTX, Ac anti-CD20), permet d'obtenir une réponse prolongée dans 40% des cas, mais cette thérapeutique n'a cependant pas d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication (Godeau *et al*, 2008). Les patients peu sévères pourront tirer bénéfice d'un traitement par danazol (Maloisel *et al*, 2004) ou dapsons (Damodar *et al*, 2005; Godeau *et al*, 1997).
- Pour les patients présentant un **PTI réfractaire**, c'est-à-dire n'ayant pas répondu à la splénectomie et présentant des saignements ou un risque hémorragique important, le recours aux immunosuppresseurs était généralement nécessaire après échec des corticoïdes, du RTX, du danazol et de la dapsons. L'azathioprine, le cyclophosphamide, la ciclosporine et de façon plus récente le mycophénolate mofetil ont montré leur efficacité dans cette indication (Bussel *et al*, 2007; Bussel *et al*, 2006; Godeau & Bierling, 2008). Cependant, avec la mise à disposition récente des agonistes du récepteur de la thrombopoïétine, le recours aux immunosuppresseurs au cours du PTI deviendra probablement anecdotique.

## 1.2. Physiopathologie de la thrombopénie immunologique: données actuelles

L'ensemble des mécanismes détaillés dans les paragraphes suivants sont schématisés dans la figure 1.

### 1.2.1. *Destruction périphérique des plaquettes*

#### 1.2.1.1. Implication de la réponse humorale

Un des mécanismes impliqués dans la destruction périphérique des plaquettes au cours du PTI est la production d'auto-anticorps (auto-Ac) dirigés contre des antigènes (Ag) plaquettaires. Les principales cibles antigéniques sont des glycoprotéines (GP) plaquettaires, notamment les complexes GPIIb/IIIa, et plus rarement GPIb/IX et GPIa/IIa, qui correspondent respectivement aux récepteurs du fibrinogène, du facteur von Willebrand et du collagène (He *et al*, 1994; van Leeuwen *et al*, 1982). Au cours du PTI, un faible risque hémorragique est observé, du fait du maintien des fonctions



d'hémostase primaire, l'interaction des auto-Ac avec ces Ag plaquettaires n'altérant que rarement leurs fonctions (Rand & Dean, 1998). Par ailleurs, les plaquettes produites au cours du PTI sont des plaquettes jeunes, de plus gros volume. Leur seuil de stimulation pour la sécrétion des protéines participant à l'hémostase, contenues dans les granules  $\alpha$  (facteur von Willebrand, le fibrinogène ou la thrombospondine), est plus bas que les plaquettes de sujets sains ou présentant une thrombopénie d'origine centrale (Rand & Dean, 1998; Rinder *et al*, 1998).

La fixation des auto-Ac est responsable d'une destruction des plaquettes par divers mécanismes : phagocytose par les macrophages, cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) et dans une moindre mesure, cytotoxicité dépendante du complément (CDC).

La maturation et la stimulation des lymphocytes B (LB) auto-réactifs sont en partie médiées par la cytokine BAFF (*B-cell Activator Factor of the TNF family*), dont les taux sériques sont élevés au cours du PTI et se normalisent lorsque la maladie est inactive ou contrôlée par des traitements immunosuppresseurs (Emmerich *et al*, 2007).

#### 1.2.1.2. Destruction splénique par les macrophages

La fixation des auto-Ac à la surface des plaquettes favorise leur phagocytose et leur destruction par les macrophages spléniques, et dans une moindre mesure par les macrophages hépatiques et médullaires (Heyns Adu *et al*, 1986).

Les macrophages spléniques jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la réponse auto-immune au cours du PTI en induisant *in vitro* la prolifération de lymphocytes T (LT) spécifiques de la GPIIb/IIIa. Ils participent aussi à la diversification épitopique (« *epitope spreading* ») en exposant certains épitopes cryptiques de la GPIIb/IIIa (Kuwana *et al*, 2009).

Une hyperactivation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), cellules dendritiques (DC) et macrophages, a été mise en évidence au cours du PTI, comme en témoigne la surexpression de marqueurs de maturation des DC (molécule de costimulation CD86) (Catani *et al*, 2006). L'élévation du taux sérique de GM-CSF au cours du PTI, un des facteurs de croissance principaux des macrophages, peut être interprétée comme un témoin de l'activité du système réticulo-endothélial ou d'un mécanisme de correction de la thrombopénie, puisque cette cytokine agit également comme facteur de croissance des mégacaryocytes, et que ses taux sont normalisés après correction de la thrombopénie (Abboud *et al*, 1996). Par ailleurs, l'apoptose accrue des plaquettes, déterminée par l'expression d'annexine V à leur surface, constitue une source d'Ag pour les DC, qui après activation

sont alors capables d'induire la prolifération des LT spécifiques des Ag plaquettaires (Catani *et al*, 2006).

Les macrophages expriment à leur surface plusieurs types de récepteurs reconnaissant le fragment Fc des IgG qui favorisent la phagocytose des plaquettes recouvertes par les auto-anticorps. Ces récepteurs, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) appartiennent à la superfamille des Ig. Ils présentent des affinités différentes pour les Ig et on distingue les récepteurs de faible affinité (CD32) et ceux de forte affinité (CD64). Par ailleurs, on dénombre plusieurs isoformes capables de transmettre des signaux activateurs ou inhibiteurs après fixation de l'Ig. Ces différences sont liées à l'agrégation de motifs cytoplasmiques différents après fixation de l'Ig. Ainsi, le FcγRIIb, couplé à des motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) transmet un signal inhibiteur, tandis que les autres récepteurs, présentant des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), transmettent un signal activateur. Le signal transmis par la phosphorylation des motifs ITAM induit l'activation de nombreuses fonctions cellulaires, comme la phagocytose, l'ADCC, la sécrétion de médiateurs et l'augmentation de l'apprêtement des antigènes. A l'inverse, les motifs ITIM inhibent l'activation cellulaire (Male D *et al*, 2007). Au cours du PTI, un polymorphisme des FcγR a été incriminé dans la chronicisation de la maladie chez l'enfant, probablement lié à une augmentation de l'affinité des récepteurs pour les Ig (Foster *et al*, 2001), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par une autre étude (Carcao *et al*, 2003). Par ailleurs, un polymorphisme de FcγRIIIa est également impliqué dans la réponse au traitement par le RTX et sera détaillé dans le paragraphe traitant de cette thérapeutique. Pour mémoire, on observe une augmentation du récepteur inhibiteur FcγRIIb chez les patients répondeurs au traitement d'éradication de *Helicobacter pylori*, bactérie impliquée dans certains PTI (Asahi *et al*, 2008). Ainsi, l'éradication de cette bactérie permet dans certains cas une immunomodulation par un rééquilibrage entre récepteurs inhibiteurs et activateurs.

#### 1.2.1.3. Implication des lymphocytes T

Les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> participent à la physiopathologie du PTI. Au cours du PTI, on observe un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur d'une orientation Th1, puisqu'il existe une augmentation de la production d'IFN-γ et une diminution de la sécrétion d'IL-4 par les LT (Stasi *et al*, 2007). Par ailleurs, l'analyse de la région hypervariable (CDR3) de la chaîne β du récepteur des LT (TCR) montre que les LT représentent une population oligoclonale. De façon surprenante, ces anomalies sont réversibles chez les patients répondeurs après rituximab, un traitement anti-

lymphocytaire B (Stasi *et al*, 2007). Dans le même temps, l'engagement dans une voie anti-apoptotique de ces LT auto-réactifs, avec l'augmentation intracellulaire de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) et la diminution de la molécule pro-apoptotique Bax (*Bcl-2 associated X protein*), est également corrigée après traitement (Stasi *et al*, 2007).

Enfin, les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs participent à l'activation et aux processus de maturation d'affinité des LB *via* l'interaction CD40-CD154 au sein des centres germinatifs spléniques au cours du PTI (Kuwana *et al*, 2002a).

L'implication des LT cytotoxiques n'a été que peu étudiée. Il existe cependant une expression accrue des gènes du système perforine/granzyme, protéines impliquées dans la lyse cellulaire, lorsque la maladie est active, ce qui suggère que les LT CD8<sup>+</sup> circulants participent à la destruction des plaquettes (Olsson *et al*, 2003). L'analyse des cytokines intracellulaires chez les patients présentant un PTI montre également un déséquilibre Tc1/Tc2 similaire à celui observé avec les LT auxiliaires (Stasi *et al*, 2007). Enfin, leur recrutement accru au niveau médullaire est responsable d'une destruction de leurs progéniteurs, les mégacaryocytes, ce qui participe au défaut de production des plaquettes (Olsson *et al*, 2008) (cf. infra).

#### 1.2.1.4. Dysrégulation de la réponse immunitaire

La présence de LT autoréactifs, reconnaissant le complexe GPIIb/IIIa, chez des sujets sains mais également chez des patients atteints de PTI (Kuwana *et al*, 1998) laisse supposer une rupture de la tolérance périphérique au cours du PTI. Cette rupture de tolérance pourrait être liée à un défaut quantitatif et/ou qualitatif en LT régulateurs (Treg). Cette sous population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>, d'origine thymique, exprime de façon constitutive et intense le CD25, chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (Sakaguchi *et al*, 2008), et le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*), qui joue un rôle primordial dans leur genèse et dans le maintien de leur fonction immunosuppressive en périphérie (Sakaguchi *et al*, 2008).

L'existence d'un déficit quantitatif en Treg au cours du PTI reste matière à débat. Certains auteurs observent un déficit quantitatif chez les patients comparativement à des sujets témoins (Ling *et al*, 2007; Liu *et al*, 2007a; Sakakura *et al*, 2007; Stasi *et al*, 2008), anomalie corrigée après corticothérapie (Ling *et al*, 2007) ou traitement par rituximab (Stasi *et al*, 2008). A l'inverse, d'autres auteurs notent des taux similaires chez les patients atteints de PTI et les témoins (Bao *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008). Cependant, tous les auteurs rapportent un déficit fonctionnel des Treg au cours du PTI,

se traduisant par une diminution de leur capacité à inhiber la prolifération de LT effecteurs (Bao *et al*, 2010; Ling *et al*, 2007; Stasi *et al*, 2008; Yu *et al*, 2008).

### 1.2.2. Défaut de production médullaire

#### 1.2.2.1. Origine immunologique

Deux mécanismes immunologiques sont impliqués dans la destruction des mégacaryocytes, progéniteurs plaquettaires. D'une part les auto-Ac sont capables de se fixer aux mégacaryocytes qui expriment également à leur surface les complexes GPIIb/IIIa et GPIb/IX. Ceci entraîne une diminution du nombre de mégacaryocytes et de leur maturation au cours du PTI du fait de l'apoptose induite par la fixation des auto-Ac (Houwerzijl *et al*, 2004) et d'une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (McMillan *et al*, 2004). D'autre part, une cytotoxicité des LT CD8<sup>+</sup> est avancée par leur nombre plus important au niveau médullaire des patients atteints de PTI (Olsson *et al*, 2008). Ces LT expriment CX3CR1, récepteur liant la fractalkine, une chémokine présente à taux élevé au niveau de la moelle osseuse des patients, permettant ainsi leur recrutement (Olsson *et al*, 2008).

Dans une moindre mesure, la présence d'auto-Ac dirigés contre le récepteur de la thrombopoïétine (TPO), facteur de croissance principal des mégacaryocytes, a été incriminée. Ces Ac ont été recherchés dans le sérum de 69 patients atteints de LES et 84 patients atteints de PTI (Kuwana *et al*, 2002b). La prévalence a été de 11,6 % au cours du LES et de 8,3 % au cours du PTI alors qu'ils n'ont jamais été détectés chez les 60 sujets sains étudiés. Leur présence est responsable d'un tableau biologique particulier associant une thrombopénie avec hypoplasie mégacaryocytaire et un taux élevé de TPO. Ces Ac inhibent probablement la thrombopoïèse en bloquant la fixation de la TPO à son récepteur (Kuwana *et al*, 2002b).

#### 1.2.2.2. Stimulation médullaire insuffisante

La TPO est le facteur de croissance principal de la mégacaryopoïèse. Produite par le foie de façon constitutive, elle se lie au récepteur c-Mpl (*c-Myeloproliferative leukemia virus oncogene*), présent à la surface des mégacaryocytes mais aussi des plaquettes. Seule la fraction libre de TPO participe à la stimulation des mégacaryocytes. Ainsi, en cas de thrombopénie, le facteur de croissance est disponible au niveau médullaire, alors qu'en cas de thrombocytose, une grande partie de la TPO est fixée et dégradée par les plaquettes (Deutsch & Tomer, 2006).

Cependant, au cours du PTI, on observe une faible concentration sérique de TPO comparativement à des sujets atteints de thrombopénie d'origine centrale (Kosugi *et al*, 1996). En fait, la masse plaquettaire gagnant la circulation périphérique étant proche de celle des sujets sains au cours du PTI, la fraction libre de TPO est donc basse, n'entraînant pas de réponse médullaire accrue.

### 1.2.3. Implications des facteurs génétiques et environnementaux

#### 1.2.3.1. Génétique

Contrairement à d'autres MAI, il n'existe que peu d'arguments en faveur d'une susceptibilité génétique au cours du PTI. Seule une association faible avec le HLA DR4 (DRB1\*0410) a été montrée au sein de la population japonaise (Nomura *et al*, 1998). Récemment, un polymorphisme de MICA (gène A associé au Complexe Majeur d'histocompatibilité de classe I) a également été identifié et pourrait jouer un rôle dans les mécanismes d'auto-immunité, MICA étant le ligand d'un récepteur situé à la surface de cellules *natural killer* (NK), NKG2D (*Natural Killer cell receptor G2D*) (Maia *et al*, 2009).

Un polymorphisme des gènes des récepteurs du fragment Fc des IgG (FcγR) a été incriminé. En effet, certains allèles des récepteurs de faible affinité FcγRIIIa et FcγRIIIb, présents à la surface des monocytes et des cellules NK, semblent prédisposer à la chronicisation du PTI chez l'enfant. Le mécanisme suspecté est une augmentation de leur affinité pour les immunoglobulines (Ig) recouvrant les plaquettes, favorisant ainsi la phagocytose (Foster *et al*, 2001).

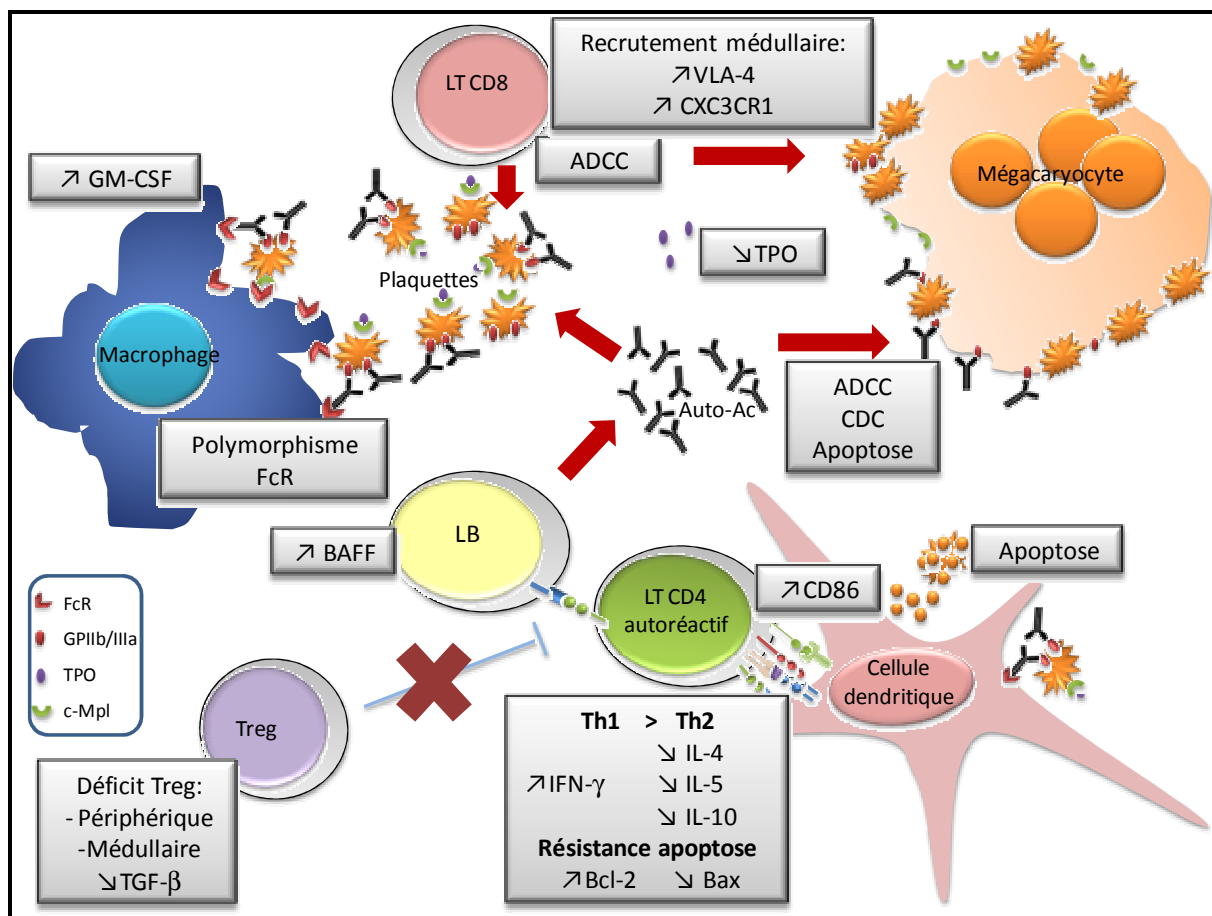
Enfin, un polymorphisme de BAFF, entraînant à l'état homozygote une élévation du taux sérique de cette cytokine, est observé chez 28 % des patients atteints de PTI contre 10 % des sujets sains (Emmerich *et al*, 2007). Ses récepteurs, BAFF-R (*B-cell Activator Factor of the TNF family Receptor*), BCMA (*B cell maturation antigen*) et TACI (*Transmembrane activator and CAML interactor protein*), sont principalement exprimés à la surface des LB mais aussi à la surface de nombreuses autres CPA. BAFF est produite par les monocytes-macrophages, les DC et les LT. BAFF intervient dans le développement et la survie des LB, la formation des centres germinatifs ainsi que la commutation de classe des Ig (Bossen & Schneider, 2006).

Pour toutes ces raisons, BAFF est donc une cytokine clé, qui régule positivement les réponses immunitaires innée et B, qu'elle soit T-indépendante ou T-dépendante.

#### 1.2.3.2. Environnement

De multiples infections virales [VIH, virus de l'hépatite C, cytomégalovirus, Epstein Barr Virus (EBV)] ou bactériennes peuvent participer au déclenchement du PTI (Cines *et al*, 2009; Liebman, 2008). Les mécanismes impliqués sont multiples : dysrégulation cellulaire T et effet cytopathogène direct dirigé contre les mégacaryocytes qui expriment le CD4 pour le VIH (Cines *et al*, 2009), stimulation polyclonale des LB pour EBV. Enfin, des phénomènes de mimétisme moléculaire sont suspectés pour *Helicobacter pylori* dont la protéine CagA, exprimée par certaines souches, partagerait des déterminants antigéniques avec des glycoprotéines plaquettaires (Takahashi *et al*, 2004). Ces phénomènes de mimétisme moléculaire sont clairement identifiés pour la GPIIIa et la particule virale GP120 du VIH (Bettaieb *et al*, 1996) ainsi que pour une protéine du VHC (*core envelope 1*) (Zhang *et al*, 2008).

De façon non spécifique, des complexes immuns circulants liés aux infections par les virus des hépatites B et C peuvent également se fixer à la surface des plaquettes et ainsi accélérer leur clairance (Doi *et al*, 2002).



**Figure 1: Physiopathologie du PTI**

Les cellules dendritiques et les macrophages sont capables de présenter des auto-antigènes dérivés des plaquettes. Ceci permet l'activation des LT CD4<sup>+</sup> autoréactifs, dont la coopération avec les LB reconnaissant ces mêmes antigènes, entraîne la production d'auto-anticorps de classe IgG. Ces auto-anticorps, en reconnaissant certaines GP membranaires, dont la GPIIb/IIIa, facilitent la phagocytose des plaquettes par le système phagocytaire splénique.

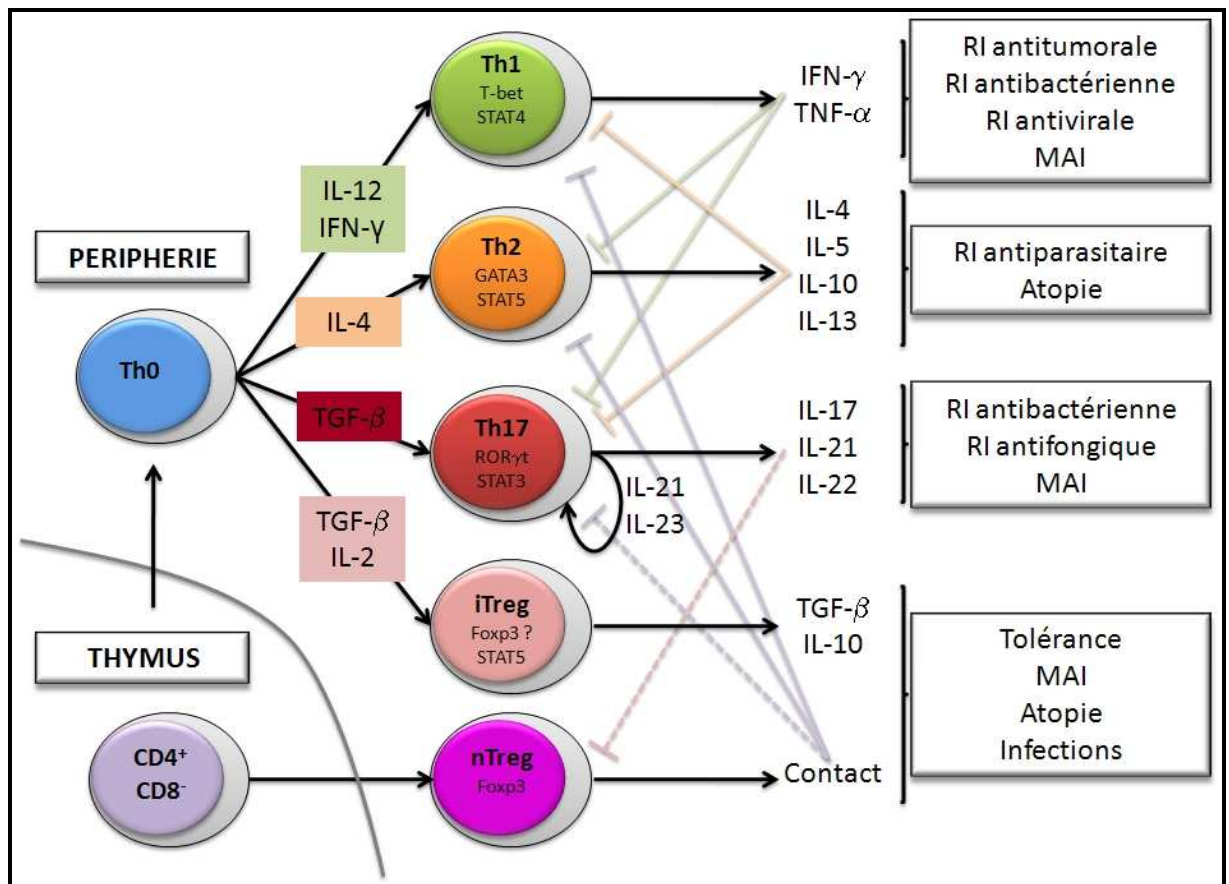
Un défaut de production médullaire des plaquettes est lié d'une part à une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et du complément dirigée contre les mégacaryocytes qui expriment la GPIIb/IIIa, d'autre part à l'absence d'élévation de la concentration en thrombopoïétine.

Il existe aussi un déséquilibre de l'expression des molécules pro- et anti-apoptotiques responsables d'une apoptose accrue des mégacaryocytes et des plaquettes, et à l'inverse, d'une résistance à l'apoptose des LT autoréactifs par surexpression de Bcl-2.

Un déficit périphérique et médullaire, fonctionnel et/ou quantitatif des Treg se traduit par un défaut de régulation de la réponse immunitaire. L'orientation vers une réponse Th1 permet l'activation des LT cytotoxiques, dont le recrutement au niveau médullaire est favorisé par la surexpression de la molécule d'adhésion VLA-4 et le récepteur de la chémokine CX3CR1.

L'augmentation de diverses cytokines dont BAFF qui active les LB, et GM-CSF, qui participe à l'activation des macrophages entraîne une hyperstimulation de ces cellules. Enfin, des prédispositions génétiques pourraient jouer un rôle favorisant notamment liées à un polymorphisme des FcR.

(Ac: anticorps; ADCC: cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps; CDC: cytotoxicité dépendante du complément; c-Mpl: récepteur de la thrombopoïétine; FcR: récepteur du fragment commun des immunoglobulines; TPO: thrombopoïétine)



**Figure 2: Différentes réponses immunitaires T**

Un lymphocyte T naïf périphérique se différencie sous l'influence du microenvironnement cytokinique en diverses populations aux implications physiologiques et physiopathologiques différentes. Une population lymphocytaire induite en périphérie (iTreg) ou constitutive, provenant du thymus (nTreg) participe à la régulation de la réponse immunitaire.

(IL: interleukine ; iTreg: lymphocytes T régulateurs induits ; MAI: maladies auto-immunes ; nTreg: lymphocytes T régulateurs constitutifs ; RI: Réponse Immunitaire ; ROR $\gamma$ t : *retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$ t*; STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*)



## 2. Polarisation de la réponse immunitaire T et lymphocytes T régulateurs

### 2.1. Polarisation Th1, Th2, Th17

On distingue plusieurs types de réponse immunitaire selon l'orientation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs, appelés Th0 (Figure 2). Une orientation Th1, sous la dépendance des facteurs de transcription T-bet et STAT4, conduit à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , entraînant la production d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . La réponse Th1 est impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, responsable d'une activation des LT cytotoxiques, et participe à la réponse antitumorale, antivirale et contre les bactéries intracellulaires. Elle est également impliquée dans de nombreuses MAI. Un environnement riche en IL-12 va orienter les cellules Th0 vers une réponse Th1, alors que l'IL-4 entraîne une réponse Th2. Les lymphocytes Th2 vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 sous la dépendance des facteurs de transcription STAT5 et GATA3. Ces cytokines activent les LB et favorisent la réponse immunitaire humorale. Un déséquilibre vers la voie Th2 intervient principalement au cours de l'atopie. Ces populations Th1 et Th2 ont un rôle antagoniste en s'inhibant mutuellement *via* l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 (Liew, 2002).

Au cours du PTI, il existe une polarisation Th1. Cette réponse permet l'activation des LT cytotoxiques qui jouent un rôle dans la destruction plaquettaire au cours du PTI. l'action des LT CD8<sup>+</sup> au cours du PTI est double : d'une part au niveau périphérique par une action cytotoxique sur les plaquettes (Olsson *et al*, 2003) ; d'autre part par une action sur les mégacaryocytes, leur recrutement médullaire étant augmenté (Olsson *et al*, 2008). Cependant, le site de destruction des plaquettes par les LT CD8<sup>+</sup> n'est pour l'instant pas connu et pourrait tout à fait être la rate qui contient à la fois les plaquettes et les LT CD8<sup>+</sup>.

La réponse Th17 est de découverte plus récente. Responsable d'une réponse inflammatoire importante, elle participe à la défense contre les germes extracellulaires, les champignons et est également impliquée dans les mécanismes d'auto-immunité (Afzali *et al*, 2007). La différenciation des cellules Th0 en TH17 se fait sous l'action conjointe de l'IL-6 et du TGF- $\beta$  chez la souris. Chez l'homme, le rôle de l'IL-6 est moins évident et le TGF- $\beta$  intervient de façon indirecte en inhibant la polarisation Th1. Une boucle d'amplification est ensuite créée par sécrétion autocrine et paracrine d'IL-21. Enfin, l'IL-23 permet une stabilisation de la lignée cellulaire et est nécessaire à la survie des lymphocytes Th17. Le facteur de transcription principal est ROR $\gamma$ t (*retinoic acid-related orphan receptor-gamma t*). Les Th17 sécrètent de l'IL-17 et IL-21 à activité pro-inflammatoire. Les cellules

Th1 et Th2 ont un effet répresseur sur la différenciation en cellules Th17, par la sécrétion respective d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 (Bettelli *et al*, 2007; Steinman, 2007). Plusieurs MAI, notamment la PR étaient jusqu'à présent considérées comme des pathologies à médiation Th1. Depuis la découverte des lymphocytes Th17, ces considérations ont évolué. Au cours de la PR, les lymphocytes Th17 jouent un rôle important notamment au niveau articulaire, en augmentant la production de métalloprotéases, en stimulant les ostéoclastes et en inhibant la prolifération des chondrocytes (McInnes & Schett, 2007). Par ailleurs, les lymphocytes Th17 inhibent la différenciation en lymphocytes Th1 par régulation négative de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-12, les lymphocytes Th1 jouant plutôt un rôle protecteur dans au cours de la PR (Toh *et al*, 2010).

Le PTI étant une maladie décrite comme à médiation Th1, le rôle des Th17 mérite également d'être étudié. A ce jour, quelques études ont déjà été réalisées par deux équipes à partir des lymphocytes circulants, avec des résultats discordants, les lymphocytes Th17 étant tantôt élevés (Zhang *et al*, 2009; Zhu *et al*, 2010), tantôt à des taux similaires à ceux des témoins (Guo *et al*, 2009; Ma *et al*, 2008).

D'autres sous-populations de LT ont été récemment décrites : les lymphocytes Th22 (producteurs d'IL-22), les lymphocytes Th9 (producteurs d'IL-9 et d'IL-10) et les lymphocytes Th17 ou lymphocytes T auxiliaires folliculaires (*T follicular helper*) qui coopèrent avec les LB au niveau du follicule secondaire. Leurs rôles en physiologie et surtout en physiopathologie sont encore très mal connus (Annunziato & Romagnani, 2009; King, 2009).

Récemment, il a été montré que cette polarisation Th1, Th2, Th17 ou Treg n'était pas un processus définitif puisqu'en fonction de l'environnement cytokinique local, les LT pouvaient évoluer notamment de Th17 à Th1, de Treg à Th17, ou de Th2 à Th9. En fait, à un état précoce de différenciation, l'ensemble des LT (Th1, Th2, Th17 ou Treg) peut être facilement redirigé vers un autre sous-type de polarisation (Annunziato & Romagnani, 2009; Bluestone *et al*, 2009; Peck & Mellins, 2010). Par exemple, des lymphocytes Th2 cultivés en présence d'IL-12 sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$ . En revanche, à un stade tardif de différenciation, seuls les lymphocytes Th17 et les Treg gardent une plasticité, les lymphocytes Th1 et Th2 étant différenciés de façon terminale (Zhu & Paul, 2010). Les Treg peuvent également, dans un environnement pro-inflammatoire constitué de CPA allogéniques, d'IL-2 ou d'IL-15, se différencier en lymphocytes Th17 (Koenen *et al*, 2008). Ainsi, le microenvironnement cytokinique local, conséquence de la réaction immunitaire innée et aussi adaptative, est donc capital dans l'orientation initiale de la réponse immunitaire mais aussi dans son évolution dans le temps. Il est donc fort probable qu'il existe au cours des MAI et du PTI, des

perturbations de ce microenvironnement, responsables de la chronicisation inadaptée d'une réponse immunitaire autoréactive.

Ces données permettent une approche « dynamique » et non pas « figée » de la réponse immunitaire. Elles mettent en avant le rôle primordial du microenvironnement cytokinique ainsi que les possibilités de réorientation de la réponse immunitaire lorsque les cellules ne sont pas engagées dans une différenciation terminale. Ainsi, un LT pourra subir des polarisations différentes au cours de sa vie, selon les proportions relatives des différents facteurs de transcriptions à un instant  $t$ , eux-mêmes régulés par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques (O'Shea & Paul, 2010). Cette notion de plasticité est probablement impliquée dans les réponses variables aux traitements observées d'un patient à l'autre, influencées par le stade de différenciation des lymphocytes. Ainsi, Stasi a montré qu'après traitement par RTX, un rétablissement de l'équilibre Th1/Th2 était observé chez les patients répondeurs contrairement aux sujets non répondeurs (Stasi *et al*, 2007). Ces considérations suggèrent qu'un traitement précoce permettrait un meilleur taux de réponse, avant que l'engagement des LT dans une voie ne soit irréversible.

## 2.2. Lymphocytes T régulateurs

### 2.2.1. *Définition des lymphocytes T régulateurs*

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population lymphocytaire aux propriétés immunorégulatrices. Leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles seront détaillées successivement.

#### 2.2.1.1. Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T régulateurs « naturels »

##### 2.2.1.1.1. Expression membranaire constitutive de CD25

Le CD25 correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2. Il s'agit d'un marqueur membranaire non spécifique puisque exprimé par les LT effecteurs après activation. Cependant, les Treg expriment cette molécule de façon constitutive avec une forte intensité et ils ont longtemps été identifiés par le phénotype  $CD4^+CD25^{High}$ , bien que la limite retenue en analyse par cytométrie en flux reste sujet à débat (Baecher-Allan *et al*, 2005). Contrairement aux LT effecteurs, les Treg ne sécrètent pas d'IL-2 après stimulation, le facteur de transcription Foxp3 agissant comme répresseur du gène de cette cytokine (Bettelli *et al*, 2005; Wu *et al*, 2006). C'est la sécrétion paracrine d'IL-2 par les LT effecteurs qui participe à la survie des Treg (Setoguchi *et al*, 2005) et à leur activation, *in vitro* et *in vivo* comme cela a été observé chez la souris (Brandenburg *et al*, 2008; de la Rosa *et al*, 2004). Cette cytokine est

primordiale pour la genèse des Treg, les souris déficientes en IL-2 mourant rapidement de manifestations auto-immunes et d'un syndrome lymphoprolifératif (Antony *et al*, 2006). De même, un défaut de signalisation de la voie de transduction du récepteur de l'IL-2 entraîne la survenue de manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg. Une mutation du récepteur de l'IL-2 a été identifiée chez l'homme, responsable d'un syndrome lymphoprolifératif, d'une susceptibilité aux infections et de manifestations auto-immunes (Sharfe *et al*, 1997). De plus, chez la souris, l'utilisation d'un Ac monoclonal anti-IL-2 entraîne une déplétion transitoire des Treg, accompagnée de manifestations auto-immunes (Setoguchi *et al*, 2005).

La surexpression de CD25 participe à l'activité immunomodulatrice des Treg en constituant une niche pour l'IL-2, qui n'est alors plus utilisable par les LT effecteurs pour le maintien de leur activation (Pandiyan *et al*, 2007). En effet, la sécrétion autocrine d'IL-2 constitue le 3<sup>ème</sup> signal d'activation des lymphocytes et son absence, alors qu'ils subissent une stimulation *via* leur TCR, entraîne un état d'anergie. Les Treg sont également capables, chez la souris, d'inhiber directement la synthèse d'ARN messenger de l'IL-2, le mécanisme impliqué demeurant inconnu (Thornton & Shevach, 1998). Par ailleurs, la déplétion du milieu en IL-2 inhibe la différenciation et l'activation des LT effecteurs. En effet, l'IL-2 participe à la différenciation des LT naïfs vers les voies Th1 et Th2 et est indispensable à leur activation et à leur survie (Scheffold *et al*, 2005).

Se reporter à la figure 3 de l'article :

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775-787.

### **Figure 3: Facteur de transcription Foxp3**

Foxp3 est capable de se lier à plusieurs autres facteurs de transcription (NFAT, AML1/Runx1) et d'en modifier les fonctions. En sa présence, il existe une inhibition de transcription des gènes de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ , alors que les gènes du récepteur de l'IL-2 (CD25) et de CTLA-4 sont activés. Ceci permet une différenciation en lymphocytes T régulateurs. D'après (Sakaguchi *et al*, 2008).

#### 2.2.1.1.2. Facteur de transcription Foxp3

Foxp3 (*Forkhead/winged helix box protein 3*) est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de l'expression de plus de 700 gènes, dont seulement 10 % sont directement sous son contrôle (Marson *et al*, 2007; Zheng *et al*, 2007). Foxp3 agit sous forme oligomérique en se liant à d'autres facteurs de transcription, notamment NFAT, NF- $\kappa$ B, AML1/Runx1 et les complexes HAT/HDAC (Figure 3). Il est capable de réprimer les gènes de l'IL-2, du CD127 alors qu'il stimule l'expression de GITR et CTLA-4 (Yagi *et al*, 2004). Chez la souris comme chez l'homme, un déficit en Foxp3 entraîne des manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg, ce facteur de transcription étant primordial pour la genèse thymique des Treg (Fontenot *et al*, 2003). Foxp3 a donc été considéré comme un marqueur spécifique des Treg. Cependant, si cela est vrai chez la souris, chez l'homme, après stimulation *via* leur TCR, les LT effecteurs sont aussi capables d'exprimer Foxp3, de façon moindre et transitoire, associé (Pillai *et al*, 2007) ou non à des fonctions régulatrices (Morgan *et al*, 2005). Par ailleurs, la transfection de Foxp3 à des LT entraîne une anergie, l'absence de sécrétion de cytokines, notamment l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ , et une activité régulatrice variable selon les études (Allan *et al*, 2005; Bettelli *et al*, 2005; Yagi *et al*, 2004). Foxp3 est donc capable, du fait de son interaction avec certains facteurs de transcription, de détourner la machinerie transcriptionnelle, orientant ainsi les LT effecteurs vers des Treg. Cependant, l'absence de corrélation entre l'expression de Foxp3 et la présence de propriétés immunorégulatrices ne fait pas de Foxp3 un marqueur totalement spécifique des Treg humains.

Un lien entre les Treg et les lymphocytes Th17, et par extension entre tolérance et réponse inflammatoire, a été suggéré chez la souris. En effet, Foxp3 inhibe également le facteur de transcription ROR $\gamma$ t, impliqué dans la différenciation Th17. De même, la présence de TGF- $\beta$  dans l'environnement cellulaire peut générer des Treg, tandis qu'associée à l'IL-6, la différenciation vers la voie Th17 sera privilégiée (Bettelli *et al*, 2006). Chez l'homme, ces constatations n'ont pas été vérifiées, par contre une plasticité entre lymphocytes Th17 et Treg est possible, et fait intervenir l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23. En effet, des Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) stimulés par des CPA en présence d'IL-2 et/ou d'IL-15 sont capables de se différencier en lymphocytes Th17, exprimant ROR $\gamma$ t et sécrétant de l'IL-17 (Koenen *et al*, 2008). Cette différenciation est augmentée en présence d'IL-1 $\beta$  et dans une moindre mesure par ajout d'IL-23 et d'IL-21. L'IL-6 et le TGF- $\beta$  n'ont quant à eux aucun impact. Ces nouvelles connaissances soulignent ainsi les interactions possibles entre Treg et Th17 dans la genèse des MAI par déséquilibre de la balance tolérance/immunité. L'implication des Treg

dans la physiopathologie du PTI incite donc à vérifier l'équilibre entre Treg et Th17. En effet, puisqu'il existe un déficit quantitatif et fonctionnel des Treg au cours du PTI, on peut supposer que les lymphocytes Th17 sont augmentés.

#### 2.2.1.1.3. Autres marqueurs

**CD152 (CTLA-4)** est également exprimé de façon constitutive par les Treg, principalement dans le compartiment intracellulaire. Les LT naïfs ne l'expriment à leur surface qu'après activation, de façon retardée et transitoire, ce qui permet la régulation de la réponse immunitaire par interaction avec CD80 et CD86, stoppant le 2<sup>ème</sup> signal activateur impliquant CD28 et ces molécules de costimulation. CTLA-4 joue un rôle important dans les phénomènes de tolérance. Après activation des Treg, CD152 est exprimé à la surface et interagit avec les molécules de costimulation CD80 et CD86, exprimées à la membrane des DC (Manzotti *et al*, 2002). Chez la souris, les Treg induisent l'expression par les DC d'une enzyme, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), capable de cataboliser le tryptophane, acide aminé essentiel à la survie et à la prolifération des lymphocytes, en kynurénines. L'induction de cette expression, en l'absence de signaux danger comme le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, est sous la dépendance de l'interaction CTLA-4/CD86. En présence de LPS, c'est l'IL-10 sécrétée par les Treg qui permet la modulation de l'expression de cette enzyme. L'action de cette enzyme est donc double, d'une part par privation d'un acide aminé essentiel, d'autre part par production de métabolites (kynurénines) exerçant une action inhibitrice sur les lymphocytes (Fallarino *et al*, 2003). Les Treg participent ainsi à l'induction de DC tolérogènes. Du fait des anomalies des Treg au cours du PTI, on peut supposer qu'il existe un défaut d'induction de l'IDO au niveau des DC, notamment au niveau splénique, ce qui n'a pas été étudié à ce jour.

De plus, CD152 interagit directement avec CD80 exprimé à la surface des LT effecteurs, entraînant leur inhibition. En effet, les Treg ne peuvent réguler les LT effecteurs issus de souris déficientes en CD80 (Paust *et al*, 2004). Cependant, CD152 n'est pas indispensable aux mécanismes de régulation, puisque les souris déficientes pour cette molécule présentent des Treg fonctionnels. Par ailleurs, l'utilisation d'un Ac bloquant le CD152 n'abroge pas les fonctions régulatrices des Treg humains (Jonuleit *et al*, 2001).

**GITR (*Glucocorticoid Induced TNF Receptor family related gene*)** est fortement exprimé à la surface des Treg, alors que les LT, LB, DC et macrophages ne l'expriment que faiblement, cette

expression étant accrue après activation. Aussi, après activation par un signal danger *via* les récepteurs toll-like, les DC expriment également le ligand de GITR (GITR-L), qui en liant son récepteur à la surface des Treg, inhibe leurs fonctions régulatrices (Shimizu *et al*, 2002). Ainsi, GITR pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité des Treg, c'est-à-dire la contre-régulation. Les macrophages jouent un rôle important dans l'activation des LT au cours du PTI. Expriment fortement GITR-L, ils participent peut-être à l'inhibition des Treg au cours du PTI, ce qui n'a pas été étudié jusqu'à présent.

L'expression de **CD127** (chaîne  $\alpha$  du récepteur membranaire à l'IL-7) pourrait permettre une distinction entre Treg et LT activés. En effet, cette molécule est peu exprimée à la surface des Treg, tandis qu'une expression importante est observée à la surface des LT après activation (Seddiki *et al*, 2006). De plus, son expression est inversement corrélée à celle de Foxp3, ce qui confirme son intérêt dans l'identification et l'isolement des Treg (Liu *et al*, 2006; Seddiki *et al*, 2006).

**CD95 (Fas)** est un récepteur de mort. La liaison à son ligand, CD95L (FasL) entraîne l'apoptose de la cellule. CD95 est exprimé de façon constitutive et importante à la surface des Treg (Fritzsching *et al*, 2005; Wing *et al*, 2002). Il ne constitue pas un marqueur spécifique puisque retrouvé à la surface de nombreux autres types cellulaires, cependant, il intervient probablement dans l'homéostasie des Treg. En effet, cette expression constitutive de CD95 rend les Treg très sensibles à la mort cellulaire induite par FasL, contrairement aux LT activés. Cette différence pourrait avoir un rôle notamment lors de l'initiation de la réponse inflammatoire, au cours de processus infectieux par exemple. L'expression de FasL par les cellules infectées entraîne alors une diminution des Treg permettant une réponse anti-infectieuse efficace (Fritzsching *et al*, 2005). On sait que FasL est exprimé de façon plus importante à la surface des lymphocytes Th1 et Th2 sanguins des sujets atteints de PTI (Stasi *et al*, 2007). Cette surexpression reste présente chez les patients en rémission. L'interaction possible avec les Treg et notamment l'induction de leur apoptose pourrait constituer un mécanisme de régulation des Treg au cours du PTI. En effet, il a été montré qu'après activation, les Treg surexpriment à la fois CD95 et CD95L. CD95L participe à l'induction d'apoptose de LT CD8<sup>+</sup> tandis que les LT CD4<sup>+</sup> ne sont pas sensibles à ce mécanisme de régulation, le système perforine/granzyme étant prédominant. Au contraire, lorsque les concentrations d'IL-2 du milieu de culture sont faibles, ce sont les Treg qui meurent par apoptose, ce qui correspond à un phénomène de mort induite par activation (*activation-induced cell death*, AICD) (Strauss *et al*, 2009).

**CD39** appartient à la famille des ectonucléoside triphosphate diphosphonucléotidases (E-NTPDases), enzymes capables de métaboliser les nucléosides triphosphates (NTP), dont l'ATP en



AMP. L'ATP, outre son rôle dans le métabolisme énergétique, est également un médiateur intercellulaire, notamment au niveau du système nerveux central. Il constitue ainsi un signal danger. En effet, la libération massive d'ATP lors de la lyse cellulaire entraîne la sécrétion par les monocytes d'IL-1 $\beta$ , principale cytokine pro-inflammatoire, et exerce une activité chimio-attractrice envers les DC. L'ATP joue donc un rôle pro-inflammatoire qui peut être inhibé par sa dégradation par le CD39. Cette molécule est exprimée à la surface des DC, des LB et LT activés, mais également, et ce de façon constitutive, à la surface des Treg mémoires humains exprimant CD45RO et CCR6. Chez la souris, pour que cette enzyme soit active, il est nécessaire que les Treg soient stimulés (Borsellino *et al*, 2007). CD39 est couplé à CD73, une autre ectonucléosidase, capable de cataboliser l'AMP en adénosine, ce dernier inhibant la réponse cellulaire T (Deaglio *et al*, 2007). CD39 ne constitue donc pas un marqueur spécifique, mais suggère un nouveau mécanisme d'action dans le contrôle de la régulation immunitaire par les Treg, par dégradation de l'ATP extracellulaire, pro-inflammatoire, en adénosine, à activité anti-inflammatoire.

**CD223** (ou **LAG-3: Lymphocyte Activation Gene-3**) est exprimé à la surface des Treg seulement après stimulation. Il s'agit d'une molécule d'adhésion associée au CD4, capable de lier le CMH-II. LAG-3 interviendrait dans les fonctions suppressives dépendantes du contact, bien que les souris invalidées pour le gène LAG-3 ne présentent pas de déficit fonctionnel ou quantitatif en Treg. L'utilisation d'un Ac bloquant LAG-3 entraîne cependant une diminution des fonctions suppressives des Treg et la transfection de LT naïfs avec LAG-3 leur confère un état d'anergie et une fonction suppressive dépendante du contact. Comme de nombreux autres marqueurs, LAG-3 est également détecté chez les LT effecteurs après activation (Huang *et al*, 2004).

**CD62-L** est une sélectine impliquée dans la migration (*homing*) des lymphocytes aux ganglions lymphatiques. Les Treg expriment cette molécule membranaire à l'état naïf, et conservent un haut niveau d'expression après activation (Baecher-Allan *et al*, 2005; Valmori *et al*, 2005). Ceci traduit donc qu'après contact avec leur Ag, les Treg sont capables de gagner les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent réguler l'initiation de la réponse immunitaire.

**TGF- $\beta$**  est une cytokine anti-inflammatoire qui peut également être exprimée à la surface cellulaire. Les Treg expriment TGF- $\beta$  de façon croissante après stimulation. Le TGF- $\beta$  membranaire est impliqué dans les mécanismes d'inhibition de la prolifération et de la sécrétion des Ig par les LB chez la souris (Nakamura *et al*, 2001) et de la prolifération des NK chez l'homme (Ralainirina *et al*, 2007; Romagnani *et al*, 2005; Trzonkowski *et al*, 2004). Cependant, les souris dont le gène de TGF- $\beta$  est invalidé, présentent un taux diminué de Treg qui gardent cependant une activité suppressive. Ceci

fait donc envisager un rôle plus important du TGF- $\beta$  dans l'homéostasie des Treg que dans leur activité immunorégulatrice (Huber *et al*, 2004).

**CD45** est un marqueur panleucocytaire à activité tyrosine phosphatase essentiel pour une transduction efficace du signal *via* les récepteurs T et B (Tchilian & Beverley, 2006). Ses différentes isoformes permettent de caractériser les stades de différenciation et d'activation des lymphocytes et ainsi de distinguer les LT naïfs CD45RA<sup>+</sup> et les LT mémoires CD45RO<sup>+</sup> (Tchilian & Beverley, 2006). Récemment, une distinction de différentes sous-populations de Treg a été apportée en fonction de l'expression des différentes isoformes de ce marqueur et de l'intensité d'expression de Foxp3 (Miyara *et al*, 2009). Les auteurs distinguent 3 types de cellules exprimant Foxp3 aux propriétés différentes: d'un côté les LT sécréteurs de cytokines (CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>low</sup>), dénués d'activité immunosuppressive ne constituant donc pas des Treg, et d'un autre côté les Treg présentant une activité immunosuppressive, scindés en deux groupes : les Treg activés (*activated Treg* ou aTreg, CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>high</sup>), à l'activité immunosuppressive importante et les Treg quiescents (*resting Treg* ou rTreg, CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup>), capables de proliférer et de se différencier en aTreg.

**ICOS (Inductible COStimulator)** est une protéine membranaire non spécifique des Treg, exprimée à la surface des LT après activation. Son ligand, ICOS-L, est exprimé de façon constitutive à la surface des DC et des monocytes, l'expression sur ces derniers étant augmentée par l'IFN- $\gamma$  (Collins *et al*, 2005). ICOS permet de distinguer deux types de Treg (Ito *et al*, 2008). Les Treg ICOS<sup>-</sup> expriment intensément le TGF- $\beta$  à leur surface, et leur fonction immunorégulatrice, médiée par cette molécule, est dépendante du contact et s'exerce directement sur les LT effecteurs. Les Treg ICOS<sup>+</sup>, quant à eux, sécrètent de grande quantité d'IL-10 capable d'inhiber la maturation des DC *in vitro*. Ils expriment également le TGF- $\beta$  à leur membrane. Leur fonction immunosuppressive est complètement abrogée par utilisation d'Ac anti-IL-10 et anti-TGF- $\beta$ . Ils présentent également une apoptose accrue en l'absence d'IL-2, rendant ainsi difficile l'analyse de leur fonction *in vitro* lors de cocultures prolongées. Ainsi, la notion d'immunosuppression dépendant exclusivement du contact est peut-être erronée et liée au fait que les Treg agissant par sécrétion d'IL-10, meurent en cours d'expérimentation. Par ailleurs, leur action n'est pas directement dirigée contre les LT effecteurs mais passe par une régulation des fonctions des DC. Ces deux populations ont également un comportement différent lors de la stimulation par un Ac anti-CD28: les Treg ICOS<sup>-</sup> prolifèrent, tandis que la prolifération des Treg ICOS<sup>+</sup> est inhibée. Ainsi, les techniques utilisées pour étudier leur fonctionnalité restent imparfaites. Si la coculture ne comprend que des LT effecteurs stimulés par des Ac anti-CD3 et anti-CD28, d'une part l'étude fonctionnelle des Treg ICOS<sup>+</sup> est exclue puisqu'elle

passer par une sécrétion d'IL-10 agissant sur les DC, d'autre part la notion d'anergie des Treg (cf infra) est à relativiser puisque les Treg ICOS<sup>-</sup> sont capables de proliférer. De fait, la mesure d'incorporation de thymidine tritiée pour étudier la prolifération des LT effecteurs et par extension l'activité immunosuppressive des Treg peut être perturbée, notamment dans les puits contenant des LT effecteurs et des Treg. Une autre méthode d'analyse est donc la technique de marquage par CFSE (*CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*) des LT effecteurs, qui permet d'étudier de façon exclusive leur prolifération, en excluant les Treg de l'analyse (Miyara *et al*, 2009).

En résumé, l'identification phénotypique des Treg est rendue difficile par l'absence de marqueurs spécifiques. Ceci rend l'interprétation des données de la littérature délicate puisque les phénotypes étudiés ne sont pas toujours les mêmes et ont évolué avec la découverte de nouveaux marqueurs. Il est donc probable que certaines discordances concernant les taux de Treg observés au cours d'une même pathologie soient en partie liées à des définitions phénotypiques différentes. Pour exemple, au cours du PTI, les taux de Treg circulants sont considérés comme abaissés (Ling *et al*, 2007; Liu *et al*, 2007a; Sakakura *et al*, 2007; Stasi *et al*, 2008) ou similaires aux témoins (Bao *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008). Cependant, les phénotypes utilisés pour définir les Treg varient d'une étude à l'autre : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> (Liu *et al*, 2007a; Sakakura *et al*, 2007), CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Ling *et al*, 2007; Stasi *et al*, 2008) ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Bao *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008).

Par ailleurs, la sélection des Treg, pour étudier leur fonctionnalité *in vitro*, est également délicate du fait de l'impossibilité d'utiliser les marqueurs intracellulaires, qui nécessitent une perméabilisation des cellules et entraînent donc leur mort. Là encore, CD127 apportera peut être une amélioration de cette sélection, puisque les cellules au phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>CD127<sup>-</sup> constituent le pool de Treg, permettant ainsi d'exclure les LT activés, au phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> (Seddiki *et al*, 2006). La sélection des Treg peut donc être réalisée à partir de cellules mononucléées sanguines par une première étape de sélection négative permettant d'obtenir une population CD4<sup>+</sup> déplétée en cellules exprimant le CD127, puis par une sélection positive des cellules exprimant fortement CD25. Elle peut également se faire par tri en cytométrie en flux, en sélectionnant directement la population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Seddiki *et al*, 2006).

## 2.2.2. Caractéristiques fonctionnelles

### 2.2.2.1. Anergie

Les Treg sont caractérisés par un état d'anergie, c'est-à-dire qu'une stimulation *via* leur TCR n'entraîne pas leur prolifération. Cependant, dans certaines conditions, telles une liaison de forte affinité de la liaison TCR-Ag, une forte concentration d'Ac anti-CD3 et anti-CD28, ou l'ajout d'IL-2 dans le milieu de culture, une prolifération des Treg est observée, sans perte de fonctionnalité (Earle *et al*, 2005).

Cette notion a récemment été mise en doute puisque les rTreg, après stimulation, sont capables de proliférer, et d'acquérir un phénotype de aTreg, c'est-à-dire une expression membranaire de CD45RO et une surexpression intracellulaire de Foxp3 et de CD152. A l'inverse, les aTreg prolifèrent peu et après stimulation, ils exercent leurs fonctions suppressives et meurent (Miyara *et al*, 2009). Cependant, comme les aTreg sont capables d'inhiber la prolifération des rTreg, il est difficile de déterminer avec précision la capacité de prolifération d'un pool cellulaire contenant à la fois des aTreg et des rTreg. Il est donc possible que l'absence de prolifération des Treg décrite initialement soit le reflet d'une part d'une inhibition des rTreg par les aTreg, d'autre part de la mort de ces derniers.

### 2.2.2.2. Inhibition de multiples lignées cellulaires

A ce jour, les connaissances des mécanismes d'inhibition sont imparfaites. Il semble que les Treg acquièrent leurs pleines fonctions inhibitrices après activation par liaison spécifique de leur TCR à l'Ag. Ils opèrent ensuite de façon non spécifique d'Ag, c'est-à-dire qu'ils peuvent inhiber des lymphocytes qui reconnaissent d'autres Ag (Thornton & Shevach, 2000). Cette fonction inhibitrice est dépendante du contact intercellulaire (Thornton & Shevach, 1998).

Les Treg sont impliqués dans l'immunorégulation de plusieurs types cellulaires, en inhibant leur activation, leur prolifération et leurs fonctions (Askenasy *et al*, 2008; Miyara & Sakaguchi, 2007).

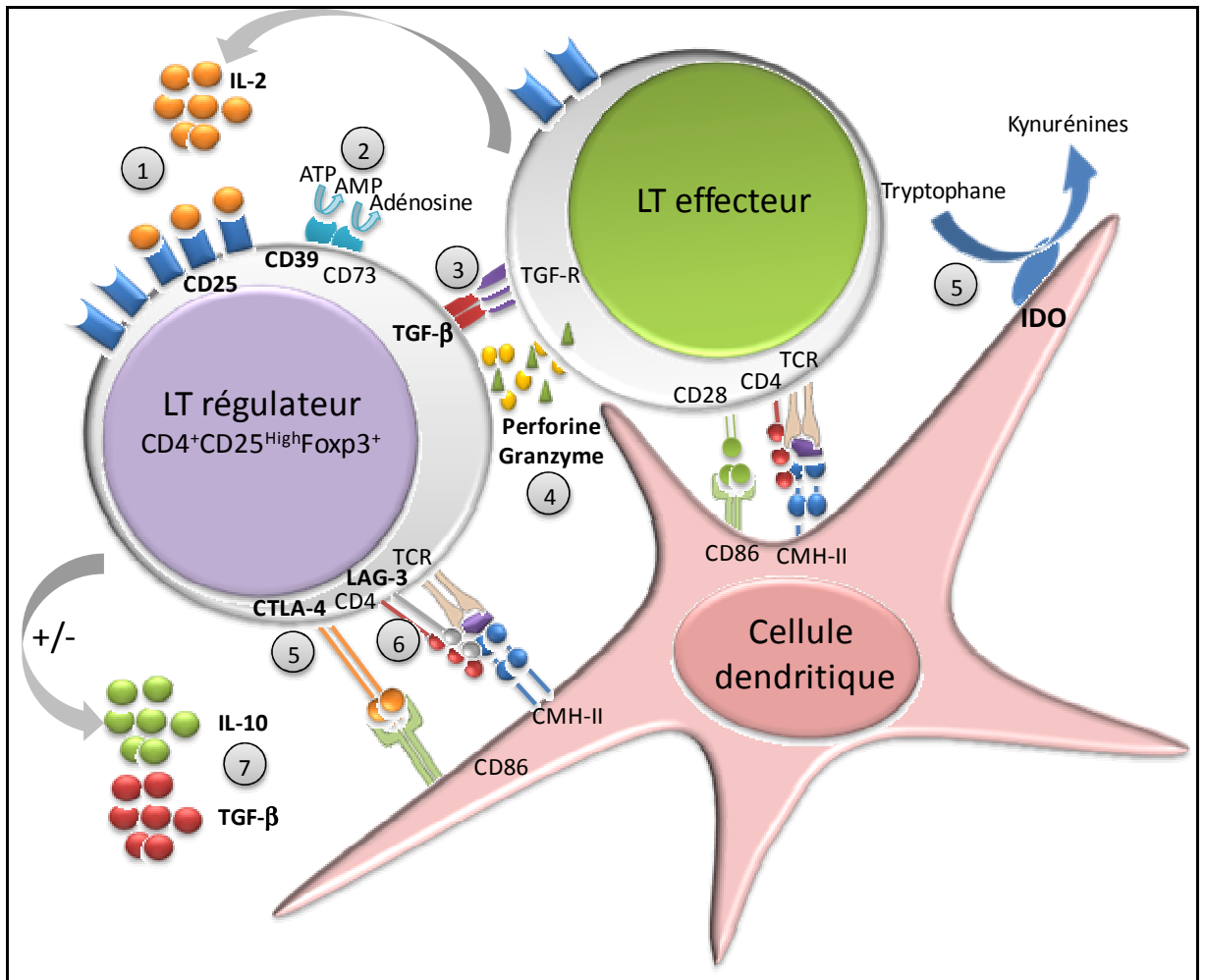
Les LB présentent *in vitro* une inhibition de leur prolifération, de la production des Ig et de la commutation de classe des Ig lorsqu'ils sont cultivés avec des Treg (Lim *et al*, 2005; Nakamura *et al*, 2001).

Les cellules NK voient leur activité cytotoxique diminuée en présence de Treg (Ralainirina *et al*, 2007; Romagnani *et al*, 2005; Trzonkowski *et al*, 2004).

Les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentent une diminution de leur activation, de leur prolifération, de la sécrétion de cytokines et une inhibition de leurs fonctions au contact de Treg (Dieckmann *et al*, 2001; Jonuleit *et al*, 2001; Piccirillo & Shevach, 2001; Trzonkowski *et al*, 2004).

L'activité des DC est également modulée avec une diminution de leur maturation et de leur capacité à présenter des Ag (Misra *et al*, 2004). Les Treg sont également capables d'induire des DC tolérogènes surexprimant IDO, inhibant ainsi de façon indirecte la prolifération des LT (Fallarino *et al*, 2003).

Les Treg exercent également une action sur les cellules de l'immunité innée que sont les polynucléaires neutrophiles. Après activation *via* les récepteurs toll-like, présents à leur surface, les Treg sont capables d'inhiber les polynucléaires neutrophiles. Ceci se traduit par une diminution de la production de radicaux oxygénés, une diminution de la sécrétion en cytokines (IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) et une augmentation de l'apoptose des polynucléaires (Lewkowicz *et al*, 2006).



**Figure 4: Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs**

**1)** Déplétion du milieu extracellulaire en IL-2, cytokine nécessaire à l'activation et la prolifération des LT effecteurs; **2)** Système enzymatique CD39/CD73 dégradant l'ATP en adénosine, toxique pour les LT effecteurs; **3)** Inhibition *via* le TGF-β membranaire; **4)** Mort cellulaire *via* le système perforine/granzyme; **5)** Compétition par le CTLA-4 pour CD86 et induction de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme catabolisant le tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération des LT, en kynurénines, toxiques pour les LT ; **6)** Inhibition par interaction de LAG-3 avec le CMH-II ; **7)** Sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (mécanisme prépondérant pour les iTreg : Th3, Tr1).

### 2.2.2.3. Mécanisme d'inhibition dépendant du contact

Chez l'homme, les mécanismes d'inhibition dépendent *in vitro* du contact intercellulaire, comme le montrent les expériences de coculture de Treg et de LT effecteurs. En effet, lorsque les Treg peuvent avoir un contact direct avec les LT effecteurs, on observe une diminution de leur prolifération, tandis que séparés à l'aide de membranes semi-perméables, ils ne présentent plus d'activité inhibitrice (Jonuleit *et al*, 2001).

Plusieurs molécules membranaires semblent impliquées dans ce mécanisme, notamment CTLA-4, LAG3 et TGF- $\beta$  (Figure 4 et tableau 1).

Cependant, d'autres mécanismes, comme les systèmes perforine/granzyme ou CD39/CD73, ne nécessitent pas un contact cellulaire *stricto sensu*, mais une forte proximité (Yi *et al*, 2006).

La production de cytokines anti-inflammatoires serait quant à elle plutôt impliquée dans les mécanismes d'immunorégulation des Treg induits en périphérie (iTreg: Th3 et Tr1), et pas pour les Treg constitutifs, d'origine thymique. L'IL-35, une cytokine anti-inflammatoire participe à l'activité immunosuppressive des Treg. Le mécanisme d'action, identifié chez la souris, est original puisque l'induction de la sécrétion d'IL-35 par les Treg nécessite un contact avec les LT effecteurs. L'action de cette cytokine peut ensuite s'exercer à distance, de façon non dépendante du contact. Ainsi, ce ne serait pas l'inhibition qui serait dépendante du contact mais son initiation seulement (Collison *et al*, 2009). L'implication de cette cytokine n'est cependant pas évidente chez l'homme puisqu'il semblerait que les Treg humains ne l'expriment pas (Bardel *et al*, 2008).

| Molécules  | Mode d'action   | Chez l'homme | Chez la souris |
|--|---|--------------|----------------|
| <b>Mécanismes d'inhibition dépendant du contact</b>    |   |              |                |
| ↳ molécules de costimulation des DC                    |   |              |                |
| CTLA-4 (CD152)   | Induction d'IDO par les DC  | +            | +              |
| ↳ sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$                    |   |              |                |
| CD39-CD73  | Hydrolyse de l'ATP extracellulaire  | +            | +              |
| LAG-3  | Induction de signaux inhibiteurs par interaction avec le CMH-II   | +            | +              |
| Granzyme/Perforine                                     | Lyse des lymphocytes T effecteurs   | +            | +              |
| CD95-CD95ligand<br>(Fas-FasL)                          | Apoptose des lymphocytes T effecteurs   | +            | -              |
| TGF- $\beta$   | Induction de Foxp3  | +/-          | +              |
| <b>Mécanismes d'inhibition dépendant des cytokines</b> |   |              |                |
| IL-10  | Inhibition de la maturation des DC  | +            | +              |
|  | Induction de Tr1  | +            | +              |
| CD25   | Séquestration d'IL-2  | -            | +              |
| IL-35  | Après activation et contact avec des LT effecteurs, sécrétion d'IL-35 qui inhibe la prolifération des LT effecteurs | -            | +              |

**Tableau 1: Protéines impliquées dans les fonctions suppressives des Treg**  
chez l'homme et chez la souris [adapté de (Sakaguchi *et al*, 2010) et (Shevach, 2009)]

### 2.2.3. Origine et homéostasie

L'existence d'une population régulatrice d'origine thymique a été suspectée dès les années 70-80. En effet, chez la souris, la réalisation d'une thymectomie à 3 jours de vie entraîne de multiples manifestations auto-immunes (thyroïdite, gastrite, ovarite), traduisant d'une part la présence de lymphocytes auto-réactifs de façon constitutionnelle et d'autre par la présence d'une population d'origine thymique capable de réguler ces lymphocytes. Par ailleurs, ces manifestations sont améliorées par transfert de lymphocytes provenant d'un animal non thymectomisé et plus particulièrement par un sous-type lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Nomura & Sakaguchi, 2007; Sakaguchi *et al*, 2007).



Se reporter à la figure 3 de l'article: Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:193-219.

et figure 1 de l'article: Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol.* 2007;8:333-334.

### **Figure 5: Genèse thymique des lymphocytes T régulateurs**

**A)** Les lymphocytes T  $CD4^+CD8^-$  dont le TCR reconnaît les molécules du CMH de classe II subissent une 1<sup>ère</sup> sélection positive. Ceux dont le TCR présente une faible affinité pour les auto-antigènes présentés par les cellules épithéliales médullaires gagnent la périphérie tandis que ceux dont l'affinité est forte enclenchent un mécanisme de mort programmée (sélection négative). Cependant, ces derniers, en présence de cellules dendritiques matures et d'une cytokine produite par les corpuscules de Hassal, la TSLP, peuvent subir une 2<sup>ème</sup> sélection positive qui permet la différenciation en lymphocytes T régulateurs. **B)** Cette différenciation implique des interactions entre TCR-Ag/CMH-II mais également entre diverses molécules de costimulation. Ces interactions participent à l'expression de Foxp3, facteur de transcription principal mis en jeu dans la genèse thymique des lymphocytes T régulateurs.

(*Aire*: gène de régulation auto-immune; CEC: cellules épithéliales corticales thymiques; DC: cellules dendritiques; HC: corpuscule de Hassal; Im-DC: cellules dendritiques immatures; MEC/mTEC: cellules épithéliales médullaires thymiques; TSLP: lymphopoïétine stromale thymique; Treg: lymphocytes T régulateurs). D'après (Liu *et al*, 2007b; Nomura & Sakaguchi, 2007).

Les Treg trouvent donc leur origine dans le thymus où les interactions avec les différentes cellules thymiques sont importantes. Les souris déficientes en CMH de classe I et II ne sont pas capables de générer de Treg, traduisant l'importance des sélections positive et négative dans leur genèse (Bensinger *et al*, 2001). L'étude du TCR des Treg a montré qu'ils reconnaissent avec une très forte affinité les auto-Ag. En effet, la sélection négative thymique est liée à l'expression par les mTEC (cellules épithéliales thymiques médullaires) de la quasi-totalité de nos auto-Ag, dont l'expression est favorisée par le gène *Aire* (*Auto-immune regulator*). Ainsi, l'absence de molécule de CMH-II à la surface des mTEC conduit à la production d'un faible nombre de Treg. A l'inverse, la transfection d'un Ag au sein des mTEC entraîne la production de Treg spécifiques de cet Ag, alors que la transfection de cet Ag aux DC thymiques n'a aucun effet (Aschenbrenner *et al*, 2007). Ainsi, la reconnaissance des auto-Ag permettrait, selon l'affinité de liaison avec le TCR, d'orienter les LT vers une apoptose lorsque l'affinité est faible, alors qu'une forte affinité orientera vers une différenciation en Treg (Picca *et al*, 2006). L'absence d'expression de *Aire* est responsable de manifestations auto-immunes chez la souris, comme chez l'homme, associant une atteinte endocrinienne multiple, une susceptibilité aux infections fongiques et une dystrophie ectodermique (syndrome APECED: *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*). Cependant, ce syndrome serait plus lié à l'absence de sélection négative des LT effecteurs qu'à un déficit de production en Treg (Liu *et al*, 2007b).

Une cytokine, la TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), sécrétée au niveau des corpuscules de Hassal, constitués de mTEC, est capable d'activer les DC. Ces DC activées participent à une deuxième sélection positive des lymphocytes présentant un TCR de haute affinité pour les auto-Ag, ces lymphocytes constituant les Treg (Liu *et al*, 2007b). Les facteurs de costimulation ont là toute leur importance, puisque les DC thymiques non activées, immatures, sont incapables de générer des Treg. Par ailleurs, un déficit en molécules de costimulation (CD28, CD80, CD86, CD40) entraîne un déficit thymique et périphérique en Treg (Sakaguchi, 2005).

C'est donc après une double sélection positive, en présence de signaux de costimulation importants, que les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> expriment Foxp3 au sein du thymus et se différencient en Treg (Figure 5).

#### 2.2.4. Circulation des Treg

La circulation des Treg dans l'organisme est sous la dépendance de diverses chémokines et de leurs récepteurs, exprimés de façon séquentielle à la surface des cellules. Actuellement, la chronologie entre le trafic des Treg et des LT effecteurs n'est pas connue. Il apparaît nécessaire que les Treg soient présents sur le site de la réponse immunitaire pour la contrôler et également pour inhiber la réponse auto-immune, sans pour autant empêcher une réponse efficace.

L'ensemble des récepteurs identifiés chez les Treg humains, leurs ligands et les cellules les exprimant sont résumés dans le tableau 2.

| SITES          | RECEPTEURS                          | LIGANDS             | CELLULES   |
|----------------|-------------------------------------|---------------------|--|
| THYMUS         | CCR8                                | CCL1                | - Macrophages de la médullaire thymique<br>- Cellules épithéliales thymiques       |
|                | CCR4                                | CCL17 /CCL22        | - Cellules dendritiques matures<br>- LT activés<br>- Monocytes/macrophages activés |
| SANG           | CCR8                                | CCL1                | - LT activés<br>- Cellules dendritiques matures<br>- Monocytes/macrophages activés |
|                | CCR7<br>CXCR5<br>(après activation) | CCL19<br><br>CXCL13 | Cellules stromales des zones T<br><br>Cellules stromales des zones B               |
| MOELLE OSSEUSE | CXCR4                               | CXCL12              | Cellules stromales médullaires   |

**Tableau 2: Récepteurs et chémokines impliqués dans le trafic des Treg**

Au niveau du thymus, les Treg expriment CCR8, qui lie la chémokine CCL1 exprimée par les macrophages médullaires thymiques et les cellules épithéliales (Annunziato *et al*, 2002).

Dans le sang, les Treg sont attirés vers les DC matures des organes lymphoïdes secondaires sécrétant CCL17 et CCL22, du fait de l'expression de CCR4 (Iellem *et al*, 2001). Les Treg se distinguent des LT effecteurs, qui expriment également CCR4, par la co-expression de CCR8 qui lie CCL1. Cette chémokine est également sécrétée par les DC activées, les LT activés et les monocytes/macrophages, notamment lors de la liaison de leur FcR aux IgG. Ainsi, CCL1 serait produite sur les sites d'inflammation, permettant ainsi le recrutement des Treg à ce niveau (Iellem *et al*, 2001).

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, ils expriment d'abord CCR7, récepteur de CCL19 sécrétée par les cellules stromales des zones T. Rapidement, après stimulation antigénique, ils expriment CXCR5, ce qui entraîne leur migration vers les zones B où le ligand CXCL13 est sécrété (Lim *et al*, 2004). Au sein de la rate de sujets sains, les Treg, identifiés par Foxp3, sont effectivement présents tant au niveau des zones T que B (Velasquez-Lopera *et al*, 2008). Leur proportion est évaluée à  $0,6 \pm 0,3$  % des lymphocytes. Leur répartition est inégale entre les différentes structures, avec une présence plus importante au niveau des manchons lymphocytaires périartériolaires (PALS) que des follicules. Ainsi, des modifications dans la sécrétion des chémokines CCL19 et CXCL13 ou un défaut d'expression des récepteurs CCR7 et CXCR5, pourraient être impliqués dans un défaut de recrutement des Treg au niveau de la rate.

La moelle osseuse, longtemps considérée comme simple site de production des LB, joue également un rôle dans la réponse immunitaire. En effet, plusieurs cellules participant à la réponse immunitaire y ont été localisées, comme les plasmocytes de longue demi-vie (Manz *et al*, 2002), mais également des LT CD8<sup>+</sup> mémoires (Mazo *et al*, 2005; Olsson *et al*, 2008) et les LT CD4<sup>+</sup> (Olsson *et al*, 2008). De façon intéressante, elle constitue également un site de stockage des Treg exprimant CXCR4, attirés par la chémokine CXCL12 sécrétée par les cellules stromales médullaires (Zou *et al*, 2004). Ces Treg peuvent être mobilisés vers la circulation sanguine par injection de G-CSF qui diminue la production de CXCL12 (Zou *et al*, 2004). Cette interaction CXCR4/CXCL12 intervient également dans le maintien des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques au niveau médullaire, ce qui a donné lieu au développement d'un nouveau traitement permettant leur mobilisation, le plerixafor, antagoniste de CXCR4 (De Clercq, 2010). L'impact de ce traitement sur le taux de Treg sanguin est à ce jour inconnu.

### 2.2.5. Rôle en pathologie humaine: auto-immunité, oncologie et infections

Des manifestations auto-immunes identiques à celles observées après réalisation d'une thymectomie à 3 jours de vie ont été observées chez la souris dite « *scurfy* ». Cette souris, naturellement déficiente en Foxp3, ne possède pas de Treg et développe dans les premiers jours de vie des signes d'auto-immunité comprenant une thyroïdite, une gastrite, un diabète, entraînant rapidement le décès (Brunkow *et al*, 2001). Chez l'homme, on décrit le syndrome IPEX (*Immune dysfunction Polyendocrinopathy Enterocolopathy X-linked syndrome*), qui se traduit par la survenue dès le plus jeune âge de troubles du transit en rapport avec une entéocolite, d'un diabète, d'une dysthyroïdie, d'un eczéma, associés à un retard de croissance. De multiples mutations de Foxp3 ont été rapportées au cours de ce syndrome (van der Vliet & Nieuwenhuis, 2007). Un syndrome « IPEX-like » est également observé lors de mutations du CD25 (Sharfe *et al*, 1997).

Au cours des MAI, les résultats concernant l'étude des Treg sont contradictoires. Un déficit quantitatif est observé au cours du LES (Miyara *et al*, 2005), de l'arthrite juvénile, du rhumatisme psoriasique, tandis que le taux de Treg semble normal au cours de la sclérose en plaque (SEP), du diabète de type I, de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et des spondylarthropathies (Dejaco *et al*, 2006). Un déficit fonctionnel est quant à lui observé au cours de la SEP (Viglietta *et al*, 2004), du diabète de type I, de la vascularite cryoglobulinémique liée au VHC. Les fonctions immunomodulatrices sont préservées *in vitro* au cours de la PR (Dejaco *et al*, 2006). Cependant, il faut noter qu'au cours de la PR, il existe des taux plus importants de Treg dans le liquide synovial que dans le sang. Ainsi, un taux de Treg abaissé dans le sang peut témoigner non pas d'un déficit quantitatif mais d'un recrutement des Treg sur les sites d'inflammation. Par ailleurs, les patients présentant le taux de Treg intrasynovial le plus important ont le meilleur pronostic (Cao *et al*, 2003). Ainsi, on peut supposer qu'au cours du PTI, un taux de Treg circulants abaissé peut être lié à un recrutement sur le site de la réponse immunitaire, notamment la rate.

Les Treg sont également impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. En effet, les patients atteints de cancers présentent une élévation des Treg sanguins, péri-tumoraux et au sein des ganglions de drainage, ce qui facilite la progression des cellules cancéreuses en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale (Zou, 2006). Cette augmentation des Treg participe à l'échec de certaines immunothérapies anti-tumorales, comme nous l'avons montré (Audia *et al*, 2007) (cf Annexe 1). Dans ce travail, nous avons observé que le taux de Treg circulants était plus élevé chez les patients atteints de cancers métastatiques et qu'ils étaient capables d'inhiber la prolifération de LT effecteurs. Contrairement à ce que notre équipe avait montré dans un modèle de cancer du colon chez le rat

(Ghiringhelli *et al*, 2004), des bolus de cyclophosphamide n'entraînent pas une déplétion en Treg permettant l'efficacité d'une immunothérapie intratumorale par BCG thérapie.

Au cours des infections, les Treg ont un effet bénéfique en limitant l'intensité de la réponse anti-infectieuse, évitant ainsi les dommages contre les tissus sains de voisinage. A l'inverse, une limitation trop importante de cette réponse anti-infectieuse est incriminée dans la chronicisation de certaines maladies infectieuses (Belkaid & Rouse, 2005).

Les Treg sont également impliqués dans les phénomènes de tolérance aux greffes et leur déficit est observé au cours des pathologies allergiques (Afzali *et al*, 2007).

### 2.3. Autres lymphocytes régulateurs

#### 2.3.1. *Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Régulateurs*

L'existence de LT CD8<sup>+</sup> régulateurs (CD8<sup>+</sup> Treg) est connue depuis les années 70 mais leur étude n'a été approfondie que récemment (Dinesh *et al*, 2010; Konya *et al*, 2009). Leurs fonctions suppressives sont variables et quatre mécanismes différents interviennent :

- Une inhibition dépendante du contact impliquant CTLA-4 et TGF- $\beta$
- La sécrétion de cytokines et chémokines anti-inflammatoires : IL-10, TGF- $\beta$ , IL-16 et CCL4
- L'induction de DC tolérogènes par une expression diminuée des molécules de costimulation CD86 et CD80 et par l'expression membranaire d'ILT3 (*Immunoglobulin-like Transcript 3*) et d'ILT4, récepteurs de la superfamille des Ig dont les domaines intracytoplasmiques comportent des domaines ITIM
- La lyse des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs exprimant HLA-E

Comme pour les Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), on distingue les CD8<sup>+</sup> Treg constitutifs des CD8<sup>+</sup> Treg induits. Les CD8<sup>+</sup> Treg constitutifs sont générés au niveau thymique et représentent une lignée spécifique. Ils partagent des marqueurs phénotypiques et un mode d'action proche de celui des Treg. Ils sont définis par le phénotype CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> et exercent leur suppression par un mécanisme dépendant du contact impliquant CTLA-4 et TGF- $\beta$ . Comme pour les Treg, il n'existe pas de marqueur spécifique puisque les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs expriment CD25 et CTLA-4 après activation, ainsi que Foxp3, au moins de façon transitoire (Dinesh *et al*, 2010; Konya *et al*, 2009).

| PHENOTYPE   | MECHANISME           |                                   | INDUCTION  |
|---|----------------------|-----------------------------------|--|
|   | Dépendant du contact | autre                             |  |
| CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> | +                    |                                   | CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> stimulés par l'entérotoxine B du staphylocoque et Ac antiCD3/28 |
| CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>   | +                    |                                   | TGF-β1 et Ac antiCD3/28  |
| CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>                                     | +                    | Expression d'ILT3 et 4 par les DC | Stimulation par CPA chargées en Ag   |
| CD8 <sup>+</sup> D103 <sup>+</sup>  | +                    |                                   | Ac antiCD3/28  |
| CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>                                     | +                    | Dépendant de CCL4 et TNF          | Ac antiCD3 modifié   |
| CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> LAG-3 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CCL4 <sup>+</sup>                    |                      | Sécrétion de CCL4                 | Stimulation par BCG  |
| CD8 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>                  | +                    |                                   | DC activées par le LPS   |
| CD8 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup>   | -                    | Sécrétion d'IL-10                 | pDC activées par CD40L   |
| CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>   | -                    | Sécrétion de TGF-β                | Sécrétion de TGF-β par les cellules épithéliales oculaires   |
| CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup>                                     | -                    | Sécrétion d'IL-10                 | pDC d'ascite tumorale  |

**Tableau 3: Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Régulateurs induits spécifiques d'antigènes chez l'homme**

Adapté de (Dinesh *et al*, 2010; Konya *et al*, 2009). (Ac : anticorps ; CPA : cellules présentatrices d'Ag ; DC : cellules dendritique ; IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase; LPS: lipopolysaccharide; pDC: cellules dendritiques plasmacytoïdes)

Chez l'homme, une autre sous population de CD8<sup>+</sup> Treg constitutifs a été identifiée par le phénotype CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>. Leur action suppressive est médiée par la sécrétion d'IL-10 et l'inhibition de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Cette population présente des caractéristiques similaires aux CD8<sup>+</sup> Treg murins CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>.

De nombreuses autres populations de CD8<sup>+</sup> Treg induits ont été décrites. Ils sont obtenus à partir de LT CD8<sup>+</sup> périphériques sous l'action de diverses stimulations. Certains nécessitent une stimulation *via* leur TCR (CD8<sup>+</sup> Treg spécifiques d'antigène), tandis que pour d'autres ce signal n'est pas nécessaire (CD8<sup>+</sup> Treg non spécifiques d'antigènes) :

- CD8<sup>+</sup> Treg induits non spécifiques d'antigènes :

Ces LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> sont obtenus à partir de cellules mononucléées sanguines stimulées par GM-CSF, IL-10 et IL-2 en présence de monocytes. Ils inhibent la présentation antigénique des CPA, la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et la cytotoxicité des LT CD8<sup>+</sup> par sécrétion d'IL-10. Cette population pourrait avoir un intérêt clinique puisque leur durée de vie est de l'ordre d'un mois et qu'ils sont résistants au traitement par corticoïdes (Konya *et al*, 2009).

- CD8<sup>+</sup> Treg spécifiques d'antigène :

Ces CD8<sup>+</sup> Treg représentent de multiples sous-populations, obtenues par des stimulations diverses et agissant soit de façon dépendante du contact soit par sécrétion de cytokines (Dinesh *et al*, 2010; Konya *et al*, 2009). Les caractéristiques de ces populations sont résumées dans le tableau 3.

Les données de la littérature suggèrent que les CD8<sup>+</sup> Treg peuvent être induits à partir de cytokines, d'une stimulation *via* leur TCR ou en présence de CPA stimulées *via* leur TLR. Malheureusement, dans les différentes études, l'ensemble des marqueurs phénotypiques n'a pas été étudié et il est donc probable que certaines populations soient redondantes avec d'autres. Ces données devront donc être uniformisées afin d'avoir une vision plus restreinte de ces CD8<sup>+</sup> Treg induits. Par ailleurs leur étude à l'heure actuelle est complexe en l'absence de marqueurs phénotypique spécifique permettant de les identifier et de les isoler.

Les CD8<sup>+</sup> Treg jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire au cours de plusieurs modèles murins de MAI (PR, LES, sclérose en plaque (SEP), diabète de type I (DID), colites inflammatoires, myasthénie) en modulant l'activité des CPA (DC et macrophages) et en diminuant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> (Dinesh *et al*, 2010; Konya *et al*, 2009). Chez l'homme, les données sont peu



nombreuses, et les CD8<sup>+</sup> Treg semblent être impliqués au cours du LES, du DID et de la SEP. Au cours du LES, les CD8<sup>+</sup> Treg circulants présentent un déficit quantitatif et fonctionnel. Au cours du DID, l'utilisation d'Ac anti-CD3 permet d'atténuer la maladie, ceci étant corrélé à l'expansion des CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>. Enfin, au cours de la SEP, un traitement permettant de diminuer l'apparition de nouvelles lésions cérébrales permet également l'expansion de CD8<sup>+</sup> Treg (Dinesh *et al*, 2010). A l'inverse, les CD8<sup>+</sup>Treg infiltrent certaines tumeurs et participent probablement à l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale (Dinesh *et al*, 2010). Au cours du PTI, les CD8<sup>+</sup> Treg n'ont jamais été étudiés et constituent un champ d'exploration potentiel afin de mieux comprendre les dysrégulations du système immunitaire au cours de cette MAI.

### 2.3.2. Lymphocytes B régulateurs

Les LB sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative en sécrétant des Ac mais également en modulant la réponse immunitaire T. En effet, en tant que CPA et par la production de cytokines pro-inflammatoires, ils peuvent stimuler la réponse immunitaire T. D'autre part, ils sont capables de l'inhiber, notamment par la sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), cytokine majeure des LB régulateurs (Lund & Randall, 2010).

Les LB expriment les molécules nécessaires aux fonctions de CPA : CMH-II permettant la présentation des Ag, et molécules CD80 et CD86 fournissant les cosignaux nécessaires à l'activation des LT. Ainsi, après stimulation antigénique, les LB augmentent l'expression membranaire de CD80 et CD86 et sont capables de faire proliférer des LT CD4<sup>+</sup> (Constant *et al*, 1995).

Par ailleurs, par la sécrétion de cytokines, le LB est capable d'entretenir l'orientation de la réponse immunitaire T. En effet, en présence de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ), les LB activés par stimulation antigénique et/ou stimulation *via* leur TLR sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12 principalement. On parle de cellules Be1 (*B effector 1 cells*) par analogie aux lymphocytes Th1. Ainsi par la sécrétion de ces cytokines, les cellules Be1 sont capables d'orienter les LT naïfs vers une réponse Th1, réalisant ainsi une boucle d'amplification de la réponse Th1. A l'inverse, des LB stimulés en présence de cytokines Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-2 et de l'IL-13. On parle alors de cellules Be2, qui entretiennent une réponse Th2 (Lund & Randall, 2010).

Enfin, les cellules B régulatrices (Breg) constituent une sous-population particulière chez la souris, exprimant CD5 et CD1d, nommées B10 du fait de la sécrétion d'IL-10 après stimulation *via* CD40 (Yanaba *et al*, 2008). Ainsi, ces cellules sont capables d'inhiber la réponse lymphocytaire T. Chez

l'homme, les Breg ne constituent pas une sous-population aisément individualisable et n'expriment notamment pas le CD5. Chez l'homme, les LB sécrétant de l'IL-10 sont retrouvés au sein des LB naïfs et des LB mémoires. Les stimulations nécessaires pour induire la sécrétion d'IL-10 divergent conférant probablement un rôle distinct à ces deux sous-populations cellulaires. Ainsi, la sécrétion d'IL-10 par les LB mémoires nécessite à la fois une stimulation antigénique, l'activation des TLR et un signal *via* CD40. Ce mécanisme est donc probablement impliqué dans la résolution de la réponse immunitaire. A l'inverse, les LB naïfs sont capables de sécréter de l'IL-10 après stimulation isolée *via* CD40. Ceci leur conférerait plutôt un rôle préventif permettant d'inhiber des LT auto-réactifs activés (Fillatreau *et al*, 2008; Rieger & Bar-Or, 2008). De façon intéressante, des LB stimulés par des Ac anti-CD40 sont capables d'induire des Treg exprimant CD25, Foxp3, CTLA-4 et GITR à partir de LT naïfs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> (Tu *et al*, 2008) mais également des CD8<sup>+</sup>Treg, CD8<sup>High</sup> présentant une activité spécifique d'Ag et CD8<sup>Low</sup> ayant une activité non spécifique d'Ag (Zheng *et al*, 2009). Les CD8<sup>High</sup> Treg présentent une activité suppressive supérieure au CD8<sup>Low</sup> et expriment Foxp3, CD62L et CD28. Ces résultats ouvrent des perspectives futures pour la génération et l'expansion de cellules immunosuppressives *ex vivo* pouvant ensuite être réinjectées dans le cadre de protocole d'immunothérapie.

Ainsi, les interactions entre LB et LT jouent un rôle prédominant avec une double action des LB. D'une part, les LB possèdent un rôle pro-inflammatoire en stimulant les lymphocytes Th1 ou Th2 par la sécrétion de cytokines Th1 ou Th2 et leur capacité à présenter de façon efficace des Ag aux LT. D'autre part, ils sont également capables d'exercer un effet immunosuppresseur direct par la sécrétion d'IL-10 et indirect par l'induction de Treg. Enfin, les LT interviennent au sein des organes lymphoïdes secondaires pour permettre la commutation de classe des Ig.

Ces données soulignent les différents impacts d'une déplétion lymphocytaire B au cours des pathologies auto-immunes selon le stade de la maladie. Au cours de l'encéphalite auto-immune expérimentale, une déplétion des LB réalisée avant l'induction de la maladie entrainera une déplétion des Breg, entrainant des manifestations cliniques plus graves. A l'inverse, si la déplétion est réalisée après l'induction de la maladie, à un moment où les LB jouent alors un rôle pathogène, la sévérité est alors moindre (Thaunat *et al*, 2010). En pathologie humaine, une meilleure connaissance de l'activité des LB, anti ou pro-inflammatoire, à un instant donné de la MAI permettrait une utilisation plus raisonnée des thérapeutiques anti-lymphocytaires B. Au cours du PTI, les Breg n'ont à notre connaissance jamais été étudiés.

Se reporter à la figure 1 de l'article : Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen.  
Nat Rev Immunol. 2005;5:606-616.

### **Figure 6: Architecture splénique**

**a)** La rate est un organe encapsulé constituée d'une artère afférente, d'une veine et de canaux lymphatiques efférents. L'artère se divise en artérioles terminales, autour desquelles se répartissent les zones T (manchons lymphocytaires périartériolaires, PALS) à proximité desquels on trouve les zones B constituées des follicules. Ces deux structures représentent la pulpe blanche. La zone marginale se situe entre les artérioles terminales et les sinus veineux. La pulpe rouge est constituée du réseau veineux sinusöide et des cordons de Billroth où a lieu la phagocytose des cellules hématopoïétiques sénescents.

**b)** la structure folliculaire diffère entre la souris et l'homme. Chez l'homme, le follicule est entouré d'une zone marginale moins importante, à la périphérie de laquelle on distingue une zone périfolliculaire. Des artérioles peuvent se diviser en capillaires et se terminer dans la zone périfolliculaire, où l'on trouve également des macrophages. D'après (Mebius & Kraal, 2005)

### 3. Un organe lymphoïde secondaire particulier: la rate

#### 3.1. Développement et anatomie splénique

La rate est un organe lymphoïde secondaire intra-abdominal se constituant dès la 5<sup>ème</sup> semaine de gestation à partir de la condensation de cellules mésenchymateuses formant un épaissement au sein de l'épithélium du mésogastre dorsal. Progressivement, des lobules indépendants se forment et s'associent pour former une masse multilobée. Il arrive que certains lobules restent indépendants, poursuivant leur développement de façon autonome, donnant alors naissance à une ou des rates dites « accessoires », observées dans 10 à 30 % de la population générale. Des boucles vasculaires apparaissent dès la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation et formeront le réseau sinusoïde dès la 9<sup>ème</sup> semaine. La colonisation par les LT et LB ainsi que les monocytes/macrophages se situe aux environs de la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation. Au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre de gestation, les LB, qui constituent le contingent principal des lymphocytes spléniques, sont organisés en follicules primaires et expriment des Ig de surface de type IgM avec une spécificité auto-antigénique. De façon intéressante, un centre germinatif ne peut être observé que dans le premier mois du post-partum, lorsque les DC folliculaires sont présentes, et ce même en période de stimulation antigénique importante, notamment infectieuse (Chadburn, 2000; Wluka & Olszewski, 2006).

La taille de la rate d'un adulte est variable, et mesure en moyenne 12 cm de long, 8 cm de large et 4 cm d'épaisseur. Son poids varie entre 50 et 250 grammes, 80 grammes en moyenne exsangue. Il s'agit d'un organe encapsulé, hautement vascularisé, recevant plus de 5 % du débit cardiaque, soit environ 300 ml/min. En une journée, l'ensemble de la masse sanguine aura transité par le réseau sinusoïde de cet organe, permettant ainsi l'élimination des cellules hématopoïétiques sénescents et le passage de tout Ag sanguin. Le hile splénique est constitué d'une artère afférente, d'une veine et de canaux lymphatiques efférents (Chadburn, 2000; Wluka & Olszewski, 2006). A la différence des ganglions lymphatiques, il n'y a donc pas de canaux lymphatiques afférents.

Macroscopiquement, on distingue la pulpe rouge de la pulpe blanche. La pulpe rouge constitue 75 % de la masse splénique. Le terme est lié à la coloration donnée par les érythrocytes qui y circulent en grande quantité. La pulpe rouge est constituée des cordons spléniques (cordons de Billroth), tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des macrophages et des LT CD8<sup>+</sup>; et les vaisseaux sinusoïdes, vaste réseau veineux constitué de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale fenêtrée. La rate constitue ainsi un shunt entre le réseau artériel et veineux,

séparés par un parenchyme permettant de filtrer le sang (Chadburn, 2000; Wluka & Olszewski, 2006) (Figure 6).

La pulpe blanche est composée des cellules immunitaires réparties en manchons lymphoïdes péri-artériolaires (*PeriArteriole Lymphoid Sheaths* ; PALS), zones riches en LT CD4<sup>+</sup>, tandis que les LB sont situés dans les follicules (Chadburn, 2000; Wluka & Olszewski, 2006).

La rate possède ainsi de multiples fonctions (Chadburn, 2000; Mebius & Kraal, 2005; Wluka & Olszewski, 2006):

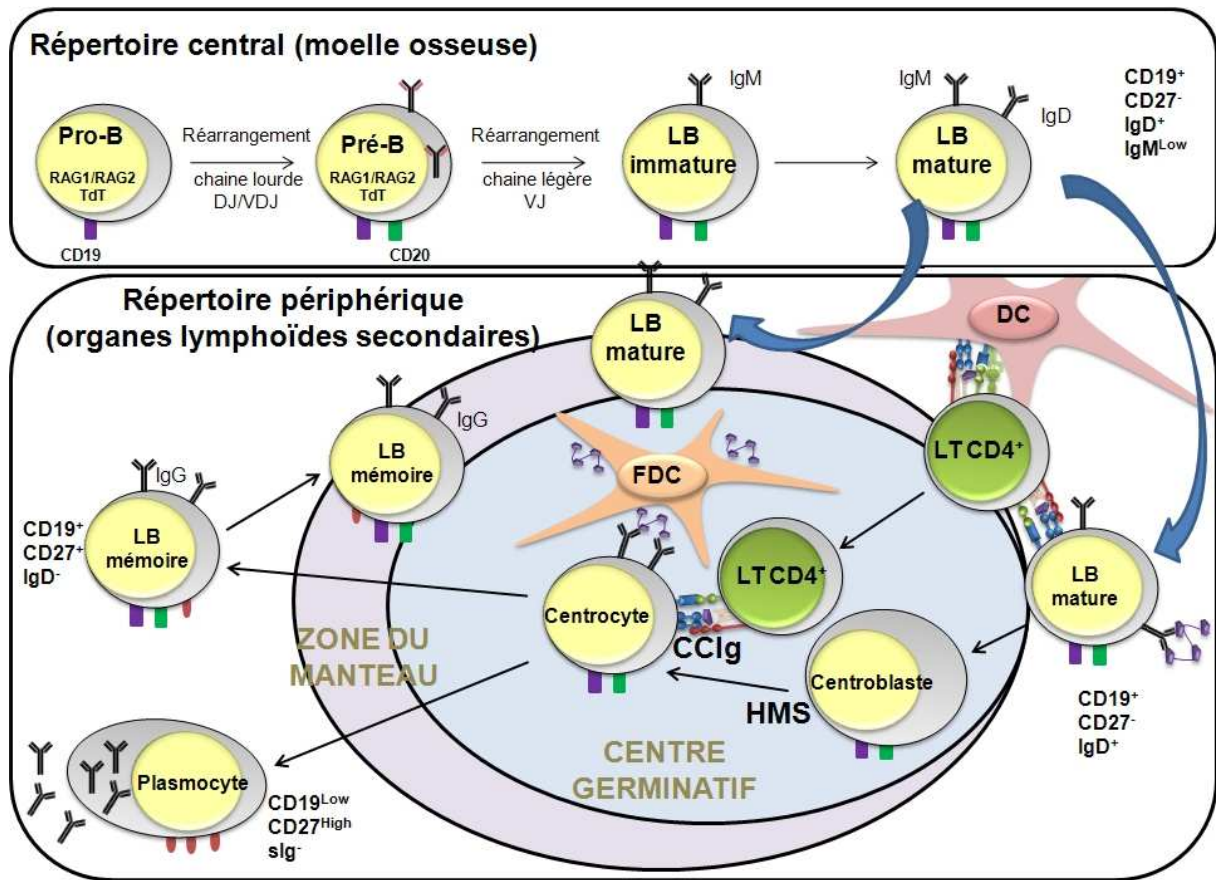
- filtration de la masse sanguine permettant la phagocytose et la destruction des cellules sénescentes, principalement les globules rouges et les plaquettes,
- réservoir cellulaire puisque 30 % des plaquettes y sont stockées,
- surveillance immunitaire puisque l'ensemble du pool sanguin transite par les vaisseaux sinusoides spléniques, facilitant la présentation des Ag exogènes ou endogènes aux cellules immunitaires,
- réponse immunitaire avec stimulation, maturation et prolifération des LB

Au cours du PTI, une destruction des plaquettes a lieu au niveau de la rate, les macrophages spléniques phagocytant les plaquettes opsonisées par les auto-Ac qui lient leur FcR. Ces macrophages, qui constituent des CPA, dégradent les plaquettes et appréhendent des auto-Ag. Ils sont ainsi capables d'exposer des épitopes cryptiques de la GPIIb/IIIa, et d'activer les LT auto-réactifs et stimuler la sécrétion d'auto-Ac par les LB (Kuwana *et al*, 2009).

### 3.2. Réponse immunitaire splénique

#### 3.2.1. *Rappels sur la lymphopoïèse B*

Les LB sont les effecteurs principaux de la réponse humorale participant ainsi à la défense de l'organisme par la sécrétion d'Ac, les immunoglobulines (Ig). Ces Ig sont présentes à la surface cellulaire et peuvent également être sécrétées. Elles sont constituées de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères codées par des gènes différents. On distingue le fragment constant, qui détermine l'isotype de l'Ig, du fragment variable, conférant la spécificité antigénique, appelée idiotype. Il existe 5 isotypes différents: D, M, G, A et E. Deux étapes successives permettent de générer un vaste répertoire idiotypique, la première au niveau de la moelle osseuse et la seconde au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, tissu lymphoïde associé aux muqueuses)(Male D *et al*, 2007).



**Figure 7: Maturation lymphocytaire B et architecture folliculaire**

La lymphopoïèse B médullaire permet d'acquérir un répertoire antigénique central. Cette diversité est possible par plusieurs mécanismes : diversité germinale des gènes codant pour les fragments VDJ, diversité combinatoire (VDJ), diversité jonctionnelle (adjonction de nucléotides par la TdT), mutations somatiques ponctuelles et imprécisions de la recombinaison, association aléatoire de la chaîne lourde  $\mu$  avec une chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Au stade pro-B, il y a réarrangement de la chaîne lourde sous la dépendance des protéines RAG1 et RAG2. Couplée à un succédané de chaîne légère, les protéines  $\lambda 5$  et V-préB, la chaîne lourde est exprimée à la surface du lymphocyte pré-B, qui après réarrangement des chaînes légères donnera le lymphocyte B immature qui exprime une IgM de surface. Au stade de lymphocyte B mature, il y a expression membranaire d'IgM et d'IgD. Ce lymphocyte mature a le phénotype  $CD19^+CD27^-IgD^+IgM^+$ . Après reconnaissance de son antigène natif, le LB mature gagne le follicule où il reçoit les signaux des lymphocytes T activés par les cellules dendritiques ayant apprêté le même antigène. Ceci permet sa prolifération et les phénomènes d'hypermutation somatique (HMS) et de commutation de classe des immunoglobulines (CCIg), sous la dépendance d'une enzyme, l'AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*) qui permet d'obtenir une diversification du répertoire antigénique périphérique. Les centrocytes subissent ensuite une maturation d'affinité : seuls ceux ayant un BCR très affiné pour les antigènes natifs présentés sous forme de complexes immuns par les cellules dendritiques folliculaires survivent. Ils se différencient soit en plasmocytes ( $CD19^{Low}CD20^+CD38^+CD138^+CD27^{High}sIg^-$ ) de longue demi-vie, qui circuleront jusque dans la moelle osseuse, soit en lymphocytes B mémoires ( $CD19^+CD27^+IgD^-$ ) qui recirculeront, certains se localisant dans les follicules primaires. Adapté de (Sagaert *et al*, 2007).

Le répertoire central ou primaire est généré au niveau médullaire. Les LB émergent de cellules hématopoïétiques pluripotentes sous la dépendance de cytokines. Le mécanisme mis en jeu est un réarrangement aléatoire des différents gènes des Ig pour former un ADN recombiné qui sera transcrit en ARN recombiné, lui-même traduit en chaîne d'Ig. L'assemblage aléatoire de trois segments géniques (V, D et J) pour les chaînes lourdes constitue la diversité combinatoire, s'effectuant à partir d'une quarantaine de régions variables (V), de 23 régions de diversité (D) et de 6 régions jonctionnelles (J) présentes sur le chromosome 14. Pour les gènes des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ , dont les locus sont situés respectivement sur les chromosomes 2 et 22, le réarrangement s'effectue à partir des segments géniques V et J. Ces réarrangements sont effectués sous la dépendance de recombinases, enzymes codées par les gènes RAG1 et RAG2 (*Recombination Activating Genes*). Cette diversité combinatoire est augmentée par une diversité jonctionnelle liée au remplacement aléatoire de nucléotides à la partie N terminale de l'ADN entre les segments DJ et VD par l'action conjointe d'exonucléases et de l'enzyme TdT (*Terminal deoxynucleotide Transferase*). Enfin, des imprécisions lors des recombinaisons et des mutations somatiques ponctuelles augmentent encore l'étendu du répertoire central (Male D *et al*, 2007).

On distingue ainsi plusieurs stades de maturation du LB au niveau médullaire (Figure 7). Après réarrangement des régions D et J des chaînes lourdes, le progéniteur B devient une cellule pré-B précoce. Après réarrangement du segment V, la chaîne lourde  $\mu$  est exprimée à la surface associée aux protéines  $\lambda 5$  et Vpré-B, et on parle alors de cellule pré-B tardive. L'étape suivante constitue le réarrangement des régions V et J des chaînes légères qui donne naissance à la cellule B immature exprimant une chaîne lourde complète associée soit à une chaîne  $\kappa$  soit à une chaîne  $\lambda$ . Cette association aléatoire d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère participe également à la diversité du répertoire central. La dernière étape permet l'expression conjointe d'IgM et d'IgD à la surface du LB, nommé alors LB mature. Ensuite, intervient la sélection négative : si le LB reconnaît un auto-Ag, il entre en apoptose ou effectue une révision de son BCR par un nouveau réarrangement de sa chaîne légère (*receptor editing*) afin de perdre cette auto-réactivité. Cette sélection négative, plus économique que pour les LT dans le thymus, est à l'origine de la tolérance centrale. Ce LB mature, ou LB naïf, va ensuite gagner la circulation sanguine, où il représente 60-70 % des LB circulants, et migrera au sein des organes lymphoïdes secondaires pour former les follicules primaires. Lors de la constitution des follicules secondaires, ces LB non stimulés sont refoulés à la périphérie du follicule, constituant la zone périfolliculaire. Parfois, malgré la sélection négative, des LB auto-réactifs gagnent la circulation sanguine et les follicules. Ils resteront dans les zones T, exclus du follicule et mourront en 1 à 2 jours (Male D *et al*, 2007; Sagaert *et al*, 2007).

### 3.2.2. Réponses folliculaire et extrafolliculaire spléniques

#### 3.2.2.1. La réponse folliculaire: lymphocytes B naïfs et lymphocytes post-switch

La réponse folliculaire, de par les différentes étapes successivement engagées est un processus long, atteignant son acmé au bout d'une dizaine de jours. Après avoir rencontré leur Ag à l'état natif, les LB naïfs circulants, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>, exprimant CCR7 se dirigent vers les zones T (PALS). Ils sont attirés par les ligands de CCR7, les chémokines CCL19 et CCL21, produites par les cellules stromales des zones T. Les LT reconnaissant l'Ag apprêté par les CPA vont subir une expansion clonale. Les LB et les LT activés expriment ensuite CXCR5, récepteur de la chémokine CXCL13, produite par les DC folliculaires et les cellules stromales folliculaires, ce qui entraîne leur migration vers le follicule dans lequel les LB vont proliférer de façon intense. Le BCR des LB reconnaissant l'Ag va alors subir des phénomènes d'hypermutation somatique, sous l'action d'une enzyme, l'AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*). Ce phénomène a lieu au niveau de la zone sombre des follicules, où les LB perdent l'expression de leur Ig de surface et présentent un large cytoplasme, d'où leur dénomination de centroblastes. Leur interaction avec les LT, *via* CD40-CD40L, entraîne également la commutation de classe de leur Ig. Ils perdront donc l'expression membranaire de l'IgD, pour exprimer, en fonction de l'environnement cytokinique un seul type d'Ig : IgG, IgA, IgM ou IgE. Ils gagnent ensuite la zone claire du follicule, et sont nommés centrocytes. Dans cette zone a lieu la maturation d'affinité. Les centrocytes interagissent avec les DC folliculaires présentant les Ag, ce qui permet la sélection des LB présentant les BCR les plus affins. Ils représentent environ 10 % des LB, les autres mourront par apoptose puis seront phagocytés par les macrophages (*tingible body macrophages*). Les LB post-switch donneront soit des plasmocytes de longue demi-vie, qui perdent l'expression de CD19, sécrètent des Ac de haute affinité, et n'expriment pas d'Ig de surface, soit des LB mémoires CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> qui recirculeront et gagneront de nouveau le follicule. Ces derniers permettront une réponse humorale plus rapide, avec sécrétion d'Ac très affins lors d'une réexposition à l'Ag (Male D *et al*, 2007; Sagaert *et al*, 2007) (Figures 7 et 8).

Par ailleurs, une population lymphocytaire B minoritaire n'exprime pas le CD27. Cette population CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> est mal définie à l'heure actuelle et constituerait un sous groupe de LB mémoires composé à la fois de LB post-switch exprimant une IgG ou une IgA de surface et des LB n'exprimant qu'une IgM de surface (Wei *et al*, 2007). Comme les LB mémoires exprimant CD27, cette sous-population prolifère après stimulation par de l'ADN CpG et n'est pas capable d'exclure un colorant comme la rhodamine du fait de l'absence d'une protéine exprimée par les LB naïfs, l'«*ATP-binding cassette 1 transporter*» (Wirhth & Lanzavecchia, 2005). Cette sous population présente également des mutations des gènes V des Ig comme cela est observé chez les LB mémoires CD27<sup>+</sup> (Agematsu *et*



*al*, 2000). Au cours du LES, l'augmentation des LB circulants CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> est corrélée à l'activité et à la gravité de la maladie (Wei *et al*, 2007). Au cours du PTI, il n'a pas été identifié de surreprésentation des différentes sous-populations lymphocytaires B sanguines et spléniques décrites selon l'expression de CD19, CD27 et IgD (Martinez-Gamboa *et al*, 2009).

### 3.2.2.2. Réponse extra-folliculaire: les lymphocytes B de la zone marginale

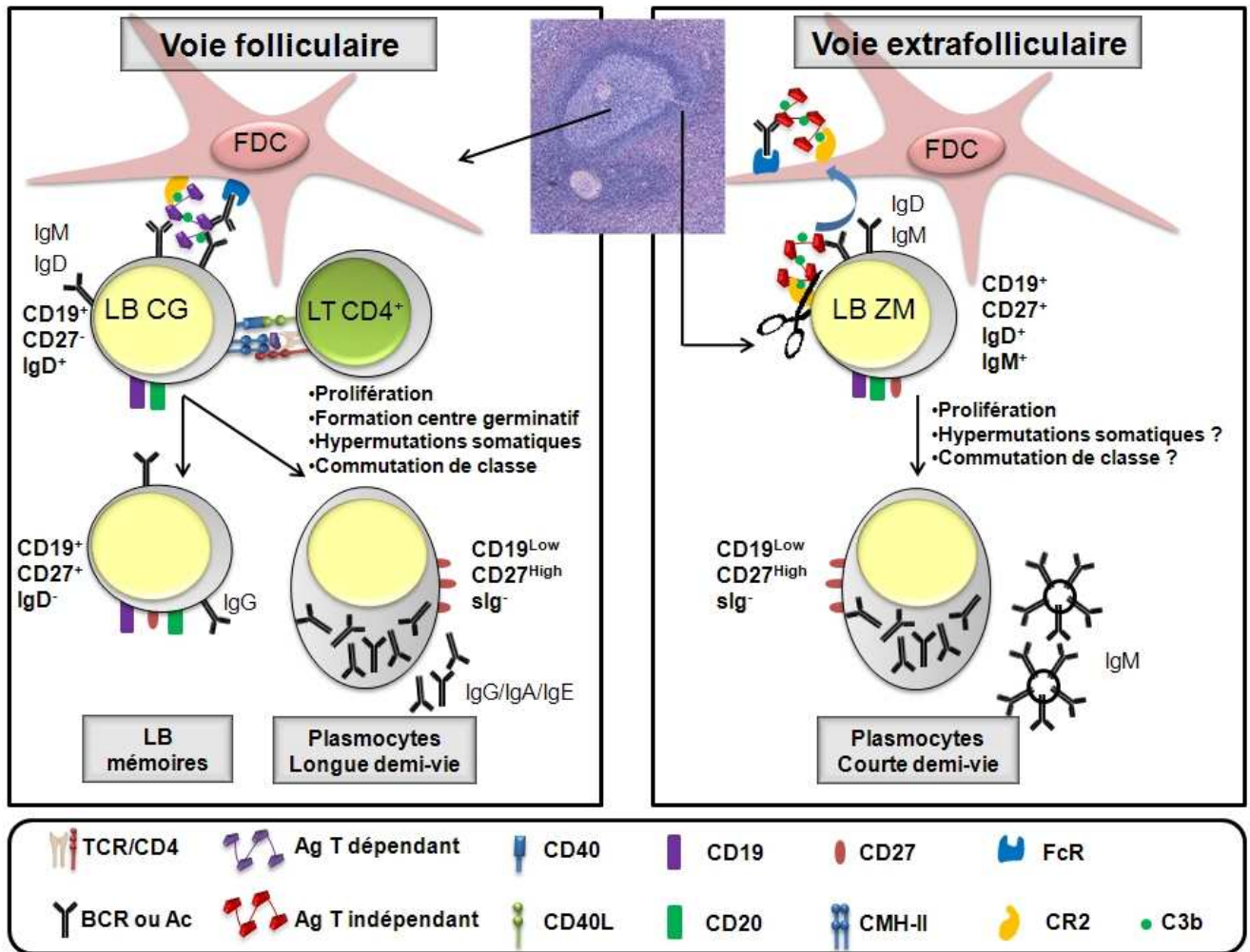
La caractéristique de la rate est l'existence d'une zone marginale, à la différence des ganglions. Cette particularité est également observée dans un autre site anatomique où de grandes quantités d'Ag sont exposées : le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Les lymphocytes présents au niveau de la zone marginale ont des caractéristiques particulières, puisqu'ils sont capables de proliférer et de se différencier rapidement en plasmocytes sans passer par les étapes de maturation du centre germinatif. Cette particularité est spécifique à la rate. Deux populations différentes présentent ces caractéristiques : les lymphocytes de la zone marginale et les cellules B1. Les lymphocytes de la zone marginale nécessitent une stimulation antigénique alors que les cellules B1 semblent pouvoir proliférer, chez la souris, sans stimulation antigénique (Male D *et al*, 2007; Sagaert *et al*, 2007).

La particularité des LB de la zone marginale est de permettre une réponse humorale rapide face à des Ag sanguins, indépendamment de la réponse T, en évitant les longs processus de maturation du centre germinatif (Figure 8). Ils sont définis par le phénotype CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>Low</sup>IgM<sup>+</sup> (Weill *et al*, 2009). Ils expriment également fortement d'autres molécules, notamment CD1c, CD21(CR2), HLA-DR (Shi *et al*, 2003; Weller *et al*, 2004) et dans une moindre mesure CD80 et CD95 (Shi *et al*, 2003). Ainsi, les LB de la zone marginale reconnaissant un Ag sanguin à l'état natif, sous forme de complexe immun ou exposé à la surface d'une DC vont proliférer et se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes de courte demi-vie. Les DC myéloïdes CD11c<sup>+</sup> participent à leur survie par la sécrétion de BAFF et APRIL. Expriment CXCR4, ces plasmablastes migrent ensuite au niveau de la pulpe rouge, attirés par la chémokine CXCL12. Les Ac sécrétés, qui sont de faible affinité et principalement de type IgM, gagnent ainsi rapidement la circulation sanguine. De façon surprenante, sont observés des phénomènes d'hypermutation somatique, conférant une plus haute affinité aux Ac, et des phénomènes de commutation de classe, permettant la sécrétion d'Ac d'autres isotypes, notamment IgG, alors que la réaction a lieu en dehors du centre germinatif, de façon T indépendante (Shi *et al*, 2003). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas compris et ont été observés chez des patients atteints du syndrome hyperIgM, lié à une mutation génétique de CD40L (Weller *et al*, 2001). Cette molécule est exprimée par les LT et intervient dans la commutation de classe des Ig des LB du centre germinatif qui expriment CD40 et dans les phénomènes de mutation somatique. Par

ailleurs, une enzyme primordiale pour la mutation somatique des Ig, l'AID, n'est pas exprimée par les LB de la zone marginale (Willenbrock *et al*, 2005). Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution. En effet, l'absence d'identification de l'AID est peut-être liée à un manque de sensibilité de la technique utilisée, l'immunohistochimie. Une autre équipe a quant à elle trouvé une expression de l'AID au sein des LB de la zone marginale par une technique plus sensible de PCR quantitative. L'expression de l'AID était 20 fois moindre qu'au sein des LB post-switch du centre germinatif, mais détectable, ce qui n'était pas le cas au sein des LB naïfs (Weller *et al*, 2005). Les mécanismes impliqués restent donc obscurs, certains auteurs pensent que ces mutations somatiques apparaîtraient avant la rencontre avec l'Ag, comme décrit chez le mouton. Il s'agirait d'une diversification du répertoire pré-immun survenant avant le contact avec l'Ag (Weller *et al*, 2004).

Cette réponse extrafolliculaire est brève, les plasmocytes de courte demi-vie meurent par apoptose après 3 jours. Cette voie présente un double intérêt, puisque d'une part la sécrétion rapide d'Ac permet de neutraliser les Ag pathogènes, et d'autre part ces Ac IgM qui se fixent aux Ag forment des complexes immuns circulants. Ceux-ci fixent le complément et facilitent ainsi la phagocytose des Ag par les CPA. Les CPA sont également stimulées par la liaison des fragments du complément fixés aux complexes immuns à leurs récepteurs CR1 (CD35) et CR2 (CD21). Ainsi, dans un second temps, une réponse T dépendante au sein des centres germinatifs pourra avoir lieu, permettant la sécrétion d'Ac de haute affinité de type IgG (Sagaert *et al*, 2007). Par ailleurs, les LB de la zone marginale sont capables de transporter les complexes immuns IgM/Ag natif se liant à leur récepteur CR2 directement aux DC folliculaires. Un clivage protéique de CR2 a lieu afin de permettre ce transfert. Ce mécanisme est important puisque ce sont ces complexes immuns présentés par les DC folliculaires qui sont impliqués dans la maturation d'affinité des BCR des LB engagés dans la voie folliculaire (Lopes-Carvalho *et al*, 2005).

D'autres lymphocytes participent à la réponse extra-folliculaire, les lymphocytes B1. Ces LB sont capables de sécréter de grandes quantités d'Ac naturels, de type IgM, reconnaissant principalement des Ag bactériens. Ils seraient produits avant la rencontre avec ces bactéries, ce qui leur confère un rôle important dans la réponse anti-infectieuse dans les premières années de vie, avant la maturation du système immunitaire. Issus de progéniteurs médullaires spécifiques, Lin<sup>-</sup> CD45R<sup>low</sup> CD19<sup>+</sup>, ils représentent 80 % du pool circulant des LB chez le fœtus et l'enfant. Ces LB expriment CD5, et sécrètent des Ac non mutés dirigés contre des auto-Ag et des Ag bactériens. A l'âge adulte, ces cellules se trouvent au niveau péritonéal et pleural. Chez l'homme, les connaissances sur leurs implications au cours de la réponse immunitaire sont partielles (Duan & Morel, 2006; Sagaert *et al*, 2007).



**Figure 8: Réponse folliculaire et extrafolliculaire splénique**

Deux types de réponse humorale sont possibles. La voie folliculaire a lieu au sein des centres germinatifs et nécessite une coopération T. Cette coopération avec les lymphocytes T préalablement activés par la reconnaissance de l'antigène apprêté par les cellules dendritiques au niveau des zones T, permet les phénomènes d'hypermutations somatiques et de commutation de classe des Ig aboutissant à la production de lymphocytes B mémoires (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) ou de plasmocytes de longue demi-vie. Cette voie permet la sécrétion d'anticorps très affins pour l'antigène, de classe IgG ou IgA principalement. La voie extrafolliculaire fait intervenir les lymphocytes B de la zone marginale (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) qui reconnaissent principalement des antigènes T indépendants, puisque cette réponse humorale ne nécessite pas de coopération avec les lymphocytes T. Elle permet la sécrétion par des plasmocytes de courte demi-vie d'anticorps peu affins, de type IgM. Cependant, dans certaines conditions, la survenue d'hypermutations somatiques serait possible ainsi qu'une commutation de classe des immunoglobulines. Par ailleurs, la fixation de l'antigène couvert de fraction C3b du complément au récepteur CR2(CD21) du lymphocyte de la zone marginale entraîne sa migration dans le centre germinatif où un clivage protéique de CR2 permet le transfert du complexe immunitaire aux cellules dendritiques folliculaires. Les lymphocytes B de la zone marginale participent donc également à la réponse folliculaire. (CG : centre germinatif, DC cellule dendritique, LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; ZM : zone marginale). Adapté de (Sagaert *et al*, 2007).

## 4. Thérapeutique anti-CD20: le rituximab

### 4.1. Généralités

Le rituximab (RTX) est un Ac monoclonal, IgG<sub>1</sub>κ, chimérique dirigé contre la molécule CD20. Cette protéine est exprimée par le LB du stade pré-B au stade B mature. L'expression est perdue par les plasmocytes et est absente des cellules souches lymphoïdes. La fonction de cette molécule membranaire n'est que partiellement connue. Le CD20 est impliqué dans les signaux de transduction régulant le flux calcique et participe ainsi à l'activation lymphocytaire B (Walshe *et al*, 2008). Le RTX agit selon trois mécanismes: ADCC, CDC et mort cellulaire programmée (Figure 9).

Se reporter à la figure 1 de l'article :Perosa F, Prete M, Racanelli V, Dammacco F. CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *J Intern Med*. 2010;267:260-277.

#### **Figure 9: Mode d'action du rituximab, extrait de (Perosa *et al*, 2010)**

Le rituximab entraîne une déplétion lymphocytaire B par trois mécanismes: une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) médiée par les cellules cytotoxiques, une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) entraînant la lyse des LB par formation du complexe d'attaque membranaire et l'induction d'apoptose des LB. Ceci entraîne, de façon irrégulière, la diminution de la production des Ac pathogènes, la diminution de la sécrétion de cytokines et la diminution de la capacité de présentation des Ag par les LB. Un autre mécanisme passerait par un phénomène de leurre. La fixation du rituximab au FcR des macrophages et des cellules cytotoxiques empêcherait la phagocytose ou l'ADCC des cellules recouvertes d'auto-Ag. De même, les macrophages et les cellules cytotoxiques sont recrutés pour la destruction des LB, ce qui les détournerait des autres sites d'inflammation.

(Ac: anticorps ; ADCC: cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ; Ag: antigène ; CDC: cytotoxicité dépendante du complément ; LB: lymphocytes B ; LT: lymphocytes T, RTX : rituximab)

Initialement utilisé dans le traitement des lymphomes, seul puis en association aux chimiothérapies, le RTX, bien que n'ayant pas une autorisation de mise sur le marché pour toutes ces pathologies, a montré son efficacité dans de nombreuses MAI comme la PR, l'anémie hémolytique auto-immune, la maladie des agglutinines froides, la vascularite cryoglobulinémique, le LES et le PTI (Kazkaz & Isenberg, 2004). Dans cette dernière indication, une méta-analyse récente a montré des taux d'efficacité et de tolérance très satisfaisants. Une réponse était observée dans 62,5 % avec une RC dans 43,6 %. Le délai d'obtention de la réponse était variable, la médiane se situant à 5,5 semaines, pour une durée de rémission de 2 à 48 mois, avec une médiane de 10,5 mois. Les facteurs prédictifs de bonne réponse sont le délai bref entre le diagnostic et l'initiation du traitement, ainsi que le jeune âge des patients. Des effets indésirables sont observés dans 1/5 cas, les épisodes ayant engagé le pronostic vital (3,7 %) ou entraîné le décès (2,9 %) ne sont pas tous directement imputables au RTX. Le schéma le plus souvent utilisé est une injection hebdomadaire pendant 4 semaines, à la dose de 375 mg/m<sup>2</sup> (Arnold *et al*, 2007). Devant l'hypothèse d'une masse lymphocytaire B moins importante au cours des pathologies auto-immunes qu'au cours des lymphomes, l'utilisation de doses moindres de RTX a été proposée. Bien que portant sur un faible effectif de patients atteints de PTI, l'utilisation d'une dose fixe de 100 mg/semaine pendant 4 semaines montre une diminution des effets indésirables tout en conservant une bonne efficacité, avec une réponse de l'ordre de 57 %. Une déplétion comparable des LB sanguins est obtenue dans les 4 semaines (LB CD19<sup>+</sup><30/mm<sup>3</sup>), avec une réascension observée entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> mois (Provan *et al*, 2007). Dernièrement, l'efficacité et la tolérance du RTX ont été évaluées chez des patients candidats à une splénectomie. Une bonne réponse, avec un taux de plaquettes supérieur à 50 000/mm<sup>3</sup> et au moins un doublement du chiffre initial sans aucune autre thérapeutique a été observée dans 40 % des cas à un an et 33 % à 2 ans. Le seul facteur prédictif corrélé au taux de réponse à long terme était le jeune âge. La tolérance était bonne, 25 % des patients ont présenté des effets indésirables mineurs liés à la première perfusion, un seul patient sur 60 a présenté une maladie sérique (Godeau *et al*, 2008).

Seule la détection de la déplétion des LB périphériques est accessible en routine, bien que son suivi ne soit pas recommandé pour l'instant chez les patients traités par RTX. Chez les patients en rechute de leur maladie, une déplétion lymphocytaire B sanguine significativement moins importante est observée, témoignant peut-être de la persistance de LB de façon importante au niveau des organes lymphoïdes (Parodi *et al*, 2006). A notre connaissance, l'effet du RTX sur les populations lymphocytaires B des organes lymphoïdes secondaires chez l'homme n'a été étudié que dans une étude, rapportant le cas de deux patients (Kneitz *et al*, 2002). Pour l'un, la splénectomie a été

réalisée 3 mois après le traitement par RTX et montrait une déplétion lymphocytaire B sanguine, médullaire et splénique complète, tandis que pour l'autre, 14 mois après le traitement, il existait une reconstitution sanguine et splénique. Des données sont également disponibles chez le singe, où l'effet du RTX a été étudié dans la prévention du rejet de greffe. La déplétion lymphocytaire B apparaît d'une grande variabilité interindividuelle et différente selon les sites étudiés. En effet, alors qu'une déplétion lymphocytaire B périphérique est observée chez tous les animaux, celle-ci est très variable au niveau splénique, ganglionnaire, médullaire et thymique. Cette déplétion semble difficile à obtenir au sein des ganglions périphériques, tandis que la moelle osseuse et le thymus apparaissent très sensibles (Schroder *et al*, 2003). Des effets similaires sont observés chez le babouin (Alwayn *et al*, 2001). L'effet d'un second cycle de traitement ou d'une augmentation de doses n'a pas été étudié pour l'instant. Chez l'homme, un polymorphisme du gène du FcγRIIIa participe à la résistance au RTX au cours des lymphomes. Ce polymorphisme implique la présence d'une valine (V) ou d'une phénylalanine (F) en position 158, l'homozygotie FCGR3A V/V entraînant une augmentation de l'affinité pour les IgG<sub>1</sub> et les IgG<sub>3</sub>, et/ou une augmentation de l'expression du récepteur. Les patients homozygotes pour l'allèle FCGR3A V/V présentent une meilleure réponse au traitement par RTX comparativement aux sujets hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle FCGR3A F (Cartron *et al*, 2002). Le rôle de ce polymorphisme au cours du PTI est inconnu pour l'instant.

La reconstitution lymphocytaire B sanguine survient en moyenne 6 à 9 mois après traitement par RTX, constituée initialement par une population de LB naïfs, composés principalement de LB transitionnels (CD27<sup>-</sup>CD38<sup>High</sup>IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD24<sup>High</sup>), dont le nombre augmente de façon constante pendant les 6 premiers mois. Six à 8 mois après le traitement, apparaissent également des LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, qui n'atteignent cependant qu'environ 30 % de leur proportion avant traitement, ce déficit se maintenant pendant au moins 2 ans (Roll *et al*, 2006). La persistance de ces LB de la zone marginale dans les mois qui suivent la perfusion est associée à une non réponse au cours de la PR ce qui pourrait plaider pour leur rôle dans la physiopathologie de la PR (Roll *et al*, 2008). A l'inverse, au cours du LES, il n'y a pas de différence entre les patients non répondeurs et répondeurs concernant cette sous population ; par contre une reconstitution rapide par des LB mémoires post-switch est observée chez les non répondeurs (Anolik *et al*, 2007).

#### 4.2. Le rituximab au cours du PTI:

Au cours du PTI, le RTX est capable d'induire une déplétion lymphocytaire B prolongée participant probablement à l'augmentation du chiffre plaquettaire. Cependant, des effets rapides sont observés alors même que les taux d'Ac anti-plaquettes restent présents dans le sérum et que les plasmocytes, cellules productrices d'Ac, n'expriment pas le CD20. Ceci a donc conduit à étudier les effets du RTX sur les cellules T. Stasi a montré que le RTX était capable de corriger les anomalies observées sur les populations lymphocytaires T, rééquilibrant les réponses Th1/Th2 et Tc1/Tc2, et restituant un profil polyclonal au TCR (Stasi *et al*, 2007). Au cours du LES, le traitement par RTX est capable d'augmenter le nombre de LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup>, mais également des Treg qui vont pouvoir inhiber la réponse auto-immune (Vallerskog *et al*, 2007).

Ces résultats témoignent donc d'une activité du RTX sur les LB, entraînant leur déplétion, mais également d'un effet sur les LT, sans que les mécanismes impliqués ne soient pour l'instant élucidés.

Ainsi, la physiopathologie du PTI est complexe et reste partiellement connue, la rate jouant un rôle crucial dans le maintien de la réponse auto-immune. Nous avons donc orienté nos recherches sur plusieurs axes :

- Le rôle des Treg circulants et spléniques
- Les réponses Th1, Th2 et Th17 spléniques
- La description des sous populations lymphocytaires B spléniques
- Les effets du RTX sur les populations lymphocytaires spléniques

Ce sont ces résultats qui sont présentés dans le manuscrit suivant.

## **RESULTATS**

Article: "Immunological effects of rituximab on human spleen in immune thrombocytopenia."



## Résumé:

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la rate au cours du PTI, nous avons étudié les différentes sous populations lymphocytaires T, dont les Treg ainsi que la polarisation des LT CD4<sup>+</sup>. L'impact du RTX sur les LB circulants et spléniques a également été analysé. Pour ce faire, quarante patients atteints de PTI primaire et 28 témoins sains ont été inclus. Les rates de 15 patients, dont 8 préalablement traités par RTX, ont été comparées à 7 rates de sujets sains (4 rates traumatiques, une splénectomie partielle pour bilan de kystes spléniques, une splénectomie de rencontre, un prélèvement multi-organe).

Nous avons montré que le taux de Treg sanguins, définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> n'était pas significativement différent entre témoins et patients. Les Treg représentaient environ 4 % des LT CD4<sup>+</sup> circulants. Cependant, après traitement, une augmentation significative du pourcentage de Treg chez les patients répondeurs (de 4.6 ± 3.5 à 6.2 ± 3.5 % ;  $p=0,04$ ) a été observée alors que les taux sont restés stables chez les sujets non répondeurs (4.7 ± 1.3 % avant et 4.1 ± 1 % après ;  $p=0.2$ ).

Les Treg ont été localisés au niveau splénique principalement au niveau des PALS et dans une moindre mesure au niveau des follicules. Leur taux était significativement plus bas chez les patients atteints de PTI traités ou non par RTX comparés aux témoins (respectivement 1.72 ± 1.19 % et 2.17 ± 0.75 % contre 4.98 ± 2.29 % des LT CD4<sup>+</sup> ;  $p=0,005$  et  $p=0,01$ ).

L'analyse des LB spléniques a montré une augmentation significative de lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire extra-folliculaire indépendante des LT, les LB de la zone marginale (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>). Ils représentaient 25 % des LB spléniques chez les patients atteints de PTI non traités par RTX, contre 10 % chez les témoins, ces résultats soulignant l'importance de la réponse humorale au cours du PTI. Par ailleurs, le taux de plasmocytes CD19<sup>Low</sup>CD27<sup>High</sup> était plus élevé chez les sujets atteints de PTI, particulièrement après traitement par RTX. Concernant les effets du RTX, une déplétion complète lymphocytaire B sanguine a été obtenue chez tous les patients, qu'ils soient en rémission ou non. Au niveau splénique, cette déplétion a été variable d'un patient à l'autre, le taux de LB résiduels n'étant pas corrélé de façon évidente au délai entre RTX et splénectomie, mais nous ne disposons que d'un faible échantillon. Cependant, une déplétion complète (<0,5 % de LB) a été obtenue chez la moitié des patients (4/8) et n'a pas cependant permis d'obtenir une réponse clinique. Ainsi, une déplétion lymphocytaire B sanguine et splénique n'est pas suffisante pour obtenir une rémission. Chez les patients en échec de RTX, l'analyse de la réponse immunitaire T splénique a montré que le ratio Th1/Treg est plus élevé, comparativement aux témoins ou aux patients non traités par RTX. Par ailleurs, il existait un déséquilibre entre les LT auxiliaires et LT cytotoxiques, le

ratio CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> étant plus élevé chez les patients en échec de RTX. Ainsi, alors que le PTI semble être initialement une maladie dépendante des LB, nous avons observé une transition vers une maladie dépendante des LT chez les patients en échec de RTX, un déséquilibre de la balance Th1/Treg et une augmentation du ratio CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> constituant probablement un mécanisme d'échappement à cette thérapeutique.

## Title page

### Immunological effects of rituximab on human spleen in immune thrombocytopenia.

Sylvain Audia,<sup>1,2</sup> Maxime Samson,<sup>1</sup> Julien Guy,<sup>3</sup> Daniela Lakomy,<sup>1</sup> Jennifer Fraszczak,<sup>1</sup> Malika Trad,<sup>1</sup> Vanessa Leguy,<sup>2</sup> Sabine Berthier,<sup>2</sup> Tony Petrella,<sup>4</sup> Serge Aho-Glélé,<sup>5</sup> Laurent Martin,<sup>4</sup> Marc Maynadié,<sup>3</sup> Bernard Lorcerie,<sup>2</sup> Bertrand Godeau,<sup>6</sup> P Rat,<sup>7</sup> N Larmonier<sup>8</sup> and Bernard Bonnotte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CRINSERM 866, University of Burgundy, Dijon, France

<sup>2</sup> Department of internal medicine, competence center for auto-immune cytopenia, University Hospital, Dijon, France.

<sup>3</sup> Hematology laboratory, University Hospital, Dijon, France

<sup>4</sup> Department of pathology and cytology, University Hospital, Dijon, France

<sup>5</sup> Department of epidemiology and hospital's hygiene, University Hospital, Dijon, France

<sup>6</sup> Departement of internal medicine, reference center for auto-immune cytopenia, University Hospital, Creteil, France.

<sup>7</sup> Department of surgery, University Hospital Dijon, France.

#### Corresponding author:

Bonnotte Bernard

Service de médecine interne et immunologie clinique

CHU, Hôpital du Bocage

2, Bd maréchal de Lattre de Tassigny

21000 DIJON

FRANCE

Tel : (33)3 80 29 34 32

Fax : (33)3 80 29 38 46

Mail : [bernard.bonnotte@chu-dijon.fr](mailto:bernard.bonnotte@chu-dijon.fr)



CR INSERM 866  
7, bd Jeanne d'Arc  
Faculté de médecine-pharmacie  
21000 DIJON  
FRANCE  
Tel : (33)3 80 39 55 52  
Fax : (33)3 80 39 34 34  
Mail : [bernard.bonnotte@u-bourgogne.fr](mailto:bernard.bonnotte@u-bourgogne.fr)

**Short title**

Immune effects of RTX in ITP

**Word counts:**

Abstract: 208

Text: 3723

Figure count: 6

Table count: 3

Reference count: 42

## Abstract

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease with a complex pathogenesis in which the spleen plays a key role. As in other auto-immune diseases, B cell depletion using rituximab (RTX) triggers good response rate but the mechanisms involved are partly unknown, particularly on secondary lymphoid organs. As splenectomy is a second-line treatment of ITP, it gives the opportunity to assess the immune response in this major secondary lymphoid organ and to study the splenic effects of RTX in this auto-immune disease. Our results show that the number of splenic CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> marginal zone B cells and splenic plasma cells is higher in ITP patients than controls. After RTX, a complete B cell depletion is observed both in the blood and in the spleen, which is not sufficient to achieve remission. However, splenic plasma cells are still observed after RTX. Moreover, ITP patients resistant to RTX therapy have higher splenic Th1/Treg and CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ratios than controls and ITP patients not treated with RTX. Unlike the circulating Treg rate, which is similar between controls and ITP patients, splenic Treg are decreased in ITP patients. Although B cells are involved in the pathogenesis of ITP, the therapeutic effects of RTX seems to be mediated by other mechanisms than B cell depletion.

## Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease characterized by a low platelet count. Its pathogenesis is complex and involves both an immune peripheral destruction of platelets and an insufficient bone marrow production<sup>1</sup>. Both B and T cells play a role in the dysregulation of the immune system. Antiplatelet auto-antibodies are often detected in ITP, although it is not a diagnostic hallmark, as it can also be observed in other pathologic conditions<sup>2</sup>. Opsonization by auto-antibodies accelerates the destruction of platelets and their progenitors<sup>3</sup>. These auto-antibodies are usually isotype-switched and harbor somatic mutations, which is consistent with a T cell cooperation<sup>4</sup>. The peripheral cytokine profile is Th1<sup>5-6</sup> and cytotoxic T cells could directly reduce platelet production by killing megakaryocytes<sup>7-8</sup>. Moreover, naturally occurring regulatory T cells (Treg) which represent a subpopulation of T CD4<sup>+</sup> lymphocytes with immunoregulatory properties<sup>9-10</sup> may play a role in ITP even if the literature showed contradictory results. Some authors found a decreased number of peripheral Treg<sup>11-14</sup>, whereas others reported normal levels<sup>15-16</sup>. In all these studies, Treg from ITP patients presented a functional deficiency<sup>11-12,14-16</sup>, which was corrected by treatments<sup>11,14,16</sup>.

As in many other auto-immune diseases<sup>17</sup>, Rituximab (RTX) is efficient in ITP, the response rate is 40 % at one year<sup>18</sup>. RTX is a chimeric monoclonal antibody directed against CD20, a molecule expressed by the whole B cell lineage except pro-B cells and plasma cells. Its ligation to CD20 triggers the death of B lymphocytes, involving apoptosis, complement dependent cytotoxicity and antibody dependent cytotoxicity<sup>17,19</sup>. After RTX infusion, a rapid and complete depletion of circulating B cells is observed. However, the effect of RTX on the immune response is partly unknown, since antiplatelet auto-antibodies can be found in responder patients treated with RTX<sup>20</sup>. Moreover, RTX can act on T helper cells in ITP by inducing a reversion of the increased Th1/Th2 and Tc1/Tc2 ratios in responder patients<sup>6</sup>. Interestingly, its effect on B cell or on T helper cells in secondary lymphoid organs is currently unknown.

In auto-immune disease mouse models, splenic cell analysis is the usual way to study the immune response. In all the human auto-immune diseases, little to nothing is known about the immune response in the spleen, a major secondary lymphoid

organ. ITP is one of the very rare situations in human in which splenic cells can be studied, as splenectomy remains one of the corner stone of the treatment with a response rate of 66 %<sup>21</sup>.

This study was performed to evaluate the splenic immune response in ITP patients and also to assess the effects of rituximab. We focused on both circulating and splenic cells, particularly B and T cells, including Treg. A lower rate of Treg was found in the spleen of ITP patients. Despite the fact that ITP patients had the same circulating level of Treg than controls, a significant increase was observed after treatment-induced remission. We also demonstrated that the effect of RTX is not correlated with splenic B cell depletion and that plasma cells remain observed after RTX therapy. Moreover, an increase in Th1/Treg and CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ratios in non responder patients after RTX infusion was observed.



## Material and Methods

### Patients

Forty consecutive ITP patients, hospitalized in a university hospital, were enrolled in this study after their consent was obtained. Patient's inclusion criteria were thrombocytopenia (platelets count under  $100.10^9/L$ ) with exclusion of familial, viral or drug-induced etiologies. Patients suffering from other auto-immune diseases (*i.e.* systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome) were excluded. Patients were treated following clinicians' experience. Blood samples were obtained at different times for each patient. This study was approved by our local ethics committee.

Response rates were defined as followed: complete response (CR) when platelet count was over  $100.10^9/L$ , partial response (PR) when platelet count ranged between 30 and  $100.10^9/L$  with at least a two-fold increase in the initial platelet count, and no response (NR) when platelet count was under  $30.10^9/L$ . Characteristics of patients are reported in table 1. Twenty-eight healthy donors matched for sex and age were used as control group. Blood samples of 27 ITP patients were available at diagnosis before treatment and following the evolution of the disease (Table 2). The mean platelet volume (MPV) was significantly increased in ITP patients ( $10.1 \pm 1.3 \mu m^3$ ) in comparison with controls ( $8.4 \pm 1.1 \mu m^3$ ). No significant difference was observed regarding the different lymphocyte subsets ( $CD4^+$  T lymphocytes,  $CD8^+$  T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells).

The spleens of 15 ITP patients were available for histological, flow cytometry (FCM) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses. Seven spleens obtained from post traumatic splenectomy were used as controls.

### Antibodies

The following antibodies were used for FCM analysis of lymphocyte subsets: anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 PE-Cy5, anti-CD16+CD56 PE, anti-CD19 PE-Cy5, anti-Kappa FITC, anti-Lambda PE, anti-CD45 PE-Cy7 (Beckman Coulter), anti-CD4

APC, anti-CD8 PB, anti-CD19 APC, anti-CD27 PE-Cy7, anti-CD14 APC, anti-CD16 FITC, anti-CD56 APC (eBioscience), anti-IgD FITC and anti-CD3 FITC (BD Bioscience). Treg staining was performed with anti-CD4 PE-Cy5.5, anti-CD25 PE and anti-Foxp3 Alexa Fluor<sup>®</sup>488 (Human Treg Flow<sup>™</sup> Kit, Biolegend), following manufacturer's instructions. Data were acquired on a Beckman Coulter<sup>®</sup> Epics-XL or a BD Bioscience LSRII cytometer and analysed with FlowJo<sup>®</sup> software.

Anti-CD3 (Neomarkers), anti-CD4 (Novocastra), anti-Foxp3 (clone 236A/E7; Abcam), anti-CD8, anti-CD20, anti-CD79a and anti-CD68 (Dako) antibodies were used for immunohistology.

### **Study of the T helper polarization**

A negative selection of CD4<sup>+</sup> lymphocytes was performed using a CD4<sup>+</sup> T cells isolation kit II (Miltenyi biotec). FCM analysis always showed a purity >90 % of CD4<sup>+</sup> cells. Then, 500 000 CD4<sup>+</sup> cells were implanted in 24 wells plate in 1 mL of RPMI 1640 (Bio Whittaker) with 10 % of FBS (Gibco BRL) and stimulated with 0.1 µg/mL of phorbol 12-myristate 23-acetate (PMA) and 1 µg/mL of ionomycin (Sigma-Aldrich) for 8 hours in presence of 1µL/mL of Brefeldine A (BD Golgi Plug; BD Bioscience) for the last 4 hours. Isolation of CD4<sup>+</sup> lymphocytes was performed before cytokine staining, because the stimulation with PMA triggers an internalization and a degradation of CD4, disturbing the identification of Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>), Th2 (CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>) and Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) cells<sup>22</sup>. Then, cells were harvested, fixated and permeabilized (Fixation Permeabilization buffer, eBioscience) for intracellular cytokines staining using anti-IFN-γ APC, anti-IL-17 PE and anti-IL-4 FITC antibodies (eBioscience).

### **Real-Time Polymerase Chain Reaction**

Total RNA was isolated from splenic CD4<sup>+</sup> cells. IL-17A, IFN-γ, RORc, T-bet, GATA3, Foxp3 transcripts were quantified by RT-PCR and normalized to the expression of L32. The following primer sequences were used: IL-17A: 5'AGCCTGGAGGCCATAGTGAA3', 3'CGGGGGAAGTTCTTGTCTCCTC5'; IFN-γ: 5'CTGTCGCCAGCAGCTAAAAC3', 3'ACTGGGATGCTCTTCGACCT5'; RORc:

5'TCTGGAGCTGGCCTTTCATC3', 3'CAGCTTTGCCAGGATGCTTT5'; T-bet: 5'CCCCTTGGTGTGGACTGAGA3', 3'ACGCGCCTCCTCTTAGAGTC5'; GATA3: 5'GTCCTCCCTGAGCCACATCT3', 3'GTGGTCCAAAGGACAGGCTG5'; and Foxp3: 5'CAGCTGCAGCTGCCCAC3', 3'TGTCCTGGAGGAGTGCCT5'. The absence of DNA contamination was checked thanks to a special primer amplifying two distinct exons of the Foxp3 gene, so that the presence of DNA would have resulted in the presence of two products of amplification.

### **Statistical analysis**

Wilcoxon test was used to compare rates of Treg before and after treatment. Percentages were compared using Fischer test. Non parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Withney) were used when normality of distribution or homoscedasticity were not verified. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Analysis was performed with STATA™ (Stata Corporation) and GraphPad Prism®.

## Results

### RTX induced follicular atrophy in the spleen of ITP patients and complete depletion of circulating B lymphocytes

The distribution of the different cell subsets was assessed first by immunohistology, performed on the spleens of control (n=4), ITP patients previously treated by RTX (ITP RTX<sup>+</sup>; n=4) or not (ITP RTX<sup>-</sup>; n=6) (Fig. 1). The characteristics of the patients who underwent splenectomy are reported in table 3. A follicular hyperplasia consistent with secondary follicles with germinal center was observed in ITP RTX<sup>-</sup>. These secondary follicles accounted for 82.5 % of total follicles in ITP patients versus 7.5 % in controls ( $p=0.013$ ). RTX induced a marked follicular atrophy as represented by the absence or the low staining by anti-CD20 and anti-CD79a antibodies (Fig. 1). Splenic cells were also quantified by FCM analysis in 7 controls and 15 ITP patients, among whom 8 previously received RTX. By FCM analysis (Fig. 2), a significant decrease in splenic B lymphocytes was observed after RTX infusion, in comparison with controls ( $5.6 \% \pm 9.8$  vs  $39.5 \% \pm 6.4$ ;  $p=0.001$ ) and ITP RTX<sup>-</sup> patients ( $5.6 \% \pm 9.8$  vs  $39.9 \% \pm 8.8$ ;  $p<0.001$ ). Surprisingly, residual B lymphocytes were clearly identified by FCM (Fig. 2) in two patients (n°10 and 14), since residual B cells accounted 10.9 and 28.2 % of total lymphocytes respectively, whereas peripheral B cell depletion was complete for both of them. The level of these residual B cells was not directly correlated with the interval between RTX infusion and splenectomy ( $p=0.66$ ; data not shown). Circulating B lymphocytes were also monitored in 14 patients by the expression of CD19. A rapid and significant decrease in B lymphocytes was observed two weeks after the first infusion: the B lymphocyte rate was under 0.5 % in all patients one month after the first infusion ( $p=0.0016$ ), whatever the response (Fig. 2). The age and the interval between diagnosis and RTX infusion were not identified as predictive factors of RTX efficiency (data not shown).

### Marginal zone B cells and plasma cells are increased in the spleen of ITP patients

As the number of B cells was very low for most of the ITP patients treated with RTX, B cell subsets were only analyzed in controls and ITP RTX<sup>-</sup>. Four populations were

studied: naïve B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), and three other subsets of memory B cells already described: marginal zone B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), post-switch memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) and a post-switched memory subsets lacking CD27 (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>)<sup>23</sup>. A significant increase in marginal zone B cells was observed in ITP RTX<sup>-</sup> patients when compared with controls (25.7 ± 7.7 % vs 10.2 ± 7.9 %;  $p=0.03$ ), whereas other subsets were similar (Fig. 2).

Plasma cells were defined as CD19<sup>Low</sup>CD27<sup>High</sup>, as previously described<sup>24-25</sup>. In comparison with controls, plasma cells were significantly higher in ITP RTX<sup>-</sup> (1.32 ± 0.73 vs 0.50 ± 0.42 % of CD19<sup>+</sup> cells;  $p=0.03$ ) and particularly in ITP RTX<sup>+</sup> (5.9 ± 4.5 vs 0.50 ± 0.42 % of CD19<sup>+</sup> cells;  $p=0.003$ ) (Fig. 2).

#### Splenic CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cell ratio is increased after RTX

Immunohistology analyses revealed that T lymphocytes were preferentially localized in the periarteriolar lymphocytoid sheaths (PALS) and at a lesser extend in the red pulp. There was no difference concerning the amount of T lymphocytes in PALS between controls and ITP patients ( $p=0.5$ ). As we could expect, because of the B cell depletion, FCM analyses showed that the number of CD3<sup>+</sup> lymphocytes was significantly higher in the spleens of ITP RTX<sup>+</sup> (76.2 ± 11.4 % of splenic lymphocytes) when compared with controls (43.3 ± 7.8 %;  $p=0.003$ ) or ITP RTX<sup>-</sup> (49.8 ± 10.8 %;  $p=0.005$ ). On the contrary, no difference was observed in the level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> between the three groups by FCM analyses (Fig. 3). Nevertheless, the CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cell ratio was significantly higher after RTX therapy when compared with ITP RTX<sup>-</sup> (1.7 ± 1.1 vs 0.81 ± 0.27;  $p=0.02$ ). The level of NK cells was similar between the three groups, representing 4.75 % of total lymphocytes at mean (Data not shown).

#### Splenic Treg are decreased in ITP whereas circulating Treg levels are similar to controls

Treg identified as Foxp3<sup>+</sup> cells by immunohistology were preferentially localized in PALS with an average number of 11 ± 7.1 in controls, 16.2 ± 5.4 in ITP RTX<sup>-</sup>

( $p=0.56$ ) and  $10.9 \pm 5$  cells in ITP RTX<sup>+</sup> ( $p=0.5$ ). In the follicles, Treg were rarer:  $1.7 \pm 1.8$  in controls and  $6.9 \pm 3.6$  in ITP RTX<sup>-</sup> (Fig. 1). The difference did not reach the level of significance ( $p=0.25$ ). Since follicles were not identifiable in ITP RTX<sup>+</sup>, Treg count was not available for this localization. By FCM analysis, Treg, defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, were significantly lower in ITP RTX<sup>-</sup> ( $2.17 \pm 0.75$  % vs  $4.98 \pm 2.29$  % of CD4<sup>+</sup> T cells;  $p=0.005$ ) and ITP RTX<sup>+</sup> patients ( $1.72 \pm 1.19$  % vs  $4.98 \pm 2.29$  % of CD4<sup>+</sup> T cells;  $p=0.01$ ) when compared with controls. No difference was observed regarding CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells ( $p=0.59$ ) (Fig. 4). RT-PCR analyses from splenic cells confirmed that Foxp3 expression was significantly lower in ITP RTX<sup>-</sup> ( $1.9 \pm 2.4$  vs  $9.8 \pm 5.5$ ;  $p=0.037$ ) and ITP RTX<sup>+</sup> ( $1.5 \pm 0.8$  vs  $9.8 \pm 5.5$ ;  $p=0.036$ ) when compared with controls (Fig. 4).

The rate of circulating Treg, identified by FCM as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>, was also assessed. The Treg level was similar in controls ( $n=26$ ) and ITP patients ( $n=20$ ) (Fig. 5). Treg represented respectively  $4.2 \pm 1.1$  % and  $3.8 \pm 1.6$  % of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes ( $p=0.31$ ). No difference was observed in the absolute count between controls and patients ( $41.9 \pm 19.2/\text{mm}^3$  vs  $35.7 \pm 23.4/\text{mm}^3$ ;  $p=0.16$ ). Results were similar regarding CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (Data not shown).

Whatever the treatment used, the percentage of Treg among CD4<sup>+</sup> cells significantly increased in responder patients ( $n=14$ ;  $4.6 \pm 3.5$  up to  $6.2 \pm 3.5$  %;  $p=0.04$ ). No significant difference was observed in term of absolute count ( $36.2 \pm 23.2$  and  $43.2 \pm 38.2/\text{mm}^3$ ;  $p=0.5$ ). In non responder patients ( $n=9$ ), Treg remained at the same level, both in percentage ( $4.7 \pm 1.3$  % and  $4.1 \pm 1$  %;  $p=0.2$ ) and absolute count ( $31.8 \pm 12.8$  and  $28.5 \pm 10.1/\text{mm}^3$ ;  $p=0.3$ ) (Fig. 5).

#### Increase in splenic Th1/Treg ratio after RTX in ITP patients

In the spleen, neither the level of Th1, Th2 and Th17 cells nor the Th1/Th2 ratios were significantly different between the three groups (Fig. 6). As autoimmunity is mainly dependent on the balance between active immune response and immune regulation, we focused on the Th1/Treg and the Th17/Treg ratios. Th17/Treg ratio was similar between the three groups, whereas a significant increase in the Th1/Treg



ratio was observed in ITP RTX<sup>+</sup> in comparison with controls ( $22.6 \pm 12.3$  vs  $2.7 \pm 3.5\%$ ;  $p=0.008$ ) and ITP RTX<sup>-</sup> ( $22.6 \pm 12.3$  vs  $3.1 \pm 3.1\%$ ;  $p=0.004$ ) (Fig. 6). These results were confirmed by RT-PCR analysis with a significant increase in the IFN- $\gamma$ /Foxp3 ratio in ITP RTX<sup>+</sup> when compared with controls ( $1113 \pm 538$  vs  $94 \pm 53.8$ ;  $p=0.036$ ; data not shown). The level of T-bet, GATA3, RORc and IL-17A mRNA were not significantly different between the three groups (data not shown).





## Discussion

In ITP patients, the spleen is of particular interest as it is the preferential location where the immune response is triggered and maintained<sup>26-27</sup>. As it was historically described<sup>28-29</sup>, the main histological feature of the spleen of ITP patients enrolled in this study was the presence of numerous hyperplastic follicles, with predominance of secondary follicles. Interestingly, we also demonstrated for the first time an increase in the marginal zone B cells in the spleen of patients suffering from an auto-immune disease. By FCM analysis, a significant increase in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> cells in the spleen of ITP patients was observed, highlighting their possible implication in ITP pathogenesis. These cells are involved in the extrafollicular T-independent immune response and recognize blood-borne antigens<sup>30</sup>. They are known for secreting IgM antibodies, but upon IL-21 and CD40L stimulation, IgG can also be produced<sup>31</sup>. Despite the fact that they particularly recognize polysaccharide antigen from bacterial envelope, they can also harbor an auto-immune repertoire<sup>32</sup> and are suspected to play a role in auto-immune mechanisms, at least in animals models<sup>33</sup>. In human, it has been shown that their early blood reconstitution after RTX infusion in rheumatoid arthritis represented a predictive factor of relapse<sup>34</sup>. Their role in the humoral immune response is not restricted to extrafollicular pathway. Indeed, it has been demonstrated that they were able to carry immune complexes to follicular dendritic cells which are able to catch them through a CD21/C3d interaction and present these antigens to B cells in the secondary follicles, which is necessary for the differentiation into long-life plasma cells and memory B cells<sup>35</sup>. A close attention should be given to this B cell subset in further ITP studies, particularly by assessing the antigenic specificity of their antibodies.

Because of the B cell involvement in ITP pathogenesis, RTX has been successfully used in ITP treatment<sup>18,20</sup>. One of the suspected therapeutic effects of RTX may result from a complete depletion of B cells which are responsible for the secretion of antiplatelet antibodies detected in the blood of ITP patients. The action of RTX on secondary lymphoid organs during auto-immune diseases is still unknown. It has been shown that RTX triggers 40 % response after one year of follow-up in ITP<sup>18</sup> despite the fact that antiplatelet auto-antibodies can still be detected in the serum of responder patients<sup>20</sup>. One of our hypotheses was that non response after RTX

treatment could be linked to either the persistence of plasma cells, or an incomplete B cell depletion in secondary lymphoid organs, even if circulating B cells are still undetectable. In our study, all the patients treated with RTX, including responders and non responders, achieved a complete peripheral depletion of B lymphocytes, which strongly suggests that peripheral B cell depletion is not sufficient to achieve remission in ITP. Moreover, examination of the spleens from non responder patients previously treated by RTX at an average of six months before splenectomy revealed a complete B cell depletion in most of them. Only one study reported B cell evaluation in the spleen of two ITP patients after RTX. Neither peripheral nor splenic B cells were detected in the first patient treated with RTX three months before, whereas the second patient presented peripheral and splenic B cell regeneration 14 months after RTX infusion <sup>36</sup>. In monkeys, high doses of RTX induced a complete B cell depletion in the blood, the lymph nodes, the spleen and the bone marrow for at least one month. However, this depletion was incomplete in one out of four animals, underlying the inter-individual variation of B cell depletion after RTX treatment despite the use of the same doses <sup>37</sup>. Our results suggest that B cell depletion in the secondary lymphoid organs can be achieved in almost all the patients, with inter-individual variation not clearly related to the time between RTX infusion and the splenectomy (personal data). However, as it was demonstrated in our study, this splenic B cell depletion is not sufficient to achieve remission in ITP. Moreover, CD19<sup>Low</sup>CD27<sup>High</sup> plasma cells, which are higher in the spleen of ITP patients, are still observed after RTX treatment, probably because they do not express CD20 <sup>24</sup>, which make them resistant to RTX. Taken altogether, these results strongly suggest that therapeutic effects of RTX in ITP are not entirely dependent on B cell depletion but can rather involve immunoregulatory effects. Indeed, it has been previously shown in ITP, that RTX was able to correct peripheral T cell abnormalities, such as anti-apoptotic protein overexpression, increase in the Th1/Th2 and the Tc1/Tc2 ratios and quantitative or functional defects of Treg in responder patients <sup>14</sup>. Recently, Treg have been involved in ITP pathogenesis. As reported by some authors <sup>15-16</sup>, we observed a similar level of peripheral Treg between ITP patients and controls, on the contrary to others who demonstrated a decrease in Treg number <sup>12-14</sup>. These contradictory results might be partly explained by the fact that, in these studies, Treg have been assessed using different phenotypes : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> <sup>13,15</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> <sup>14</sup>

or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> <sup>12,16</sup> as in our study. It is well known that CD25 is expressed by effector T lymphocytes after activation, but at a lower level than Treg, those CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup> being devoid of regulative properties <sup>38</sup>. Furthermore, it is well described that Foxp3 is transiently expressed by effector T lymphocytes after activation in human <sup>39</sup>. As a result, the use of at least these three markers is necessary to identify Treg. Interestingly, we found that the percentage of circulating Treg increased significantly in responder patients whatever the type of treatment (steroids, RTX, dapsone or splenectomy), contrary to non responders, as previously described for steroids and RTX <sup>11,14</sup>. Nevertheless, whether the correction of Treg abnormalities is a cause or a consequence of remission is still on debate. Recently, it has been shown that the defective function of Treg can be reversed by the use of a non immunological treatment, the thrombopoietin receptor agonist romiplostim <sup>16</sup>. The suspected mechanism is an increase in TGF-β1 level secondary to the platelet level normalization. Whether this cytokine has induced the generation of a particular subset of induced Treg, called Th3 cells, had not been assessed <sup>40</sup>. Unfortunately, the level of TGF- β1 before and after treatment was not measured in our study. It could have been of a particular interest in order to know if an increase in TGF-β1 is observed in responder patients whatever the treatment used or if this phenomenon is specific to romiplostim.

Up to now, splenic Treg have never been assessed in ITP. Similarly to what is observed in the spleens of healthy subjects <sup>41</sup>, immunohistology analyses have shown a few Treg in the PALS and in a lesser extent in the follicles of ITP patients. In ITP RTX<sup>-</sup> splenic follicles, Foxp3 expression was not statistically different when compared to controls. Indeed, FCM analyses of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells and Foxp3 expression by RT-PCR showed that the level of splenic Treg was lower in ITP patients than in controls. Taken together, these observations suggest a defect in the recruitment of Treg in the spleen in ITP. The role of Treg in ITP is confirmed by the study of Th1, Th2 and Th17 polarizations of T cells in the spleen; since we demonstrated that the Th1/Treg ratio was significantly higher in ITP RTX<sup>+</sup> patients.

As a conclusion, the increase in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B cells and plasma cells in the spleen of ITP patients argues for a predominant B cell mediated disease. As it has already been demonstrated that Treg can inhibit B cell differentiation, activation and antibody production, this B cell mediated response may be partly favored by the decrease in splenic Treg<sup>42</sup>. Regarding the mechanism of action of RTX, we have shown that neither blood nor splenic complete B cell depletion was sufficient to trigger remission, and that plasma cells were still observed in the spleen after RTX. Moreover, in non responder patients to RTX, we observed a marked imbalance in Th1/Treg response and an increase in the CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cell ratio consistent with a switch to a Th1 mediated disease instead of a B cell mediated disease.



## **Acknowledgements**

This work was supported and financed by the University Hospital of Dijon.

## **Authorship contributions**

SA and BB were the principal investigators and takes primary responsibility for the paper. SA, VL, SB, BL and BB recruited the patients. SA, MS, JG, DL, JF, TP and LM performed the laboratory work for this study. SA-G participated in the statistical analysis. SA and BB coordinated the research. SA and BB wrote the paper.

## **Disclosures of conflicts of interest**

The authors declare no competing financial interests.

## References

1. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost.* 2008;99:4-13.
2. Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood.* 1996;88:194-201.
3. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood.* 2004;103:1364-1369.
4. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood.* 2002;100:1388-1398.
5. Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2003;71:283-288.
6. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2007;110:2924-2930.
7. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood.* 2008;112:1078-1084.
8. Li S, Wang L, Zhao C, Li L, Peng J, Hou M. CD8+ T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2007;139:605-611.
9. Abbasi SY, Milhem M, Zaru L. A positive antinuclear antibody test predicts for a poor response to initial steroid therapy in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol.* 2008;87:459-462.
10. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13:108-116.



11. Ling Y, Cao X, Yu Z, Ruan C. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol.* 2007;79:310-316.
12. Liu B, Zhao H, Poon MC, et al. Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2007;78:139-143.
13. Sakakura M, Wada H, Tawara I, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007;120:187-193.
14. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood.* 2008;112:1147-1150.
15. Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2008;112:1325-1328.
16. Bao W, Bussel JB, Heck S, et al. Improved regulatory T cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood.* 2010.
17. Perosa F, Prete M, Racanelli V, Dammacco F. CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *J Intern Med.* 2010;267:260-277.
18. Godeau B, Porcher R, Fain O, et al. Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune thrombocytopenic purpura - results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood.* 2008;112:999-1004.
19. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 2007;44:3823-3837.
20. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001;98:952-957.
21. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood.* 2004;104:2623-2634.

22. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000;243:107-124.
23. Wei C, Anolik J, Cappione A, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2007;178:6624-6633.
24. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2000;165:5970-5979.
25. Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper C, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol*. 2009;130:199-212.
26. Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2009;7:322-329.
27. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol*. 2002;168:3675-3682.
28. Tavassoli M, McMillan R. Structure of the spleen in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Clin Pathol*. 1975;64:180-191.
29. Chang CS, Li CY, Cha SS. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Splenic pathologic features and their clinical correlation. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:981-985.
30. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:267-285.
31. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol*. 2007;179:8180-8190.
32. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*. 2007;26:205-213.
33. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:323-335.

34. Roll P, Dorner T, Tony HP. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1566-1575.
35. Youd ME, Ferguson AR, Corley RB. Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization. *Eur J Immunol.* 2002;32:2328-2337.
36. Kneitz C, Wilhelm M, Tony HP. Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiology.* 2002;206:519-527.
37. Schroder C, Azimzadeh AM, Wu G, Price JO, Atkinson JB, Pierson RN. Anti-CD20 treatment depletes B-cells in blood and lymphatic tissue of cynomolgus monkeys. *Transpl Immunol.* 2003;12:19-28.
38. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167:1245-1253.
39. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:129-138.
40. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol.* 2002;169:4183-4189.
41. Velasquez-Lopera MM, Correa LA, Garcia LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2008;154:107-114.
42. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;175:4180-4183.

## Tables

Table 1: Characteristics of ITP patients

|   |              |
|---|--------------|
| Female/Male (sex ratio)                                       | 23/17 (1.35) |
| Mean Age (years)  | 53.5 ± 23.1  |
| Mean evolution duration (months)                              | 33 ± 56      |
| Mean platelet count at diagnosis ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ ) | 19 ± 18.8    |
| Mean number of treatments                                     | 3.7 ± 2.5    |
| Treatments  |              |
| - Steroids  | 37 (92.5%)   |
| - Rituximab   | 19 (47.5%)   |
| - IVIg  | 19 (47.5%)   |
| - Dapsone   | 19 (47.5%)   |
| - Splenectomy   | 14 (35%)     |
| - Danazol   | 3 (7.5%)     |
| - Other   | 7 (17.5%)    |



Table 2. Lymphocyte subsets in ITP patients (n=27) and controls (n=28).

| <b>Variable</b>                             | <b>ITP patients<br/>(n=27)</b> | <b>Controls<br/>(n=28)</b> | <b><i>p</i></b>   |
|---|--------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <b>Age (years)</b>                          | 54.1 ± 22.5                    | 54.6 ± 21.4                | 0.9               |
| <b>Female/male (%)</b>                      | 59.3/40.7                      | 67.9/32.1                  | 0.58              |
| <b>Hemoglobin (g/dL)</b>                    | 13.5 ± 1.9                     | 13.5 ± 1.4                 | 0.88              |
| <b>Platelets (.10<sup>9</sup>/L)</b>        | 21.0 ± 12.5                    | 245.2 ± 89.7               | <b>&lt;0.0001</b> |
| <b>MPV (μm<sup>3</sup>)</b>                 | 10.1 ± 1.3                     | 8.4 ± 1.1                  | <b>&lt;0.0001</b> |
| <b>Leucocytes (.10<sup>9</sup>/L)</b>       | 7.7 ± 3.7                      | 6.8 ± 2.1                  | 0.8               |
| <b>Lymphocytes (.10<sup>9</sup>/L)</b>      | 1.9 ± 0.7                      | 2.1 ± 0.8                  | 0.35              |
| <b>CD3<sup>+</sup> (%)</b>                  | 75.1 ± 8.6                     | 72.8 ± 8.6                 | 0.37              |
| <b>CD4<sup>+</sup> (%)</b>                  | 49.9 ± 9.4                     | 48.7 ± 8.5                 | 0.48              |
| <b>CD8<sup>+</sup> (%)</b>                  | 26.1 ± 11.3                    | 21.6 ± 7.9                 | 0.16              |
| <b>CD19<sup>+</sup> (%)</b>                 | 10.6 ± 5.7                     | 10.7 ± 4.3                 | 0.86              |
| <b>κ/λ</b>                                  | 1.7 ± 0.6                      | 1.6 ± 0.4                  | 0.22              |
| <b>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (%)</b> | 10.5 ± 5.9                     | 14.7 ± 7.8                 | 0.0536            |

Table 3. Characteristics of patients who underwent splenectomy.

| Patients | Sex | Age (years) | Previous treatments                           | Duration before splenectomy (months) | Interval between RTX and splenectomy (months) | Response to splenectomy |
|----------|-----|-------------|---|--------------------------------------|---|-------------------------|
| 1        | F   | 16.8        | Steroids ; Dapsone; IVIg                      | 4.4                                  | -   | CR                      |
| 2        | F   | 21.3        | Steroids ; Dapsone                            | 30.4                                 | -   | CR                      |
| 3        | F   | 55.2        | Steroids ; Dapsone; IVIg                      | 13.2                                 | -   | CR                      |
| 4        | M   | 18.9        | Steroids ; Dapsone; IVIg                      | 16.0                                 | -   | CR                      |
| 5        | F   | 49.6        | Steroids ; Dapsone ; IVIg                     | 206.4                                | -   | CR                      |
| 6        | F   | 23.5        | Steroids ; Dapsone; IVIg                      | 8.1                                  | -   | NR                      |
| 7        | F   | 27.5        | Steroids ; IVIg                               | 17.5                                 | -   | CR                      |
| 8        | F   | 42.7        | Steroids ; Dapsone; IVIg ; RTX                | 16.5                                 | 6.87  | CR                      |
| 9        | F   | 78.7        | Steroids ; Dapsone ; IVIg ; RTX               | 3.7                                  | 2.33  | NR                      |
| 10       | F   | 79.5        | Steroids ; IVIg ; RTX                         | 7.9                                  | 7.50  | NR                      |
| 11       | F   | 87.7        | Steroids ; Dapsone; IVIg ; RTX                | 9.2                                  | 8.43  | CR                      |
| 12       | M   | 74.0        | Steroids ; Dapsone ; IVIg ; RTX               | 121.0                                | 2.30  | NR                      |
| 13       | M   | 75.8        | Steroids ; Dapsone ; IVIg ; RTX               | 87.3                                 | 5.57  | NR                      |
| 14       | F   | 58.5        | Dapsone ; IVIg ; RTX                          | 37.6                                 | 14.70   | CR                      |
| 15       | F   | 71.0        | Steroids ; Dapsone ; Vincristine ; IVIg ; RTX | 12.4                                 | 5.77  | CR                      |

## Figure legends

**Figure 1. Effect of RTX on splenic cells.** Representative immunohistology analyses performed on controls (normal spleen), on ITP RTX<sup>-</sup> (ITP patients not treated with RTX) and on ITP RTX<sup>+</sup> (ITP patients treated with RTX) using antibodies against CD20 and CD79a for B cells, CD3, CD4, CD8 for T cells, Foxp3 for Treg. Similar results were obtained with 4 controls, 6 ITP patients RTX<sup>-</sup> and 4 ITP patients RTX<sup>+</sup>. HES: Hematoxylin-eosin stain, PALS: periarteriolar lymphoid sheaths. Magnification x10, except for Foxp3, x100.

**Figure 2. Splenic B cell subsets.** (A) B cells were quantified using CD19 expression by flow cytometry. Left: Scatter plot representing splenic B cells in 7 controls, 7 ITP patients not treated with RTX (ITP RTX<sup>-</sup>) and 8 ITP patients treated by RTX (ITP RTX<sup>+</sup>). Right: Level of circulating CD19<sup>+</sup> B lymphocytes assessed by flow cytometry before and after RTX infusion, expressed as a percentage of total lymphocytes (right) (B) Mechanical disrupted spleen cells were labeled using anti-CD19, anti-CD27 and anti-IgD antibodies. Splenic B cells were gated on CD19 expression, then four subsets were studied using CD27 and IgD expression: naïve B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), marginal zone B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>), post-switched memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) and post-switched memory B cells lacking CD27 expression (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>). Plasma cells were identified as CD19<sup>Low</sup>CD27<sup>High</sup> cells. Dot plot of one representative ITP RTX<sup>-</sup>. (C) Scatter plots representing the different B cell subsets in 7 controls and 7 ITP patients not treated by RTX (ITP RTX<sup>-</sup>). B cell subsets were not analyzed in ITP patients treated by RTX (ITP RTX<sup>+</sup>) because the rate of residual B cells was very low. Plasma cells were assessed in 7 controls, 7 ITP RTX<sup>-</sup> and 7 ITP RTX<sup>+</sup>. The horizontal bar represents the mean value.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant (\*); NS= non significant.

**Figure 3. Splenic T cells analyses.** After mechanical disruption, spleen T cells subsets were quantified by flow cytometry using anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Scatter plots of analyses performed on the spleens of 7 controls, 7 patients who were not treated with RTX (ITP RTX<sup>-</sup>) and 8 patients who previously received RTX (ITP RTX<sup>+</sup>). The horizontal bar represents the mean value.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant (\*); NS= non significant.

**Figure 4. Splenic regulatory T cells.** After mechanical disruption of the spleen, Treg were quantified using the phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>. The gating strategy is explained in panel (A). In this example, Treg expressed as a percentage of CD4<sup>+</sup> T cells represented 1.4 %, as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> represented 2.3 % of CD4<sup>+</sup> lymphocytes, among which 59.8 % expressed Foxp3. Dot plot of one representative ITP RTX<sup>+</sup>. (B) Data are summarized in scatter plots representing the level of Treg (left) and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (right) in controls (n=7),



ITP patients not treated with RTX (ITP RTX<sup>-</sup>; n=7) and ITP patients previously treated with RTX (ITP RTX<sup>+</sup>; n=8). (C) The level of Foxp3 RNA was measured by RT-PCR after CD4<sup>+</sup> cell isolation. Scatter plot of the results obtained in 5 controls, 5 ITP RTX<sup>-</sup> and 3 ITP RTX<sup>+</sup>. The horizontal bar represents the mean value.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant (\*); NS= non significant.

**Figure 5. Circulating Treg in ITP.** (A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells were analyzed by flow cytometry in controls and ITP patients. Scatter plots of Treg represented as percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes (left) and as absolute count (right), in controls (n=26) and ITP patients (n=20). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells were also measured by flow cytometry before and after treatments. Patients were sorted in responders (platelet level over 30.10<sup>9</sup>/L with at least a two-fold increase in the baseline level) or non responders (platelet level under 30.10<sup>9</sup>/L). Data are summarized in before/after graphs representing circulating Treg levels as a percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes (left) and as absolute count (right) in 14 responder ITP patients (B) and in 9 non responders (C). The horizontal bar represents the mean value.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant (\*); NS= non significant.

**Figure 6. Splenic T cell responses.** Sorted CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with PMA and ionomycin for 8 hours. Brefeldin A was added for the last 4 hours, then cells were fixated and permeabilized for IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17 intracellular staining. (A) Th1 cells were defined as CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells, Th17 cells as CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and Th2 cells as CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>. Dot plot of one representative ITP RTX<sup>+</sup>. (B) Data are summarized in scatter plots representing the different T cell subsets (Th1, Th17 and Th2) in controls (n=7), ITP RTX<sup>-</sup> (n=6) and ITP RTX<sup>+</sup> (n=7). The balance between immune response and immune tolerance was assessed by the Th1/Treg and Th17/Treg ratios. The Th1/Th2 ratio is also represented. The horizontal bar represents the mean value.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant (\*); NS= non significant.

Figure 1

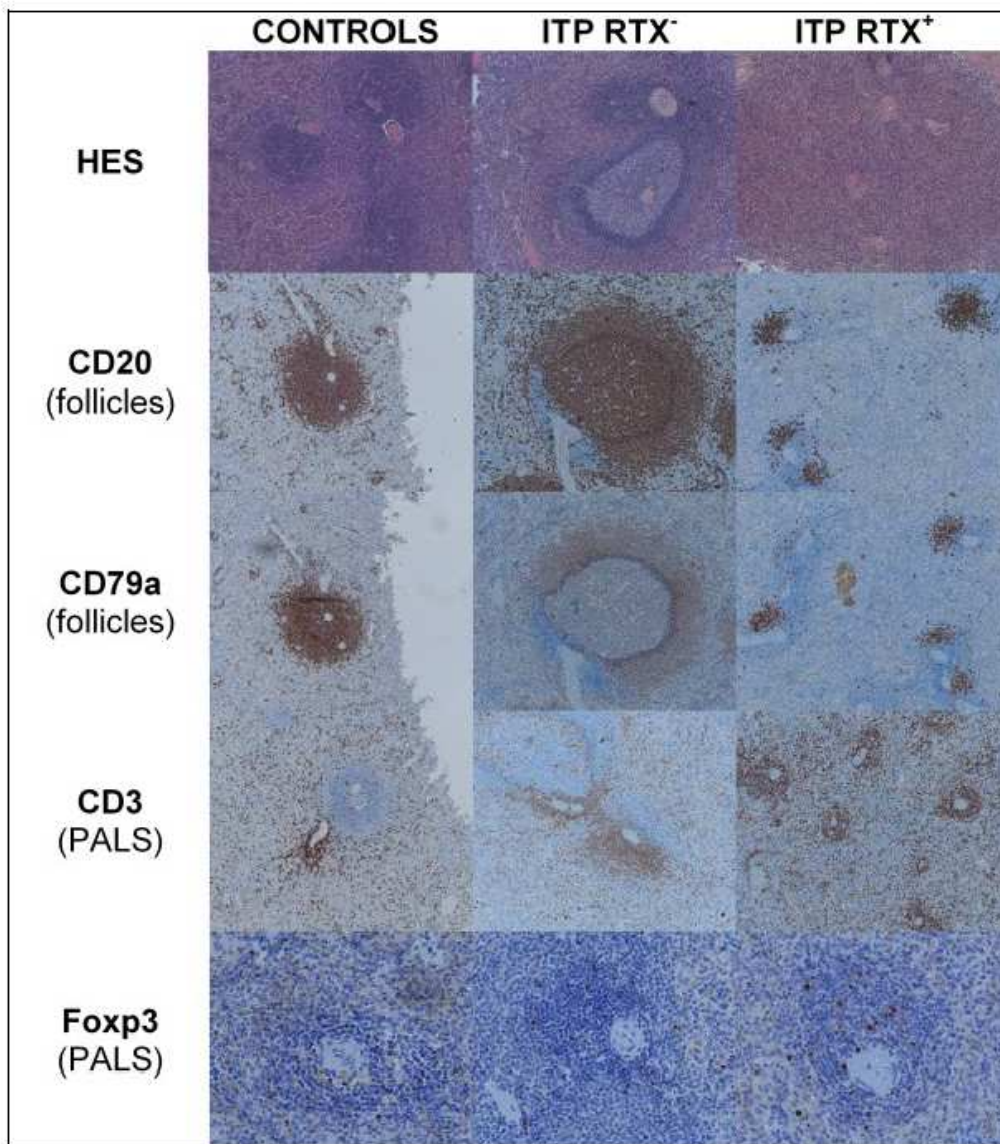


Figure 2

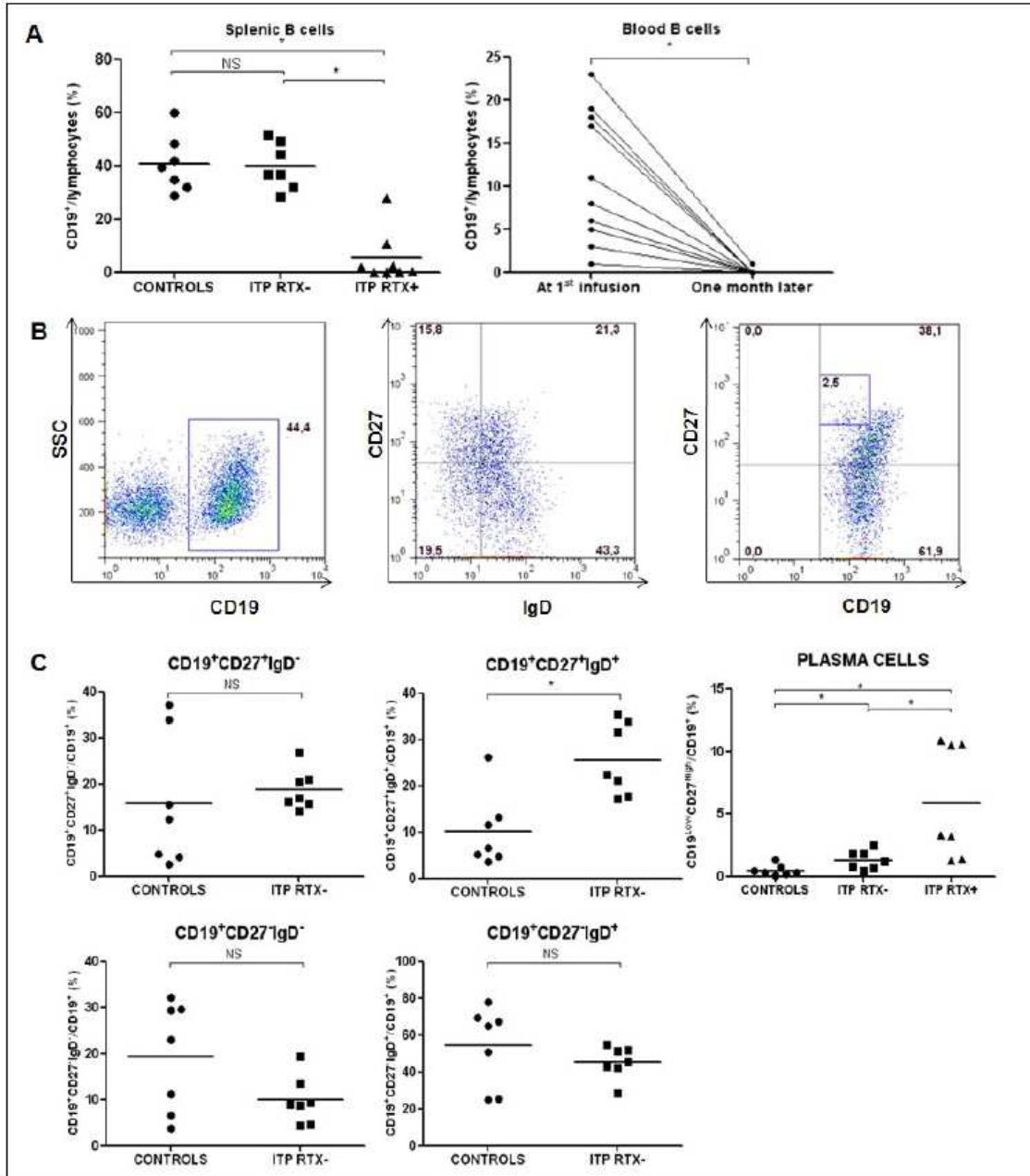


Figure 3

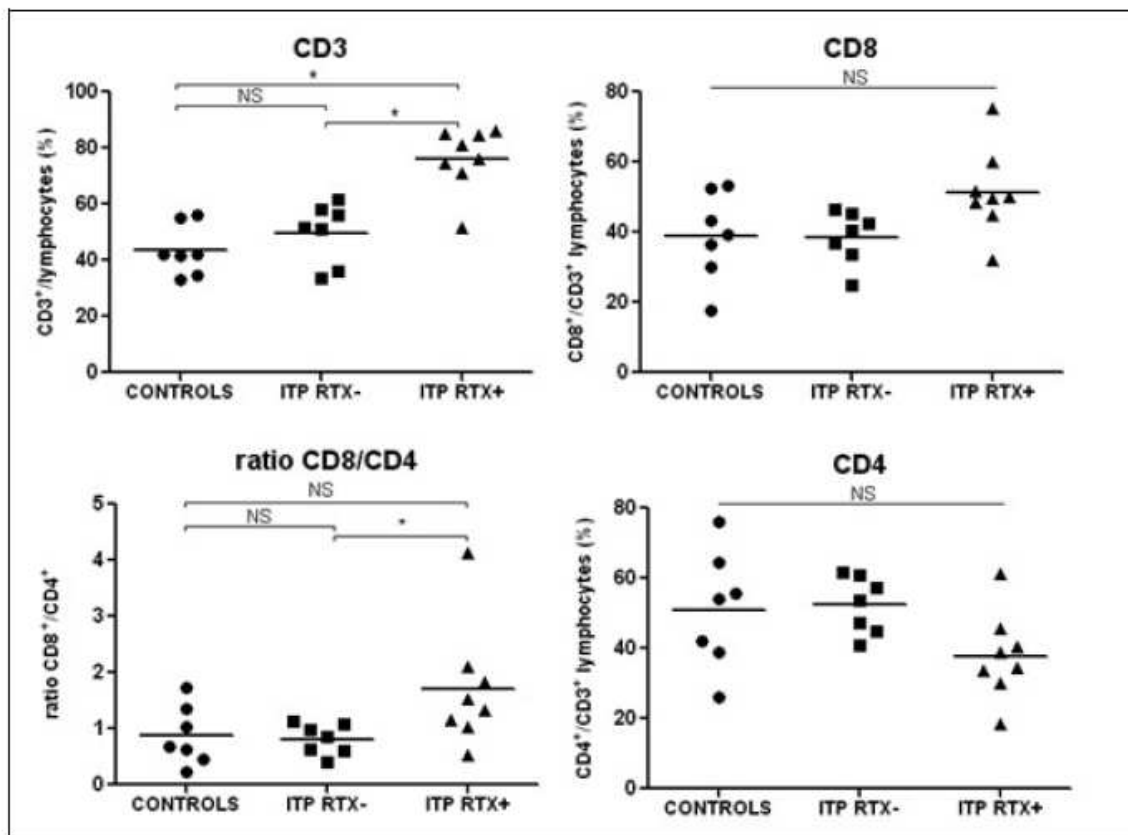


Figure 4

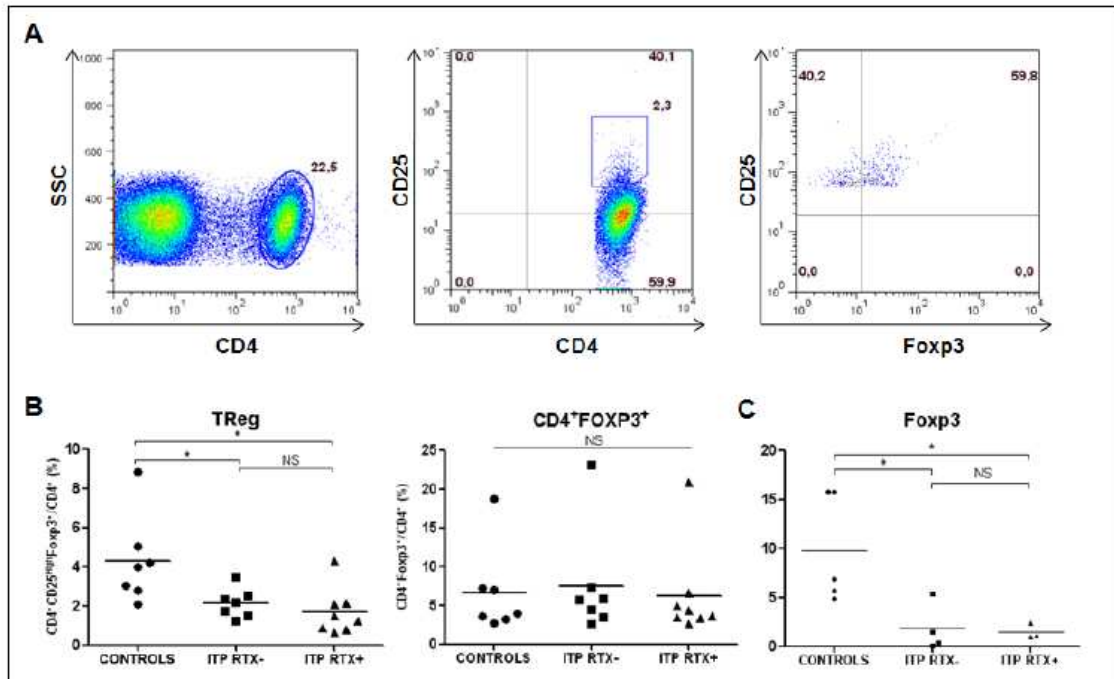


Figure 5

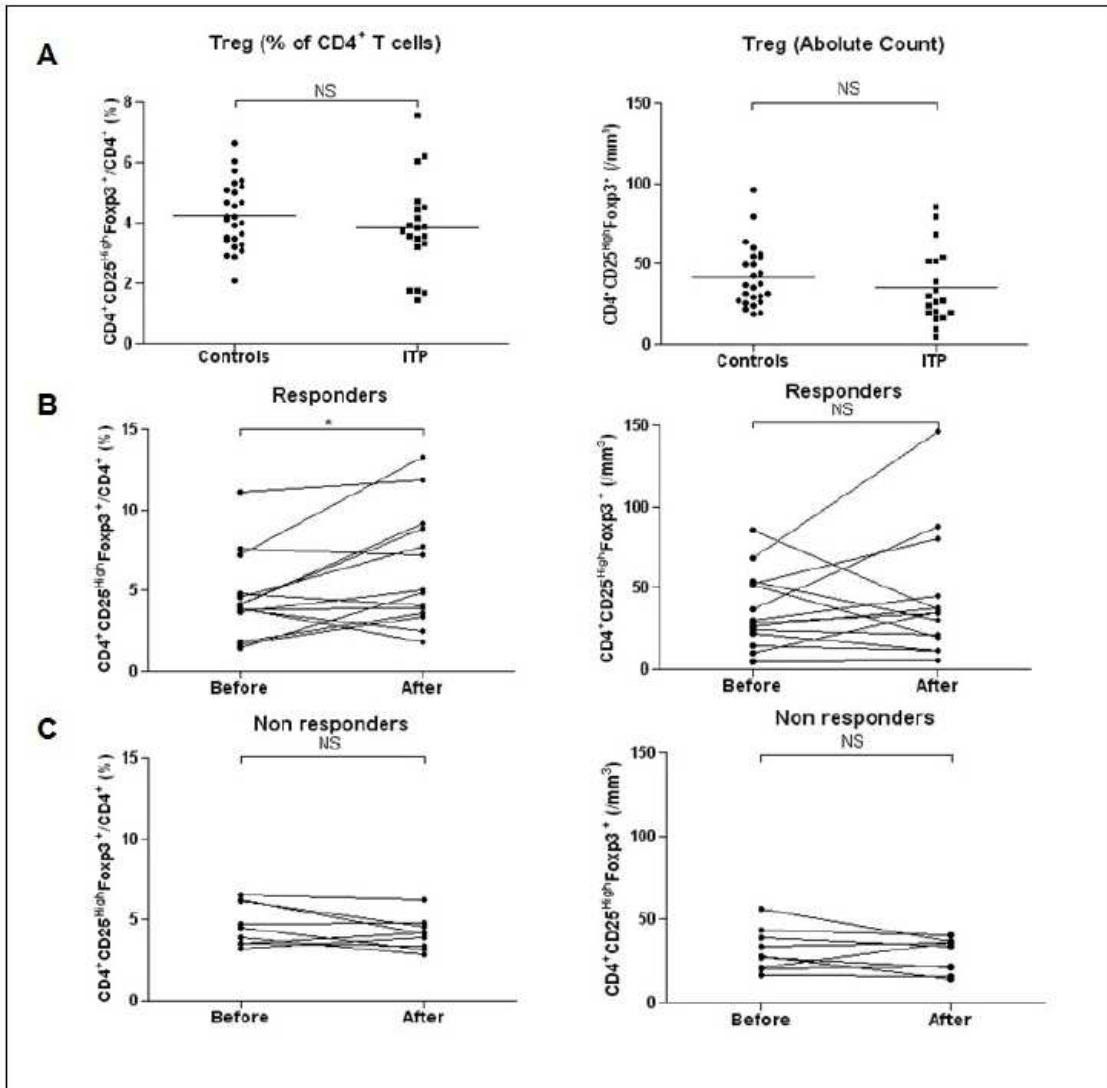
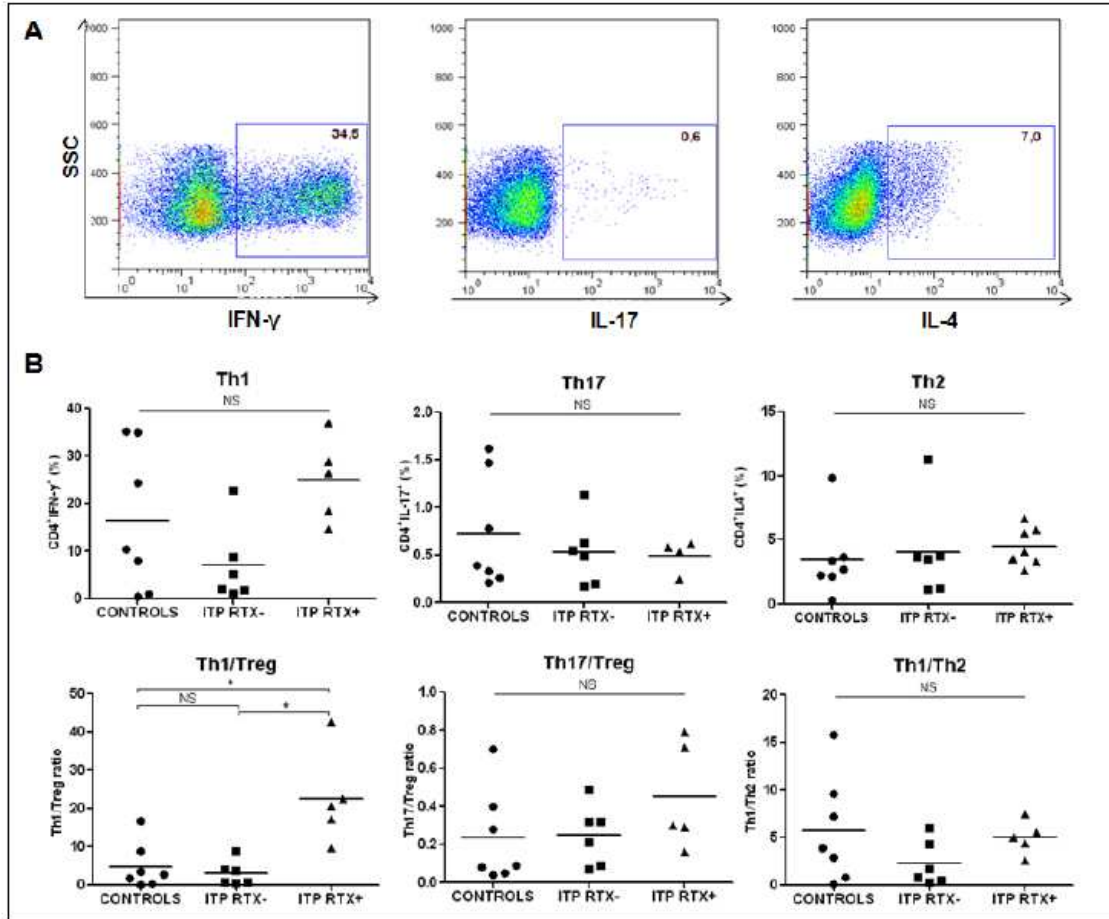


Figure 6



## DISCUSSION

Les résultats de ce travail viennent compléter les données de la littérature concernant la physiopathologie du PTI et suggèrent de nouvelles hypothèses physiopathologiques.

### Hyperstimulation lymphocytaire B splénique

La première constatation histologique est l'existence d'une stimulation lymphocytaire B splénique puisque 85 % des follicules des patients atteints de PTI sont des follicules secondaires, rarement observés chez les sujets témoins. De façon surprenante, l'analyse des sous populations lymphocytaires B n'a pas montré d'augmentation des LB mémoires ( $CD19^+CD27^+IgD^-$ ) c'est-à-dire des lymphocytes ayant subi une différenciation folliculaire après exposition antigénique. Cependant, la proportion de plasmocytes, identifiés par le phénotype  $CD19^{Low}CD27^{High}$  est plus élevée chez les patients atteints de PTI, témoignant probablement de l'aboutissement de la maturation des LB des centres germinatifs. Ce type d'anomalie a déjà été mis en évidence au niveau sanguin chez des sujets atteints de LES évolutif (Odendahl *et al*, 2000). Dans cet article, les auteurs ont confirmé que les cellules  $CD19^{Low}CD27^{High}$  sont bien des plasmocytes par l'étude de marqueurs complémentaires comme CD38, CD138 et CD20, les plasmocytes étant définis par le phénotype  $CD38^+CD19^{Low}CD20^-CD138^+sIg^{Low}$ . Bien que nous n'ayons pas vérifié le statut mutationnel de leur Ig, ni leur cible antigénique, il est probable que dans ce contexte, ces plasmocytes soient impliqués dans la production des Ac anti-plaquettes. Par ailleurs, leur taux, exprimé en pourcentage de LB  $CD19^+$ , est plus élevé chez les patients traités par RTX traduisant la persistance de plasmocytes malgré une déplétion B complète, ce qui est probablement expliqué par l'absence d'expression du CD20 à leur membrane. Ceci souligne de nouveau le problème des mécanismes d'action des traitements au cours du PTI, en particulier du RTX, déjà évoqué par certains auteurs, puisque l'on peut observer une rémission après traitement alors même que sont encore identifiés des Ac anti-plaquettes dans le sérum, sans qu'il existe de corrélation entre leur taux et la réponse plaquettaire (Stasi *et al*, 2001). Enfin, une analyse des plasmocytes de longue demi-vie serait souhaitable au niveau de la moelle osseuse qui constitue leur site préférentiel de localisation (Male D *et al*, 2007).



### **Augmentation des LB de la zone marginale, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>**

Dans ce travail, l'analyse des différentes populations lymphocytaires B spléniques montre une élévation isolée des LB de la zone marginale CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>. Cette constatation peut trouver plusieurs explications.

La première serait un biais lié à la vaccination des patients atteints de PTI avant la splénectomie. En effet, il est maintenant établi que la réponse humorale contre des Ag polysaccharidiques bactériens est médiée par les lymphocytes de la zone marginale. Leur rôle est double, puisqu'ils permettent dans un premier temps une réponse humorale rapide, indépendante de la réponse T, par la sécrétion d'IgM. Dans un second temps, la formation de complexes immuns IgM-Ag bactérien stimule la réponse immunitaire humorale dépendante de la réponse T, la réponse folliculaire, plus lente à mettre en œuvre. Elle donne lieu à la sécrétion d'Ac plus affins, de classe IgG, du fait des mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation de classe des Ig. Or les rates contrôles ont été obtenues à partir de sujets sains pour lesquels la splénectomie a été pratiquée en urgence, sans que les vaccinations anti-pneumococque ou anti-*Haemophilus* n'aient été réalisées avant l'intervention, contrairement aux sujets atteints de PTI, pour lesquels la chirurgie est programmée. Ces vaccinations sont recommandées avant splénectomie compte tenu du rôle important de la rate dans les mécanismes de défense contre les bactéries encapsulées. L'augmentation des LB de la zone marginale témoignerait alors de l'exposition aux Ag bactériens par la vaccination et donc au développement d'une réponse humorale antibactérienne. Cependant, un des témoins a bénéficié d'une splénectomie partielle dans le cadre d'un bilan de kystes spléniques et a donc été vacciné préalablement. Le taux de LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> était de 13 %, ce qui n'est pas différent de celui observé chez les autres témoins (moyenne de 10 %). Un cas de figure proche a déjà été décrit dans la littérature après vaccination anti-méningococque et anti-pneumococque chez un sujet de 9 ans atteint de sphérocytose héréditaire (Weller *et al*, 2004). L'analyse des réarrangements VDJ par étude de la région hypervariable CDR3 du BCR des LB sanguins issus de la zone marginale montrait l'émergence d'un clone non identifié avant vaccination, représentant la moitié des LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> 8 jours après la vaccination et un tiers de ces LB 5 semaines après. Cependant, dans cette étude, les auteurs ne mentionnent pas d'élévation du taux des LB de la zone marginale au sein de la rate par rapport aux autres sujets. Finalement, seule une analyse de la spécificité antigénique du BCR de ces cellules nous permettrait de répondre à cette interrogation.

L'autre explication serait une implication de ces lymphocytes dans la physiopathologie du PTI mais les mécanismes restent à préciser. Tout d'abord, il est admis dans la littérature que les LB de la

zone marginale sont responsables d'une sécrétion d'IgM (Weill *et al*, 2009), or, au cours du PTI, les auto-Ac identifiés à la surface des plaquettes sont des IgG, la sous classe IgG<sub>1</sub> étant d'ailleurs prédominante (Chan *et al*, 2003), ce qui rend peu probable la participation des LB de la zone marginale dans la production des Ac anti-plaquettes. Cependant, cette hypothèse doit être nuancée puisqu'il a été montré *in vitro*, que les LB de la zone marginale, en présence d'IL-21 et de CD40L, sont capables de sécréter des IgG (Bryant *et al*, 2007). *In vivo*, ces stimuli peuvent être fournis par des LT particuliers impliqués dans la différenciation des LB, les LT auxiliaires folliculaires (T *Follicular Helper*, TFH). Il faut également noter qu'une stimulation isolée par CD40L n'entraîne qu'une très faible sécrétion d'Ac. Ceci est important puisque les plaquettes expriment CD40L (CD154), et qu'elles sont physiologiquement présentes au niveau de la rate qui constitue à la fois un site de stockage mais également de destruction. Or au cours du PTI, les plaquettes surexpriment CD154 et la sécrétion des auto-Ac antiGPIIb/IIIa par les LB circulants est dépendante de l'interaction CD40-CD154 (Solanilla *et al*, 2005). Une participation des plaquettes dans la stimulation des LB de la zone marginale n'est donc pas exclue. Une analyse des TFH et de l'expression de CD40L au sein des rates de sujets atteints de PTI permettrait d'avancer dans cette hypothèse.

Chez l'homme les LB de la zone marginale ne présentent pas un répertoire auto-immun important, 1 % contre 26 % pour les LB post-switch CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> (Tiller *et al*, 2007). Dans les modèles animaux les LB de la zone marginale semblent pourtant être impliqués dans des phénomènes d'auto-immunité (Martin & Kearney, 2002). Cependant, alors que dans un modèle murin de LES (hybride NZB/NZW) il existe une hyperplasie de la zone marginale, il a été montré qu'elle n'était pas nécessaire à la survenue des manifestations cliniques et biologiques, relativisant ainsi le rôle des LB de la zone marginale dans la pathogénie des MAI (Atencio *et al*, 2004). Chez l'homme, leur participation au cours des MAI peut être suspectée de manière indirecte. En effet, chez les patients atteints de PR traités par RTX, la persistance de ces cellules au niveau sanguin après traitement est un facteur de risque de rechute précoce (Roll *et al*, 2008). Une analyse de la spécificité antigénique de leurs Ac permettrait de confirmer l'hypothèse de leur participation dans la production des Ac anti-plaquettes au cours du PTI.

Enfin, si l'hyperplasie folliculaire avec présence d'un centre germinatif au cours du PTI traduit à priori une réponse folliculaire, quel rôle peuvent jouer les lymphocytes de la zone marginale ? Comme nous l'avons déjà exposé, les LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> sont impliqués dans la réponse humorale T indépendante, mais ce n'est pas là leur rôle exclusif, puisqu'ils participent également à la réponse folliculaire T dépendante. En effet, les LB de la zone marginale sécrètent des IgM, Ig capable d'activer la voie classique du complément. Ainsi, chez les rongeurs, les LB de la zone marginale, exprimant fortement CR2, récepteur du complément, sont capables de lier fortement les complexes immuns et

de les transporter aux DC folliculaires (Youd *et al*, 2002). En l'absence de LB de la zone marginale, ces complexes immuns ne sont pas transportés aux DC folliculaires. Ceci suggère que les LB de la zone marginale pourraient participer à la réponse humorale au cours du PTI en « chargeant » les DC folliculaires avec les auto-Ag plaquettaires contenus dans les complexes immuns IgM/Ag plaquettaires, permettant ainsi une réponse folliculaire qui à terme aboutirait à la génération de plasmocytes de longue demi-vie. Malheureusement, la démonstration de ce mécanisme chez l'homme paraît difficilement réalisable à l'heure actuelle.

### **Rôle des lymphocytes T régulateurs**

Les données disponibles concernant les Treg étaient jusqu'à présent contradictoires, avec des taux sanguins diminués ou similaires à ceux de sujets témoins. Comme nous l'avons déjà détaillé, ces résultats sont d'interprétation difficile puisque les phénotypes utilisés pour caractériser les Treg sont différents d'une étude à l'autre. Notre étude est en accord avec les résultats de deux autres équipes (Bao *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008) qui ont montré que le taux de Treg définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> était similaire entre patients et témoins.

De façon intéressante, une élévation du taux de Treg chez les patients répondeurs est observée quel que soit le traitement utilisé, sans que l'on puisse préciser à ce stade si cette augmentation est une cause ou une conséquence de la rémission. Une augmentation du taux de Treg a déjà été montrée chez les patients répondeurs après dexaméthasone (Ling *et al*, 2007), RTX (Stasi *et al*, 2008) ou splénectomie (Sakakura *et al*, 2007). Le traitement par agonistes du récepteur de la TPO ne modifie pas les taux de Treg (Bao *et al*, 2010), par contre, les Treg retrouvent une fonctionnalité similaire à celle de sujets témoins corrélée à l'augmentation des taux sériques de TGF-β1. Ceci permet de supposer, bien que cela n'ait pas été montré dans cette étude, que le mécanisme implique la formation de Treg induits notamment les lymphocytes Th3. En effet, *in vitro*, des Treg ont été générés à partir de LT effecteurs exposés à cette cytokine (Zheng *et al*, 2002).

Les Treg spléniques n'ont à ce jour été étudiés que dans une étude, chez seulement 8 patients (Liu *et al*, 2007a). Dans ce travail, leur taux et leur localisation n'ont pas été évalués au sein de la rate, par contre un déficit fonctionnel défini par une capacité moindre à inhiber la prolifération de LT effecteurs a été mis en évidence. Nos résultats montrent pour la première fois qu'il existe un déficit quantitatif en Treg au niveau splénique chez les sujets atteints de PTI. Bien que nous n'ayons pas réalisé d'analyse fonctionnelle des Treg spléniques, ces résultats permettent cependant de formuler quelques hypothèses. En effet, selon les résultats de Liu *et al.*, les Treg spléniques sont non fonctionnels (Liu *et al*, 2007a), or la rate est considérée comme le site majeur de la réponse auto-immune au cours du PTI (Kuwana *et al*, 2009; Kuwana *et al*, 2002a). De plus, les Treg sont capables

d'inhiber de multiples lignées cellulaires participant à la réponse immunitaire. Cela a été notamment montré pour les LB au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Lim *et al*, 2005), pour les LT CD4<sup>+</sup> au niveau sanguin (Jonuleit *et al*, 2001) mais également splénique (Liu *et al*, 2007a), pour les LT CD8<sup>+</sup> (Trzonkowski *et al*, 2004) et enfin pour les DC (Misra *et al*, 2004). Ainsi, l'ensemble de ces résultats laisse penser qu'un déficit quantitatif et fonctionnel des Treg au niveau splénique ne permet pas de contrôler les LB et LT auto-réactifs ainsi que la maturation des DC et participe donc à l'entretien de la réponse auto-immune. Ces hypothèses devront être confirmées en étudiant les interactions entre les Treg spléniques et ces différentes populations, notamment leur capacité à inhiber la production d'auto-Ac par les LB spléniques.

### **PTI et polarisation Th1**

Le PTI, comme d'autres MAI est considéré comme une maladie à polarisation Th1. Cependant ces résultats doivent être nuancés, puisqu'il s'agit d'une polarisation relative, liée à un déséquilibre du rapport Th1/Th2 par diminution de la polarisation Th2 (Ogawara *et al*, 2003; Stasi *et al*, 2007). De plus, ces études sont critiquables sur les méthodes utilisées pour déterminer les profils de polarisation. A partir de LT totaux ou de cellules mononucléées sanguines, une stimulation par PMA (phorbol 12-myristate 23-acetate) et ionomycine, puissants activateurs polyclonaux, puis un blocage de la sécrétion des cytokines par de la brefeldine A sont effectués, ce qui constitue une méthode largement utilisée dans les travaux publiés (Arora, 2002). Les cytokines sont ensuite détectées par un marquage intracellulaire. Préalablement, un marquage membranaire est réalisé pour identifier les LT CD4<sup>+</sup>. C'est cette étape qui peut entraîner un biais important. En effet, après stimulation par PMA, de nombreux récepteurs membranaires sont internalisés, notamment le CD4 et le complexe CD3/TCR, phénomène qui semble moins important pour le CD8 (Pala *et al*, 2000). Ainsi, après stimulation, la population CD4 n'est que partiellement identifiée. Pour limiter ce biais, deux techniques peuvent être proposées. La première est d'effectuer un marquage des récepteurs membranaires moins sensibles à cette internalisation comme le CD3 et le CD8, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> étant alors identifiés de façon indirecte par le phénotype CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, ce qui ne permet cependant pas d'exclure une production cytokinique par les LT  $\gamma\delta$ . L'autre méthode, plus rigoureuse, est d'isoler dans un premier temps les LT CD4<sup>+</sup> afin d'obtenir une population pure, et d'effectuer dans un second temps la stimulation. En utilisant cette méthode, nous n'observons pas de polarisation Th1 évidente au niveau splénique des sujets atteints de PTI, ni de déséquilibre du ratio Th1/Th2. Seuls les patients en échec de RTX présentent une augmentation du ratio Th1/Treg. Nous n'avons malheureusement pas réalisé cette analyse sur les cellules sanguines, ce qui mériterait d'être étudié, par la même méthode, afin de vérifier définitivement ce qui constitue quasiment à l'heure actuelle un dogme. Par ailleurs, si cette

modification est le témoin d'une évolution vers une maladie dépendante des LT, cela pourrait éventuellement constituer un marqueur de non réponse au traitement par RTX et avoir des conséquences cliniques et thérapeutiques importantes.

Enfin, la commutation isotypique des Ig se fait sous l'action de cytokines, et au cours du PTI, les auto-Ac sont majoritairement de type IgG<sub>1</sub> (Chan *et al*, 2003). L'IL-4, cytokine principale des lymphocytes Th2 est impliquée dans l'orientation de la commutation de classe vers la synthèse d'IgG<sub>1</sub>, tandis que l'IFN- $\gamma$ , cytokine des lymphocytes Th1 l'inhibe, favorisant plutôt la sécrétion d'IgG<sub>2</sub> (Male D *et al*, 2007). Il est donc actuellement difficile d'expliquer cette discordance entre orientation Th1 et la sécrétion d'IgG<sub>1</sub> observée au cours du PTI.

### **PTI et lymphocytes Th17**

Les lymphocytes Th17 sont de découverte récente et semblent impliqués dans de nombreuses MAI (PR, maladie de Crohn, sclérose en plaque, spondylarthropathies, psoriasis, LES, granulomatose de Wegener, sclérodermie) (Samson *et al*, 2010). Leur étude au cours du PTI est récente avec des résultats contradictoires. Pour certains auteurs il existe une élévation du taux de lymphocytes Th17 sanguins (Zhang *et al*, 2009; Zhu *et al*, 2010) tandis que pour d'autres il n'y a pas de différence (Guo *et al*, 2009; Ma *et al*, 2008). L'analyse au niveau splénique n'a à notre connaissance jamais été réalisée. Nos résultats montrent qu'une polarisation Th17 est possible à partir des LT spléniques, mais qu'il n'y a pas de différence entre témoins et sujets atteints de PTI. Nous n'avons par ailleurs pas identifié de déséquilibre dans la balance Th17/Treg. En effet, alors que nous observons un déficit en Treg, nous pouvons supposer une orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th17, ce d'autant que certains LT exprimant Foxp3 pourraient se différencier en lymphocytes Th17, dans certaines conditions, à en juger par l'expression de ROR $\gamma$ t et leur capacité à sécréter de l'IL-17. Des Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), présentant une activité immunosuppressive, sont capables de se différencier en lymphocytes Th17 en présence de CPA et d'IL-2 ou d'IL-15. Cette plasticité des Treg, qui peuvent donc dans un environnement pro-inflammatoire devenir des lymphocytes Th17, est sous la dépendance d'une régulation épigénétique de Foxp3. En effet, l'acétylation de Foxp3 augmente les fonctions inhibitrices des Treg. L'HDAC (*Histone DeAcetylase*) est une enzyme capable de diminuer l'acétylation des gènes. L'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme, responsable d'une acétylation des gènes, permet d'inhiber la différenciation des Treg en lymphocytes Th17 (Koenen *et al*, 2008).

## Mécanismes d'action du rituximab

Bien qu'utilisé pour le traitement de nombreuses pathologies auto-immunes (LES, PR, vascularites à ANCA, vascularite cryoglobulinémique, PTI, AHAI, maladies des agglutinines froides, syndrome de Gougerot-Sjögren, myosites inflammatoires, pemphigus), les mécanismes d'action du RTX ne sont que partiellement connus (Perosa *et al*, 2010). Les principaux mécanismes impliqués sont une déplétion lymphocytaire B par des phénomènes d'ADCC, de CDC et une induction d'apoptose des LB. Ceci a pour conséquence une diminution de la production des auto-Ac pathogènes notamment au cours de la vascularite cryoglobulinémique (diminution du taux de cryocrite et par extension du facteur rhumatoïde), des vascularites à ANCA (diminution des Ac anti-PR3 et anti-MPO) et du pemphigus vulgaire (diminution des Ac anti-desmogléine 1). Une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des fonctions de CPA des LB est également impliquée (Perosa *et al*, 2010). Par ailleurs, le RTX peut agir comme un leurre : fixé à la surface des LB, il entraîne un recrutement des cellules exprimant un FcγR à leur surface, comme les macrophages et les cellules NK, ces cellules n'étant alors plus mobilisées sur les autres sites d'inflammation ou ne pouvant plus phagocyter ou exercer leurs fonctions cytotoxiques sur les cellules reconnues par d'autres Ac (Taylor & Lindorfer, 2007). Cette dernière hypothèse est surprenante et revient à résumer en partie l'action du RTX à celle des IgIV. Dans ce cas de figure la réponse devrait être de courte durée, comme avec les IgIV, à savoir de l'ordre de 2 à 3 semaines, dépendant de la clairance des Ig. En effet, la demi-vie d'élimination du RTX évaluée au cours des pathologies malignes selon un schéma de 4 injections de 375 mg/m<sup>2</sup> est de l'ordre de 3 semaines (Regazzi *et al*, 2005).

Si la déplétion lymphocytaire B sanguine après RTX est une donnée facilement obtenue en pratique courante, l'action du RTX sur les organes lymphoïdes secondaires est une approche beaucoup plus difficile. Dans ce domaine, seules quelques études effectuées chez l'animal (Alwayn *et al*, 2001; Schroder *et al*, 2003) et quelques cas cliniques chez l'homme ont été publiés (Kneitz *et al*, 2002). Les données de la littérature montrent une déplétion généralement variable et dépendante de la durée entre le traitement et la splénectomie. Une des questions non résolues dans l'échec du RTX utilisé au cours du PTI était de savoir si une déplétion incomplète des LB au sein de la rate pouvait en être la cause. Nos résultats montrent que cette déplétion lymphocytaire B splénique est obtenue dans la majorité des cas et qu'elle ne constitue donc pas un critère suffisant pour l'obtention d'une réponse. Un des mécanismes d'échappement que nous proposons est un déséquilibre du ratio Th1/Treg spléniques chez ces patients, associé à une augmentation relative des LT cytotoxiques comme en témoigne l'augmentation du ratio CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Stasi (Stasi *et al*, 2007). En effet, l'analyse des populations lymphocytaires T sanguines avant et après RTX qu'il avait réalisé avait permis de montrer que les

anomalies observées, à savoir l'augmentation du ratio Th1/Th2, l'engagement des LT dans des voies anti-apoptotiques et leur répertoire oligoclonal étaient corrigées chez les patients répondeurs. Une explication proposée par l'auteur pour expliquer l'absence de réponse au RTX est l'utilisation du traitement de façon « tardive », à un stade où le développement des LT auto-réactifs ne nécessite plus de coopération avec les LB.

Ainsi, nos résultats peuvent être interprétés de trois façons. Soit l'augmentation des ratios Th1/Treg et CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> spléniques précèdent le traitement par RTX, ces anomalies constituant alors un marqueur de l'évolution du PTI d'une maladie dépendante des LB vers une maladie dépendante des LT. Il serait alors intéressant d'avoir un marqueur sanguin prédictif de non réponse. Cependant, dans cette hypothèse, il est surprenant que nous n'ayons pas également observé ces anomalies chez certains des patients non traités par RTX.

La seconde hypothèse est que cette différence soit induite par le traitement par RTX et ne présage en rien de l'absence de réponse. L'élévation du rapport CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> traduit plutôt l'implication des LT cytotoxiques dans la déplétion lymphocytaire B. Cette hypothèse ne peut malheureusement pas être vérifiée puisque par définition les sujets répondeurs au RTX ne subissent pas de splénectomie.

Enfin, ces modifications n'apparaissent peut être après RTX que chez les patients non répondeurs, et pourraient ainsi traduire un mode « d'échappement » au RTX, une maladie B dépendante devenant alors T dépendante, avec une polarisation Th1 responsable d'un recrutement plus important de LT CD8<sup>+</sup> au niveau splénique, participant alors à la destruction des plaquettes.

## PERSPECTIVES

Nos résultats, outre l'apport de nouvelles données dans la physiopathologie du PTI, soulèvent de nouvelles interrogations et ouvrent de nouvelles voies d'explorations.

Ainsi, l'implication dans la pathogénie du PTI d'une sous-population lymphocytaire B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, correspondant aux LB de la zone marginale est suggérée par leur surreprésentation dans les rates de sujets atteints de PTI. Leur rôle, d'une manière générale et particulièrement au cours des MAI n'est que partiellement connu et devra être précisé. Leur participation à la sécrétion des Ac antiplaquettes nécessitera une isolation et des stimulations diverses (SAC, IL-2, anti-CD40, anti-BCR...) afin de déterminer leur capacité à se différencier en plasmocytes et d'étudier la capacité de leur Ac à reconnaître des cibles antigéniques plaquettaires (GPIIb/IIIa, GPIb/IX,...). Dans le même temps, l'absence de reconnaissance des Ag vaccinaux du pneumocoque, d'*Haemophilus* ou du méningocoque pourra être vérifiée. Ces LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> étant également impliqués dans le transport des Ag fixés par le complément aux DC folliculaires, il serait intéressant de mettre en évidence des complexes immuns composés d'Ag plaquettaires à leur surface. Une première étape serait l'utilisation d'Ac anti-GPIIb/IIIa par exemple qui permettrait une analyse par cytométrie en flux. Cependant, cette méthode risque d'être prise en défaut si les sites antigéniques sont déjà occupés par des auto-Ac ou si l'Ag a subi des modifications. L'expression membranaire de CR2, récepteur du complément, devra être également vérifiée puisque chez la souris, la fixation de complexes immuns à ce récepteur entraîne la migration des LB de la zone marginale vers le centre germinatif où sont localisées les DC folliculaires (Lopes-Carvalho *et al*, 2005).

De façon générale, nous avons confirmé l'hyperstimulation lymphocytaire B au cours du PTI par la prédominance de follicules lymphoïdes secondaires au sein des rates de sujets atteints de PTI. L'analyse de l'expression des cytokines BAFF et APRIL ainsi que de leurs récepteurs (BAFF-R, TACI, BCMA) participant à l'activation et à la différenciation des LB permettrait de mieux comprendre cette activation lymphocytaire B, ce d'autant que des traitements sont déjà disponibles : Ac monoclonal anti-BAFF, le belimumab (Ding, 2008) et protéines TACI recombinée fusionnée à un fragment Fc permettant la neutralisation de BAFF soluble, l'atacept (Tak *et al*, 2008).

La polarisation des LB spléniques et sanguins n'a jamais été évaluée au cours du PTI: s'agit-il de cellules Be1 ou Be2 ? Y-a-t-il un contingent de LB produisant de l'IL-10 ? Après isolation et stimulation des LB de sujets atteints de PTI et de sujets témoins, une analyse des sécrétions cytokiniques permettrait de répondre à cette question. Par ailleurs, les LB spléniques des sujets atteints de PTI



ont-ils des capacités de CPA ? La recherche d'une surexpression des molécules de CMH-II, CD80 et CD86, ainsi que leur capacité à faire proliférer des LT CD4<sup>+</sup> naïfs pourraient être étudiées par cytométrie en flux et par coculture. Dans le même temps, une analyse du phénotype de LT CD4<sup>+</sup> naïfs cultivés en présence de ces LB permettrait d'évaluer leur capacité à induire des Treg. En effet, nous avons montré qu'il existait un déficit quantitatif en Treg spléniques au cours du PTI, dont la cause n'est pas connue. Ainsi, on peut supposer que ce déficit est lié à une anomalie quantitative ou fonctionnelle des Breg spléniques puisqu'il a été montré que les LB sanguins stimulés par un Ac anti-CD40 sont capables d'induire des Treg (Tu *et al*, 2008).

Un déficit fonctionnel des Treg sanguins au cours du PTI a déjà été montré tandis que l'implication d'un déficit quantitatif reste matière à débat. Nos résultats montrent pour la première fois qu'il n'y a pas de relocalisation des Treg au cours du PTI au sein des différentes structures spléniques. Nous montrons également qu'il existe un déficit quantitatif en Treg spléniques. La prochaine étape de l'analyse des Treg spléniques sera l'étude de leur fonction suppressives vis à vis des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs mais également LT CD8<sup>+</sup> et LB. Par ailleurs ce déficit quantitatif est-il lié à un défaut de recrutement des Treg au sein de la rate ? Une analyse des différentes chémokines spléniques (CCL19 et CXCL13 notamment) ainsi que l'expression de leurs récepteurs (CCR7 et CXCR5) à la surface des Treg circulants et spléniques permettrait de répondre à cette question. L'implication des Treg dans la physiopathologie du PTI pourrait également être montrée dans un modèle murin de thrombopénie immunologique, bien qu'à ce jour aucun modèle ne reflète correctement ce qui est observé chez l'homme (Chow *et al*, 2010; Nieswandt *et al*, 2000).

Le rôle des LT CD8<sup>+</sup> n'a été que peu étudié au cours du PTI. L'analyse des gènes impliqués dans les mécanismes de cytotoxicité (perforine, granzyme) a montré une surexpression chez certains patients (Olsson *et al*, 2003). Par ailleurs le recrutement des LT CD8<sup>+</sup> au sein de la moelle osseuse est augmenté au cours du PTI participant probablement au défaut de production médullaire en plaquettes (Olsson *et al*, 2008). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur les LT CD8<sup>+</sup> spléniques au cours du PTI. Il nous paraît cependant important d'analyser leur fonction cytotoxique qui pourrait être augmentée au cours du PTI. Par ailleurs, l'analyse des CD8<sup>+</sup> Treg n'a jamais été effectuée au cours du PTI alors que leur implication au cours des MAI se précise (Dinesh *et al*, 2010). Une étude quantitative et fonctionnelle des CD8<sup>+</sup> Treg circulants et spléniques permettrait une meilleure compréhension de la physiopathologie du PTI et pourrait permettre de nouvelles orientations thérapeutiques.

Concernant le RTX, nous avons proposé un mécanisme d'échappement par un déséquilibre de la balance Th1/Treg. Cette anomalie est observée au sein des rates après traitement et ne constitue donc pas une donnée facilement accessible en pratique clinique. La mise en évidence de telles anomalies au niveau sanguin aurait un impact thérapeutique plus important. En effet, dans un premier temps, il serait intéressant de savoir si cette anomalie est également présente au niveau sanguin chez les patients en échec de traitement. Si cela se vérifiait, il faudrait vérifier l'absence ou la présence de cette anomalie avant traitement qui pourrait alors constituer un critère pronostique de réponse au traitement.

En pratique, nous avons débuté la mise au point de plusieurs analyses qui pourront ensuite être utilisées sur des échantillons congelés :

- Isolation des LT CD8<sup>+</sup> pour analyse phénotypique (CD8<sup>+</sup> Treg, expression de granzyme B, HLA-DR,...)
- Extraction d'ARN des LT CD8<sup>+</sup> pour étude de l'expression de granzyme et perforine notamment
- Analyse des sous populations lymphocytaires B sanguines
- Expression des molécules du CMH-II, CD80 et CD86 par les LB spléniques et circulants
- Isolation des LB spléniques et circulants pour étude de la sécrétion des Ig et cytokines après stimulation
- Extraction d'ARN des cellules mononucléées sanguines et splénocytes totaux ainsi que des LB pour analyse de l'expression de BAFF, APRIL, BAFF-R, BCMA et TACI
- Analyse des populations Th1, Th2, Th17, Tc1, Tc2 et Tc17 circulantes
- Analyse fonctionnelle des Treg circulants et spléniques
- Etude des LT folliculaires auxiliaires spléniques
- Analyse quantitative des DC plasmacytoïdes et myéloïdes spléniques et circulantes

A plus long terme, nous envisageons également la mise au point d'un modèle murin de PTI dont la physiopathologie serait plus proche de ce qui est observé chez l'homme contrairement aux modèles actuellement utilisés.

## CONCLUSION

Les principaux résultats de notre étude sont tout d'abord la possible implication des LB de la zone marginale dans la physiopathologie du PTI, ce qui constitue une nouvelle piste d'exploration. De plus, l'absence de déplétion splénique en plasmocytes après RTX explique probablement la persistance d'Ac antiplaquettes chez les sujets répondeurs et interroge sur les véritables mécanismes d'action de cette thérapeutique. Nous proposons que le mécanisme d'échappement à ce traitement soit un déséquilibre du ratio Th1/Treg c'est-à-dire réponse immunitaire inflammatoire versus tolérance. Par ailleurs, l'implication des LT cytotoxiques dans la physiopathologie du PTI est confirmée par notre étude montrant une augmentation du ratio  $CD8^+/CD4^+$  au niveau splénique chez les patients non répondeurs au RTX. En outre, nous montrons pour la première fois l'existence d'un déficit quantitatif en Treg au niveau splénique chez les patients atteints de PTI, alors que nous retrouvons des taux similaires de Treg circulants entre patients et témoins, avec cependant une augmentation de leur taux chez les sujets répondeurs. Enfin, les LT spléniques peuvent subir une polarisation Th17 au cours du PTI, mais celle-ci n'apparaît pas différente de celle des sujets témoins. L'ensemble de nos résultats ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie du PTI et des mécanismes d'action du RTX.

## BIBLIOGRAPHIE

ABBOUD MR, LAVER J, XU F, WEKSLER B, BUSSEL J. - Serum levels of GM-CSF are elevated in patients with thrombocytopenia. - *Br J Haematol*, 1996, 92 (2): 486-488.

AFZALI B, LOMBARDI G, LECHLER RI, LORD GM. - The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. - *Clin Exp Immunol*, 2007, 148 (1): 32-46.

AGEMATSU K, HOKIBARA S, NAGUMO H, KOMIYAMA A. - CD27: a memory B-cell marker. - *Immunol Today*, 2000, 21 (5): 204-206.

ALEDORT LM, SALAMA A, KOVALEVA L, ROBAK T, NEWLAND AC, NUGENT DJ, BRENNER B, ZENKER O. - Efficacy and safety of intravenous anti-D immunoglobulin (Rhophylac) in chronic immune thrombocytopenic purpura. - *Hematology*, 2007, 12 (4): 289-295.

ALLAN SE, PASSERINI L, BACCHETTA R, CRELLIN N, DAI M, ORBAN PC, ZIEGLER SF, RONCAROLO MG, LEVINGS MK. - The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. - *J Clin Invest*, 2005, 115 (11): 3276-3284.

ALWAYN IP, XU Y, BASKER M, WU C, BUHLER L, LAMBRIGTS D, TRETER S, HARPER D, KITAMURA H, VITETTA ES, ABRAHAM S, AWWAD M, WHITE-SCHARF ME, SACHS DH, THALL A, COOPER DK. - Effects of specific anti-B and/or anti-plasma cell immunotherapy on antibody production in baboons: depletion of CD20- and CD22-positive B cells does not result in significantly decreased production of anti-alphaGal antibody. - *Xenotransplantation*, 2001, 8 (3): 157-171.

ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, LAZZERI E, MANETTI R, VANINI V, ROMAGNANI P, MAGGI E, ROMAGNANI S. - Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. - *J Exp Med*, 2002, 196 (3): 379-387.

ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. - Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. - *Arthritis Res Ther*, 2009, 11 (6): 257.

ANOLIK JH, BARNARD J, OWEN T, ZHENG B, KEMSHETTI S, LOONEY RJ, SANZ I. - Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. - *Arthritis Rheum*, 2007, 56 (9): 3044-3056.

ANTONY PA, PAULOUS CM, AHMADZADEH M, AKPINARLI A, PALMER DC, SATO N, KAISER A, HINRICHS CS, KLEBANOFF CA, TAGAYA Y, RESTIFO NP. - Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. - *J Immunol*, 2006, 176 (9): 5255-5266.

ARNOLD DM, DENTALI F, CROWTHER MA, MEYER RM, COOK RJ, SIGOUIN C, FRASER GA, LIM W, KELTON JG. - Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Ann Intern Med*, 2007, 146 (1): 25-33.

ARORA SK. - Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. - *Methods Cell Sci*, 2002, 24 (1-3): 37-40.

ASAHI A, NISHIMOTO T, OKAZAKI Y, SUZUKI H, MASAOKA T, KAWAKAMI Y, IKEDA Y, KUWANA M. - Helicobacter pylori eradication shifts monocyte Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. - *J Clin Invest*, 2008, 118 (8): 2939-2949.

ASCHENBRENNER K, D'CRUZ LM, VOLLMANN EH, HINTERBERGER M, EMMERICH J, SWEE LK, ROLINK A, KLEIN L. - Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. - *Nat Immunol*, 2007, 8 (4): 351-358.

ASKENASY N, KAMINITZ A, YARKONI S. - Mechanisms of T regulatory cell function. - *Autoimmun Rev*, 2008, 7 (5): 370-375.

ATENCIO S, AMANO H, IZUI S, KOTZIN BL. - Separation of the New Zealand Black genetic contribution to lupus from New Zealand Black determined expansions of marginal zone B and B1a cells. - *J Immunol*, 2004, 172 (7): 4159-4166.

AUDIA S, NICOLAS A, CATHELIN D, LARMONIER N, FERRAND C, FOUCHER P, FANTON A, BERGOIN E, MAYNADIE M, ARNOULD L, BATEMAN A, LORCERIE B, SOLARY E, CHAUFFERT B, BONNOTTE B. - Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+ CD25+ T lymphocytes. - *Clin Exp Immunol*, 2007, 150 (3): 523-530.

BAECHER-ALLAN C, WOLF E, HAFLER DA. - Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells. - *Clin Immunol*, 2005, 115 (1): 10-18.

BAO W, BUSSEL JB, HECK S, HE W, KARPOFF M, BOULAD N, YAZDANBAKHS K. - Improved regulatory T cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. - *Blood*, 2010, [07/08/2010], pubmed.

BARDEL E, LAROUSSERIE F, CHARLOT-RABIEGA P, COULOMB-L'HERMINE A, DEVERGNE O. - Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. - *J Immunol*, 2008, 181 (10): 6898-6905.

BELKAID Y, ROUSE BT. - Natural regulatory T cells in infectious disease. - *Nat Immunol*, 2005, 6 (4): 353-360.

BENSINGER SJ, BANDEIRA A, JORDAN MS, CATON AJ, LAUFER TM. - Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. - *J Exp Med*, 2001, 194 (4): 427-438.

BETTAIEB A, OKSENHENDLER E, DUEDARI N, BIERLING P. - Cross-reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. - *Clin Exp Immunol*, 1996, 103 (1): 19-23.

BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, KORN T, STROM TB, OUKKA M, WEINER HL, KUCHROO VK. - Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. - *Nature*, 2006, 441 (7090): 235-238.

BETTELLI E, DASTRANGE M, OUKKA M. - Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (14): 5138-5143.

BETTELLI E, KORN T, KUCHROO VK. - Th17: the third member of the effector T cell trilogy. - *Curr Opin Immunol*, 2007, 19 (6): 652-657.

BLUESTONE JA, MACKAY CR, O'SHEA JJ, STOCKINGER B. - The functional plasticity of T cell subsets. - *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (11): 811-816.

BOEHLEN F, HOHLFELD P, EXTERMANN P, PERNEGER TV, DE MOERLOOSE P. - Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. - *Obstet Gynecol*, 2000, 95 (1): 29-33.

BORSELLINO G, KLEINWIETFIELD M, DI MITRI D, STERNJAK A, DIAMANTINI A, GIOMETTO R, HOPNER S, CENTONZE D, BERNARDI G, DELL'ACQUA ML, ROSSINI PM, BATTISTINI L, ROTZSCHKE O, FALK K. - Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. - *Blood*, 2007, 110 (4): 1225-1232.

BOSSEN C, SCHNEIDER P. - BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. - *Semin Immunol*, 2006, 18 (5): 263-275.

BRANDENBURG S, TAKAHASHI T, DE LA ROSA M, JANKE M, KARSTEN G, MUZZULINI T, ORINSKA Z, BULFONE-PAUS S, SCHEFFOLD A. - IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. - *Eur J Immunol*, 2008, 38 (6): 1643-1653.

BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD KA, PAEPER B, CLARK LB, YASAYKO SA, WILKINSON JE, GALAS D, ZIEGLER SF, RAMSDELL F. - Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. - *Nat Genet*, 2001, 27 (1): 68-73.

BRYANT VL, MA CS, AVERY DT, LI Y, GOOD KL, CORCORAN LM, DE WAAL MALEFYT R, TANGYE SG. - Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. - *J Immunol*, 2007, 179 (12): 8180-8190.

BUSSEL JB, CHENG G, SALEH MN, PSAILA B, KOVALEVA L, MEDDEB B, KLOCZKO J, HASSANI H, MAYER B, STONE NL, ARNING M, PROVAN D, JENKINS JM. - Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *N Engl J Med*, 2007, 357 (22): 2237-2247.

BUSSEL JB, KUTER DJ, GEORGE JN, MCMILLAN R, ALEDORT LM, CONKLIN GT, LICHTIN AE, LYONS RM, NIEVA J, WASSER JS, WIZNITZER I, KELLY R, CHEN CF, NICHOL JL. - AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. - *N Engl J Med*, 2006, 355 (16): 1672-1681.

BUSSEL JB, KUTER DJ, PULLARKAT V, LYONS RM, GUO M, NICHOL JL. - Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. - *Blood*, 2008,

BUSSEL JB, PROVAN D, SHAMSI T, CHENG G, PSAILA B, KOVALEVA L, SALAMA A, JENKINS JM, ROYCHOWDHURY D, MAYER B, STONE N, ARNING M. - Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. - *Lancet*, 2009, 373 (9664): 641-648.

CAO D, MALMSTROM V, BAECHER-ALLAN C, HAFLER D, KLARESKOG L, TROLLMO C. - Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. - *Eur J Immunol*, 2003, 33 (1): 215-223.

CARCAO MD, BLANCHETTE VS, WAKEFIELD CD, STEPHENS D, ELLIS J, MATHESON K, DENOMME GA. - Fc $\gamma$  receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. - *Br J Haematol*, 2003, 120 (1): 135-141.

CARTRON G, DACHEUX L, SALLES G, SOLAL-CELIGNY P, BARDOS P, COLOMBAT P, WATIER H. - Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc $\gamma$ RIIIa gene. - *Blood*, 2002, 99 (3): 754-758.

CATANI L, FAGIOLI ME, TAZZARI PL, RICCI F, CURTI A, ROVITO M, PEDA P, CHIRUMBOLO G, AMABILE M, LEMOLI RM, TURA S, CONTE R, BACCARANI M, VIANELLI N. - Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. - *Exp Hematol*, 2006, 34 (7): 879-887.

CHADBURN A. - The spleen: anatomy and anatomical function. - *Semin Hematol*, 2000, 37 (1 Suppl 1): 13-21.

CHAN H, MOORE JC, FINCH CN, WARKENTIN TE, KELTON JG. - The IgG subclasses of platelet-associated autoantibodies directed against platelet glycoproteins IIb/IIIa in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Br J Haematol*, 2003, 122 (5): 818-824.

CHENG Y, WONG RS, SOO YO, CHUI CH, LAU FY, CHAN NP, WONG WS, CHENG G. - Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. - *N Engl J Med*, 2003, 349 (9): 831-836.

CHOW L, ASLAM R, SPECK ER, KIM M, CRIDLAND N, WEBSTER ML, CHEN P, SAHIB K, NI H, LAZARUS AH, GARVEY MB, FREEDMAN J, SEMPLE JW. - A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. - *Blood*, 2010, 115 (6): 1247-1253.

CINES DB, LIEBMAN H, STASI R. - Pathobiology of secondary immune thrombocytopenia. - *Semin Hematol*, 2009, 46 (1 Suppl 2): S2-14.

COHEN YC, DJULBEGOVIC B, SHAMAI-LUBOVITZ O, MOZES B. - The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. - *Arch Intern Med*, 2000, 160 (11): 1630-1638.

COLLINS M, LING V, CARRENO BM. - The B7 family of immune-regulatory ligands. - *Genome Biol*, 2005, 6 (6): 223.

COLLISON LW, PILLAI MR, CHATURVEDI V, VIGNALI DA. - Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. - *J Immunol*, 2009, 182 (10): 6121-6128.

CONSTANT S, SCHWEITZER N, WEST J, RANNEY P, BOTTOMLY K. - B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4<sup>+</sup> T cells to protein antigens in vivo. - *J Immunol*, 1995, 155 (8): 3734-3741.

DAMODAR S, VISWABANDYA A, GEORGE B, MATHEWS V, CHANDY M, SRIVASTAVA A. - Dapsone for chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in children and adults--a report on 90 patients. - *Eur J Haematol*, 2005, 75 (4): 328-331.

DE CLERCQ E. - Recent advances on the use of the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100, Mozobil) and potential of other CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers. - *Pharmacol Ther*, 2010, [10/09/10], pubmed.

DE LA ROSA M, RUTZ S, DORNINGER H, SCHEFFOLD A. - Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. - *Eur J Immunol*, 2004, 34 (9): 2480-2488.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A, ERAT A, CHEN JF, ENJOJI K, LINDEN J, OUKKA M, KUCHARO VK, STROM TB, ROBSON SC. - Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. - *J Exp Med*, 2007, 204 (6): 1257-1265.

DEJACO C, DUFTNER C, GRUBECK-LOEBENSTEIN B, SCHIRMER M. - Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. - *Immunology*, 2006, 117 (3): 289-300.

DEUTSCH VR, TOMER A. - Megakaryocyte development and platelet production. - *Br J Haematol*, 2006, 134 (5): 453-466.

DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, BERGER T, SCHULER G. - Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. - *J Exp Med*, 2001, 193 (11): 1303-1310.

DINESH RK, SKAGGS BJ, LA CAVA A, HAHN BH, SINGH RP. - CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. - *Autoimmun Rev*, 2010, 9 (8): 560-568.

DING C. - Belimumab, an anti-BLyS human monoclonal antibody for potential treatment of inflammatory autoimmune diseases. - *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8 (11): 1805-1814.

DOI T, HOMMA H, MEZAWA S, KATO J, KOGAWA K, SAKAMAKI S, NIITSU Y. - Mechanisms for increment of platelet associated IgG and platelet surface IgG and their implications in immune thrombocytopenia associated with chronic viral liver disease. - *Hepatol Res*, 2002, 24 (1): 23.

DUAN B, MOREL L. - Role of B-1a cells in autoimmunity. - *Autoimmun Rev*, 2006, 5 (6): 403-408.

EARLE KE, TANG Q, ZHOU X, LIU W, ZHU S, BONYHADI ML, BLUESTONE JA. - In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. - *Clin Immunol*, 2005, 115 (1): 3-9.

EMMERICH F, BAL G, BARAKAT A, MILZ J, MUHLE C, MARTINEZ-GAMBOA L, DORNER T, SALAMA A. - High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Br J Haematol*, 2007, 136 (2): 309-314.

FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, ORABONA C, VACCA C, BIANCHI R, BELLADONNA ML, FIORETTI MC, ALEGRE ML, PUCETTI P. - Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. - *Nat Immunol*, 2003, 4 (12): 1206-1212.



FILLATREAU S, GRAY D, ANDERTON SM. - Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. - *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (5): 391-397.

FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. - Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. - *Nat Immunol*, 2003, 4 (4): 330-336.

FOSTER CB, ZHU S, ERICHSEN HC, LEHRNBECHER T, HART ES, CHOI E, STEIN S, SMITH MW, STEINBERG SM, IMBACH P, KUHNE T, CHANOCK SJ. - Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcγ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. - *Br J Haematol*, 2001, 113 (3): 596-599.

FREDERIKSEN H, SCHMIDT K. - The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. - *Blood*, 1999, 94 (3): 909-913.

FRITZSCHING B, OBERLE N, EBERHARDT N, QUICK S, HAAS J, WILDEMANN B, KRAMMER PH, SURIPAYER E. - In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. - *J Immunol*, 2005, 175 (1): 32-36.

GERNSHEIMER T. - Epidemiology and pathophysiology of immune thrombocytopenic purpura. - *Eur J Haematol Suppl*, 2008, (69): 3-8.

GERNSHEIMER T. - Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Mechanisms of Pathogenesis. - *Oncologist*, 2009, 14 (1): 12-21.

GHIRINGHELLI F, LARMONIER N, SCHMITT E, PARCELLIER A, CATHELIN D, GARRIDO C, CHAUFFERT B, SOLARY E, BONNOTTE B, MARTIN F. - CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. - *Eur J Immunol*, 2004, 34 (2): 336-344.

GODEAU B, BIERLING P. - Traitement du purpura thrombopenique auto-immun de l'adulte. - *Presse Med*, 2008,

GODEAU B, CHEVRET S, VARET B, LEFRERE F, ZINI JM, BASSOMPIERRE F, CHEZE S, LEGOUFFE E, HULIN C, GRANGE MJ, FAIN O, BIERLING P. - Intravenous immunoglobulin or high-dose methylprednisolone, with or without oral prednisone, for adults with untreated severe autoimmune thrombocytopenic purpura: a randomised, multicentre trial. - *Lancet*, 2002, 359 (9300): 23-29.

GODEAU B, DURAND JM, ROUDOT-THORAVAL F, TENNEZE A, OKSENHENDLER E, KAPLANSKI G, SCHAEFFER A, BIERLING P. - Dapsone for chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: a report of 66 cases. - *Br J Haematol*, 1997, 97 (2): 336-339.

GODEAU B, MICHEL M. - Treatment of chronic immune thrombocytopenic purpura in adults. - *Ann Hematol*, 2010,

GODEAU B, PORCHER R, FAIN O, LEFRERE F, FENAUX P, CHEZE S, VEKHOFF A, CHAUVEHEID MP, STIRNEMANN J, GALICIER L, BOURGEOIS E, HAIAT S, VARET B, LEPORRIER M, PAPO T, KHELLAF M, MICHEL M, BIERLING P. - Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune thrombocytopenic purpura - results of a prospective multicenter phase 2 study. - *Blood*, 2008, 112 (4): 999-1004.

GODEAU B, PROVAN D, BUSSEL J. - Immune thrombocytopenic purpura in adults. - *Curr Opin Hematol*, 2007, 14 (5): 535-556.

GUO ZX, CHEN ZP, ZHENG CL, JIA HR, GE J, GU DS, DU WT, WANG XY, ZHAO HF, YANG RC. - The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Eur J Haematol*, 2009, 82 (6): 488-489.

HE R, REID DM, JONES CE, SHULMAN NR. - Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 1994, 83 (4): 1024-1032.

HEYNS ADU P, BADENHORST PN, LOTTER MG, PIETERS H, WESSELS P, KOTZE HF. - Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous <sup>111</sup>In-labeled platelets and homologous <sup>51</sup>Cr-labeled platelets differ. - *Blood*, 1986, 67 (1): 86-92.

HOUWERZIJL EJ, BLOM NR, VAN DER WANT JJ, ESSELINK MT, KOORNSTRA JJ, SMIT JW, LOUWES H, VELLENGA E, DE WOLF JT. - Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 2004, 103 (2): 500-506.

HUANG CT, WORKMAN CJ, FLIES D, PAN X, MARSON AL, ZHOU G, HIPKISS EL, RAVI S, KOWALSKI J, LEVITSKY HI, POWELL JD, PARDOLL DM, DRAKE CG, VIGNALI DA. - Role of LAG-3 in regulatory T cells. - *Immunity*, 2004, 21 (4): 503-513.

HUBER S, SCHRAMM C, LEHR HA, MANN A, SCHMITT S, BECKER C, PROTSCHKA M, GALLE PR, NEURATH MF, BLESSING M. - Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. - *J Immunol*, 2004, 173 (11): 6526-6531.

IELLEM A, MARIANI M, LANG R, RECALDE H, PANINA-BORDIGNON P, SINIGAGLIA F, D'AMBROSIO D. - Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. - *J Exp Med*, 2001, 194 (6): 847-853.

ITO T, HANABUCHI S, WANG YH, PARK WR, ARIMA K, BOVER L, QIN FX, GILLIET M, LIU YJ. - Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. - *Immunity*, 2008, 28 (6): 870-880.

JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH. - Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. - *J Exp Med*, 2001, 193 (11): 1285-1294.

KAZKAZ H, ISENBERG D. - Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. - *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4 (4): 398-402.

KHELLAF M, MICHEL M, SCHAEFFER A, BIERLING P, GODEAU B. - Assessment of a therapeutic strategy for adults with severe autoimmune thrombocytopenic purpura based on a bleeding score rather than platelet count. - *Haematologica*, 2005, 90 (6): 829-832.

KING C. - New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. - *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (11): 757-766.

- KNEITZ C, WILHELM M, TONY HP. - Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases. - *Immunobiology*, 2002, 206 (5): 519-527.
- KOENEN HJ, SMEETS RL, VINK PM, VAN RIJSSEN E, BOOTS AM, JOOSTEN I. - Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. - *Blood*, 2008, 112 (6): 2340-2352.
- KOJOURI K, VESELY SK, TERRELL DR, GEORGE JN. - Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. - *Blood*, 2004, 104 (9): 2623-2634.
- KONYA C, GORONZY JJ, WEYAND CM. - Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. - *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9 (8): 951-965.
- KOSUGI S, KURATA Y, TOMIYAMA Y, TAHARA T, KATO T, TADOKORO S, SHIRAGA M, HONDA S, KANAKURA Y, MATSUZAWA Y. - Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. - *Br J Haematol*, 1996, 93 (3): 704-706.
- KUWANA M, KABURAKI J, IKEDA Y. - Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. - *J Clin Invest*, 1998, 102 (7): 1393-1402.
- KUWANA M, OKAZAKI Y, IKEDA Y. - Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. - *J Thromb Haemost*, 2009, 7 (2): 322-329.
- KUWANA M, OKAZAKI Y, KABURAKI J, KAWAKAMI Y, IKEDA Y. - Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. - *J Immunol*, 2002a, 168 (7): 3675-3682.
- KUWANA M, OKAZAKI Y, KAJIHARA M, KABURAKI J, MIYAZAKI H, KAWAKAMI Y, IKEDA Y. - Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. - *Arthritis Rheum*, 2002b, 46 (8): 2148-2159.
- LEWKOWICZ P, LEWKOWICZ N, SASIAK A, TCHORZEWSKI H. - Lipopolysaccharide-activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. - *J Immunol*, 2006, 177 (10): 7155-7163.
- LIEBMAN HA. - Viral-associated immune thrombocytopenic purpura. - *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2008, 2008: 212-218.
- LIEW FY. - T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. - *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (1): 55-60.
- LIM HW, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. - Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. - *J Immunol*, 2005, 175 (7): 4180-4183.
- LIM HW, HILLSAMER P, KIM CH. - Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. - *J Clin Invest*, 2004, 114 (11): 1640-1649.

LING Y, CAO X, YU Z, RUAN C. - Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. - *Eur J Haematol*, 2007, 79 (4): 310-316.

LIU B, ZHAO H, POON MC, HAN Z, GU D, XU M, JIA H, YANG R, HAN ZC. - Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Eur J Haematol*, 2007a, 78 (2): 139-143.

LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, GOTTLIEB PA, KAPRANOV P, GINGERAS TR, FAZEKAS DE ST GROTH B, CLAYBERGER C, SOPER DM, ZIEGLER SF, BLUESTONE JA. - CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. - *J Exp Med*, 2006, 203 (7): 1701-1711.

LIU YJ, SOUMELIS V, WATANABE N, ITO T, WANG YH, MALEFYT RDE W, OMORI M, ZHOU B, ZIEGLER SF. - TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. - *Annu Rev Immunol*, 2007b, 25: 193-219.

LOPES-CARVALHO T, FOOTE J, KEARNEY JF. - Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. - *Curr Opin Immunol*, 2005, 17 (3): 244-250.

LUND FE, RANDALL TD. - Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. - *Nat Rev Immunol*, 2010, 10 (4): 236-247.

MA D, ZHU X, ZHAO P, ZHAO C, LI X, ZHU Y, LI L, SUN J, PENG J, JI C, HOU M. - Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. - *Ann Hematol*, 2008, 87 (11): 899-904.

MAIA MH, PEIXOTO R DE L, DE LIMA CP, MAGALHAES M, SENA L, COSTA PDO S, BARBOSA FB, DE OLIVEIRA LF, ROMERO M, SILVA CN, DOS SANTOS EJ. - Predisposition to idiopathic thrombocytopenic purpura maps close to the major histocompatibility complex class I chain-related gene A. - *Hum Immunol*, 2009, 70 (3): 179-183.

MALE D, BROSTOFF J, ROTH DB, ROITT I - *Immunologie* - France: Dragos Bobu (Elsevier Masson),2007.

MALOISEL F, ANDRES E, ZIMMER J, NOEL E, ZAMFIR A, KOUMARIANOU A, DUFOUR P. - Danazol therapy in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: long-term results. - *Am J Med*, 2004, 116 (9): 590-594.

MANZ RA, ARCE S, CASSESE G, HAUSER AE, HIEPE F, RADBRUCH A. - Humoral immunity and long-lived plasma cells. - *Curr Opin Immunol*, 2002, 14 (4): 517-521.

MANZOTTI CN, TIPPING H, PERRY LC, MEAD KI, BLAIR PJ, ZHENG Y, SANSOM DM. - Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. - *Eur J Immunol*, 2002, 32 (10): 2888-2896.

MARSON A, KRETSCHMER K, FRAMPTON GM, JACOBSEN ES, POLANSKY JK, MACISAAC KD, LEVINE SS, FRAENKEL E, VON BOEHMER H, YOUNG RA. - Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. - *Nature*, 2007, 445 (7130): 931-935.

MARTIN F, KEARNEY JF. - Marginal-zone B cells. - *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (5): 323-335.

MARTINEZ-GAMBOA L, MEI H, LODDENKEMPER C, BALLMER B, HANSEN A, LIPSKY PE, EMMERICH F, RADBRUCH A, SALAMA A, DORNER T. - Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. - *Clin Immunol*, 2009, 130 (2): 199-212.

MAZO IB, HONCZARENKO M, LEUNG H, CAVANAGH LL, BONASIO R, WENINGER W, ENGELKE K, XIA L, MCEVER RP, KONI PA, SILBERSTEIN LE, VON ANDRIAN UH. - Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. - *Immunity*, 2005, 22 (2): 259-270.

MCINNES IB, SCHEFF G. - Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. - *Nat Rev Immunol*, 2007, 7 (6): 429-442.

MCMILLAN R, WANG L, TOMER A, NICHOL J, PISTILLO J. - Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. - *Blood*, 2004, 103 (4): 1364-1369.

MEBIUS RE, KRAAL G. - Structure and function of the spleen. - *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (8): 606-616.

MISRA N, BAYRY J, LACROIX-DESMAZES S, KAZATCHKINE MD, KAVERI SV. - Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. - *J Immunol*, 2004, 172 (8): 4676-4680.

MIYARA M, AMOURA Z, PARIZOT C, BADOUAL C, DORGHAM K, TRAD S, NOCHY D, DEBRE P, PIETTE JC, GOROCHOV G. - Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. - *J Immunol*, 2005, 175 (12): 8392-8400.

MIYARA M, SAKAGUCHI S. - Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. - *Trends Mol Med*, 2007, 13 (3): 108-116.

MIYARA M, YOSHIOKA Y, KITO A, SHIMA T, WING K, NIWA A, PARIZOT C, TAFLIN C, HEIKE T, VALEYRE D, MATHIAN A, NAKAHATA T, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M, AMOURA Z, GOROCHOV G, SAKAGUCHI S. - Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. - *Immunity*, 2009, 30 (6): 899-911.

MORGAN ME, VAN BILSEN JH, BAKKER AM, HEEMSKERK B, SCHILHAM MW, HARTGERS FC, ELFERINK BG, VAN DER ZANDEN L, DE VRIES RR, HUIZINGA TW, OTTENHOFF TH, TOES RE. - Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. - *Hum Immunol*, 2005, 66 (1): 13-20.

NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W. - Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. - *J Exp Med*, 2001, 194 (5): 629-644.

NIESWANDT B, BERGMEIER W, RACKEBRANDT K, GESSNER JE, ZIRNGIBL H. - Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. - *Blood*, 2000, 96 (7): 2520-2527.

NOMURA S, MATSUZAKI T, OZAKI Y, YAMAOKA M, YOSHIMURA C, KATSURA K, XIE GL, KAGAWA H, ISHIDA T, FUKUHARA S. - Clinical significance of HLA-DRB1\*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 1998, 91 (10): 3616-3622.

- NOMURA T, SAKAGUCHI S. - Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. - *Nat Immunol*, 2007, 8 (4): 333-334.
- O'SHEA JJ, PAUL WE. - Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. - *Science*, 2010, 327 (5969): 1098-1102.
- ODENDAHL M, JACOBI A, HANSEN A, FEIST E, HIEPE F, BURMESTER GR, LIPSKY PE, RADBRUCH A, DORNER T. - Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. - *J Immunol*, 2000, 165 (10): 5970-5979.
- OGAWARA H, HANDA H, MORITA K, HAYAKAWA M, KOJIMA J, AMAGAI H, TSUMITA Y, KANEKO Y, TSUKAMOTO N, NOJIMA Y, MURAKAMI H. - High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Eur J Haematol*, 2003, 71 (4): 283-288.
- OLSSON B, ANDERSSON PO, JERNAS M, JACOBSSON S, CARLSSON B, CARLSSON LM, WADENVIK H. - T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Nat Med*, 2003, 9 (9): 1123-1124.
- OLSSON B, RIDELL B, CARLSSON L, JACOBSSON S, WADENVIK H. - Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. - *Blood*, 2008, 112 (4): 1078-1084.
- PALA P, HUSSELL T, OPENSHAW PJ. - Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. - *J Immunol Methods*, 2000, 243 (1-2): 107-124.
- PANDIYAN P, ZHENG L, ISHIHARA S, REED J, LENARDO MJ. - CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. - *Nat Immunol*, 2007, 8 (12): 1353-1362.
- PARODI E, NOBILI B, PERROTTA S, ROSARIA MATARESE SM, RUSSO G, LICCIARDELLO M, ZECCA M, LOCATELLI F, CESARO S, BISOGNO G, GIORDANO P, DE MATTIA D, RAMENGHIA U. - Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in children with chronic refractory symptomatic immune thrombocytopenic purpura: efficacy and safety of treatment. - *Int J Hematol*, 2006, 84 (1): 48-53.
- PAUST S, LU L, MCCARTY N, CANTOR H. - Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (28): 10398-10403.
- PECK A, MELLINS ED. - Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. - *Immunology*, 2010, 129 (2): 147-153.
- PEROSA F, PRETE M, RACANELLI V, DAMMACCO F. - CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. - *J Intern Med*, 2010, 267 (3): 260-277.
- PICCA CC, LARKIN J, BOESTEANU A, LERMAN MA, RANKIN AL, CATON AJ. - Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. - *Immunol Rev*, 2006, 212: 74-85.
- PICCIRILLO CA, SHEVACH EM. - Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. - *J Immunol*, 2001, 167 (3): 1137-1140.

PILLAI V, ORTEGA SB, WANG CK, KARANDIKAR NJ. - Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. - *Clin Immunol*, 2007, 123 (1): 18-29.

PROVAN D, BUTLER T, EVANGELISTA ML, AMADORI S, NEWLAND AC, STASI R. - Activity and safety profile of low-dose rituximab for the treatment of autoimmune cytopenias in adults. - *Haematologica*, 2007, 92 (12): 1695-1698.

RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, POOS L, ANDRES E, HENTGES F, ZIMMER J. - Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. - *J Leukoc Biol*, 2007, 81 (1): 144-153.

RAND ML, DEAN JA. - Platelet function in autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. - *Acta Paediatr Suppl*, 1998, 424: 57-60.

REGAZZI MB, IACONA I, AVANZINI MA, ARCAINI L, MERLINI G, PERFETTI V, ZAJA F, MONTAGNA M, MORRA E, LAZZARINO M. - Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. - *Ther Drug Monit*, 2005, 27 (6): 785-792.

RIEGER A, BAR-OR A. - B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators. - *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (6): 486-487.

RINDER HM, TRACEY JB, RECHT M, DECASTRO L, RINDER CS, MCHUGH C, SMITH BR. - Differences in platelet alpha-granule release between normals and immune thrombocytopenic patients and between young and old platelets. - *Thromb Haemost*, 1998, 80 (3): 457-462.

RODEGHIERO F, STASI R, GERNESHEIMER T, MICHEL M, PROVAN D, ARNOLD DM, BUSSEL JB, CINES DB, CHONG BH, COOPER N, GODEAU B, LECHNER K, MAZZUCCONI MG, MCMILLAN R, SANZ MA, IMBACH P, BLANCHETTE V, KUHNE T, RUGGERI M, GEORGE JN. - Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. - *Blood*, 2009, 113 (11): 2386-2393.

ROLL P, DORNER T, TONY HP. - Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. - *Arthritis Rheum*, 2008, 58 (6): 1566-1575.

ROLL P, PALANICHAMY A, KNEITZ C, DORNER T, TONY HP. - Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. - *Arthritis Rheum*, 2006, 54 (8): 2377-2386.

ROMAGNANI C, DELLA CHIESA M, KOHLER S, MOEWES B, RADBRUCH A, MORETTA L, MORETTA A, THIEL A. - Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. - *Eur J Immunol*, 2005, 35 (8): 2452-2458.

SAGAERT X, SPRANGERS B, DE WOLF-PEETERS C. - The dynamics of the B follicle: understanding the normal counterpart of B-cell-derived malignancies. - *Leukemia*, 2007, 21 (7): 1378-1386.

SAKAGUCHI S. - Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. - *Nat Immunol*, 2005, 6 (4): 345-352.

SAKAGUCHI S, MIYARA M, COSTANTINO CM, HAFLER DA. - FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. - *Nat Rev Immunol*, 2010, 10 (7): 490-500.

SAKAGUCHI S, WING K, MIYARA M. - Regulatory T cells - a brief history and perspective. - *Eur J Immunol*, 2007, 37 Suppl 1: S116-123.

SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M. - Regulatory T cells and immune tolerance. - *Cell*, 2008, 133 (5): 775-787.

SAKAKURA M, WADA H, TAWARA I, NOBORI T, SUGIYAMA T, SAGAWA N, SHIKU H. - Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Thromb Res*, 2007, 120 (2): 187-193.

SAMSON M, LAKOMY D, AUDIA S, BONNOTTE B. - Les lymphocytes T(H)17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. - *Rev Med Interne*, 2010, [15/06/2010], pubmed.

SCHEFFOLD A, HUHN J, HOFER T. - Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. - *Eur J Immunol*, 2005, 35 (5): 1336-1341.

SCHRODER C, AZIMZADEH AM, WU G, PRICE JO, ATKINSON JB, PIERSON RN. - Anti-CD20 treatment depletes B-cells in blood and lymphatic tissue of cynomolgus monkeys. - *Transpl Immunol*, 2003, 12 (1): 19-28.

SEDDIKI N, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A, SOLOMON M, SELBY W, ALEXANDER SI, NANAN R, KELLEHER A, FAZEKAS DE ST GROTH B. - Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. - *J Exp Med*, 2006, 203 (7): 1693-1700.

SEGAL JB, POWE NR. - Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. - *J Thromb Haemost*, 2006, 4 (11): 2377-2383.

SETOGUCHI R, HORI S, TAKAHASHI T, SAKAGUCHI S. - Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. - *J Exp Med*, 2005, 201 (5): 723-735.

SHARFE N, DADI HK, SHAHAR M, ROIFMAN CM. - Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94 (7): 3168-3171.

SHEVACH EM. - Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. - *Immunity*, 2009, 30 (5): 636-645.

SHI Y, AGEMATSU K, OCHS HD, SUGANE K. - Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. - *Clin Immunol*, 2003, 108 (2): 128-137.

SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. - Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. - *Nat Immunol*, 2002, 3 (2): 135-142.

SOLANILLA A, PASQUET JM, VIALARD JF, CONTIN C, GROSSET C, DECHANET-MERVILLE J, DUPOUY M, LANDRY M, BELLOC F, NURDEN P, BLANCO P, MOREAU JF, PELLEGRIN JL, NURDEN AT, RIPOCHE J. - Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 2005, 105 (1): 215-218.



STASI R, COOPER N, DEL POETA G, STIPA E, LAURA EVANGELISTA M, ABRUZZESE E, AMADORI S. - Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. - *Blood*, 2008, 112 (4): 1147-1150.

STASI R, DEL POETA G, STIPA E, EVANGELISTA ML, TRAWINSKA MM, COOPER N, AMADORI S. - Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 2007, 110 (8): 2924-2930.

STASI R, PAGANO A, STIPA E, AMADORI S. - Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 2001, 98 (4): 952-957.

STEINMAN L. - A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. - *Nat Med*, 2007, 13 (2): 139-145.

STRAUSS L, BERGMANN C, WHITESIDE TL. - Human circulating CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. - *J Immunol*, 2009, 182 (3): 1469-1480.

TAK PP, THURLINGS RM, ROSSIER C, NESTOROV I, DIMIC A, MIRCETIC V, RISCHMUELLER M, NASONOV E, SHMIDT E, EMERY P, MUNAFO A. - Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. - *Arthritis Rheum*, 2008, 58 (1): 61-72.

TAKAHASHI T, YUJIRI T, SHINOHARA K, INOUE Y, SATO Y, FUJII Y, OKUBO M, ZAITSU Y, ARIYOSHI K, NAKAMURA Y, NAWATA R, OKA Y, SHIRAI M, TANIZAWA Y. - Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of H. pylori-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. - *Br J Haematol*, 2004, 124 (1): 91-96.

TAYLOR RP, LINDORFER MA. - Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. - *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3 (2): 86-95.

TCHILIAN EZ, BEVERLEY PC. - Altered CD45 expression and disease. - *Trends Immunol*, 2006, 27 (3): 146-153.

THAUNAT O, MORELON E, DEFRANCE T. - Am<sup>B</sup>-valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. - *Blood*, 2010, 116 (4): 515-521.

THORNTON AM, SHEVACH EM. - CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. - *J Exp Med*, 1998, 188 (2): 287-296.

THORNTON AM, SHEVACH EM. - Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. - *J Immunol*, 2000, 164 (1): 183-190.

TILLER T, TSUIJI M, YURASOV S, VELINZON K, NUSSENZWEIG MC, WARDEMANN H. - Autoreactivity in human IgG<sup>+</sup> memory B cells. - *Immunity*, 2007, 26 (2): 205-213.

TOH ML, KAWASHIMA M, HOT A, MIOSSEC P. - Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12R $\beta$ 2 inhibition. - *Ann Rheum Dis*, 2010, 69 (8): 1562-1567.

TRZONKOWSKI P, SZMIT E, MYSLIWSKA J, DOBYSZUK A, MYSLIWSKI A. - CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. - *Clin Immunol*, 2004, 112 (3): 258-267.

TU W, LAU YL, ZHENG J, LIU Y, CHAN PL, MAO H, DIONIS K, SCHNEIDER P, LEWIS DB. - Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. - *Blood*, 2008, 112 (6): 2554-2562.

VALLERSKOG T, GUNNARSSON I, WIDHE M, RISSELADA A, KLARESKOG L, VAN VOLLENHOVEN R, MALMSTROM V, TROLLMO C. - Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. - *Clin Immunol*, 2007, 122 (1): 62-74.

VALMORI D, MERLO A, SOULEIMANIAN NE, HESDORFFER CS, AYYOUB M. - A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. - *J Clin Invest*, 2005, 115 (7): 1953-1962.

VAN DER VLIET HJ, NIEUWENHUIS EE. - IPEX as a result of mutations in FOXP3. - *Clin Dev Immunol*, 2007, 2007: 89017.

VAN LEEUWEN EF, VAN DER VEN JT, ENGELFRIET CP, VON DEM BORNE AE. - Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. - *Blood*, 1982, 59 (1): 23-26.

VELASQUEZ-LOPERA MM, CORREA LA, GARCIA LF. - Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. - *Clin Exp Immunol*, 2008, 154 (1): 107-114.

VIGLIETTA V, BAECHER-ALLAN C, WEINER HL, HAFLER DA. - Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. - *J Exp Med*, 2004, 199 (7): 971-979.

WALSHE CA, BEERS SA, FRENCH RR, CHAN CH, JOHNSON PW, PACKHAM GK, GLENNIE MJ, CRAGG MS. - Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B cell antigen receptor signaling. - *J Biol Chem*, 2008, 283 (25): 16971-16984.

WEI C, ANOLIK J, CAPPIONE A, ZHENG B, PUGH-BERNARD A, BROOKS J, LEE EH, MILNER EC, SANZ I. - A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. - *J Immunol*, 2007, 178 (10): 6624-6633.

WEILL JC, WELLER S, REYNAUD CA. - Human marginal zone B cells. - *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 267-285.

WELLER S, BRAUN MC, TAN BK, ROSENWALD A, CORDIER C, CONLEY ME, PLEBANI A, KUMARARATNE DS, BONNET D, TOURNILHAC O, TCHERNIA G, STEINIGER B, STAUDT LM, CASANOVA JL, REYNAUD CA, WEILL JC. - Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. - *Blood*, 2004, 104 (12): 3647-3654.

WELLER S, FAILI A, GARCIA C, BRAUN MC, LE DEIST FF, DE SAINT BASILE GG, HERMINE O, FISCHER A, REYNAUD CA, WEILL JC. - CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (3): 1166-1170.

WELLER S, REYNAUD CA, WEILL JC. - Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? - *Eur J Immunol*, 2005, 35 (10): 2789-2792.

WILLENBROCK K, JUNGNICHEL B, HANSMANN ML, KUPPERS R. - Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. - *Eur J Immunol*, 2005, 35 (10): 3002-3007.

WING K, EKMARK A, KARLSSON H, RUDIN A, SURI-PAYER E. - Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. - *Immunology*, 2002, 106 (2): 190-199.

WIRTHS S, LANZAVECCHIA A. - ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. - *Eur J Immunol*, 2005, 35 (12): 3433-3441.

WLUKA A, OLSZEWSKI WL. - Innate and adaptive processes in the spleen. - *Ann Transplant*, 2006, 11 (4): 22-29.

WU Y, BORDE M, HEISSMEYER V, FEUERER M, LAPAN AD, STROUD JC, BATES DL, GUO L, HAN A, ZIEGLER SF, MATHIS D, BENOIST C, CHEN L, RAO A. - FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. - *Cell*, 2006, 126 (2): 375-387.

YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, KITAWAKI T, HORI S, MAEDA M, ONODERA M, UCHIYAMA T, FUJII S, SAKAGUCHI S. - Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. - *Int Immunol*, 2004, 16 (11): 1643-1656.

YANABA K, BOUAZIZ JD, HAAS KM, POE JC, FUJIMOTO M, TEDDER TF. - A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. - *Immunity*, 2008, 28 (5): 639-650.

YI H, ZHEN Y, JIANG L, ZHENG J, ZHAO Y. - The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. - *Cell Mol Immunol*, 2006, 3 (3): 189-195.

YOUD ME, FERGUSON AR, CORLEY RB. - Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization. - *Eur J Immunol*, 2002, 32 (8): 2328-2337.

YU J, HECK S, PATEL V, LEVAN J, YU Y, BUSSEL JB, YAZDANBAKHS K. - Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. - *Blood*, 2008, 112 (4): 1325-1328.

ZHANG J, MA D, ZHU X, QU X, JI C, HOU M. - Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. - *Haematologica*, 2009, 94 (9): 1326-1329.

ZHANG W, NARDI MA, LI Z, BORKOWSKY W, KARPATKIN S. - Role of molecular mimicry of hepatitis C-virus (HCV) protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. - *Blood*, 2008, 113 (17): 4086-4093.

ZHENG J, LIU Y, QIN G, CHAN PL, MAO H, LAM KT, LEWIS DB, LAU YL, TU W. - Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. - *J Immunol*, 2009, 183 (6): 3742-3750.

ZHENG SG, GRAY JD, OHTSUKA K, YAMAGIWA S, HORWITZ DA. - Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. - *J Immunol*, 2002, 169 (8): 4183-4189.

ZHENG Y, JOSEFOWICZ SZ, KAS A, CHU TT, GAVIN MA, RUDENSKY AY. - Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. - *Nature*, 2007, 445 (7130): 936-940.

ZHU J, PAUL WE. - Heterogeneity and plasticity of T helper cells. - *Cell Res*, 2010, 20 (1): 4-12.

ZHU X, MA D, ZHANG J, PENG J, QU X, JI C, HOU M. - Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. - *J Clin Immunol*, 2010, 30 (2): 253-259.

ZOU L, BARNETT B, SAFAH H, LARUSSA VF, EVDEMON-HOGAN M, MOTTRAM P, WEI S, DAVID O, CURIEL TJ, ZOU W. - Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. - *Cancer Res*, 2004, 64 (22): 8451-8455.

ZOU W. - Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. - *Nat Rev Immunol*, 2006, 6 (4): 295-307.

# ANNEXES

## **Annexe 1: Article «Increase of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma. A Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+CD25+ T lymphocytes»**

Résumé:

L'apparition et la progression des cancers est en partie liée à un défaut de la réponse antitumorale, notamment du fait d'une réponse tolérogène accrue. Un des mécanismes impliqués est une augmentation des lymphocytes T régulateurs (Treg) circulants et intratumoraux. Dans la première partie de ce travail, nous avons donc étudié le taux de Treg circulants, leur phénotype et leur fonction chez 49 patients atteints de cancers métastatiques et 24 sujets sains. Le taux de Treg est significativement plus élevé chez les patients comparativement aux sujets contrôles ( $9,22 \pm 2,6\%$  vs  $7,08 \pm 1,77\%$  des lymphocytes CD4<sup>+</sup>;  $p < 0,01$ ). Les Treg expriment GITR, CTLA-4 et Foxp3 en accord avec les données de la littérature. Leur fonctionnalité a ensuite été évaluée par leur capacité à inhiber une prolifération de lymphocytes T effecteurs. Nous montrons que les Treg sont fonctionnels, avec une capacité d'inhibition variable d'un sujet à l'autre, sans qu'il y ait de différence significative entre témoins et patients.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'impact d'un traitement par cyclophosphamide et d'une immunothérapie intratumorale chez 9 patients atteints de cancers solides évolutifs sur la base de résultats obtenus dans un modèle animal. En effet, dans un modèle de cancer colique chez le rat, notre équipe a préalablement montré qu'une déplétion en Treg par dose unique de cyclophosphamide associée à une stimulation immunitaire par une immunothérapie par BCG permettait d'obtenir une régression tumorale. Chez l'homme, quelle que soit la dose de cyclophosphamide utilisée (250, 500 ou 750 mg/m<sup>2</sup>) nous n'observons pas de diminution significative des Treg circulants. Cependant, ce schéma d'immunothérapie permet une augmentation des cellules dendritiques immatures, des macrophages et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au sein de la tumeur, associée à une diminution des lymphocytes T CD25<sup>+</sup>. Ceci a permis une stabilisation clinique chez deux des neuf patients.

Ainsi, nous confirmons que les Treg circulants sont augmentés chez les patients atteints de cancers métastatiques. Le schéma d'immunothérapie utilisé n'entraîne qu'une déplétion modérée en Treg et la réponse immunitaire intratumorale reste insuffisante pour permettre un contrôle de la pathologie.

# Increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes

S. Audia,<sup>\*†§§</sup> A. Nicolas,<sup>\*§§</sup>  
D. Cathelin,<sup>\* N. Larmonier,<sup>‡</sup>  
C. Ferrand,<sup>§ P. Foucher,<sup>†</sup> A. Fanton,<sup>§</sup>  
E. Bergoin,<sup>\*\* M. Maynadie,<sup>\*\*</sup>  
L. Arnould,<sup>††</sup> A. Bateman,<sup>‡‡</sup>  
B. Lorcerie,<sup>† E. Solary,<sup>\* B. Chauffert<sup>\*†</sup></sup></sup></sup></sup></sup>

<sup>\*</sup>INSERM, UMR 866, Faculty of Medicine and Pharmacy, <sup>†</sup>Departments of Internal Medicine and Immunology and <sup>‡</sup>Pulmonary Disease, <sup>\*\*</sup>Hematology Laboratory, Hospital du Bocage, <sup>††</sup>Department of Pathology, Centre Georges-Francois Leclerc, Dijon, <sup>§</sup>INSERM, U645, EFSB-FC IFR133 University of Franche-Comté, Besançon, France, <sup>‡‡</sup>Department of Paediatrics, Steele Children's Research Centre, University of Arizona, Tucson, AZ, USA, and <sup>§§</sup>Cancer Sciences Division, University of Southampton, Southampton, UK

Accepted for publication 4 September 2007  
Correspondence: Professor B. Bonnotte,  
INSERM U866, Faculty of Medicine, 7 Bd  
Jeanne d'Arc, BP87900, 21079 Dijon, France.  
E-mail: bernard.bonnotte@u-bourgogne.fr

<sup>§§</sup>S. Audia and A. Nicolas contributed equally to this work.

## Introduction

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) play a critical role in the regulation of self-tolerance, preventing the occurrence of autoimmune diseases [1,2]. In humans, T<sub>reg</sub> represent 5–10% of circulating CD4<sup>+</sup> T cells. They are defined functionally by their capability to suppress the activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector T cells [3,4]. Despite the identification of several antigens, the identification of a specific T<sub>reg</sub> cell surface marker is still missing, and the transcription factor forkhead box P3 (FoxP3), involved in the development and the inhibitory functions of these cells, remains to date their only specific molecular signature. As well as their role in autoimmunity, T<sub>reg</sub> participate in the control of infection, transplantation tolerance and tumour immunity.

## Summary

We determined the number and functional status of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) in blood samples from patients with metastatic carcinoma, and evaluated their sensitivity to a single intravenous infusion of cyclophosphamide. T<sub>reg</sub> numbers were significantly higher in 49 patients with metastatic cancer (9.2% of CD4<sup>+</sup> T cells) compared to 24 healthy donors (7.1%). These cells expressed the transcription factor forkhead box P3 (FoxP3), glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related protein (GITR) and intracellular CD152, and demonstrated a suppressive activity *in vitro* against CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologous proliferation. At a single intravenous infusion, cyclophosphamide failed, in association with a non-specific immunotherapy by intratumoral bacille Calmette–Guérin (BCG), to modulate significantly T<sub>reg</sub> numbers or function. Metastatic cancer is associated with an expansion of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>CD152<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> cells whose immunosuppressive properties do not differ from those of healthy subjects. Moreover, cyclophosphamide administration may not represent an optimal therapy to eliminate T<sub>reg</sub>, which further underlines the need to identify specific agents that would selectively deplete these cells.

**Keywords:** immunotherapy, metastatic carcinoma, regulatory T cells

It has been shown that T<sub>reg</sub> numbers were increased in tumour-bearing animals [5–7]. It has also been demonstrated that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell elimination, obtained with monoclonal antibodies or cyclophosphamide treatment, fostered a tumour-specific immune response in mice [7–11]. In various animal models, T<sub>reg</sub> depletion prevented the growth or triggered the regression of tumours when performed before or very early after tumour cell injection [6,9,10,12–14]. T<sub>reg</sub> depletion also triggered tumour regression when associated with anti-cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) antibody [15] or with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell transfer [16]. In a rat model of syngeneic colon carcinoma, we have shown that cyclophosphamide-induced depletion of T<sub>reg</sub> followed by a specific immunotherapy cured all animals bearing established and progressive tumours [7].

In humans, an increase in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell numbers has been detected in the blood of patients with cancers of diverse nature, including oesophageal and gastric [17], colon [18], pancreas and breast [19], melanomas [20], hepatocarcinoma [21], cervical and endometrial [22], ovarian and lung carcinomas [4,23,24] and Hodgkin's disease [25]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells may also accumulate within the tumour site or at its vicinity and in the draining lymph nodes [19,22,25]. The percentage of T<sub>reg</sub> cells among peripheral blood T cells was shown to correlate with prognosis [18,26].

The current study was designed to further explore CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> population in patients with advanced and metastatic cancers from a variety of primary sites. Based on impressive results obtained in tumour-bearing rats by using a single injection of cyclophosphamide to deplete T<sub>reg</sub> cells [7], we evaluated in a Phase I trial the ability of a single infusion of cyclophosphamide (tested at three different doses) to deplete T<sub>reg</sub> cells from peripheral blood.

## Patients and methods

### Patient characteristics

Between September 2002 and December 2005, all patients with metastatic cancer admitted to the internal medicine, pneumology or medical oncology departments (Hôpital du Bocage, Dijon, France) were asked to participate in our study. They were excluded if they had received chemotherapy, radiation therapy or immunotherapy within the previous 12 weeks. After consent was obtained, blood samples were collected from 24 healthy volunteers and 49 patients with advanced cancer. The Institutional Review Board of the Ethics Committee of Burgundy (France) approved the study protocol (No. 2003/19). The entry criteria for the Phase I clinical trial were the same as above. All the patients included in this assay had extensive metastatic disease and had failed to respond to at least two prior chemotherapeutic regimens.

### Phase I design

At day 1, patients received a single intravenous injection of cyclophosphamide. Three different dose cohorts, 250, 500, 750 mg/m<sup>2</sup>, with three patients in each group, were studied. At days 7 and 14, patients received a bacille Calmette–Guérin (BCG) injection into an easily accessible metastasis (cutaneous or lymph nodes). During this protocol CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were monitored: percentage, absolute number, FoxP3 expression and immunosuppressive function. Histology of the injected metastasis was performed at days 0 and 28 to evaluate immune cell activation and infiltration by dendritic cells (DCs), macrophages and T cells. Clinical activity was assessed by applying the response evaluation criteria in solid tumours (RECIST) criteria to computed tomography or

magnetic resonance imaging scans obtained before and after treatment.

### Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation

Whole blood was collected into heparin-containing Vacutainer tubes and processed within 2 h. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation for 20 min at 22°C and 800 g.

### Phenotypic characterization of T<sub>reg</sub>

To determine the frequency and the phenotype of T<sub>reg</sub> cells in PBMCs, multi-colour fluorescence-activated cell sorting analysis was performed using the following antibodies: anti-CD4, anti-CD25, anti-human leucocyte antigen D-related (HLA-DR), anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD152 (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and anti-glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related protein (GITR) (R&D Systems, Lille, France). Expression of intracellular CD152, membrane GITR and CD25 were also assessed after cell sorting on the negative and positive fractions. Flow cytometry analysis was achieved on a Becton Dickinson LSRII using Facsdiva software (BD Biosciences; Erembodegen, Belgium). Isotype-matched antibodies were used as controls.

### Functional characterization of T<sub>reg</sub>

CD4<sup>+</sup> T cells were first separated using a human CD4 T cell enrichment kit (StemSep; StemCell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. Selected cell purity was > 90% as determined by flow cytometry. Using CD25<sup>+</sup> microbeads (Miltenyi Biotech, Paris, France), CD4<sup>+</sup> T cells were then sorted into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. The purity of the cells after sorting was 90–99%. T cell proliferation of both fractions was induced by two different methods: co-culture with allogeneic *in vitro* granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4 differentiated DCs, or stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 microbeads (Dyna, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in 96-well round-bottomed plates for 96 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To determine the suppressive ability of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, stimulated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells (100 000 per wells) were co-cultured with or without autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells (50 000 per wells). Proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (Amersham, GE Healthcare, Saclay, France) added for the last 18 h. Incorporated radioactivity was measured using a scintillation counter (Wallac, Turku, Finland). All experiments were performed in triplicate.

### Foxp3 expression by real time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR)

Total cellular RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) RNA lysis buffer according the



Table 1. Patient characteristics.

| Tumor type     | Age (years) | Sex    |      | Number of patients | T <sub>reg</sub> (%) |
|----------------|-------------|--------|------|--------------------|----------------------|
|                |             | Female | Male |                    |                      |
| Breast         | 63 ± 7      | 3      |      | 3                  | 8.0 ± 1.0            |
| Lung           | 68 ± 8      | 5      | 21   | 26                 | 8.8 ± 2.8            |
| Kidney         | 66 ± 14     | 2      | 5    | 7                  | 9.8 ± 1.0            |
| Stomach        | 40 ± 0      |        | 3    | 3                  | 9.3 ± 1.2            |
| Colorectal     | 70 ± 6      | 2      | 2    | 4                  | 8.3 ± 1.0            |
| Bladder        | 65 ± 11     |        | 3    | 3                  | 11.3 ± 3.2           |
| Prostate       | 64 ± 12     |        | 2    | 2                  | 8.5 ± 2.1            |
| Unknown        | 58 ± 0      |        | 1    | 1                  | 16                   |
| Healthy donors | 58.5 ± 15   | 9      | 15   | 24                 | 7.08 ± 1.8           |

manufacturer's instructions. Real-time quantification of FoxP3 gene expression (GenBank accession number: AF277993) and of the reference gene *Abl* was performed using gene-specific fluorogenic hydrolysis probes in a final volume of 20 µl with 1X universal master mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), 10 µM of each primer and 5 µM of bifluorescent probe. Quantitative PCRs were run as a standard two-step cycling reaction in an iCycler (BioRad; Marnes-la-Coquette, France). Primer sequences were as follows: forward (spanning exons 1 and 2): 5'-CCCACAAGCCAGGCTGAT-3'; reverse: 5'-CATCGGGTCCTTGTCCAA3-'; Probe: 5'-FamTTTCTGTCAGTCCACTTCA CCAAGCCT-Tamra-3'. Mean duplicate measurements were normalized and expressed as a ratio of FoxP3 mRNA copies/*Abl* mRNA copies.

#### Histological study of the tumour cell injection site

Biopsies were embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetechnical; Tokyo, Japan) and snap-frozen in methylbutane cooled in liquid nitrogen. An immunohistochemical study of tumour-infiltrating inflammatory cells was performed on acetone-fixed 5 µM cryostat sections. Mouse monoclonal antibodies (mAb) to human cells, including DCs and monocytes (CD11c), macrophages (CD68), activated/regulatory T cell (CD25) and CD8<sup>+</sup> T cell (CD8) (all from Serotec, Oxford, UK), were used. After incubation with specific mAbs, sections were incubated with biotinylated sheep anti-

mouse immunoglobulin (IgG) antibody (Amersham, Little Chalfont, UK), then with streptavidin-peroxidase, and stained with aminoethylcarbazole.

#### Statistical analysis

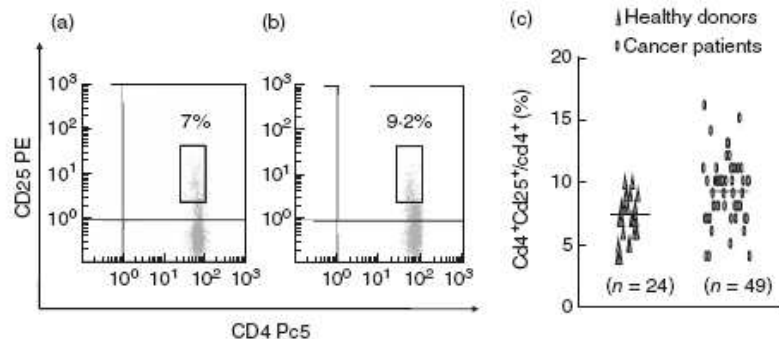
Data are expressed as mean and standard deviation (s.d.) for percentages. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test to assess differences between the different study groups. *P* < 0.05 was considered statistically significant. A mixed model of statistical analysis was used to compare the proliferation curves.

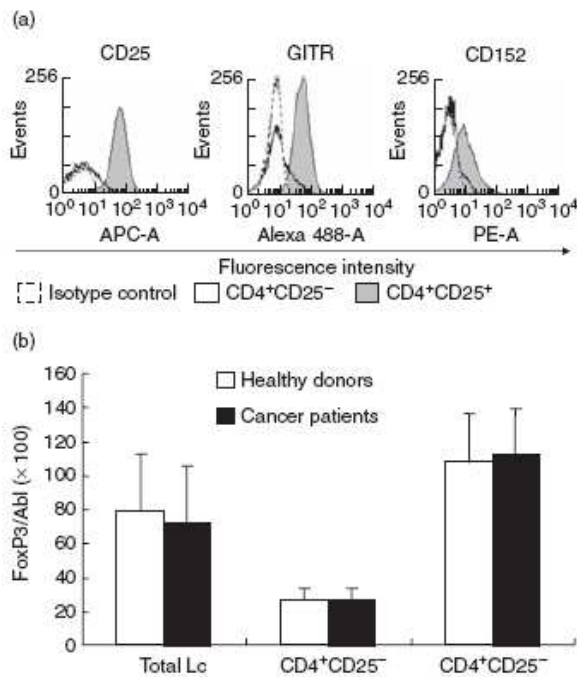
#### Results

##### Patients with metastatic cancers demonstrate an increased frequency of blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells

The prevalence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells was determined in the peripheral blood of 49 patients with metastatic cancer and 24 healthy donors. Cancer patient characteristics are described in Table 1. We analysed the CD4<sup>+</sup> cells with the highest level of CD25 expression (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>), which protrudes as a tail on flow cytometry from the major population of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> cells in cancer patients (Fig. 1a) and healthy donors (Fig. 1b). Individual frequencies of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> to total CD4<sup>+</sup> T cells as well as the cumulative data for all the cancer patients and healthy donors are

Fig. 1. Increase of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T lymphocytes in cancer patients. Representative flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from a healthy donor (a) or a patient with metastatic cancer (b). (c) Percentage of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from patients with metastatic cancer (*n* = 49) and healthy donors (*n* = 24). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells are presented as a percentage of total CD4<sup>+</sup> cells. Each plot represents an individual patient. *P* < 0.01 using Student's *t*-test.





**Fig. 2.** Phenotypic analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells and forkhead box P3 (FoxP3) expression. (a) CD4<sup>+</sup> cells were sorted in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and then stained with anti-CD25, anti-glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related protein (GITR) and anti-CD152 antibodies. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cell populations were analysed separately. (b) cDNA obtained from purified populations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from 49 cancer patients and 24 healthy donors were subjected to quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis using primers specific for FoxP3 and Abelson (Abl), as described in Materials and Methods.

represented as scatter plots (Fig. 1c). As depicted in Fig. 1c, the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells was significantly higher in patients with metastatic cancer ( $9.22 \pm 2.6\%$ ) than in healthy donors ( $7.08 \pm 1.77\%$ ) ( $P < 0.01$ , Student's *t*-test). No correlation was found between the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells and the type of cancer (breast, lung or kidney) (Table 1).

#### Phenotypic analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells

The phenotypic characteristics of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T lymphocytes from cancer patients and healthy donors were then analysed further by flow cytometry. GITR, a member of the tumour necrosis factor receptor superfamily reported to be expressed predominantly on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> regulatory T cells [27], was detected on up to 100% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells. Similarly, 70% of the purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells expressed intracellular CD152 (Fig. 2a). Furthermore, consistent with previous reports [19], CD45RO, a marker for T cell responses to recall antigens was

detected on 96% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells (data not shown). In contrast, the CD45RA marker (a marker for naive T cells) was expressed by only 17% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells (data not shown). The transcription factor FoxP3 has been described as the most specific molecular marker for regulatory T cells [28,29]. We therefore analysed FoxP3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells isolated from cancer patients and healthy donors using real-time PCR. As depicted in Fig. 2b, contrasting with their CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> counterparts, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T lymphocytes from both cancer patients and healthy donors expressed FoxP3. Together, these results indicate that circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cell isolated from patients demonstrate specific phenotypic features of immunosuppressive regulatory T cells. Furthermore, no phenotypical difference was observed between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from metastatic cancer patients and healthy donors.

#### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from healthy donors and cancer patients exhibit a similar suppressive potential

Because the phenotypic definition of T<sub>reg</sub> in the human population remains controversial, we sought to compare the functional status of sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from cancer patients and healthy donors. We first evaluated whether purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells were able to inhibit the proliferation of non-regulatory effector T cells induced by allogeneic dendritic cells from healthy patients. The results were highly variable, depending upon the allogeneic pair (data not shown), and allogeneic proliferation was never inhibited completely by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from cancer patients or healthy donors (data not shown).

Then, autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 microbeads in the presence or absence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells. The proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells induced by anti-CD3 and anti-CD28 was reduced in the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T lymphocytes (Fig. 3a). This suppressive effect was not significantly different between T<sub>reg</sub> from cancer patients and those from healthy donors (respectively,  $50\% \pm 28\%$  and  $58\% \pm 18\%$ ;  $P = 0.28$ , Fig. 3a). Inhibition of effector T cell proliferation by T<sub>reg</sub> was extremely variable from patient to patient within each group (cancer patients and healthy donors), ranging from 22 to 94%, and no significant correlation was observed between the type of cancer and the potency of T<sub>reg</sub>-mediated suppression (Fig. 3b). These data suggest that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from patients with metastatic cancer are as capable as those from healthy donors of inhibiting the proliferation of autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells upon T cell receptor stimulation.

#### Cyclophosphamide treatment and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells in cancer patients

We have shown previously that, in a rat model of syngeneic colon cancer, cyclophosphamide-induced T<sub>reg</sub> depletion

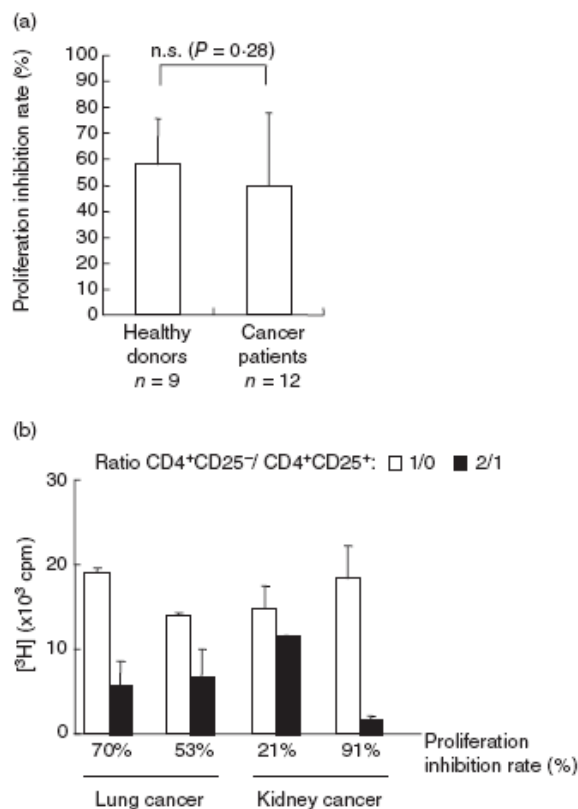


Fig. 3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from cancer patients and healthy donors exhibit a similar suppressive potential. (a) Sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from nine healthy donors and 12 patients with metastatic cancer were cultured with autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> stimulated with microbeads-conjugated anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. T cell proliferation was evaluated using [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. Proliferation was determined in triplicate cultures. Inhibition rate of proliferation is expressed as a percentage of co-culture proliferations of 100 000 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> at a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ratio of 2 : 1, compared to proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> alone. (b) Sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from four representative cancer patients (kidney cancer: two, lung cancer: two) were cultured with autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 microbeads. Similar assay as described in (a).

combined with a non-specific active immunotherapy was able to cure animals bearing established tumours [7]. These results prompted us to conduct a pilot clinical trial in patients with metastatic cancer who received a single intravenous injection of cyclophosphamide at day 1 and a BCG injection into an easily accessible metastasis (cutaneous or lymph nodes) at days 7 and 14. The characteristics of enrolled patients are described in Table 2. The regimens were well tolerated with only three grades 3/4 adverse events, such as pain at the injection site (two patients) and adenomegaly (one patient). Seven patients demonstrated progressive disease and died a few months later, one remained stable for 10 months and the remaining patient remains stable 4 years after treatment.

The number of T<sub>reg</sub>s were monitored weekly for the first 4 weeks, then monthly for 3 months after cyclophosphamide injection. Only a slight decrease in the absolute number (not shown) and the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T<sub>reg</sub> cells to total CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 4a) was observed without significant differences between cyclophosphamide doses. In line with these data, FoxP3 expression was not modified significantly by cyclophosphamide treatment (Fig. 4b).

Histological analysis performed in five patients before and after cyclophosphamide administration followed with BCG intratumoral injection demonstrated a dramatic infiltration of the tumour by myeloid cells, CD11c<sup>+</sup> immature DCs, CD68<sup>+</sup> macrophage cells and CD8<sup>+</sup> T cells. Analysis of CD25<sup>+</sup> T cells at the vicinity of the metastatic tumour showed variable degrees of tumour infiltration, and suggested a decrease in this infiltration following cyclophosphamide injection (Fig. 4c).

## Discussion

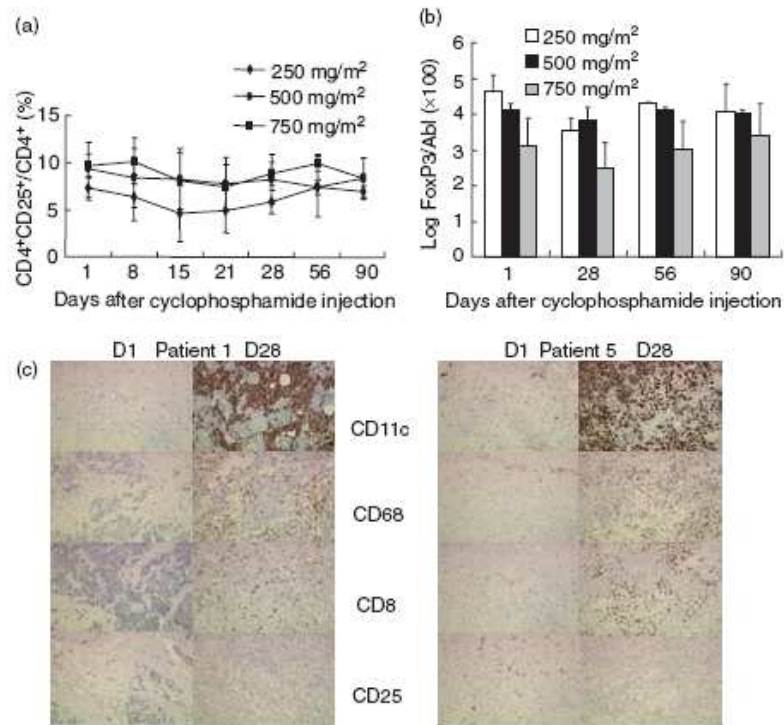
In the current study we confirm that the prevalence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells among CD4<sup>+</sup> cells in peripheral blood was significantly higher in patients with metastatic cancer than in healthy subjects. Cell surface markers and FoxP3 expression analysis identified these cells phenotypically as T<sub>reg</sub>. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells from healthy donors and cancer patients were capable of inhibiting, to a similar extent, the

Table 2. Summary of patient characteristics, clinical Phase I.

| Patients | Age (years) | Sex | Cancer type           | Metastasis              | Clinical outcome     |
|----------|-------------|-----|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| 1        | 58          | F   | Breast                | Lymph nodes             | PR (10 months)       |
| 2        | 69          | F   | Pancreatic            | Lymph nodes, skin       | PD                   |
| 3        | 79          | M   | Mesothelioma          | Peritoneum              | PD                   |
| 4        | 54          | F   | Uterine sarcoma       | Bone, lungs             | PR (4 years, stable) |
| 5        | 56          | M   | Chordoma              | Lymph nodes             | PD                   |
| 6        | 58          | F   | Colorectal            | Liver                   | PD                   |
| 7        | 55          | F   | Ovarian               | Lymph nodes, peritoneum | PD                   |
| 8        | 53          | M   | Neuroendocrine tumour | Bone                    | PD                   |
| 9        | 58          | F   | Ovarian               | Lymph nodes, peritoneum | PD                   |

PR, partial response; PD, progressive disease.

**Fig. 4.** T regulatory ( $T_{reg}$ ) evolution following a single cyclophosphamide injection. (a) Determination of the percentage of  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  to total  $CD4^+$  by flow cytometry at different time points after administration of the indicated doses of cyclophosphamide. The therapeutic protocol is described in Material and methods. (b) Evaluation of forkhead box P3 (FoxP3) expression in peripheral  $CD4^+$  T cells by real time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) at different time-points after administration of the indicated doses of cyclophosphamide. (c) Immunohistochemical analyses of metastatic tumours were performed at days 0 and at 28 of the therapeutic protocol on serial sections using monoclonal antibodies: anti-CD68 that labels monocytes, anti-CD11c for myeloid dendritic cells, anti-CD8 and anti-CD25. Representative immunohistochemistry analyses of two patients (1 and 5) are shown.



proliferative response of autologous  $CD4^+CD25^-$  T cells. These results indicate that tumours do not modulate significantly the suppressive activity of peripheral blood  $T_{reg}$ s, but rather increase their number. We did not find any correlation between the suppressive capacity of  $CD4^+CD25^{high}$  T cells and the type of cancer, and the inhibitory potency of  $T_{reg}$ s was highly variable from one individual to another, in either healthy subjects or cancer patients. These results suggest that, unlike the reproducible  $T_{reg}$  suppressive activity in rodents, the suppressive potential of human  $CD4^+CD25^{high}$  T cells is highly variable and depends on parameters that remain partly undefined. In cancer patients, the persistent inflammation induced by the tumour or growth factors and chemokines secreted by cancer cells create a microenvironment that may vary from patient to patient and consequently influence differentially the suppressive activity of  $T_{reg}$ s. In our study,  $T_{reg}$ s were able to inhibit T cell proliferation induced by anti-CD3 and anti-CD28, but not that induced by allogeneic DCs. This may be explained by the ability of anti-CD3 and anti-CD28 to not only stimulate effector cell proliferation, but to also promote and further enhance  $T_{reg}$  immunosuppressive function.

As  $T_{reg}$  elimination in cancer patients may foster the efficiency of anti-tumour vaccination [18,21,23,26,28], we adapted to the clinic an experimental protocol set up in rats [7]. This regimen was well tolerated and two patients demonstrated significant clinical improvement: one stable disease for 10 months and one disease that remains stable

4 years after treatment. However, no relationship was found between the percentage of the  $CD4^+CD25^{high}$  circulating T cells or the  $CD4^+CD25^{high}$  cells infiltrating the tumour and the clinical evolution of the disease.

The current data are in disagreement with a recent study which demonstrated cyclophosphamide-induced  $T_{reg}$  depletion [30]. A single injection of cyclophosphamide may not be sufficient to impair significantly circulating  $T_{reg}$  numbers. In fact, there is no clear evidence to suggest the mechanism for the induction of  $T_{reg}$  in cancer patients or  $T_{reg}$  trafficking. The predominant location of these suppressive cells may be the tumour, where  $T_{reg}$ s could have been attracted by CCL22 secreted by tumour cells or the myeloid cells infiltrating the tumour [26]. In accordance with this hypothesis, we demonstrated that an increase of myeloid cells infiltrating the tumour fosters the growth of rat colon carcinoma [31].

Taken together, our results confirm that  $CD4^+CD25^{high}$   $T_{reg}$ s are increased in peripheral blood of patients with metastatic cancer. Their immunosuppressive activity appears more heterogeneous than in animal models and cannot be inhibited by a single cyclophosphamide injection. Metronomic doses of cyclophosphamide combined with immunotherapy have shown a synergistic anti-tumour effect, but the mechanisms remain unclear [32]. Therefore an efficient strategy aiming to deplete  $T_{reg}$  cells is still required to determine whether this depletion could favour tumour regression.

## Acknowledgements

This work was supported by the French National League against Cancer (Burgundy and Nièvre committees) and by the Centre Hospitalier de Dijon and the French Ministry of Health – PHRC Régional: 2003-R-07-01. D. Cathelin received financial support from the Saône-et-Loire committee of the French National League against Cancer. N. Larmonnier received support from the Leukaemia and Lymphoma Society Fellow Award 5188-07, the Tee Up for Tots and Raise a Racquet Funds. We thank A. Fromentin, P. Monin Baroille and F. Krzystanek, C. Parmeland, C. Serrée, C. Ridel for excellent technical assistance.

## References

- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; **101**:455–8.
- Morse MA, Clay TM, Mosca P, Lyerly HK. Immunoregulatory T cells in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2002; **2**:27–34.
- Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; **167**:1137–40.
- Woo EY, Yeh H, Chu CS *et al.* Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002; **168**:4272–6.
- Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1996; **184**:465–72.
- Fu T, Shen Y, Fujimoto S. Tumor-specific CD4(+) suppressor T-cell clone capable of inhibiting rejection of syngeneic sarcoma in A/J mice. *Int J Cancer* 2000; **87**:680–7.
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; **34**:336–44.
- Tuve S, Chen BM, Cheng TL *et al.* Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* 2007; **67**:5929–39.
- Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK *et al.* Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immunol* 2002; **2**:1.
- Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother* 2002; **25**:207–17.
- Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; **200**:771–82.
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; **59**:3128–33.
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; **163**:5211–18.
- Tawara I, Take Y, Uenaka A, Noguchi Y, Nakayama E. Sequential involvement of two distinct CD4+ regulatory T cells during the course of transplantable tumor growth and protection from 3-methylcholanthrene-induced tumorigenesis by CD25-depletion. *Jpn J Cancer Res* 2002; **93**:911–16.
- Sutmoller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; **194**:823–32.
- Casares N, Arribillaga L, Sarobe P *et al.* CD4+CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 2003; **171**:5931–9.
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:4404–8.
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; **98**:1089–99.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; **169**:2756–61.
- Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003; **26**:85–93.
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; **65**:2457–64.
- Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G *et al.* Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2004; **92**:106–15.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:4766–72.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; **9**:606–12.
- Marshall NA, Christie LE, Munro LR *et al.* Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; **103**:1755–62.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; **10**:942–9.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through G1TR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; **3**:135–42.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**:330–6.
- Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; **4**:337–42.
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T

- cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:641–8.
- 31 Bonnotte B, Crittenden M, Larmonier N, Gough M, Vile RG. MIP-3alpha transfection into a rodent tumor cell line increases intratumoral dendritic cell infiltration but enhances (facilitates) tumor growth and decreases immunogenicity. *J Immunol* 2004; 173:4929–35.
- 32 Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, Harris AL, Cerundolo V. Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model. *Cancer Res* 2003; 63:8408–13.

## **Annexe 2: Publications personnelles**

### **Publications scientifiques**

1. J. Fraszczak, M. Trad, N. Janikashvili, D. Cathelin, D. Lakomy, V. Granci, A. Morizot, **S. Audia**, O. Micheau, L. Lagrost, E. Katsanis, E. Solary, N. Larmonier, B. Bonnotte. Peroxynitrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells. *Journal of Immunology*, 2010; 184(4):1876-84.
2. **S. Audia**, A. Nicolas, D. Cathelin, N. Larmonier, C. Ferrand, P. Foucher, A. Fanton, E. Bergoin, M. Maynadie, L. Arnould, A. Bateman, B. Lorcerie, E. Solary, B. Chauffert, B. Bonnotte. Increase of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma. A Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+CD25+ T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007; 150(3):523-30.
3. N. Larmonier, D. Cathelin, C. Larmonier, A. Nicolas, D. Merino, N. Janikashvili, **S. Audia**, A. Bateman, J. Thompson, T. Kottke, T. Hartung, E. Katsanis, R. Vile, B. Bonnotte. The inhibition of TNF-alpha anti-tumoral properties by blocking antibodies promotes tumor growth in a rat model. *Experimental Cell Research*, 2007; 313(11): 2345-55.

### **Publications médicales**

1. **S. Audia**, N. Falvo, V. Leguy-Seguin, S. Berthier, L. Martin, B. Bonnotte, B. Lorcerie. Scalp vein thrombosis mimicking giant cell arteritis relapse. *Internal Medicine Journal*, 2010, accepté.
2. M. Samson, **S. Audia**, D. Lakomy, B. Bonnotte, C. Tavernier, P. Ornetti. Stratégie diagnostique devant la découverte d'une hypogammaglobulinémie en rhumatologie. Diagnostic strategy after the discovery of hypogammaglobulinemia in rheumatology. *La revue du rhumatisme / Bone Joint Spine*. Sous presse.
3. **S. Audia**, B. Lorcerie, B. Godeau, B. Bonnotte. Physiopathologie du purpura thrombopénique immunologique. *La Revue de Médecine Interne*, 2010.
4. M. Samson, D. Lakomy, **S. Audia**, B. Bonnotte. Les lymphocytes T<sub>H</sub>17: différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *La Revue de Médecine Interne*. 2010.

5. **S. Audia**, D. Lakomy, J. Guy, V. Leguy-Seguin, S. Berthier, S. Aho, B. Lorcerie, B. Bonnotte. Traitement du purpura thrombopénique immunologique. Etude rétrospective de 40 patients. *La Revue de Médecine Interne*, 2010 ; 31:337-44.
6. A. Grandvuillemin, **S. Audia**, V. Leguy-Seguin, V. Couillet, B. Bonnotte, C. Sgro. Thrombocytopénie sévère et leucopénie modérée sous déférasirox (Exjade®). *Thérapie*. 2009;64(6):405-7.
7. M. Samson, **S. Audia**, M. Georges, E. Collet, C. Camus, P. Camus, P. Bonniaud. Une éruption cutanée. *La Revue de Médecine Interne*, 2010 ; 31(3):236-7.
8. M. Samson, **S. Audia**, C. Duchêne, I. Perinet, P. Bielefeld, J.-F. Besancenot. Maladie de Crohn au cours d'une sclérose en plaques: rôle de l'interféron bêta. *La Revue de Médecine Interne*, 2009 ; 30 (12):1825-8.
9. J. Vinit, **S. Audia**, A. Fromont, S. Berthier, B. Bonnotte, M. Giroud, B. Lorcerie, T. Moreau. Un déficit neurologique multifocal pseudo-infectieux révélant une encéphalomyélite aiguë disséminée. *La Presse Médicale*, 2008 ; 37 (12): 1825-8.
10. J. Vinit, H. Devilliers, **S. Audia**, V. Leguy, H. Mura, N. Falvo, S. Berthier, J.-F. Besancenot, B. Bonnotte, B. Lorcerie. Sueurs profuses invalidantes sous hydromorphone. *La Revue de Médecine Interne*, 2009 ; 30 (2): 190-191.
11. J. Vinit, **S. Audia**, C. Boichot, J.F. Couaillier, S. Berthier, B. Bonnotte, J.F. Besancenot, B. Lorcerie. Multiples hyperfixations sur une scintigraphie osseuse. *La Revue de Médecine Interne*, 2008 ; 29 (11): 922-923.
12. **S. Audia**, C. Duchêne, M. Samson, G. Muller, P. Bielefeld, F. Ricolfi, M. Giroud, J.F. Besancenot. Accident vasculaire cérébral ischémique de l'adulte jeune au cours de la maladie coéliqua: À propos de deux observations. *La Revue de Médecine Interne*, 2008 ; 29(3): 228-31.
13. M. Mahévas, **S. Audia**, V. De Lastours, M. Michel, B. Bonnotte, B. Godeau. Neutropenia in Felty's syndrome successfully treated with hydroxychloroquine. *Haematologica*, 2007; 92(7): e78-9.
14. **S. Audia**, L. Popitean, A. Camus, P. Pfitzenmeyer, J.M. Petit. An unusual complication of anticoagulation therapy in an elderly patient: Pituitary apoplexy with remission of acromegaly. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2006; 54(11): 1798-800.
15. **S. Audia**, B. Martha, M. Grappin, M. Duong, M. Buisson, J.-F. Couaillier, B. Lorcerie, P. Chavanet, H. Portier, L. Piroth. Les abcès pyogènes secondaires du psoas: à propos de six cas et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 2006 ; 27(11): 828-835.

## **Communications**



1. **S. Audia**, J. Guy, D. Lakomy, J. Fraszczak, V. Leguy, S. Berthier, T. Petrella, S. Aho-Glélé, L. Martin, M. Maynadié, B. Lorcerie, B. Bonnotte. Regulatory T lymphocytes in immune thrombocytopenia and effect of rituximab on blood and spleen B lymphocytes. 7ème congrès international d'auto-immunité, 2010.
2. V. Leguy-Seguin, **S. Audia**, H. Devilliers, M. Samson, F. Maurier, R. Jaussaud, H. Gil, J.L. Dupond, A.S. Dupond, B. Bonnotte, B. Lorcerie et le collège des internistes de l'Est France. Fasciite avec éosinophilie ou maladie de Shulman: apport de l'IRM, du Pet-scan et des nouvelles thérapeutiques dans le diagnostic et le traitement de cette affection. *La Revue de Médecine Interne*, 2009 ; 30(S4):363-364. Congrès SNFMI
3. **S. Audia**, V. Leguy, S. Berthier, B. Bonnotte and B. Lorcerie. Purpura thrombopénique immunologique: étude rétrospective descriptive de 40 patients et réponse aux traitements. *La Revue de Médecine Interne*, 2009 ; 30 (S2): 66. Congrès SNFMI.