



HAL
open science

Etude des populations lymphocytaires T au cours de l'anémie hémolytique auto immune

Marion Ciudad

► **To cite this version:**

Marion Ciudad. Etude des populations lymphocytaires T au cours de l'anémie hémolytique auto immune. Cancer. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK065 . tel-03947267

HAL Id: tel-03947267

<https://theses.hal.science/tel-03947267v1>

Submitted on 19 Jan 2023

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

PRÉPARÉE A L'INSERM RIGHT 1098

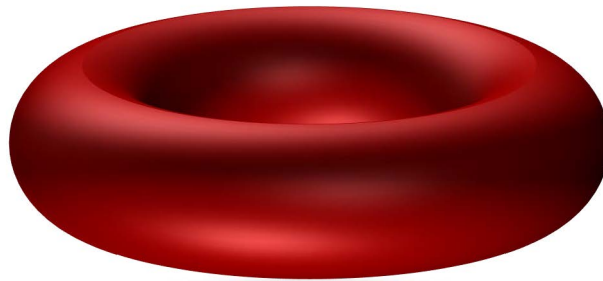
Ecole doctorale n°554, Environnement - santé

Doctorat d'Immunologie

Par

Marion CIUDAD

Équilibre des populations lymphocytaires T au cours de l'anémie hémolytique auto-immune



Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 29.11.2022

Composition du jury

Pr Bernard BONNOTTE	PUPH, Université de Bourgogne Franche-Comté	Président du jury
Pr Mikael EBBO	PUPH, Aix-Marseille Université	Rapporteur
Dr Frédéric GROS	MCU, Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr Marc MICHEL	PUPH, Université Paris-Est Créteil	Examineur
Pr Sylvain AUDIA	PUPH, Université de Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse

„ La science, mon garçon, est faite d’erreurs mais d’erreurs qu’il est bon
de commettre car elles mènent peu à peu à la vérité “

Jules Verne
Voyage au centre de la terre
1864

„ All models are wrong; some models are useful “

Georges Box
2005

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci au **Pr Mikael EBBO** et au **Dr Frédéric GROS** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce projet et merci au **Pr Marc MICHEL** et au **Pr Bernard BONNOTTE** d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens également à remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, **Pr Sylvain AUDIA**.

Sylvain, je te remercie sincèrement pour ton soutien sans faille, tes encouragements ainsi que pour la confiance et la liberté que tu m'as accordée durant la conduite de ce projet, et quel projet ! De la quête éternelle des étoiles de Man Whitney, aux vertigineuses data de RNAseq... c'était top !

Même si la période de rédaction a été quelque peu longue et éprouvante pour ma part, c'est un réel plaisir de travailler avec toi, notre binôme s'équilibre parfaitement. Par chance, le temps nous ayant manqué pour élucider tous les mystères des cytopénies auto-immunes, il nous reste pas mal de voies à explorer !

Je n'ai qu'une interrogation : est-ce que je pourrai continuer de t'appeler le vendredi soir ?

Un travail de thèse, c'est avant tout un travail collaboratif, tant au niveau scientifique que technique et relationnel. Il faut beaucoup de monde pour soutenir un doctorant et à vous tous qui m'avez aidé, je vous vous remercie.

A mon chef, mon très cher chef, Pr Bernard BONNOTTE. C'est un honneur et une chance pour moi de travailler dans votre équipe depuis toutes ces années. Je vous remercie de la confiance que vous me portez et je vous suis reconnaissante de m'avoir soutenue et permis de réaliser ce projet. Vous êtes aux commandes d'une très belle équipe de recherche, qui sait allier dynamisme, rigueur, intégrité et bonne humeur. Il fait bon vivre chez les Bonnotte, on en ferait des envieux... Merci pour tout.

A la BB team. Maxime, Claudie, Thibault, Sethi, Florine, André, Coraline, Hélène, Martin : la crème de la crème !!! C'est un grand plaisir de travailler avec chacun d'entre vous. Je vous ai beaucoup sollicité ces derniers mois, merci de votre gentillesse, de votre écoute, de votre compassion, de votre aide technique, morale, psychologique, orthographique... Martin, pour moi tu restes un Bonnotte, je crois que je fais un déni... Maxime, merci de ta confiance et de ton amitié. Depuis tout ce temps, j'affectionne toujours autant nos petites discussions d'entre 2 portes. Claudie, pour toi mes remerciements sont infinis. Ta gentillesse, ton investissement, ta bonne humeur, je suis très chanceuse d'être ton binôme ! J'ai une confiance absolue dans ton travail et sans toi cette thèse n'aurait pas été possible.

Baptiste, franchement tu mériterais d'être un Bonnotte, tu en as toutes les qualités... Je suis très heureuse de ton arrivée parmi nous. Merci de ton aide, de tes conseils toujours avisés et de ta bienveillance.

Une petite pensée particulière à mes amies de bureau et de doctorat, Coraline et Hélène. Je vous suis tellement reconnaissante d'avoir été doctorantes avec moi ! La solidarité des étudiants, plus qu'un concept, une nécessité ! On avait dit : petite thèse tranquille sans pression non ? Que s'est-il passé ? Courage, je crois que c'est la dernière ligne droite !

Aux voisins de la BB team. L'entraide, la bonne humeur et parfois on peut le dire, la folie règnent sur le 2ème étage du B3 et c'est bien grâce à vous les voisins ! Marine, Mathieu, Amandine, Tracy, Julie, Hervé, Fabienne, il est très plaisant de travailler à vos côtés, merci.

Merci Louise pour ton amitié, tes précieux conseils et tes chouettes attentions qui résonnent comme des slogans : never give up !

A mes collaborateurs. Un grand merci aux membres de la plateforme de cytométrie, Anabelle, Nico, Serges. Merci pour votre disponibilité et votre grande expertise en résolution de galères de multiplex notamment ! Merci Romain BOIDOT pour tes conseils et pour la réalisation du RNAseq, ton calme et ta confiance étaient très rassurants. Merci Yannis et Hervé pour votre précieux soutien pendant ma période d'analyse de RNAseq, je crois que sans vous j'aurais paniqué. Ok, j'ai un peu paniqué...

A l'UMR RIGHT 1098. Merci au Pr Philippe SASS, au Pr Olivier ADOTEVI, à l'équipe de direction, aux membres des équipes ATI et TIM-C. Malgré la distance, nos interactions sont toujours riches scientifiquement et très plaisantes.

Un grand merci à **tous les patients** pour leur altruisme et leur générosité.

A mes copines de labo. Ce qui n'est pas évident dans un labo, c'est que l'on fait de très belles rencontres mais après quelques années, les personnes partent. C'est inéluctable. Cindy, Leslie, Marine, Alexandrine, Malika, Nona, Catherine et bientôt Coraline...

Vous m'avez toutes soutenue, motivée, et aidée à en arriver là, c'est une certitude... et il est loin le temps où je disais : « moi, non je ne ferai pas de thèse, pour quoi faire ? »

C'est vrai au fait pour quoi faire ??

A ma famille, mes frères et belles sœurs, mes amis, les perchés. Ceci est une invitation : très prochainement, à Somberton, au 8 rue Ferdinand Mercusot, FIESTA !! Et c'est promis, vous ne me verrez plus accompagner de mon ordinateur...

A Clem, Pierre, Louis, Solène et Michi. C'est clairement vous qui m'avez le plus vu enfermé dans cette bulle, les we, les vacances... Vous êtes tellement importants pour moi. Merci de votre soutien, de votre écoute et d'avoir été là pour me changer les idées quand enfin le soir mon portable était éteint ! Merci de m'avoir alimenté en café, en kinder, en ratafia, en rhum... C'était précieux !

Maè ma puce, tu es si souvent avec moi, il est évident que toi aussi tu me soutiens.

A ma petite famille, Mathieu, Zoé & Salomé. Je vous adresse mes plus chers remerciements. Ça n'a pas dû être une partie de plaisir pour vous, particulièrement pour toi Mathieu... Pourtant, tout au long de ces quatre années, sans faille, vous m'avez soutenue, encouragée, endurée ! Merci de vos conseils organisationnels, de vos attentions réconfortantes, de vos séances de motivation mais surtout merci d'être là pour moi. Je mesure ma chance, vous me comblez de bonheur.

Après cette petite parenthèse rédactionnelle, on va enfin pouvoir reprendre ensemble les films de Noël, les vides greniers, les grasses matinées, les journées ménage, les cinés, les journées jardinage, les marchés, lire des bouquins sur les impressionnistes, les musées, les randos, le dos de Lieu noir, les docus sur les pharaons, les expos sur les pharaons, les musées sur les pharaons, les spectacles de cirque, la blanquette, les spectacles de danse, la raclette et bien sûr... les devoirs !!! Finalement, vous allez peut-être regretter le temps où je travaillais à la maison.

Je vous aime.

Etude des populations lymphocytaires T au cours de l'anémie hémolytique auto-immune

L'anémie hémolytique auto-immune à auto-anticorps chaud (AIHA) est une maladie auto-immune rare, acquise et à l'origine d'une destruction des GR par des auto-Ac ciblant certains Ag érythrocytaires membranaires (protéines Rhésus, protéine bande 3, glycophorine A). Le rôle des populations lymphocytaires T helper (Th) CD4+ dans la physiopathologie a été peu étudié et la plupart des résultats sont extrapolés de modèles murins. Bien que cela soit encore débattu, l'AIHA pourrait être associée à une polarisation pro-inflammatoire de type Th17 et à un déficit quantitatif en lymphocytes T régulateurs (Treg).

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la première étude concomitante des LT effecteurs et des Treg circulants, ainsi qu'une étude fonctionnelle et transcriptomique des Treg de patients atteints d'AHAI au diagnostic.

Nous avons observé une orientation des LT effecteurs vers une polarisation Th17 accompagnée d'une diminution des Treg circulants, principalement des Treg effecteurs. Ce déficit quantitatif est associé à une

diminution de la capacité des Treg à inhiber la prolifération des LT effecteurs, ce qui semble favoriser d'avantage la polarisation Th17.

Le déficit en Treg est associé à une diminution du niveau d'expression de la protéine Foxp3, le facteur de transcription dominant des Treg, qui assure la stabilité de leur phénotype et le maintien de leurs fonctions suppressives. Le profil transcriptomique des Treg des patients a révélé : |1. Un fort engagement des voies de signalisation du TNF dans les Treg, en accord avec une augmentation significative du TNF- α sérique chez les patients. |2. Un rôle possible de mécanismes post-traductionnels conduisant à la dégradation de Foxp3 à l'origine des dysfonctionnements des Treg.

A travers ce travail nous rapportons deux observations majeures pour la compréhension de la physiopathologie de l'AHAI, l'augmentation du TNF- α sérique chez les patients AHAI au diagnostic ainsi que le déficit quantitatif et fonctionnel des Treg circulants. Bien que les aspects mécanistiques ou les liens entre ces deux observations restent à préciser, elles nous permettent d'ores et déjà d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques pour les patients tels que le renforcement des populations Treg et/ou la neutralisation de la production du TNF- α .

AHAI, Treg, Th17, TNF- α

T cell lymphocytes in warm autoimmune hemolytic anemia

Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) is a rare acquired autoimmune disease mediated by antibodies targeting red blood cells. The involvement of CD4 T helper (Th) cells has been scarcely explored, with most findings extrapolated from animal models. Although it is still debated, wAIHA is thought to be associated with a pro-inflammatory Th17 polarization and a quantitative deficit of regulatory T cells (Treg).

In this work, we performed the first concomitant quantification of circulating effector T lymphocytes (Teff) and Treg, associated with functional and transcriptomic analyses of Treg in human wAIHA at diagnosis. We observed a shift towards a Th17 polarization of Teff and a decrease in circulating Treg, notably effector Treg. This quantitative deficit was associated with an impairment of Treg capability to inhibit Teff

proliferation and promoted the Th17 skewing. Treg deficiency was related to the diminished Foxp3 protein level, the master transcription factor maintaining phenotype stability and suppressive functions of Treg.

The transcriptomic profile of patients' Treg revealed: |1. A strong engagement of TNF signaling pathways in Treg, consistent with serum TNF- α increase in patients. |2. A possible role of post-translational mechanisms leading to Foxp3 downregulation accounting for Treg dysfunctions.

Through this work, we report two novel and major observations for the understanding of wAIHA pathophysiology: the increase of serum TNF- α in patients at diagnosis, and both a quantitative and functional deficit of circulating Treg. Although the mechanistic aspects and the links between these two observations remain to be clarified, they allow us to consider new therapeutic axes for patients such as Treg strengthening and/or the neutralization of TNF- α production.

wAIHA, Treg, Th17, TNF- α

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
RÉSUMÉ	4
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ANNEXES	11
ABRÉVIATIONS.....	12
Avant-propos	17
INTRODUCTION	19
1 L'anémie hémolytique auto-immune.....	20
1.1 Description clinique de l'AHAI	20
1.1.1 Définition et épidémiologie.....	20
1.1.2 Manifestations biologiques et cliniques de l'AHAI à auto-Ac chauds	20
1.1.3 Etiologies	21
1.1.4 Prise en charge thérapeutique de l'AHAI	24
1.2 Physiopathologie de l'AHAI à auto-Ac chauds	30
1.2.1 Modèles expérimentaux de l'AHAI	32
1.2.2 Mécanismes de destruction des globules rouges	35
1.2.3 Dysfonctionnement de la réponse innée	40
1.2.4 Altération de la réponse humorale	44
1.2.5 Dysfonctionnement de la réponse cellulaire	45
2 La tolérance des lymphocytes T.....	52
2.1 Tolérance centrale de la lignée T conventionnelle.....	52
2.2 Activation et polarisation des populations lymphocytaires T CD4⁺.....	56
2.2.1 La synapse immunologique : reconnaissance de l'Ag et activation des LT CD4 ⁺	56
2.2.2 Polarisation lymphocytaire	58
2.2.3 Différenciation des populations lymphocytaires T CD4 ⁺ mémoires	60
2.3 Tolérance périphérique.....	61
3 Les Treg.....	68
3.1 Caractérisation des Treg.....	68
3.1.1 Découverte des Treg	68
3.1.2 Foxp3, le régulateur dominant des Treg	69
3.1.3 Phénotype des Treg.....	74
3.2 Mécanismes fonctionnels des Treg.....	79
3.2.1 Les cytokines anti-inflammatoires	80
3.2.2 Répression des cellules présentatrices d'antigènes.....	82
3.2.3 Perturbation métabolique.....	84
3.2.4 Cytolyse directe.....	86
3.2.5 Autres mécanismes immunosuppresseurs	86
3.2.6 Rôle non régulateur des Treg.....	87
3.3 Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg :	
adaptabilité, plasticité et stabilité	87
3.3.1 Stabilité des Treg.....	88
3.3.2 Plasticité et instabilité des Treg	90
3.3.3 Cas controversés de OX40L et du TNF- α	92
4 Problématique	96

RÉSULTATS	99
1 L'AHAI & la réponse lymphocytaire T périphérique	100
1.1 Résumé de l'article	100
1.2 Article	101
2 Evaluation des populations Lymphocytaires T spléniques	144
2.1 La rate, anatomie et fonctions.....	144
2.2 Rationnel.....	147
2.3 Matériel et méthode.....	148
2.3.1 Cohorte de patients.....	148
2.3.2 Dissociation et conservation des prélèvements spléniques	149
2.3.3 Immunophénotypage.....	149
2.3.4 Analyses et statistiques.....	150
2.4 Résultats	151
2.4.1 Fréquence des lymphocytes T régulateurs spléniques	151
2.4.2 Polarisation lymphocytaire T et balance pro/anti-inflammatoire	152
2.4.3 Autres résultats	154
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	157
1. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire en périphérie	158
2. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire splénique	161
3. Atteinte fonctionnelle des Treg circulants.....	162
3.1. Profil transcriptomique des Treg.....	162
3.2. Impact du TNF- α sur les Treg	163
3.3. Régulation post traductionnelle de Foxp3	165
4. Provenance et incidence du TNF- α	166
5. Les thérapeutiques.....	167
5.1. Stratégies de renforcement des populations Treg.....	168
5.2. Neutralisation du TNF- α ou de sa signalisation.....	169
CONCLUSION.....	173
BIBLIOGRAPHIE.....	174
ANNEXES	204

LISTE DES FIGURES

Figure 01. Stratégie thérapeutique de l’AHAI à auto-Ac chauds primitive de l’adulte	page 26
Figure 02. Nouvelles stratégies thérapeutiques	page 28
Figure 03. Corrélation entre la positivité du TDA et l’AHAI	page 30
Figure 04. Physiopathologie générale de l’AHAI à auto-Ac chauds	page 31
Figure 05. Protéine de fusion HEL-OVA-Duffy (HOD)	page 35
Figure 06. Mécanismes d’hémolyse médiés par les auto-Ac	page 37
Figure 07. Différenciation thymique des précurseurs lymphocytaires	page 53
Figure 08. Dynamique du développement lymphocytaire thymiques	page 54
Figure 09. Sélection négative thymique	page 55
Figure 10. Synapse immunologique	page 57
Figure 11. Polarisaison lymphocytaire	page 58
Figure 12. Populations lymphocytaires mémoires	page 61
Figure 13. Structure et régulation du gène FOXP3	page 70
Figure 14. Structure de la protéine Foxp3	page 71
Figure 15. Régulation post-traductionnelle de Foxp3	page 72
Figure 16. Sous-populations de Treg circulants	page 77
Figure 17. Différenciation des lymphocytes Treg	page 78
Figure 18. Fonctions immunosuppressives des Treg	page 80
Figure 19. Synthèse et expression de TGF- β	page 81
Figure 20. Configuration du récepteur de l’IL-2	page 84
Figure 21. Mode d’action des ectonucléotidases CD39 et CD73	page 85
Figure 22. Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg	page 88
Figure 23. Dualité fonctionnelle de TNFR1 & TNFR2 dans les Treg	page 93
Figure 24. Structure macroscopique de la rate	page 144
Figure 25. Micro-anatomie de la pulpe blanche splénique humaine	page 145
Figure 26. Quantification des Treg spléniques	page 151
Figure 27. Evaluation de l’expression de Foxp3 et Foxp3 Δ 2 parmi les Treg spléniques	page 152
Figure 28. Evaluation de la polarisation des LT CD4+ spléniques et des rapports Treg/Th	page 153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01. Pathologies associées aux AHAI secondaires	page 22
Tableau 02. Médicaments associés aux AHIM	page 23
Tableau 03. Critères d'évaluation de la réponse aux thérapeutiques	page 24
Tableau 04. Modèles murins d'AHAI à auto-Ac chauds	page 33
Tableau 05. Autres populations aux propriétés suppressives	page 63
Tableau 06. Caractéristiques des sujets splénectomisés	page 148
Tableau 07. Réactifs utilisés pour l'immunophénotypage	page 149
Tableau 08. Inhibiteurs de TNF- α	page 170

LISTE DES ANNEXES

Autres articles publiés pendant la thèse

T-cell immune response predicts the risk of critical SARS-Cov2 infection in hospitalized COVID-19 patients. Samson M, Nicolas B, **Ciudad M**, Greigert H, Guilhem A, Cladiere C, Straub C, Blot M, Piroth L, Rogier T, Devilliers H, Manckoundia P, Ghesquiere T, Francois S, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. Eur J Intern Med. 2022 Jun 3:S0953-6205(22)00213-8. doi: 10.1016/j.ejim.2022.06.001. Online ahead of print. PMID: 35690570

Human Monocyte-Derived Suppressor Cell Supernatant Induces Immunoregulatory Effects and Mitigates xenoGvHD. Gérard C, Thébault M, Lamarthée B, Genet C, Cattin F, Brazdova A, Janikashvili N, Cladière C, **Ciudad M**, Ouandji S, Ghesquière T, Greigert H, Tinel C, Adotevi O, Saas P, Samson M, Audia S, Bonnotte B. Front Immunol. 2022 Mar 8;13:827712. doi: 10.3389/fimmu.2022.827712. eCollection 2022. PMID: 35345675

Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis. Samson M, Greigert H, **Ciudad M**, Gerard C, Ghesquière T, Trad M, Corbera-Bellalta M, Genet C, Ouandji S, Cladière C, Thebault M, Ly KH, Liozon E, Maurier F, Bienvenu B, Terrier B, Guillevin L, Charles P, Quipourt V, Devilliers H, Gabrielle PH, Creuzot-Garcher C, Tarris G, Martin L, Saas P, Audia S, Cid MC, Bonnotte B. Clin Transl Immunology. 2021 Sep 12;10(9):e1332. doi: 10.1002/cti2.1332. eCollection 2021. PMID: 34532040

Immune Thrombocytopenia: Recent Advances in Pathogenesis and Treatments. Audia S, Mahévas M, Nivet M, Ouandji S, **Ciudad M**, Bonnotte B. Hemasphere. 2021 Jun 1;5(6):e574. doi: 10.1097/HS9.0000000000000574. eCollection 2021 Jun. PMID: 34095758

Mucosal-associated invariant T cells in Giant Cell Arteritis. Ghesquière T, **Ciudad M**, Ramon A, Greigert H, Gerard C, Cladière C, Thébault M, Genet C, Devilliers H, Maurier F, Ornetti P, Quipourt V, Gabrielle PH, Creuzot-Garcher C, Tarris G, Martin L, Soudry-Faure A, Saas P, Audia S, Bonnotte B, Samson M. J Autoimmun. 2021 Jul;121:102652. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102652. Epub 2021 May 14. PMID: 34000675

Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect. Janikashvili N, Gérard C, Thébault M, Brazdova A, Boibessot C, Cladière C, **Ciudad M**, Greigert H, Ouandji S, Ghesquière T, Samson M, Audia S, Saas P, Bonnotte B. Oncoimmunology. 2021 Feb 19;10(1):1880046. doi: 10.1080/2162402X.2021.1880046. PMID: 33659098

Altered distribution and function of splenic innate lymphoid cells in adult chronic immune thrombocytopenia. Audia S, Moulinet T, **Ciudad-Bonté M**, Samson M, Facy O, Ortega-Deballon P, Saas P, Bonnotte B. J Autoimmun. 2018 Sep;93:139-144. doi: 10.1016/j.jaut.2018.07.015. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30055825

ABRÉVIATIONS

Ac : Anticorps

Ac : Acétylation

ACG : Artérite à Cellules Géantes

ADCC : *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADO : Adénosine

ADP : Adénosine Diphosphate

AF : *Alexa Fluor*

Ag : Antigène

AHAI : Anémie Hémolytique Auto-Immune

AHIM : Anémie Hémolytique Immunologique Médicamenteuse

AIRE : *Autoimmune Regulator*

Akt : Protéine Kinase B

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique

AP-1 : Activating Protein-1

APC : *Allophycocyanin*

AR : Acide rétinoïque

AREG : Amphiréguline

Arg-1 : Arginase 1

ATF1 : *Activating Transcription Factor 1*

ATP : Adénosine Triphosphate

AxR : *Adenosin x Receptor*

BAFF : B-cell activating factor

BACH2 : *BTB Domain And CNC Homolog 2*

Bcl-6 : B-cell Lymphoma-6

BCR : *B-cell Receptor*

Breg : Lymphocyte B régulateur

BV : Brilliant Violet

CAR : Chimeric Antigen Receptor

CASP : Cysteine-Aspartate Proteases, Caspase Gene

CBF β : Core Binding Factor Subunit β

CCN3 : Cellular Communication Network Factor 3

CCR : *C-C Chemokine Receptor*, Récepteur de Chémokine CC

cDC : Conventional Dendritic Cell

CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément

CDK2 : Kinase Cycline-Dépendante 2

CG : Centre Germinatif

CH2 : *Constant domain of the Heavy Chain*, domaine constant de la chaîne lourde

clAP : *Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1*

c-Kit : Tyrosine-Protein Kinase Kit

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CNS : *Conserved Non-Coding Sequences*, Séquence Non Codante

CoA : Coenzyme A

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CR1 : Complement Receptor 1, Récepteur du Complément 1

Cre : *Cre Recombinase*

CREB : *C-AMP Response Element-Binding protein*

CRTh2 : *Chemoattractant Receptor-Homologous Molecule Expressed on T-Helper type 2 Cells*, récepteur de la prostaglandine D2

cTEC : *Cortical Thymic Epithelial Cells*, cellules épithéliales thymiques de la zone corticale

CTLA-4 : *Cytotoxique-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein*

Cx : *Complement x Fragment*, fragment du complément

CXCL : *C-X-C Motif Chemokine*, Chémokine à motif CXC

CXCR : *C-X-C Motif Chemokine Receptor*, Récepteur de Chémokine CXC

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DBC1 : *Deleted in Breast Cancer 1*

DC : *Dendritic Cell*, Cellule Dendritique

DIB : Double In Vivo Biotinylation

DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable

DIP : Déficit Immunitaire Primaire

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DN : Cellules Doubles Négatives

DNMT1 : DNA Méthyltransférase 1

DP : Cellules Doubles Positives

EA2 : Endophilin A2

EBI3 : Epstein-Barr Virus Induced 3

EBV : Epstein-Barr Virus

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPO : Erythropoïétine
ETP : Early Thymic Progenitor
eTreg : Treg effecteur
EZH2 : *Enhancer of Zeste Homolog 2*

FADD : Fas-Associated Protein with Death

Domain

FAO : *Fatty Acid Oxidation*

FasL : Ligand de Fas

FcRn : *Neonatal Fc Receptor*, récepteur néonatal du fragment cristallisable

FcγR : *Fcγ Receptor*, Récepteur du Fragment Cristallisable des IgG

FDC : *Follicular Dendritic Cells*, Cellule Dendritique Folliculaire

FEZF2 : *FEZ Family Zinc Finger 2*

Foxo : Forkhead Box Class O

Foxp3 : Forkhead/Winged-Helix box protein 3

Foxp3Δ2 : Foxp3 dépourvue de l'exon 2

Fr : Fraction

G/dL : Gramme par Décilitre

G/L : Gramme par Litre

GARP : *Glycoprotein A Repetitions Predominant*

GATA3 : GATA binding protein 3

GITR : *Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*

GP : Glycoprotéine

GR : Globules Rouges

GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*

GvHD : *Graft-Versus-Host Disease*, maladie du greffon contre hôte

HAT : *Histone Acétyltransférase*

Hb : hémoglobine

HDAC : Histone Deacetylase

HEL : *Hen Egg Lysozyme*, lysozyme d'œuf de poule

HIF-1 : *Hypoxia-Inducible Factor-1*

HL : *Heavy and Light*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

HOD : HEL-Ova-Duffy

ICOS : Inductible T cell COStimulator

ID-2 : Inhibitor Of DNA Binding 2

IDO : Indoléamine 2,3 dioxygénase

IFN-γ : Interféron γ

Ig : Immunoglobuline

IKZF2 : *IKAROS Family Zinc Finger 2*, gène de Helios

IKZF4 : *IKAROS Family Zinc Finger 4*, gène de Eos

IL : Interleukine

ILC : *Innate lymphoid cells*, Cellules Lymphoïdes Innées

IL-xR : *Interleukin x Receptor*, Récepteur de l'Interleukine x

IPEX : Syndrome de dysrégulation Immunitaire avec, olynodocrinopathie, Entéropathie, lié à l'X

IRF_x : *Interferon Regulatory Factor x*

iT_{R35} : *IL-35 Induced Regulatory T Cell Population*

iTreg : *Induced Regulatory T Cell*, Lymphocyte T Régulateur Induit

Jak : Janus Kinase

KAT : Lysine Acétyltransférases

KDAC : Lysine Désacétylases

KEL : *Kell Metallo-Endopeptidase, Kell Blood Group*

KLF2 : *Kruppel-Like Factor 2*

KO : *Knock-out*

LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3

LAP : *Latency-Associated Peptide*

LB : Lymphocyte B

LDH : Lactate Déshydrogénase

LDV : Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus

LGL : *Large Granular Lymphocytes*

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LT-α : Lymphotoxine-α

MAF : Maladie Chronique des Agglutinines Froides

MAI : Maladies Auto-immunes

MALT : *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MBD2 : *Methyl-CpG-binding domain protein 2*

MFI : Median Fluorescence Intensity

MHV : Mouse Hepatitis Virus

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
miR, miRNA : Micro-RNA
MLL4 : *Mixed-Lineage Leukemia 4*
MPEC : Memory Precursor Effector Cells
MPP : Multipotent Progenitors
Mst-1 : Mammalian Sterile 20-Like Kinase
mTEC : Medullary *Thymic Epithelial Cells*, cellules épithéliales thymiques de la zone médullaire
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

NET : Neutrophil Extracellular Traps
NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells*
NFκB : *Nuclear Factor-Kappa B*
NK : *Natural Killer*
NLK : Nemo-Like Kinase
NOD : Non-Obèse Diabétique
Nrp-1 : Neuropiline 1
nTreg : *Naive Regulatory T Cell*, Lymphocyte T Régulateur naïf
NZB : New Zealand Black
NZB/W : New Zealand Black/White

OL2 : Organes Lymphoïdes Secondaires
OVA : Ovalbumine
OX40L : OX40 ligand

P : Phosphorylation
P300 : E1A Binding Protein P300
PALS : *PeriArteriolar Lymphoid Sheaths*, manchons lymphoïdes périartériolaires
PB : Pacific Blue
PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*, cellules mononuclées du sang périphérique
PD-1 : *Programmed Cell Death Protein 1*
PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
pDC : Plasmacytoid Dendritic Cell
PE : Phycoerythrin
Pi3K : Phosphoinositide 3-Kinase
Pim-1 : Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
Pim-2 : Pim-2 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
PKA : Protéine kinase A
PMA : Phorbol-12-Myristate-23-Acétate
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
Poly I:C : Acide Polyinosinique-Polycytidylique
PP1 : Protéine Phosphatase 1

PPAR-γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
pTα : Pseudo-chaine α du TCR
PTI : Thrombopénie Immunologique, purpura thrombopénique immunologique

RAG : Recombination-Activating Gene
Rh : Rhésus
RORC : *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor C*
ROR-γt : *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γt*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
rTreg : Resting Treg
RTX : Rituximab
RSS : Recombination Signal Sequences
RunX1 : *Runt-Related Transcription Factor 1*

S1PR1 : *Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1*, Récepteur de la Sphingosine 1 Phosphate
SEP : Sclérose en Plaques
SIRP-α : Signal Inhibitory Regulatory Protein α
SIRT1 : Sirtuin 1
SLAI : Syndrome Lymphoprolifératif Auto-Immune
SLEC : *Short-Lived Effector Cells*, cellules effectrices de courte durée de vie
SMAD3 : Mothers Against DPP Homolog 3
SOCS1 : *Suppressor of Cytokine Signaling Protein 1*
SOD : Superoxyde Dismutase
SP : Single Positive
Stab-1 : *Stabilin 1*
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
Stub-1 : *STIP1 Homology and U-Box Containing Protein 1*
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SYK : Spleen Tyrosine Kinase

TACE : TNF-α Converting Enzyme
TAZ : Tafazzin
T-bet : T-box transcription factor
TβR : Récepteur de TGF-β
TCM : LT Centraux Mémoires
TCR : *T Cell Receptor*
TDA : Test Direct à l'Antiglobuline
TEM : LT Effecteurs Mémoires

TEMRA : LT Effecteurs Mémoires CD45RA⁺
TET1 : *Ten-Eleven Translocation Demethylases 1*
TFH : *T Follicular Helper*, LT folliculaires
auxiliaires
TFR : *T Follicular Regulatory*, LT folliculaires
régulateurs
TGFB1 : *Transforming Growth Factor Beta 1*
gene
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th : *T Helper Lymphocyte*, lymphocyte T
auxiliaire
TIM-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin*
containing protein-3
TIP60 : Protein Interactive Tat 60 kDa
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFRSF : Tumor Necrosis Factor Receptor
Super Family
TRADD : *Tumor Necrosis Factor Receptor Type*
1-Associated DEATH Domain Protein
TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*
TRAIL-DR5 : *TNF-Related Apoptosis-Inducing*
Ligand - Death Receptor 5
Treg : Lymphocyte T régulateur
tTreg : *Thymique Regulatory T Cell*, Treg
Thymique

TSP-1 : Thrombospondine-1

U_b : Ubiquitination

USP7 : Ubiquitin Specific-Processing Protease 7

V_E : Vésicules Extracellulaires

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

W_T : *Wild Type*, sauvage

wAIHA : *Warm Autoimmune Hemolytic*
Anemia

Y_{FP} : Yellow Fluorescent Protein

Z_{ip} : Leucine zipper

ZnF : Zinc Finger

4-1BB : Récepteur de Costimulation
Inductible TNFR9

Avant-propos

Les maladies auto-immunes (MAI) affectent 5 à 8 % de la population mondiale et leur prévalence est en constante progression au cours de ces dernières décennies. Elles représentent la troisième cause de morbidité dans les pays industrialisés et 8 cas sur 10 concernent des femmes (Gleicher and Barad 2007; Quintero et al. 2012). On ressent actuellement près de 80 MAI et même s'il existe de très rares MAI monogéniques tel que l'IPEX (Syndrome de dysrégulation Immunitaire avec Polyendocrinopathie, Entéropathie, liée à l'X) ou les syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (SLAI), la plupart présentent un caractère multifactoriel rendant très difficile l'identification de leur origine.

De nombreuses susceptibilités génétiques sont incriminées dans le développement des MAI, c'est notamment le cas des polymorphismes des gènes *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*), ou *IRF5* (*Interferon Regulatory Factor 5*) qui ont été identifiés au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), du diabète de type 1, du lupus systémique ou de la sclérodermie systémique. Il est par ailleurs admis que l'influence de facteurs endogènes tels que les hormones féminines, le microbiote intestinal ou l'inflammation chronique, soit un paramètre majeur dans l'initiation et l'entretien des réponses auto-immunes. Il en est de même pour les facteurs exogènes et environnementaux (infections virales, tabagisme, stress, prises médicamenteuses...) même s'il est encore difficile de déterminer s'ils déclenchent le processus auto-immun ou s'ils favorisent sa survenue chez des patients initialement prédisposés (Vatanen et al. 2016; Björk, Mofors, and Wahren-Herlenius 2020; Vojdani and Vojdani 2021; Quintero et al. 2012).

Malgré l'absence de traitements étiologiques, la compréhension des mécanismes de tolérance, la caractérisation de la réponse auto-immune et le développement des biothérapies ont permis de réaliser de considérables progrès dans la prise en charge des MAI, ce qui se traduit directement sur l'amélioration de la qualité de vie et l'allongement de l'espérance de vie des patients. Chaque MAI répond à une stratégie thérapeutique déterminée, dans l'optique de contrôler l'activité de la maladie et de limiter les lésions des organes cibles. Pour autant, le contrôle des rechutes et des complications sous traitement, notamment infectieuses, reste un défi dans ces pathologies d'évolution chronique fréquente et pour lesquelles les patients multiréfractaires peuvent être confrontés à une impasse thérapeutique.

Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'identification des effecteurs cellulaires et des molécules médiatrices de l'auto-immunité est au centre des projets de recherche translationnels, avec pour objectif ultime le développement de thérapeutiques permettant de neutraliser le processus auto-immun sans altérer la réponse immunitaire physiologique.

INTRODUCTION

1

L'anémie hémolytique auto-immune

1.1 Description clinique de l'AHAI	page 20
1.1.1 Définition et épidémiologie	page 20
1.1.2 Manifestations biologiques et cliniques	page 20
1.1.3 Etiologies	page 21
1.1.4 Prise en charge thérapeutique de l'AHAI	page 24
1.2 Physiopathologie de l'AHAI à auto-Ac chauds	page 30
1.2.1 Modèles expérimentaux de l'AHAI	page 32
1.2.2 Mécanismes de destruction des globules rouges	page 35
1.2.3 Dysfonctionnement de la réponse innée	page 40
1.2.4 Altération de la réponse humorale	page 44
1.2.5 Dysfonctionnement de la réponse cellulaire	page 45

1 L'anémie hémolytique auto-immune

1.1 Description clinique de l'AHAI

1.1.1 Définition et épidémiologie

L'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) est une cytopénie auto-immune qui se caractérise par la diminution de la durée de vie des globules rouges (GR) du fait d'auto-anticorps (Ac) dirigés contre les protéines membranaires érythrocytaires qui conduisent à une hémolyse intravasculaire ou intratissulaire (Brodsky 2019).

L'AHAI est une maladie hétérogène, rare et acquise dont l'incidence moyenne est estimée à 1,77/100 000 habitants/ans au Danemark (Hansen et al. 2020). Elle survient à tout âge, avec une augmentation de l'incidence chez l'adulte et la personne âgée. Il existe une discrète prédominance féminine (1,27 femmes pour 1 homme) (Hansen et al. 2020). L'AHAI évolue vers la chronicité chez environ 70 % des patients et elle peut engager le pronostic vital avec une mortalité estimée entre 8 et 15 % selon les études (Barcellini et al. 2014; Roumier et al. 2014).

La classification des AHAI repose principalement sur la température optimale à laquelle les auto-Ac se lient aux globules rouges et sur l'activation du complément. On distingue ainsi l'AHAI à auto-Ac chaud et les AHAI liées aux agglutinines froides qui comportent la maladie chronique des agglutinines froides (MAF) et l'hémoglobinurie paroxystique a frigore. Dans de rares cas, l'AHAI est dite « mixte » en présence à la fois d'auto-Ac chauds et d'agglutinines froides (Michalak et al. 2020).

L'AHAI à auto-Ac chauds est la forme la plus répandue des AHAI et représente plus de 2/3 des cas (Michalak et al. 2020). Les objectifs de ce travail portant exclusivement sur l'étude de la physiopathologie de l'AHAI à auto-Ac chauds, la suite de cette introduction se concentrera sur sa description.

1.1.2 Manifestations biologiques et cliniques de l'AHAI à auto-Ac chauds

En 2020, un consensus international proposait pour la première fois une harmonisation des recommandations relatives au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'AHAI (Jäger et al. 2020).

Sur le plan biologique, l'anémie est caractérisée par un taux d'hémoglobine (Hb) sanguin inférieur à 10 g/dL. Il s'agit d'une anémie normochrome, régénérative avec un taux de réticulocytes généralement supérieur à 120 G/L. L'examen des GR sur le frottis sanguin montre une polychromatophilie, une anisocytose érythrocytaire et une poïkilocytose. La présence de sphérocytes s'observe dans 30 à 40 % des AHAI.

L'hémolyse est confirmée par la diminution du taux d'haptoglobine, l'augmentation de la bilirubine libre plasmatique et l'augmentation du taux de lactate déshydrogénase (LDH).

La confirmation du caractère auto-immun repose sur la détection des auto-Ac +/- de la fraction C3d du complément à la surface des globules rouges par le test direct à l'antiglobuline (TDA ou test de Coombs direct). Au cours de l'AHAI à auto-Ac chauds, les auto-Ac sont de type IgG1 (Immunoglobuline G1) ou IgG3, plus rarement de type IgM, ou IgA (Jäger et al. 2020; Chadebech et al. 2018) et ils sont

dirigés, par ordre de fréquence, contre les protéines Rhésus (Rh), la protéine bande 3 ou la glycophorine A (Leddy et al. 1993).

Le TDA peut être faussement négatif lorsque le taux d'auto-Ac est inférieur au seuil de sensibilité du test, lorsque les auto-Ac sont de faible affinité ou en raison de la nature de l'isotype lorsqu'il s'agit d'IgA ou d'IgM et qu'une recherche spécifique n'est pas réalisée. C'est le cas pour près de 10 % des patients, l'établissement du caractère auto-immun repose alors sur l'exclusion des diagnostics différentiels et l'évolution sous traitement (Jäger et al. 2020).

D'apparition brutale ou progressive, la symptomatologie de l'AHAI est variable selon les patients. Le syndrome anémique (asthénie, dyspnée, palpitations/tachycardie, pâleur généralisée) est d'intensité variable en fonction de la profondeur de l'anémie et peut s'associer à des signes d'hémolyse (ictère cutané et/ou conjonctival, hémoglobinurie, fébricule, douleurs lombaires, splénomégalie modérée).

La présentation clinique de l'AHAI dépend du type d'hémolyse (intravasculaire ou intratissulaire), les patients présentant une hémolyse intravasculaire aiguë ayant des tableaux cliniques plus sévères (MICHEL 2017).

L'AHAI est dite sévère ou profonde lorsque l'hémoglobine est inférieure à 8 g/dL ou 5 g/dL respectivement, mais la distinction de phases de la maladie telles qu'aiguë ou chronique n'est pas de mise car aucun critères cliniques ou biologiques ne permettent cette catégorisation (Jäger et al. 2020).

Le pronostic vital peut être engagé lorsque l'anémie est profonde ou d'installation brutale. De façon générale, le pronostic global des AHAI est en partie conditionné par la sévérité de la maladie sous-jacente dans le cas des AHAI secondaires, par les comorbidités, l'âge, la sévérité de l'hémolyse mais également les traitements entrepris (MICHEL 2017; Brodsky 2019; Audia et al. 2018; Barcellini et al. 2014). La gravité clinique est également liée aux complications qui surviennent chez 10 à 30 % des patients selon les séries. Les événements thrombotiques veineux de type embolie pulmonaire ou thrombose veineuse profonde, l'insuffisance rénale aiguë et les risques d'infections sont les complications les plus fréquemment rencontrées ((Brodsky 2019; Audia et al. 2018).

1.1.3 Etiologies

Pour près de 35 % des patients, l'AHAI n'est associée à aucune autre pathologie, elle est dite primitive. A contrario, elle est pour 65 % des cas associée ou secondaire à une autre affection non fortuite dont le diagnostic peut être antérieur, concomitant, ou se déclarer plusieurs mois à plusieurs années après la découverte de l'AHAI (Roumier et al. 2014)(**Tableau 01**. Pathologies associées aux AHAI secondaires).

L'AHAI est fréquemment associée à une autre maladie auto-immune, elle est notamment associée à un lupus systémique dans 1 à 10 % des cas selon les séries, le plus souvent chez la jeune femme adulte (MICHEL 2017; Kokori et al. 2000). Le syndrome de Evans qualifie la survenue simultanée ou séquentielle d'une AHAI et d'une thrombopénie immunologique (PTI) parfois associée à une neutropénie auto-immune (NAI) (Evans et al. 1951; Audia et al. 2020). Son diagnostic, en particulier

chez l'enfant ou le jeune adulte, peut être révélateur d'un déficit immunitaire primitif humoral (DIP), déficit immunitaire commun variable (DICV) ou syndrome lymphoprolifératif auto-immun (SLAI) notamment (Miano 2016). A contrario, chez l'adulte de plus de 60 ans, l'AHAI est fréquemment associée à une hémopathie lymphoïde de bas grade (Barcellini, Fattizzo, and Cortelezzi 2018).

Hémopathies lymphoïdes et autres désordres hématologiques
Leucémie lymphoïde chronique - Lymphome de Hodgkin - Lymphomes malins non Hodgkinien de type B (lymphome de la zone marginale) - Leucémie aigüe lymphoblastique B - Leucémie chronique à LGL - Lymphome angio-immunoblastique - Myélodysplasies - Myélofibrose - Cytopénies auto-immunes
Autres tumeurs
Thymome - Maladie de Castleman - Histiocytose sinusale de Rosai Dorfman - Kyste dermoïde de l'ovaire - Carcinomes
Maladies auto-immunes ou inflammatoires
Lupus systémique - Syndrome primaire des antiphospholipides - Polyarthrite rhumatoïde, Syndrome de Gougerot-Sjögren - Rectocolite hémorragique, maladie de Crohn - Hépatite auto-immune - Sarcoïdose - Fasciite de Shulman
Maladies infectieuses :
Mononucléose infectieuse (EBV) - Infection chronique par le VHC, VIH - CMV, Parvovirus B19 - Tuberculose - Brucellose - Syphilis
Déficits immunitaires primitifs
Déficit immunitaire commun variable
Autres associations :
Post-allogreffe de moelle, syndrome de Di George

Tableau 01. Pathologies associées aux AHAI secondaires

Adapté de Jager 2020 - CMV : Cytomégalovirus, EBV : *Epstein-Barr Virus*, LGL : *Large Granular Lymphocytes*, VHC : Virus de l'Hépatite C, VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Les infections pourraient également être en lien avec l'induction et la progression de l'AHAI. L'hypothèse d'une présentation d'Ag (Antigène) cryptiques de la protéine Rh, par les macrophages et conduisant à une activation de clones lymphocytaires T autoréactifs a été proposée au cours de l'AHAI (Barker and Elson 1994).

Les causes génétiques des AHAI ont été explorées mais la plupart des altérations ont été décrites au cours de la MAF primitive ou secondaire à une hémopathie lymphoïde (Michaux et al. 1995; Małecka et al. 2018; Ferrer et al. 2013; Michalak et al. 2020). Très peu de données sont disponibles

concernant les AHAI à auto-Ac chauds chez l'homme. La présence des polymorphismes du TNF- α (*Tumor Necrosis Factors α*), de l'IL-10 (Interleukine 10), de l'IL-12 et de CTLA-4 (*Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein*) ont été étudiés mais aucun ne semble associé à l'émergence ou l'évolution de l'AHAI (D'Abronzio et al. 2012). Seul une augmentation significative du phénotype +235 A/G de la lymphotoxine- α (LT- α , ou TNF- β) a été mise en évidence, suggérant son éventuelle implication. Par ailleurs, les patients atteints de SLAI, lié à une mutation germinale de *FAS*, *FASL* (Ligand de Fas), ou de la *CASP10* (*Caspase, Cysteine-Aspartate Proteases*), présentent des anomalies de l'apoptose lymphocytaire, ce qui leur confère un risque accru de développer une MAI tel qu'une AHAI à auto-Ac chauds (Seidel 2014).

La survenue de l'AHAI peut être liée à une prise médicamenteuse, elle est alors qualifiée d'anémie hémolytique immunologique médicamenteuse (AHIM). Bien qu'il s'agisse d'évènements rares, près de 130 médicaments ont été identifiés au cours d'AHIM et les classes thérapeutiques les plus souvent incriminés sont les antibiotiques, les AINS, et plus récemment les thérapies anti-cancéreuses avec notamment les inhibiteurs de check points (Jäger et al. 2020; MICHEL 2017) (**Tableau 02**. Médicaments associés aux AHIM).

Dans la plupart des cas, le mécanisme impliqué est de type immuno-allergique, c'est-à-dire que l'hémolyse est conditionnée par la présence du médicament dans l'organisme (Garratty 2012). L'Ag impliqué peut alors être de plusieurs nature :

- Un haptène, l'hémolyse est due à la fixation d'Ac anti-médicaments qui ciblent un haptène du médicament lui-même lié aux globules rouges du patient.
- Un complexe immun, les Ac ciblent un épitope immunogène « mixte », révélé par la fixation du médicament à la membrane des GR par une liaison non covalente.

Mécanisme immuno-allergique : haptène
Pénicillines, céphalosporines, tétracycline, hydrocortisone, oxaliplatine...
Mécanisme immuno-allergique : complexe immun
Metformine, quinine, céphalosporines, thiopental, tolmétine, céphalosporines, diclofenac...
Mécanisme auto-immun
Céphalosporines, tolmétine, L-dopa, acide méfénamique, téniposide, pentostatine, cladribine, fludarabine, diclofénac...
Mécanisme inconnu
Mésantoïne, insecticides, chlorpromazine, acétaminophène, ibuprofène, carboplatine, streptomycine...

Tableau 02. Médicaments associés aux AHIM

Adapté de Jager 2020

De façon plus marginale, l'hémolyse peut être d'origine auto-immune. La prise médicamenteuse déclenche dans ce cas la production d'auto-Ac ciblant directement les GR et dont l'activité perdure même après l'élimination du médicament dans l'organisme. Les phénomènes conduisant à la production d'auto-Ac à la suite d'une prise médicamenteuse ne sont pas encore pleinement élucidés (Garratty 2012).

Qu'elle soit primitive ou secondaire à un déficit immunitaire, à une hémopathie lymphoïde, à une autre maladie auto-immune, ou à une prise médicamenteuse, la rupture de la tolérance un évènement essentiel au déclenchement de l'AHAI (Michalak et al. 2020).

1.1.4 Prise en charge thérapeutique de l'AHAI

La gravité des symptômes, la présence de maladies sous-jacentes et les comorbidités coexistantes sont les trois principaux critères qui conditionnent la stratégie thérapeutique.

L'objectif du traitement de l'AHAI est de parvenir à une rémission prolongée avec un maintien du taux d'hémoglobine proche de la normale afin de restreindre les conséquences fonctionnelles, limiter les risques de complications et de préserver une qualité de vie satisfaisante pour le patient. L'appréciation de la réponse du patient au traitement est déterminée en fonction de l'évolution du taux d'Hb plasmatique à distance d'une transfusion (>7 jours) et à sa stabilité dans le temps (**Tableau 03. Critères d'évaluation de la réponse aux thérapeutiques**).

Réponse	Critères d'évaluations
Réponse partielle (RP)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb ≥ 10 g/dL ▪ Gain ≥ 2 g/dL (rapport aux taux avant traitement)
Réponse complète (RC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb ≥ 11 g/dL chez la femme ▪ Hb ≥ 12 g/dL chez l'homme
Non réponse (NR)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb < 10 g/dL ▪ ou ≥ 10 g/dL avec gain < 2 g/dL après délai d'action du médicament (corticoïdes : 2 semaines, rituximab : 2 mois...)
Rémission partielle	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb > 10 g/dL ▪ Gain ≥ 2 g/dL ▪ Signes d'hémolyse persistante en absence traitement excepté corticothérapie < 10mg équivalent prednisone/j ou immunosuppresseur à dose stable.
Rémission complète	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb ≥ 11 g/dL chez la femme ▪ Hb ≥ 12 g/dL chez l'homme ▪ Normalisation des paramètres d'hémolyse, en l'absence de tout traitement à 2 reprises à au moins 4 semaines d'intervalle.

Tableau 03. Critères d'évaluation de la réponse aux thérapeutiques au cours de l'AHAI
Adapté du PNDS 2017 - Hb : hémoglobine.

1.1.4.1 Traitement d'urgence de l'AHAI

En phase initiale, dans le cas de rechute ou de mauvaise tolérance clinique, il est souvent nécessaire de recourir à des thérapies symptomatiques d'urgence au cours de l'AHAI. Ces traitements transitoires permettent de surmonter un épisode d'hémolyse aiguë (Hb inférieure à 5 g/dL). Ils réduisent l'incidence des décès mais n'apportent pas de bénéfices sur l'évolution de l'AHAI au long cours (Jäger et al. 2020; Brodsky 2019).

Le recours à la transfusion est très fréquent et l'utilisation d'agents stimulant l'érythropoïèse peut s'avérer utile dans le cas où le patient est dépendant des transfusions avec un taux de réticulocytes inadapté à la profondeur de l'anémie (Salama et al. 2014)(Fattizzo et al. 2021). De façon exceptionnelle, il peut être envisagé le recours aux échanges plasmatiques qui consistent à soustraire les auto-Ac et les protéines du complément circulants en remplaçant quotidiennement le plasma du patient par de l'albumine humaine.

Depuis quelques années, les inhibiteurs de complément (Eculizumab ou Pegcetacoplan) sont considérés comme une option thérapeutique d'urgence dans l'AHAI réfractaire menaçant le pronostic vital, lorsque le TDA est positif pour les IgG et les C3d (Gauchy et al. 2020; Ma and Caplan 2016; Berentsen et al. 2019).

Bien que ces traitements ne permettent pas d'améliorer le rendement transfusionnel, ils peuvent apporter un bénéfice aux cas sévères sans réponse aux traitements par corticostéroïdes (García-García et al. 2020).

1.1.4.2 Traitement de l'AHAI primitive

Le traitement initial de l'AHAI repose sur la corticothérapie et elle permet une réponse complète mais transitoire pour environ 80 % des patients (Jäger et al. 2020; Roumier et al. 2014). Néanmoins, seuls 30 % des patients obtiennent une rémission complète à 12 mois et dans environ 60 % des cas, les patients développent une AHAH corticodépendante et les glucocorticoïdes ne peuvent être arrêtés sans rechute (Birgens et al. 2013; Roumier et al. 2014; Barcellini et al. 2014; Michel et al. 2017)(**Figure 01**. Stratégie thérapeutique de l'AHAI à auto-Ac chauds primitive de l'adulte).

Les glucocorticoïdes répriment de nombreux gènes codant pour des protéines inflammatoires dans l'ensemble des cellules immunitaires, pour autant aucune étude n'a rapporté leur impact précis sur les différents mécanismes physiopathologiques de l'AHAI.

De façon intéressante, l'administration conjointe de glucocorticoïdes et de rituximab (RTX) peut également être proposée en première ligne de traitement et cette association permet d'obtenir une rémission complète pour environ 70 % des patients après 12 mois de suivi (Michel et al. 2017; Birgens et al. 2013).

Pour les patients dont la corticothérapie n'apporte aucun bénéfice en 3 semaines et qui nécessitent un support transfusionnel (patients non répondeurs), dans le cas d'une rechute précoce ou en cas de corticodépendance, une seconde ligne thérapeutique est proposée.

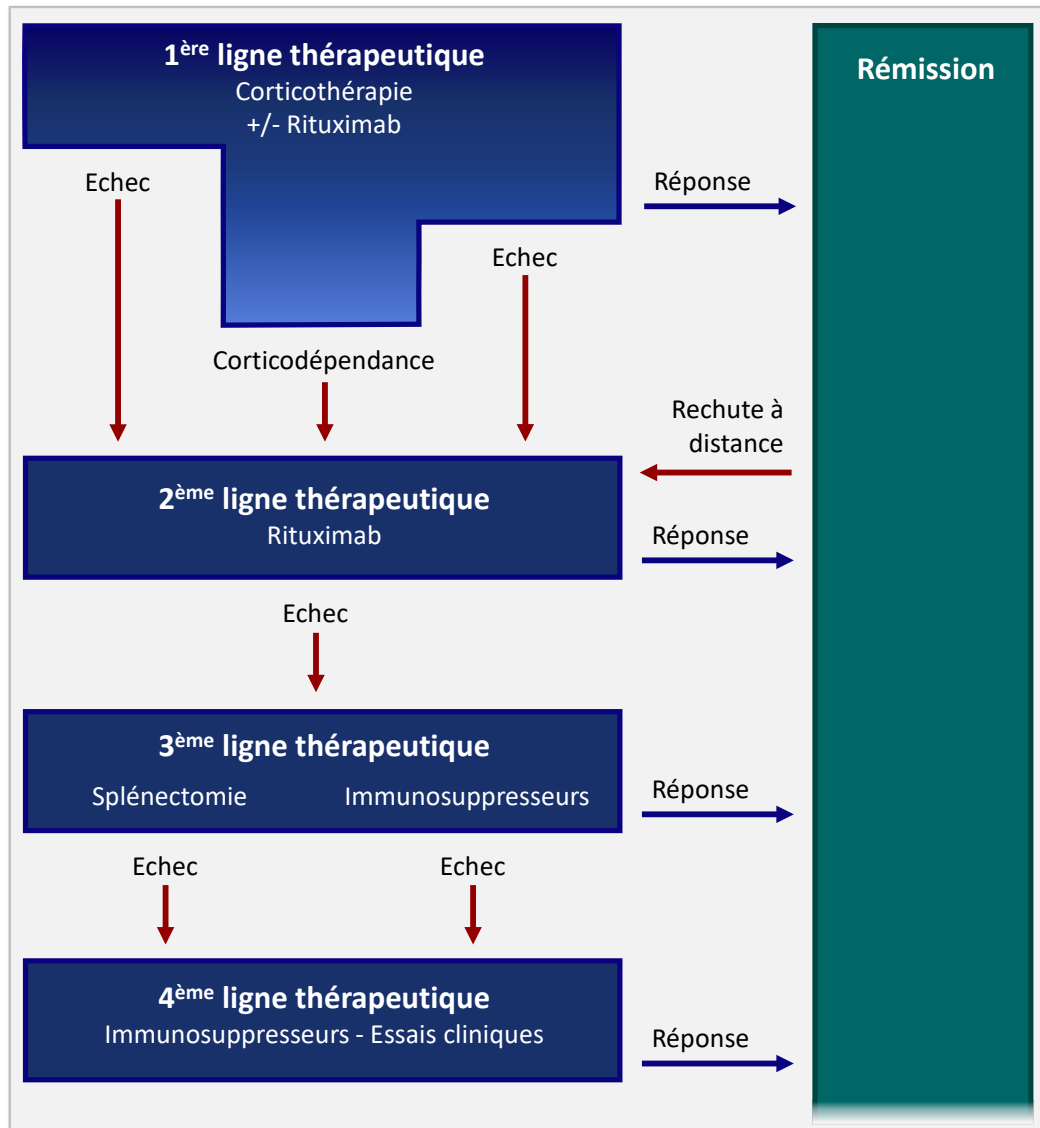


Figure 01. Stratégie thérapeutique de l'AHAI à auto-Ac chauds primitive de l'adulte
Adaptée de Jager 2020.

Historiquement, la splénectomie était indiquée en seconde intention mais en raison du risque infectieux et thrombotique auquel l'asplénie expose, et des résultats des essais prospectifs sur le rituximab, celui-ci est désormais préféré et apporte un meilleur rapport bénéfice/risque pour le patient (Reynaud et al. 2015; Bussone et al. 2009; Roumier et al. 2014). Pour près de 80 % des patients, le rituximab permet une réponse complète en 3 à 6 semaines qui persiste à 5 ans pour 3 patients sur 5 (Maung et al. 2013; Barcellini et al. 2013; Michel et al. 2017; Fattizzo et al. 2018).

Le RTX est un anticorps chimérique monoclonal anti-CD20, qui cible les lymphocytes B (LB) du stade pré-B au stade B mature, conduisant à leur destruction par des phénomènes d'ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps), de CDC (Cytotoxicité Dépendante du Complément) et d'apoptose. Au cours de l'AHAI, l'administration de rituximab favorise paradoxalement chez les patients réfractaires, l'établissement de plasmocytes de longue durée de vie

spléniques, notamment autoréactifs qui pourraient être à l'origine de la rechute (Thai et al. 2018; Mahévas et al. 2015; Mahévas et al. 2013). Ceci est en partie lié au fait que les plasmablastes, n'exprimant pas le CD20, ne sont pas ciblés par le rituximab. Par ailleurs, il a été observé chez la souris et chez l'homme, que la maturation des plasmocytes de longue durée de vie spléniques, dans un contexte de déplétion lymphocytaire B, était soutenue par la cytokine BAFF (*B cell activating factor*). L'implication de cette cytokine aux fonctions majeures dans le développement et l'homéostasie des populations B est révélée par une augmentation de la concentration sérique et par une augmentation de la sécrétion de BAFF par les splénocytes (Thai et al. 2018; Mahévas et al. 2015; Naradikian, Perate, and Cancro 2015).

Bien qu'aucune étude ne permette de hiérarchiser le bénéfice de la splénectomie par rapport aux traitements immunosuppresseurs, en cas d'échec et/ou de rechute après corticothérapie et rituximab, la splénectomie est proposée en troisième intention. Elle permet de ralentir la clairance des GR par l'élimination de leur principal site de destruction et du lieu de maturation des LB autoréactifs. Environ 70 % des patients répondent à la splénectomie et près de 40 % présentent une réponse complète (Reynaud et al. 2015; Jäger et al. 2020), néanmoins les données sur les taux de rémission à long terme sont anciennes et disparates, et les taux de rechute varient de 25 à 70 % selon les études (Crowther et al. 2011; Reynaud et al. 2015; Allgood and Chaplin 1967).

Une splénectomie d'urgence ou une embolisation splénique partielle peut être nécessaire aux patients hautement dépendants des transfusions et ne répondant pas aux autres traitements (Jäger et al. 2020).

Même si les risques de complication et de mortalité post splénectomie ont été amoindris ces dernières années, cette approche thérapeutique radicale n'est pas anodine. L'asplénie expose notamment aux risques infectieux envers les germes encapsulés (Bisharat et al. 2001), une complication infectieuse survient chez 2 à 5 % des patients splénectomisés, majoritairement au cours des deux premières années. Ces infections peuvent être d'une extrême gravité, il est indispensable de réaliser une vaccination anti-pneumococcique et anti-méningococcique au moins deux semaines avant la splénectomie. Par ailleurs, dans les semaines succédant l'intervention, plus de 70 % des patients présentent une thrombocytose qui majore le risque d'accident thromboembolique au niveau des veines porte et splénique (Bouvier et al. 2017). A ce jour, aucun facteur prédictif de la réponse immédiate et/ou à long terme de la splénectomie n'a été identifié. Compte tenu du bénéfice apporté par l'administration du rituximab et des nouvelles thérapies, la splénectomie sera sans doute à l'avenir réservée à de très rares cas de patients.

Le recours aux immunosuppresseurs est à envisager en quatrième intention, à la suite de l'échec du rituximab et de la splénectomie, ou en troisième intention dans le cas de contre-indications ou du refus de la splénectomie par le patient. L'azathioprine, le cyclophosphamide, la cyclosporine et le mycophénolate mofétil sont les plus souvent utilisés. Quelques études rétrospectives ont été conduites sur des petites séries de patients, elles rapportent dans l'ensemble un bon rapport

bénéfice/risque avec une efficacité globale de 40 à 60 % (Moyo et al. 2002; Howard et al. 2002; Fattizzo et al. 2022).

Enfin, bien que cette pratique tende à disparaître grâce aux nouvelles thérapeutiques disponibles, une transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues peut être envisagée dans les rares cas d'AHAI multiréfractaires en impasse thérapeutique (Passweg et al. 2004).

1.1.4.3 Nouvelles thérapies

Le développement de stratégies thérapeutiques innovantes basées sur de nouvelles molécules ou des associations de traitements est indispensable pour apporter aux patients réfractaires des alternatives thérapeutiques (**Figure 02**. Nouvelles stratégies thérapeutiques).

Actuellement une dizaine de molécules, essentiellement des Ac monoclonaux, sont à l'étude et ciblent précisément certains mécanismes physiopathologiques de l'AHAI.

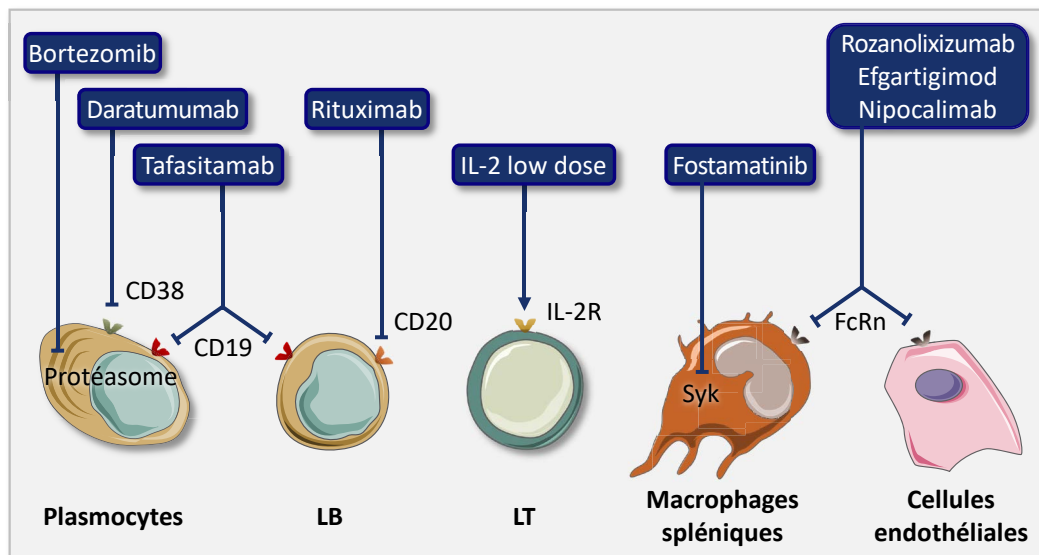


Figure 02. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Adaptée de Michalak 2020 - Nouveaux médicaments ciblant précisément certains mécanismes physiopathologiques de l'AHAI (IL-2 : Interleukine 2, IL-2R : Récepteur de l'Interleukine 2, FcRn - Fragment cristallisable du récepteur néonatal, LB : Lymphocyte B, LT : Lymphocyte T, SYK : *Spleen Tyrosine Kinase*)

Plusieurs molécules, actuellement à l'étude chez les patients atteints d'AHAI, visent les FcRn (*Neonatal Fc Receptor*) exprimé par les cellules endothéliales et les cellules présentatrices d'Ag (CPA). Il s'agit du rozanolixizumab, du nipocalimab et de l'efgartigimod. Les FcRn sont impliqués dans le recyclage des IgG et leur confère une demi-vie plus longue, comparativement aux autres Ig, en prévenant spécifiquement leur catabolisme des au sein du système lysosomal. Les Ac monoclonaux ciblant les FcRn entrent en compétition avec les auto-Ac sur les sites de liaison des IgG ce qui conduit à une accélération de la clairance des auto-Ac et à une inhibition des propriétés inflammatoires des CPA (Blumberg et al. 2019).

La régulation de l'activation des LT, en renforçant les capacités suppressives des LT régulateurs (Treg), est envisagé par l'administration d'IL-2 à faible dose. Différents inhibiteurs de compléments sont également à l'essai ainsi que le fostamatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase splénique SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*), qui permet de bloquer la signalisation des FcγR et d'inhiber l'activation et les capacités phagocytaires des macrophages spléniques (Kuter et al. 2022).

Plusieurs essais évaluent le bénéfice apporté par une stratégie ciblant de façon consécutive ou concomitante les lymphocytes B matures, les plasmablastes et les plasmocytes de longue durée de vie. Cette approche permettrait de limiter les rechutes post rituximab et *de facto* le recours à la splénectomie. L'administration successive de rituximab puis de daratumumab (anti-CD38) ou bortezomib (inhibiteur de protéasome) a montré sur des petites séries de patients un apport bénéfique et une réponse soutenue (Schuetz et al. 2018; Fadlallah et al. 2019; Crickx et al. 2021).

Par ailleurs une association conjointe, telle qu'expérimentée au cours du PTI, associant rituximab avec un inhibiteur de BAFF pourrait être envisagée au cours de l'AHAI puisqu'elle permet outre la déplétion des LB, de limiter la survie des plasmocytes de courte durée de vie et d'inhiber la différenciation des plasmocytes de longue durée de vie (Mahévas et al. 2015).

1.1.4.4 Traitement de l'AHAI secondaire

Dans le cas d'AHAI secondaire à une autre MAI et plus particulièrement au lupus systémique, la prise en charge est relativement similaire à l'AHAI primitive et repose essentiellement sur la corticothérapie et le rituximab (Serris et al. 2018). Les immunosuppresseurs doivent être préférés à la splénectomie en cas de non-réponse au rituximab en raison du risque thrombotique accru, notamment chez les patients présentant des anticorps antiphospholipides ou un syndrome des antiphospholipides (Serris et al. 2018; Delgado Alves et al. 2004).

Lorsque l'AHAI est associée à un déficit immunitaire, notamment au déficit immunitaire commun variable (DICV), la stratégie thérapeutique est également comparable à l'AHAI primitive. L'administration de rituximab en seconde ligne a montré une réponse initiale positive pour 4 patients sur 5. Compte tenu de l'hypogammaglobulinémie liée au DICV, qui peut être aggravée par le rituximab, une substitution par immunoglobulines est recommandée si ce n'était pas déjà le cas (Gobert et al. 2011). Le recours à la splénectomie et aux immunosuppresseurs doit être évité étant donné le risque infectieux accru dans ce contexte. En revanche, l'administration de sirolimus (inhibiteur de la voie mTOR, *Mammalian Target Of Rapamycin*) permet d'obtenir une réponse partielle ou complète à 6 mois pour 4/6 patients dans le cas de syndrome lymphoprolifératif auto-immun (Bride et al. 2016).

Enfin, dans le cadre d'une AHAI secondaire associée à une hémopathie lymphoïde de bas grade, la prise en charge thérapeutique doit tenir compte de l'évolutivité de l'hémopathie. A titre d'exemple, la gestion de l'AHAI au stade précoce de la LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique) est la même que celle de l'AHAI primitive (Jäger et al. 2020). En revanche, les patients atteints de LLC évolutive doivent recevoir en deuxième intention une thérapie combinatoire associant le rituximab, la

cyclophosphamide et la dexametasone, la fludarabine ou l'ibrutinib afin de cibler les deux versants pathologiques (Piatek et al. 2020; Moreno et al. 2010).

Malgré la multiplicité des étiologies conduisant à l'AHAI, la diversité des acteurs de la physiopathologie et la disparité des réponses aux traitements, l'apport du rituximab et des nouvelles thérapies permet d'obtenir pour près de 60 % des patients une réponse complète et persistante à 5 ans. Cependant, une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'AHAI permettrait d'optimiser les taux de réponse et de rémission complète prolongée des patients. Alors que certains aspects de la destruction des GR sont relativement bien décrits, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue et l'entretien de la réponse auto-immune ne sont pas complètement compris. Nombreuses hypothèses sont encore à ce jour, fondées sur des études réalisées sur des modèles murins et nécessiteraient d'être confirmées chez l'homme.

1.2 Physiopathologie de l'AHAI à auto-Ac chauds

A travers l'histoire de la description des anémies hémolytiques auto-immunes c'est tout un pan de l'histoire de l'auto-immunité que l'on retrace. La première description clinique de l'AHAI a été publiée en 1904 par J. Donath et K. L. Landsteiner puis le caractère auto-immun de cette pathologie a été mis en évidence par le développement du TDA (Goltz 1982; Coombs, Mourant, and Race 1945). L'utilisation même du terme « auto-immun » a été proposée pour la première fois par Young en 1951 lors de la caractérisation d'une anémie hémolytique acquise à auto-Ac anti-GR.

Comme pour d'autres MAI, l'AHAI est caractérisée par la présence d'auto-Ac, de populations B et T autoréactives et elle est initiée par une rupture de la tolérance périphérique. Pour autant, la seule détection d'auto-Ac par un TDA ne permet pas de préjuger de l'apparition d'une AHAI, l'incidence d'un TDA positif chez des patients tout venant hospitalisés est estimé à 1/1000 et seuls 1,4 % des patients « porteurs » d'auto-Ac dirigés contre les GR développent une AHAI (**Figure 03**. Corrélation entre la

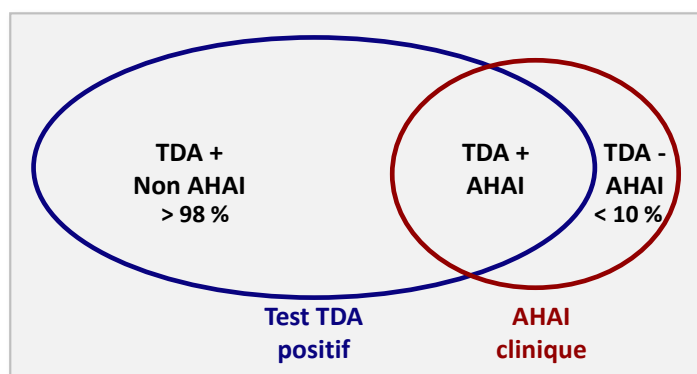


Figure 03. Corrélation entre la positivité du TDA et l'AHAI

Adaptée de Meulenbroek 2015 - Au cours de l'AHAI, le TDA est positif pour plus de 90% des patients. Pour 5 à 10 % en revanche, le DAT est négatif, alors qu'un DAT positif peut être présent pour de nombreux patients qui ne sont pas atteints d'AIHA (TDA : Test Direct à l'Antiglobuline).

positivité du TDA et l'AHAI). La pertinence du TDA s'inscrit dans un contexte clinique évocateur et dépend de l'intensité de sa positivité. A contrario, pour 5 à 10 % des patients atteints d'AHAI, le TDA ne permet pas de détecter d'auto-Ac (Meulenbroek, Wouters, and Zeerleder 2015).

La grande majorité des effecteurs de l'immunité innée et adaptative semble impliquée dans la physiopathologie de l'AHAI et les mécanismes mis en jeu ont été décrits pour une part chez l'homme ou dans des modèles murins (Michalak et al. 2020). Alors que les mécanismes d'hémolyse des GR sont bien connus, les processus conduisant à la rupture de la tolérance sont encore loin d'être compris (**Figure 04**. Physiopathologie générale de l'AHAI à auto-Ac chauds).

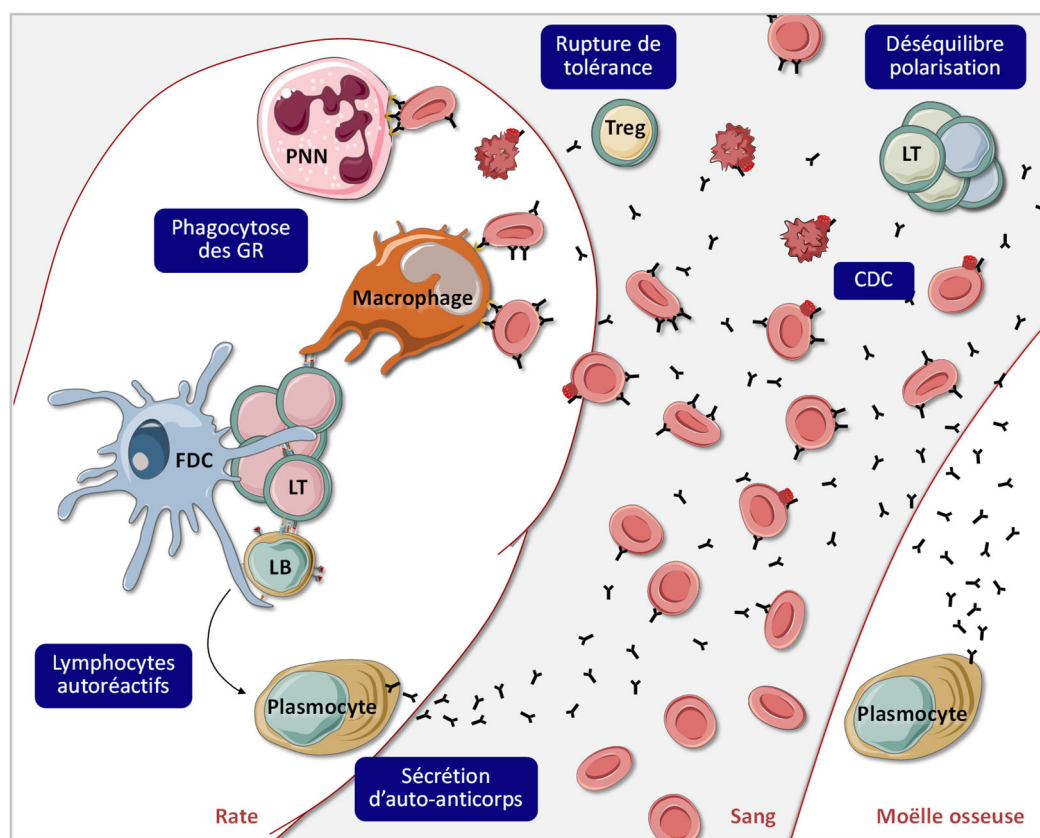


Figure 04. Physiopathologie générale de l'AHAI à auto-anticorps chauds

L'AHAI à auto-anticorps (Ac) chauds résulte d'une destruction des globules rouges (GR) médiée par des auto-Ac ciblant les antigènes érythrocytaires membranaires : les protéines Rhésus, la protéine bande 3 ou la glycopherine A. Lors de leur passage dans la rate, les GR opsonisés sont phagocytés par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles spléniques. Au cours de l'AHAI, ce sont les macrophages spléniques qui sont les principales cellules présentatrices d'antigènes, elles stimulent les lymphocytes T (LT) autoréactifs qui en coopération avec les cellules détritiques folliculaires (FDC) induisent l'activation, la différenciation et la maturation des lymphocytes B (LB) autoréactifs en plasmocytes. Les plasmocytes nichent dans la rate et la moëlle osseuse où ils produisent les auto-Ac. Il peut advenir une hémolyse intravasculaire du fait d'une activation de la voie classique du complément conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la lyse des GR dans le sang. La polarisation des populations lymphocytaires circulantes est déséquilibrée et bien que les mécanismes conduisant à la rupture de tolérance soient encore inconnus, il existe un déficit quantitatif des lymphocytes T régulateurs (Treg) circulants.

1.2.1 Modèles expérimentaux de l'AHAI

De multiples modèles d'AHAI murine ont été développés, des modèles d'AHAI spontanée, un modèle induit ainsi que plusieurs modèles transgéniques. La diversité des mécanismes d'induction de l'AHAI murine est le reflet de la complexité de sa physiopathologie et chaque modèle permet d'en explorer une facette (**Tableau 04**. Modèles murins d'AHAI à auto-Ac chauds). Nous nous attacherons dans cette section à la description biologique de ces différents modèles, leurs conceptions, et les mécanismes cellulaires qu'ils ont préférentiellement permis d'étudier. Les mécanismes physiopathologiques dont ils ont contribué à la compréhension seront décrits par la suite dans les parties référentes.

La lignée de souris NZB (*New Zealand Black*) est l'un des tout premiers modèles d'AHAI décrit. Elle est prédisposée à développer spontanément une anémie hémolytique auto-immune à l'âge de 6 mois. Cette lignée a été développée en 1959 par l'équipe de Bielschowsky et le caractère auto-immun de l'anémie a été décrit par Helyer et Howie en 1963 (Helyer and Howie 1963). Le fond génétique de ces souris a été étudié afin de distinguer des anomalies ou des polymorphismes prédisposants à l'AHAI mais aucune des cibles révélées n'a pu être transposée à la physiopathologie humaine. Sans que les mécanismes impliqués ou les gènes incriminés n'aient été identifiés, les loci *Aia1/2/3* et *Lbw2*, respectivement localisés sur les chromosomes 7 et 4, semblent notamment jouer un rôle important dans la production des auto-Ac érythrocytaires et la survenue de l'AHAI murine NZB. De même, le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) d'haplotype H-2^d est important dans le développement des auto-Ac spléniques (Naiki et al. 1993; Kikuchi et al. 2005; Knight and Adams 1981; Scatizzi et al. 2012).

L'anémie survient également de façon spontanée dans le modèle de souris non-obèse diabétique (NOD), modèle privilégié de l'étude du diabète de type I. Les souris NOD âgées de plus de 200 jours développent une anémie régénérative médiée par les lymphocytes B qui se caractérise par un effondrement de la durée de vie des GR, une diminution de l'hématocrite, l'augmentation des réticulocytes, une splénomégalie et la détection d'auto-Ac par le TDA.

Par ailleurs, l'AHAI murine peut être induite à la suite d'une xéno-immunisation des souris par une transfusion hebdomadaire de globules rouges de rats, c'est le modèle Playfair et Marshall-Clarke (Playfair and Marshall-Clarke 1973). L'induction de l'AHAI repose sur un phénomène de réactivité croisée entre les xéno-Ag et les auto-Ag de GR. La production d'auto-Ac est détectable en 5 à 6 semaines chez 30 à 90 % des animaux et conduit à un effondrement de la durée de vie des GR et à une hémolyse (Cox and Keast 1974). Il s'agit du modèle privilégié pour étudier les mécanismes cellulaires auto-immuns mis en jeu dans le développement de l'AHAI, notamment l'implication des Treg et des TFH (*T Follicular helper*, LT folliculaires auxiliaires) (Mqadmi, Zheng, and Yazdanbakhsh 2005; Gao et al. 2019).

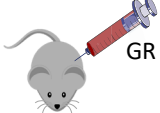





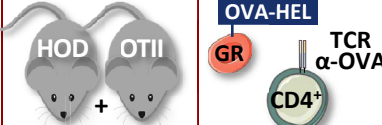
Modèles spontanés		
NZB New Zealand Black	-	• AHAI en 6 semaines
NOD Non-Obese Diabetic	-	• AHAI en 200 jours
Modèle induit		
Playfair and Marshall-Clarke	 GR de rats	• Xénoimmunisation • AHAI en 6 semaines
Modèles transgénique		
HL Heavy and Light chain	 Ac 4C8 α-Band-4.1 NZB	• AHAI en contexte inflammatoire
BALB/c	IL2^{-/-}  IL-2	• Syndrome lymphoprolifératif • AHAI létale en 5 semaines
	IL2RA^{-/-}  IL-2Rα	• MAI systémique • AHAI létale
	IL2RB^{-/-}  IL-2Rβ	• MAI systémique puis • AHAI létale
HOD⁺ IgHEL⁺	 HOD + OTII OVA-HEL GR BCR α-HEL LB	• AHAI/MAF • Auto-IgM α-HEL
HOD⁺ OTII⁺	 HOD + OTII OVA-HEL GR TCR α-OVA CD4 ⁺	• AHAI pour 40% des souris • Auto-IgG α-OVA

Tableau 04. Modèles murins d'AHAI à auto-Ac chauds

Ac : Anticorps, BCR : *B-cell* Receptor, GR : Globules Rouges, HOD : HEL-Ova-Duffy, HEL : *Hen Egg Lysozyme*, Ig : Immunoglobuline, IL-2 : Interleukine 2, *IL2* : *Interleukin 2 gene*, *IL2RA* : *Interleukin 2 receptor α chain gene*, *IL-2Rβ* : *Interleukin 2 receptor β*, *IL2RB* : *Interleukin 2 receptor β chain gene*, LB : Lymphocyte B, MAF : Maladie Chronique des Agglutinines Froides, OVA : Ovalbumine

Depuis le début des années 90, six modèles transgéniques d'AHAI murine ont été développés, le premier d'entre eux est le modèle de chaîne lourde et de chaîne légère HL (*Heavy and Light*). Les lymphocytes B de ces souris expriment tous un BCR (*B-cell receptor*) constitué des chaînes lourdes et légères de l'auto-Ac 4C8 de souris NZB, ciblant la protéine Band 4.1 des GR murines (Okamoto et al.

1992) et ils sécrètent des auto-Ac. Étonnamment, ces souris présentent un phénotype disparate, pouvant aller d'un profil tolérogène avec une délétion des LB ou la présence de LB anergiques associés à des symptômes très modérés, à une réaction auto-immune intense conduisant à une hémolyse sévère ((Okamoto et al. 1992; Howie and Hudson 2018). L'hétérogénéité de la symptomatologie est notamment en lien avec le niveau d'inflammation puisque d'une part, l'élevage des animaux dans un environnement stérile prévient la survenue de l'AHAI et d'autre part, l'administration de LPS (Lipopolysaccharide) aux animaux « tolérogènes » conduit à l'expansion des populations B, à la rupture de tolérance vis-à-vis des GR et au déclenchement de l'AHAI (Murakami et al. 1997; Murakami et al. 1994). Ce modèle, qui souligne l'importance de la survenue d'infections dans le déclenchement de l'AHAI, a souvent été privilégié pour étudier les populations lymphocytaires B.

A contrario, le modèle de souris BALB/c déficientes pour l'IL-2 (*IL2^{-/-}*), a permis d'observer l'importance de l'activation des populations T activées au cours de l'AHAI et plus particulièrement la nécessité de leur régulation. Aucune altération du système immunitaire n'est observée durant les premiers jours de vie des souris. Le développement thymique semble normal probablement en raison d'un phénomène compensatoire médié par l'IL-7 et/ou l'IL-15 (Malek 2008). A partir du 10^{ème} jour, il survient une prolifération polyclonale des lymphocytes T (LT) activés et incontrôlée en raison de l'absence de développement de Treg périphériques. Les souris *IL2^{-/-}* développent un syndrome lymphoprolifératif et une AHAI sévère conduisant à la mort des animaux en 5 semaines (Sadlack et al. 1995). De façon similaire, au cours des deux modèles murins respectivement déficients pour l'IL-2R α (Chaîne α du récepteur de l'Interleukine 2, *Interleukin 2 Receptor α*) de et l'IL-2R β , les souris développent des maladies auto-immunes systémiques et meurent d'anémie hémolytique en quelques semaines (Suzuki et al. 1995; Mullins et al. 2020).

Plus récemment, le modèle transgénique HOD (HEL-Ova-Duffy) a été développé et il permet d'étudier à la fois la tolérance et l'auto-immunité vis-à-vis des GR. Les souris HOD expriment, à la surface de leur GR exclusivement, une protéine de fusion constituée de deux Ag fréquemment utilisés en immunologie, HEL (*Hen Egg Lysozyme*, lysozyme d'œuf de poule) et OVA (Ovalbumine), et l'Ag Fyb du système Duffy permettant l'ancrage dans la membrane érythrocytaire (**Figure 05**. Protéine de fusion HEL-OVA-Duffy (HOD)) (Desmarests et al. 2009).

Ce modèle tire l'avantage des très nombreux outils immunologiques permettant l'analyse des réponses immunitaires dirigées contre HEL et OVA tels que les Ac monoclonaux ou les tétramères. Par ailleurs, il permet, lorsqu'il est croisé avec d'autres souches transgéniques telles que les souris IgHEL ou OTII, de développer des modèles d'anémies hémolytiques auto-immunes (Howie and Hudson 2018).

La tolérance des souris HOD naïves vis à vis des GR est importante malgré la présence de LB autoréactifs. Ainsi, une immunisation par les peptides HEL ou OVA n'est pas suffisante pour induire une rupture de tolérance et la production d'auto-Ac (Hudson et al. 2012).

Dans le modèle de souris IgHEL les lymphocytes B expriment une IgM reconnaissant la protéine HEL et, du fait d'une suppression allélique de la recombinaison des IgG, ils ne peuvent pas effectuer de

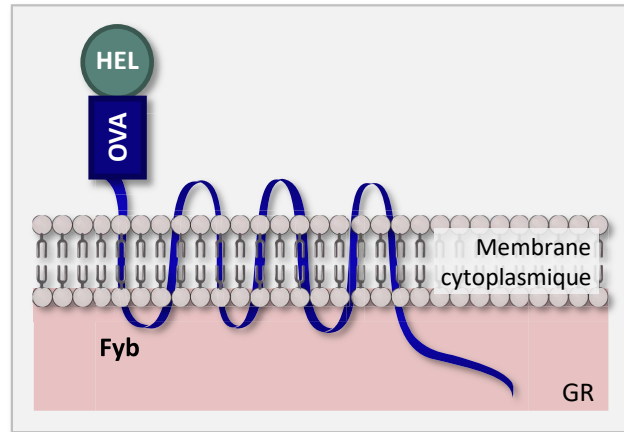


Figure 05. Protéine de fusion HEL-OVA-Duffy (HOD)

Adaptée de Desmarests 2011 - L'antigène HOD est une protéine de fusion associant la protéine lysozyme d'œuf de poule (HEL), un fragment de l'albumine d'œuf de poule (OVA) et l'antigène de groupe sanguin Fyb. Son expression est spécifique à la membrane des globules rouges (GR) dans le modèle de souris transgénique HOD.

réarrangement de leur BCR, ni opérer de commutation de classe des immunoglobulines (Hartley et al. 1991; Howie and Hudson 2018). Le croisement des souris HOD et IgHEL permet d'obtenir des souris HOD⁺ IgHEL⁺ productrices d'auto-Ac de type IgM, dirigés contre HEL et atteintes d'une anémie hémolytique auto-immune (Richards et al. 2017). Bien que la température optimum de liaison de ces auto-Ac n'ai jamais été évaluée, ce modèle permet plutôt d'étudier la maladie des agglutinines froides au cours de laquelle les auto-Ac sont des IgM.

De façon similaire, les souris HOD peuvent être croisées avec les souris OTII qui possèdent des lymphocytes T CD4⁺ exprimant un TCR (*T Cell Receptor*) transgénique reconnaissant la protéine OVA (Barnden et al. 1998). Bien que les jeunes souris HOD⁺ OTII⁺ ne produisent pas d'auto-Ac et soient tolérantes vis-à-vis des GR, en vieillissant environ 40 % des souris développent une AHAI caractérisée par des auto-Ac dirigés contre OVA, une splénomégalie une anémie régénérative (Hudson et al. 2012; Howie and Hudson 2018; Dei Zotti et al. 2021). Le phénotype murin décrit dans ce modèle est relativement proche de la biologie observée chez les patients atteints d'AHAI primitive (Dei Zotti et al. 2021).

Le modèle HOD s'avère être un puissant outil, permettant d'étudier indépendamment les mécanismes par lesquels les populations B et T tolèrent et/ou reconnaissent les Ag érythrocytaires.

1.2.2 Mécanismes de destruction des globules rouges

Dans des conditions physiologiques, le vieillissement des GR entraîne de très nombreuses perturbations métaboliques et structurales qui conduisent à la reconnaissance et à la destruction de près de 10 millions de globules rouges chaque seconde chez l'homme (Bratosin et al. 1998).

Au cours de l'AHAI, la clairance des GR est accélérée par la présence d'auto-Ac, ciblant les protéines membranaires érythrocytaires, majoritairement les protéines Rhésus, mais également la protéine bande 3 et/ou la glycophorine A (Leddy et al. 1993). Pour près de 10 % des patients, aucune spécificité n'est identifiée (Chadebech et al. 2018). Les GR matures sont la cible des auto-Ac, et il est observé chez

20 % des patients une réticulocytopenie, probablement le fait d'une réaction auto-immune dirigée contre les réticulocytes et/ou les précurseurs érythrocytaires médullaires qui expriment également les Ag érythrocytaires. L'anémie est alors arégénérative, ce qui constitue un facteur de gravité (Sahin and Niroula 2019; Meunier et al. 2017).

Bien que les auto-Ac ciblant la protéine Bande 3 aient longtemps été associés à la survenue d'hémolyses sévères, une récente étude menée sur 40 patients a observé que la spécificité des auto-Ac n'était pas corrélée à la sévérité de l'AHAI (Chadebech et al. 2018). Toutefois, le niveau de phosphorylation de la protéine band 3 pourrait influencer la sévérité de l'hémolyse (Bloch et al. 2020).

1.2.2.1 Mécanismes d'hémolyse médiés par les auto-Ac

Au cours de l'AHAI à auto-Ac chauds, l'hémolyse est majoritairement intratissulaire et localisée dans la rate (**Figure 06. Mécanismes d'hémolyse médiés par les auto-Ac, Hémolyse intratissulaire splénique**). Le principal mécanisme conduisant à l'accélération de la clairance des hématies est la phagocytose des globules rouges opsonisés par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN), *via* les récepteurs du fragment Fc γ des immunoglobulines (Fc γ R, *Fc γ Receptor*) et les récepteurs du complément (Gallagher et al. 1983; Meulenbroek, Wouters, and Zeerleder 2015; Meinderts et al. 2017).

Il a également été décrit des phénomènes de trogocytose ou de « Ag-shaving », au cours desquels les macrophages spléniques ne phagocytent pas les globules rouges matures mais soustraient une partie de la membrane érythrocytaire opsonisée conduisant à la formation de sphérocytes (Chadebech et al. 2018; Da Costa et al. 2001). Les sphérocytes regagnent alors la circulation puis seront piégés et phagocytés lors d'un prochain passage dans la pulpe rouge splénique (Mebius and Kraal 2005). Ce phénomène implique notamment l'engagement des récepteurs Fc γ RIII, Fc γ RI des macrophages mais de façon non exclusive. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des FcR n'abolit que partiellement la trogocytose témoignant de l'implication d'autres mécanismes, non médiés par les auto-Ac, mais dont la nature reste à explorer (Chadebech et al. 2018; Chadebech et al. 2010).

Les auto-Ac sont également à l'origine d'une activation de la voie classique du complément, aboutissant à une CDC. Les auto-Ac de type IgG, les plus fréquents au cours de l'AHAI, entraînent une activation incomplète de la voie classique du complément, à l'origine d'hémolyse intratissulaire hépatique et splénique (**Figure 06. Mécanismes d'hémolyse médiés par les auto-Ac**). Dans ce cas, le complexe C1 se lie au domaine CH2 (*Constant domain of the Heavy chain*, domaine constant de la chaîne lourde) des IgG opsonisées à la surface des GR, s'autoactive et par le clivage de C2 et C4, forme la C3 convertase à l'origine de C3b (Dunkelberger and Song 2010). Les GR ainsi associés du complexe C3b sont captés puis phagocytés lors de leur passage dans le foie et dans la rate par les cellules de Kupffer et les macrophages spléniques qui expriment le récepteur de C3b, CR1 (*Complement Receptor 1*, CD35).

Dans les très rares cas d'AHAI à auto-Ac chaud de type IgM, il survient une hémolyse intravasculaire conduisant à un tableau clinique sévère (Kalfa 2016)(**Figure 06. Mécanismes d'hémolyse médiés par**

les auto-Ac, Hémolyse intravasculaire). En raison de leur structure pentamérique, les Ac de type IgM permettent une activation complète du complément par la voie classique avec la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM, C5b9). À la suite de la fixation de C3b, C5 est clivé, C6 C7 C8 et C9 s'ancrent dans la membrane pour former le CAM, conduisant à l'hémolyse des GR dans la circulation (Dunkelberger and Song 2010).

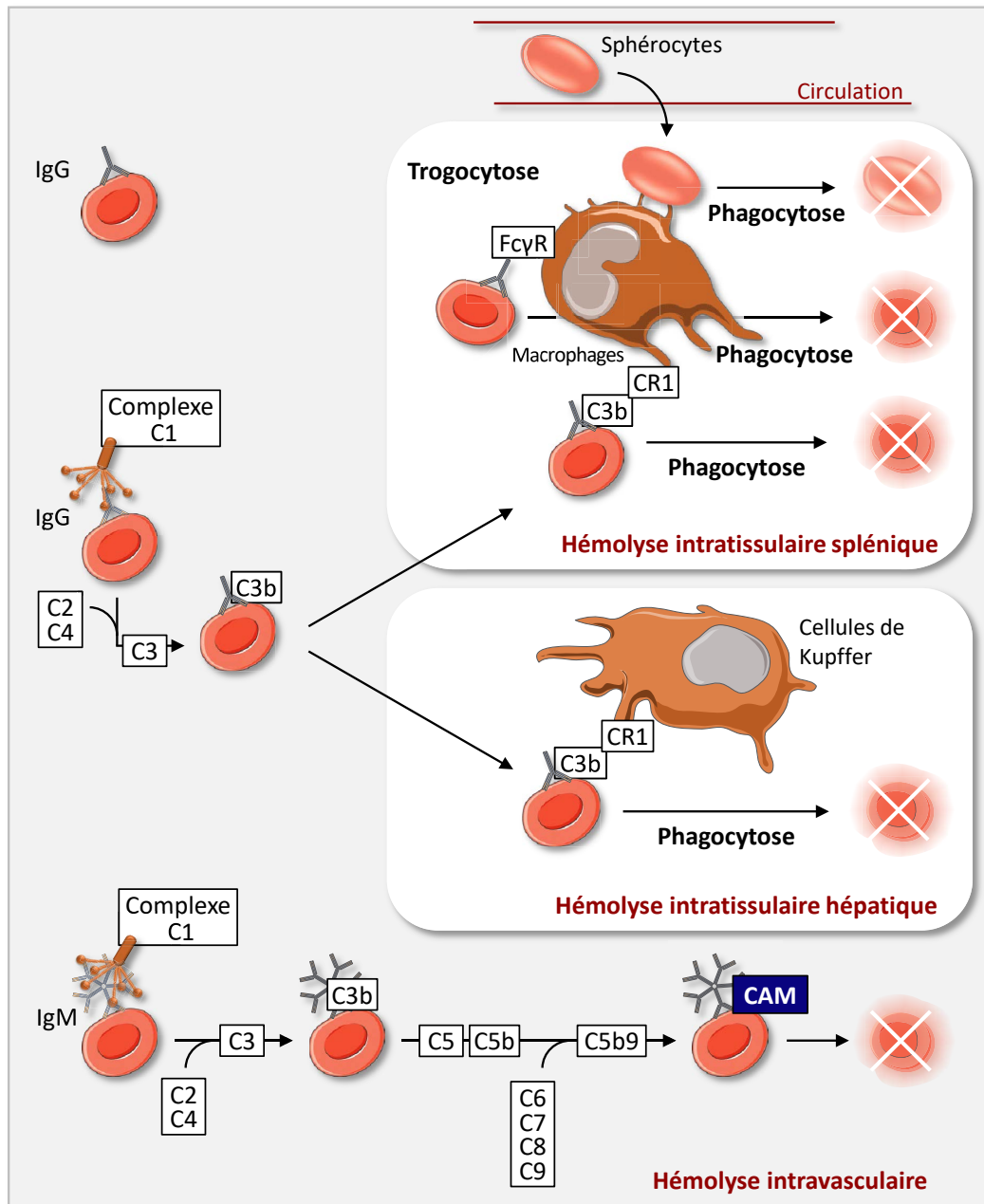


Figure 06. Mécanismes d'hémolyse médiés par les auto-anticorps

Adaptée de Michalak 2020 - Les globules rouges (GR) opsonisés d'auto-anticorps (Ac) sont phagocytés par les macrophages spléniques. Certains GR ne sont que partiellement phagocytés par trogocytose et forment des sphérocytes qui rejoignent la circulation et seront phagocytés lors de leur prochain passage dans la rate. L'opsonisation des GR par les IgG peut conduire à une activation incomplète de la voie classique du complément et à la formation du complexe C3b. Les IgG entraînant une faible activation de la voie classique du complément la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) et l'hémolyse intravasculaire qui y est liée sont faible. De même, l'hémolyse intratissulaire hépatique est peu importante au cours de l'AHAI à auto-Ac chauds.

1.2.2.2 Autres mécanismes d'hémolyse

La sénescence des GR entraîne de très nombreuses perturbations métaboliques et structurales. L'architecture de leur membrane plasmique est notamment désorganisée en raison de l'oxydation des glycoprotéines et des phospholipides qui la constituent (Bratosin et al. 1998), ce qui conduit *in fine* à l'élimination des GR par différents mécanismes détaillés ci-dessous.

Dans des conditions physiologiques, les GR expriment de nombreux récepteurs « protecteurs » qui leur octroient une certaine protection vis-à-vis de la phagocytose ou de l'activation du complément. Ils expriment notamment la glycoprotéine ubiquitaire CD47, dont la liaison au récepteur inhibiteur SIRP- α (*Signal Inhibitory Regulatory Protein α*) exprimé par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, les protègent de la phagocytose et de la trogocytose par un signal « *don't eat me* » (Oldenborg et al. 2002; Kusakari et al. 2008). Dans le cas des souris NOD déficientes en CD47 (NOD *CD47^{-/-}*), la clairance des GR est augmentée et elles développent une AHAI spontanée létale entre le 120^{ème} et le 280^{ème} jour (Oldenborg et al. 2002). Au cours du vieillissement des GR, l'expression de CD47 diminue et il a été montré plus récemment que l'action du stress oxydatif participe au changement conformationnel de cette glycoprotéine. CD47 s'associe alors à la thrombospondine-1 (TSP-1) et leur liaison à SIRP- α provoque alors un signal « *eat me* » puissant conduisant à la phagocytose des GR (Burger et al. 2012).

Le couple CD47/SIRP- α pourrait participer à l'accélération de la clairance et à la trogocytose non médiée par les auto-Ac qui survient au cours de l'AHAI (Chadebech et al. 2018; Chadebech et al. 2010). L'intensité d'expression de CD47 sur les GR et de SIRP- α sur les monocytes a été explorée mais ne permet pas de présager de leur implication (de Almeida et al. 2009; Barros et al. 2009), cependant aucune étude n'a encore apprécié la nature du signal transmis par CD47 au cours de l'AHAI.

Dans les modèles murins, le stress oxydatif des GR est directement désigné comme un des mécanismes physiopathologiques de l'AHAI (Howie and Hudson 2018). Chez la souris NZB, le niveau intracellulaire des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* – ROS) est élevé et corrélé à la profondeur de l'anémie (Iuchi et al. 2010). Par ailleurs, la suppression de la métalloprotéase antioxydante, superoxyde dismutase Cu/Zn (SOD) dans le modèle murin *SOD1^{-/-}*, conduit à un phénotype d'AHAI (Iuchi et al. 2007). Les GR sont dans ce contexte soumis à un stress oxydatif intense entraînant une anémie partiellement compensée par l'érythropoïèse, puis survient une production d'auto-Ac dirigés contre des Ag érythrocytaires cytosoliques et membranaires. Sans que le processus ne soit expliqué, ces observations indiquent que l'oxydation renforcerait l'antigénicité des GR. L'administration d'anti-oxydants permet d'améliorer l'anémie et d'inhiber la production des auto-Ac mais des investigations nécessitent d'être menées chez l'homme pour envisager la mise en jeu de ce mécanisme dans l'initiation de l'AHAI.

La trogocytose (médiée ou non par les Ac) et le stress cellulaire (en particulier le stress oxydatif) jouent également un rôle important dans la formation des vésicules extracellulaires (VE) dérivés de GR. Les VE se forment tout au long de la vie des GR et sont constituées d'hémoglobine résiduelle, de

lipides organisés en radeaux enrichis en protéines à encrage lipidique ainsi que de protéines membranaires qui leur confèrent des propriétés de communication cellulaire importantes et un rôle direct au cours de l'hémostase (Westerman and Porter 2016). Leur composition est un reflet de l'état intrinsèque des GR dont elles dérivent et elles participent aux mécanismes physiopathologiques mis en place au cours de différentes anémies congénitales ou acquises telles que la drépanocytose, la thalassémie ou l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (Westerman and Porter 2016; Fibach 2021).

Leur implication au cours de l'AHAI est envisagée mais une exploration phénotypique et fonctionnelle des VE des patients atteints d'AHAI est nécessaire afin de caractériser leur nature et leurs propriétés. En 2021, une étude menée sur les anémies hémolytiques acquises a rapporté des taux de VE dérivées de GR équivalents dans le plasma des patients d'anémies hémolytiques auto-immunes et des donneurs sains. En revanche, les VE des patients ont une proportion plus élevée de phosphatidylsérine, témoignant d'un stress oxydatif important (Barcellini et al. 2021). Il s'agit cependant d'une étude globale sans distinction de diagnostic parmi les types d'AHAI (AHAI à auto-Ac chaud ne représentait que 1/3 des patients du groupe) et sans distinction des antécédents thérapeutiques. Aucune exploration fonctionnelle des VE dérivées des GR au cours de l'AHAI à auto-Ac chaud, dans la phase active de la maladie n'a été conduite à ce jour.

1.2.2.3 Atteinte des réticulocytes et de l'érythropoïèse

Bien que l'AHAI soit le plus souvent régénérative chez l'homme, une réticulocytopenie affecte 20 % des patients et elle est probablement due à une réaction auto-immune dirigée contre les réticulocytes et/ou les précurseurs érythrocytaires médullaires. Dans ce cas, l'anémie est arégénérative et constitue un facteur de gravité (Sahin and Niroula 2019) (Meunier et al. 2017).

Dans le modèle de Playfair and Marshall-Clarke, une expérience de DIB (*Double In vivo Biotinylation*), qui consiste à réaliser à 30 jours d'intervalle une biotinylation de haute intensité puis une biotinylation de faible intensité des GR circulant, a permis d'étudier distinctement le statut des réticulocytes et des érythrocytes jeunes, intermédiaires et âgés par cytométrie en flux (Chatterjee, Bhardwaj, and Saxena 2016). Les auteurs ont ainsi observé que les réticulocytes et les GR jeunes présentent une sensibilité accrue aux auto-Ac. Ils sont préférentiellement opsonisés, présentent des niveaux de ROS (*Reactive Oxygen Species*) intracellulaires élevés et sont rapidement éliminés de la circulation. Ils observent également une atteinte de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse avec une diminution importante des populations érythroblastiques.

Par ailleurs, l'injection d'auto-Ac pathologiques provenant du modèle de souris xeno-immunisées, à des souris naïves conduit à une opsonisation importante des réticulocytes et un flip-flop de leurs phosphatidylcholines laissant penser que la fixation des auto-Ac pourrait directement générer des modifications structurelles de la membrane plasmique (Howie and Hudson 2018).

Chez l'homme également, la littérature concernant l'érythropoïèse au cours de l'AHAI est parcellaire. En 2018 puis en 2021, deux articles de Fattizzo rapportent que d'une part, 64 % des

patients présentent une moelle osseuse siège d'une dysérythropoïèse pouvant être accompagnée de fibrose, et d'autre part, les patients présentent des taux d'EPO (Erythropoïétine) sériques inférieurs aux témoins sains. Ces anomalies de maturation des érythroblastes peuvent être à l'origine de la production insuffisante d'érythrocytes qui caractérise les anémies arégénératives. Cependant ces études portent sans distinction sur des patients atteints d'AHAI régénérative ou non, de MAF ou d'AHAI mixte et en cours de traitements. Il serait intéressant de compléter ces observations dans une série de patients nouvellement diagnostiqués d'AHAI.

Les descriptions biologiques des biopsies ostéo-médullaires des patients arégénératifs confortent l'hypothèse d'une atteinte médullaire des précurseurs érythrocytaires par la réponse auto-immune. Elles décrivent notamment, une opsonisation des précurseurs érythrocytaires, la phagocytose des érythroblastes par les macrophages médullaires (Meunier et al. 2017; Sahin and Niroula 2019; Lussana et al. 2007) et il a été rapporté un cas d'apoptose majeure des érythroblastes dans la moelle (Van De Loosdrecht et al. 2000).

1.2.3 Dysfonctionnement de la réponse innée

Au cours des MAI en générale comme de l'AHAI en particulier, les effecteurs de l'immunité innée sont impliqués sur plusieurs versants de la physiopathologie notamment la rupture de la tolérance, la destruction des GR, l'orientation et l'entretien de la réponse adaptative. Pour autant, très peu d'études ont été conduites sur les cellules innées humaines et elles se sont principalement concentrées sur les macrophages spléniques, nous conduisant peut-être à surestimer leur implication.

L'immunité innée nécessiteraient d'être plus amplement explorée même si depuis quelques années une attention particulière a été portée vers d'autres cellules phagocytaires, les PNN et les cellules dendritiques (*dendritic cells* - DC) (Meinderts et al. 2017; Richards et al. 2021).

1.2.3.1 Les macrophages

Dans les modèles murins, les fonctions de phagocytose et de présentation antigénique confèrent aux macrophages spléniques de la pulpe rouge un rôle primordial dans la physiopathologie de l'AHAI, par l'activation des LT et la diversification antigénique d'une part mais également par la clairance des GR opsonisés. Dans le modèle NZB, l'administration d'un agent pro-apoptotique ciblant les cellules phagocytaires (le clodronate liposomal) permet une déplétion complète des macrophages, ce qui conduit au ralentissement de la clairance des GR et à la normalisation du taux d'hémoglobine et de réticulocytes circulants (Jordan et al. 2003).

En condition d'homéostasie, les macrophages spléniques sont les principaux garants de la clairance des GR sénescents (Meinderts et al. 2017) et du maintien de l'homéostasie du fer.

L'érythrophagocytose physiologique peut également être assurée par les cellules de Küpffer hépatiques et les macrophages médullaires, notamment à la suite d'une splénectomie.

Une récente description phénotypique des macrophages de la pulpe rouge splénique humaine dans des conditions physiologiques a révélé un profil d'expression singulier des FcγR. Contrairement aux macrophages dérivant de monocytes, ils expriment majoritairement les récepteurs de faible affinité FcγRIIa et FcγRIIIa et ils n'expriment pas le récepteur inhibiteur FcγRIIb. De façon intéressante, l'expression du récepteur de haute affinité FcγRI est très modérée à l'état basal mais semble être inductible et il est le principal récepteur impliqué dans la phagocytose *in vitro* des GR opsonisés puisque l'addition d'un Ac bloquant le FcγRI induit une inhibition partielle mais franche de la phagocytose des GR (Nagelkerke et al. 2018). A ce jour, aucune étude ne propose de description phénotypique des macrophages de la pulpe rouge splénique au cours de l'AHAI.

De nombreux polymorphismes des FcγR ont été décrits, dans des contextes pathologiques variés et certains conduisent à une augmentation de l'affinité des récepteurs associé à un gain de fonction (Kapur, Einarsdottir, and Vidarsson 2014). Ces polymorphismes ont été incriminés dans le développement de maladies auto-immunes ciblant d'autres éléments figurés sanguin tels que les plaquettes au cours du PTI (Foster et al. 2001; Breunis et al. 2008), mais ils peuvent également avoir une influence directe sur la clairance des GR opsonisés par des IgG. Au cours d'une étude sur la prévention de l'allo-immunisation foëto-maternelle, une élimination plus rapide de GR ciblés par des anti-RhD a été observée chez des individus présentant un polymorphisme des récepteurs FcγRIIa (131H) ou FcγRIIIa (158V) (Miescher et al. 2004). De plus, l'allotype FcγRIIa-131H est plus souvent retrouvé chez les nouveau-nés atteints de la maladie hémolytique du nouveau-née (Hadley 2002).

Malgré les nombreux indices convergents, la démonstration causale entre le profil d'expression ou le polymorphisme des FcγR exprimés par les macrophages de la pulpe rouge et la profondeur de l'anémie au cours de l'AHAI humaine reste à établir.

Un autre aspect fonctionnel des macrophages pourrait influencer sur la clairance des GR au cours de l'AHAI, c'est leur potentiel phagocytaire. Il semblerait que les monocytes circulants des patients aient des capacités phagocytaires plus élevées que celle des témoins, mais cette hypothèse est soutenue par une seule étude en 1985 et sans proposition mécanistique (Sunada, Suzuki, and Ota 1985). Plus récemment, une étude menée chez la souris WT (*Wild Type*, sauvage) a rapporté l'importance du niveau d'inflammation, médié par l'IFN-γ (Interféron-γ), sur l'activation des macrophages et le déclenchement de l'AHAI. Les auteurs décrivent que l'administration d'auto-Ac ciblant les GR (à des doses insuffisantes pour induire seul une AHAI) à des animaux préalablement infectés par le virus de la LDV (*Lactate Dehydrogenase-elevating Virus*) ou par le virus de l'hépatite murine (*Mouse Hepatitis Virus*, MHV) conduit à une accentuation de la pathogénicité des auto-Ac, à une augmentation des capacités phagocytaires des macrophages et déclenche une anémie hémolytique sévère (Musaji et al. 2005).

Etant donné leur abondance dans la rate, leur accès aux cellules circulantes facilité par le réseau réticulo-endothélial et leurs propriétés fonctionnelles, les macrophages de la pulpe rouge splénique

ont longtemps été considérés comme les acteurs uniques de la destruction des GR opsonisés au cours de l'AHAI. Ce dogme ne reposait *in fine* sur aucune étude comparative. Au demeurant, toutes les cellules phagocytaires spléniques exprimant les récepteurs Fcγ peuvent être impliquées dans la clairance des érythrocytes et de plus en plus d'éléments soutiennent une implication des PNN spléniques (Meinderts et al. 2017).

1.2.3.2 Les polynucléaires neutrophiles

Jusqu'à peu, les PNN n'avait pas été impliqués dans la physiopathologie de l'AHAI. Pendant des années, ces acteurs primordiaux de l'immunité innée qui constituent une des 1^{ères} lignes de défense contre les microorganismes, ont rarement été pris en considération au cours des pathologies auto-immunes médiées par des auto-Ac. Aujourd'hui, le potentiel rôle des PNN au cours de l'AHAI est étayé par plusieurs études et ils pourraient intervenir sur 2 versants de la physiopathologie.

Dans le modèle de drépanocytose murine tout d'abord, il a été montré que l'augmentation de la concentration plasmatique de l'hème, du fait de l'hémolyse excessive, était à l'origine d'une activation des PNN par la voie de signalisation des ROS et conduisait à la formation des filets extracellulaires de neutrophiles (*Neutrophil Extracellular Traps* – NET) (Chen et al. 2014). Par ailleurs, la NETose est également favorisée par la protéine du complément C5a, anaphylatoxine produite lors de la formation complexe d'attaque membranaire (Yousefi et al. 2009).

Les NETs sont des filaments de chromatine décondensée et recouvert de protéines, principalement granulaires, qui sont rejetés par les PNN activés (Papayannopoulos 2018). Bien que la première fonction des NETs soit de limiter la dissémination infectieuse, ils sont à l'origine de nombreux dommages tissulaires, ils participent à l'inflammation et favorisent la survenue de thromboses (Kimball et al. 2016).

Alors qu'elle reste à démontrer, l'activation des PNN au cours de l'AHAI est sans doute effective du fait de l'hémolyse intense et pour certains patients, de l'activation du complément qui s'y associe. Les PNN participent possiblement aux complications liées à l'hémolyse, notamment la maladie thrombo-embolique veineuse qui est observées chez 20 % des patients et pour laquelle aucun facteur prédictif n'a été identifié à ce jour (Chen et al. 2014; Audia et al. 2018; Brodsky 2019).

Par ailleurs, bien que la démonstration ne soit pas complète, les PNN semblent avoir un rôle plus central dans la physiopathologie de l'AHAI, en contribuant directement à l'érythrophagocytose splénique d'une part mais également à la stimulation des LB.

L'érythrophagocytose par les PNN est un phénomène qui a été observé sporadiquement, sur les frottis sanguins de patients atteints d'hémopathies malignes, mais également lors de différentes pathologies hémolytiques telles que l'hémoglobinurie paroxystique « *a frigore* » et l'AHAI à auto-Ac chauds (Etzell et al. 2005; Wong et al. 2020; Chandrashekar and Soni 2012; Lobreglio and Valacca 2001). Bien qu'elle soit considérée comme un phénomène marginal et atypique au cours de l'AHAI, l'érythrophagocytose par les PNN peut survenir au niveau sanguin comme médullaire et atteindre 35 % des PNN circulants (Lewandowski et al. 2011).

Cette hypothèse a été récemment renforcée par une étude conduite *in vitro*, par S. Meinderts et R. Van Bruggen en 2017, au cours de laquelle les PNN spléniques ont montrés de très hautes capacités de phagocytose vis-à-vis de GR artificiellement opsonisés, supérieures à celles des monocytes et des macrophages alors qu'ils n'interviennent pas dans la phagocytose des GR contrôles. Cette capacité est corrélée à l'intensité de l'opsonisation et elle est potentialisée par des facteurs pro-inflammatoires tels que le LPS et le TNF- α . De plus, ils constatent que les PNN spléniques de sujets sains sont capables de phagocyter les GR de patients atteints d'AHAI.

De façon plus inattendue, les PNN spléniques pourraient également jouer un rôle de soutien dans la maturation des LB. Il a été rapporté dans un modèle murin, une production élevée de la cytokine BAFF par les PNN spléniques dans le contexte d'une reconstitution des populations B spléniques à la suite d'un traitement des animaux par le rituximab (Ac monoclonale IgG1- κ chimérique spécifique ciblant le CD20) (Thai et al. 2018).

1.2.3.3 Les cellules dendritiques

Jusqu'à peu, le rôle des DC dans la physiopathologie de l'AHAI semblait insignifiant et n'était évoqué dans aucun article. En 2020 l'équipe de K. Hudson a proposé une étude comparative de l'implication des différentes CPA dans le développement de l'AHAI dans le modèle murin HOD (Richards et al. 2021). Les auteurs ont créé 3 souches de souris HOD dont le gène de la molécule de CMH I-Ab est inducible soit dans les populations de monocytes-macrophages-neutrophiles, soit de DC, soit de LB (HOD^{+I-Ab^{flox/flox}XCre⁺}). Ils ont ainsi mis en évidence que, tout comme les populations myéloïdes (monocytes-macrophages-neutrophiles), les DC spléniques étaient capables d'érythrophagocytose et de stimuler la prolifération des LT autoréactifs. Ils ont également démontré que la présentation des auto-Ag par les DC, mais non les cellules myéloïdes, était indispensable pour l'induction de l'AHAI dans ce modèle murin.

Ces résultats qui bousculent les grandes lignes de la physiopathologie murine placent les DC dans une position centrale et inspireront sans doute de futures études phénotypiques et mécanistiques des DC spléniques de patients atteints d'AHAI.

1.2.3.4 Cellules NK et autres effecteurs de l'immunité innée

Aucune description des populations lymphocytaires T invariantes n'a été réalisée à ce jour et parmi les cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoid cells*, ILC) seuls les NK ont fait l'objet d'études au cours de l'AHAI. Elles sont rarement incriminées dans la physiopathologie à l'exception du cas très particulier d'AHAI secondaire à des syndromes lymphoprolifératifs à NK et sans auto-Ac. Le clone cellulaire NK dominant peut alors présenter une autoréactivité dirigée contre un épitope érythrocytaire, ce qui conduit à une activité lytique vis-à-vis des GR autologues, sans lien avec des auto-Ac (Meulenbroek, Wouters, and Zeerleder 2015; Sekiguchi et al. 2017; Gilsanz et al. 1996).

Par ailleurs, une expérience d'ADCC *in vitro* a montré que les NK de patients atteints d'AHAI avaient un potentiel lytique vis-à-vis des GR autologues très modéré et sans corrélation avec la profondeur de l'anémie (Chadebech et al. 2018).

1.2.4 Altération de la réponse humorale

Par la découverte des auto-Ac ciblant les Ag érythrocytaires, le dysfonctionnement de la réponse humorale a été le premier mécanisme physiopathologique mis en évidence et il donne une place centrale aux LB autoréactifs au cours de l'AHAI. Pour autant, la présence de LB autoréactifs et d'auto-Ac est indispensable mais pas suffisante pour déclencher une AHAI. L'activation des populations lymphocytaires B, conduisant à la diversification antigénique et à leur expansion clonale paraît être en revanche une étape déterminante.

Chez les patients nouvellement diagnostiqués, la fréquence des LB CD5⁺ circulants, correspondants à une population non clonale de LB activés, est augmentée et il a été observé une corrélation positive entre leur niveau d'expression des marqueurs d'activation CD80, CD86, CD69 et la sévérité de l'anémie (Zhu et al. 2016). Par ailleurs, chez les patients ayant reçu une courte corticothérapie, les centres germinatifs (CG) spléniques, site de maturation des LB, sont observés en plus grand nombre comparativement à des rates de sujets sains (Mahévas et al. 2015).

Ces dysrégulations sont probablement liées en partie aux TFH qui accompagnent les LB tout au long de leur maturation dans les CG, *via* l'axe de signalisation CD40/CD40L et par la sécrétion de l'IL-21 et de l'IL-4 (Kurosaki, Kometani, and Ise 2015) Dans le modèle de Playfair and Marshall-Clarke, il a été décrit une augmentation des TFH spléniques, accompagné d'une diminution des LT folliculaires régulateurs (TFR). Cela conduit à un déséquilibre du ratio TFH/TFR qui impacte directement la production des auto-Ac (Gao et al. 2019). Par ailleurs, dans le modèle de souris HOD, le blocage de l'axe CD40/CD40L prévient l'expansion des LT autoréactifs et la formation des CG au cours de l'allo-immunisation (Natarajan et al. 2017). A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur les populations de TFH au cours de l'AHAI chez l'homme.

Le niveau d'inflammation semble être un facteur important dans le dérèglement des populations lymphocytaires B. Dans le modèle HL, l'administration de LPS aux animaux entraîne notamment une activation des lymphocytes B1 et conduit au déclenchement de l'AHAI (Murakami 1994). Dans les souris HOD, l'activation des TLR3 par le poly I:C (Acide Polyinosinique-Polycytidylique) lors de l'allo-immunisation des animaux par l'antigène KEL (*Kell Metallo-Endopeptidase, Kell Blood Group*) amplifie la production d'auto-Ac dirigés contre KEL par un processus T dépendant d'une part, et favorise la diversification antigénique puisque les souris développent également des auto-Ac anti-HOD (Patel et al. 2018).

Il est établi par ailleurs que les LB activés et les LB des CG des souris NZB et NOD présentent une moindre expression du récepteur inhibiteur FcγRIIb en raison d'un polymorphisme du promoteur (Pritchard et al. 2000; Xiu et al. 2002).

L'activation des LB et leur maturation dans les CG conduisent à la génération des plasmablastes qui migrent dans la moelle osseuse ou dans la rate pour achever leur maturation en plasmocytes, sécrétants d'Ac. Dans des conditions physiologiques, on distingue classiquement les plasmocytes de longue durée de vie qui nichent essentiellement dans la moelle osseuse pendant plusieurs dizaines d'années, des plasmocytes de courte durée de vie qui résident préférentiellement dans la rate (Kurosaki, Kometani, and Ise 2015; Radbruch et al. 2006).

En adéquation avec l'activité intense des CG, la fréquence des plasmablastes circulants est augmentée chez les patients nouvellement diagnostiqués d'AHAI (Mahévas et al. 2015). Alors que les plasmocytes de longue durée de vie peuvent être présents au niveau splénique dans certains modèles murin auto-immuns, notamment dans les souris NZB/W (*New Zealand Black/White*) développant un lupus, ils ne sont pas détectables dans la rate des patients ayant subi une splénectomie à la suite d'une courte corticothérapie. En revanche, des plasmocytes de longue durée de vie sont présents au niveau splénique lorsque la splénectomie survient après une déplétion des populations B par un anticorps monoclonale ciblant le CD20 (Rituximab) et ils expliquent probablement l'échec de cette thérapie chez ces patients, les plasmocytes n'exprimant pas le CD20 (Mahévas et al. 2015; Thai et al. 2018).

Sur un tout autre plan et bien qu'aucun article ne mette en cause les LB de la zone marginale splénique chez l'homme, certaines observations récentes, notamment dans le contexte de l'allo-immunisation post transfusionnelle, laissent penser que cette population pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la production des auto-Ac. Dans un modèle murin d'allo-immunisation par l'Ag KEL comme dans le modèle d'AHAI HOD, les GR spléniques sont colocalisés dans les sinusoides veineux de la pulpe rouge avec les LB de la zone marginale. De façon similaire dans ces 2 modèles, la déplétion des LB de la zone marginale prévient la sécrétion des auto-Ac là où la déplétion des LB et des LT CD4⁺ folliculaires n'entraîne qu'une inhibition partielle (Patel et al. 2018; Zerra et al. 2021).

1.2.5 Dysfonctionnement de la réponse cellulaire

Au-delà de leur rôle majeur dans la différenciation et la maturation des populations autoréactives B, les LT occupent une place importante dans l'équilibre de la balance pro et anti-inflammatoire, dans la stabilité du microenvironnement splénique et dans le maintien de la tolérance périphérique.

Au cours de l'AHAI murine, les populations T autoréactives ont été décrites dans le modèle Playfair and Marshall-Clarke en 1974 et il a été montré qu'une activation des populations T par de multiples réactions croisées entre les antigènes de GR de souris et de rat était nécessaire à la production d'auto-Ac et au déclenchement de l'AHAI dans ce modèle (Playfair and Marshall-Clarke 1973; Barker, Shen, and Elson 2002).

Chez l'homme et dans un contexte non pathologique, l'équipe de Barker décrivait en 1994 la présence de populations de LT autoréactives, naïves et capables d'être activées par une multitude de peptides Rhésus, de façon dépendante du CMH de classe II (Barker and Elson 1994). Ces LT qualifiés de T « immunologiquement ignorants » de peptides du soi sont pour la plupart spécifiques d'Ag cryptiques qui, dans des conditions physiologiques, n'ont pas vocation à être présentés par les CPA.

1.2.5.1 Polarisation lymphocytaire

Alors qu'un déséquilibre de la polarisation est établi dans de nombreuses MAI, les résultats des travaux portant sur la dysrégulation des cytokines et la polarisation des LT au cours de l'AHAI sont discordants et leur implication dans la physiopathologie n'est pas encore clairement établie.

Dans le modèle de souris NZB, la polarisation Th1 (LT helper 1) semble prédominante. Les LT stimulés par la protéine bande 3 produisent de grandes quantités d'IFN- γ alors que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 sont très peu secrétées (Shen et al. 1996). Dans ce modèle, la polarisation Th2 protégerait de l'AHAI puisque l'administration d'IL-4 à fortes doses, permet de rééquilibrer artificiellement la polarisation des LT, induit l'expression des récepteurs inhibiteurs Fc γ RIIb par les macrophages spléniques, et amoindrit la gravité de l'AHAI (Youssef et al. 2005).

A contrario chez l'homme, il a été décrit dans un premier temps une prédominance de la polarisation Th2 au détriment des Th1.

En 1994, l'équipe de Fagiolo a rapporté une augmentation des taux sériques d'IL-1 α , d'IL-2, et d'IL-4 chez des patients non traités par immunosuppresseurs (Fagiolo, Vigevani, and Pozzetto 1994). De surcroît, l'analyse du sécrétome des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, cellules mononucléées du sang périphérique) de patients avec une maladie active, a révélé une augmentation de la sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-10 ainsi qu'une diminution de l'IFN- γ comparativement à des sujets sains, que ce soit à l'état basal ou à la suite d'une stimulation par un agent mitogène (Fagiolo and Toriani-Terenzi 2002; Barcellini et al. 2000). Ce profil pro-Th2 des populations lymphocytaires T pourrait ainsi potentialiser la maturation et la prolifération des clones B autoréactifs.

Depuis quelques années, l'attention s'est portée vers la polarisation Th17 qui semble également impliquée dans la physiopathologie de l'AHAI. Deux articles ont récemment décrit une augmentation des taux d'IL-17 sériques chez les patients nouvellement diagnostiqués, les concentrations d'IL-17 étant corrélées à l'activité de la maladie. Ils rapportent également une augmentation de la proportion de Th17 circulants chez les patients comparativement aux donneurs sains, après stimulation des PBMC soit par des GR soit par une stimulation polyclonale par PMA et ionomycine (Hall et al. 2012; Xu et al. 2012).

La prédominance de la polarisation Th17 pourrait contribuer au déclenchement de l'AHAI puisque dans le modèle de Marshall-Clarke and Playfair, le transfert adoptif de Th17 accélère son déclenchement et amplifie la réponse humorale auto-immune. Par ailleurs, la neutralisation de l'IL-17 abroge le développement de l'AHAI tandis que l'allo-immunisation de souris *IL17^{-/-}* conduit au développement d'une réponse auto-immune modérée chez seulement 7 % des animaux (Xu et al. 2012).

Au cours de l'AHAI, la dysrégulation des cytokines est certaine mais la nature de cette perturbation reste discutée. La méthodologie des études conduites est disparate, notamment concernant les techniques d'analyses entreprises (dosage ELISA ou quantification par cytométrie en flux), le matériel

biologique analysé (sérum ou PBMC de patients) ou le type de stimulation appliquée *in vitro* (absence de stimulation, agents mitogènes, GR opsonisés, peptides Rh). Ces éléments de divergence expliquent probablement en grande partie la disparité des résultats.

1.2.5.2 Cytotoxicité des LT CD8⁺

Les LT CD8⁺ jouent un rôle important dans de nombreuses MAI notamment par leurs fonctions cytotoxiques (Gravano and Hoyer 2013), pour autant, les travaux étudiant leur implication au cours de l'AHAI sont très peu nombreux et n'indiquent pas de rôle majeur dans la physiopathologie de l'AHAI.

Dans le modèle d'AHAI murine NZB, la délétion des LT CD8⁺ (NZB CD8^{-/-}) n'a aucun impact sur la présentation clinique ou sur la chronologie de la pathologie (Chen et al. 1996).

Une expansion clonale de LT CD8⁺ a été observée chez les patients atteints d'AHAI mais l'absence de corrélation avec la sévérité de l'hémolyse et la persistance des clones lorsque les patients sont en rémission suggère qu'il s'agit d'une induction associée mais non essentielle au processus auto-immun (Smirnova et al. 2016). Des expériences d'ADCC *in vitro* réalisée par l'équipe de Mahévas en 2018, ont montré que les LT CD8 n'exerçaient pas de cytotoxicité vis-à-vis de GR opsonisés par des auto-Ac de patients atteint d'AHAI (Chadebech et al. 2018).

Par ailleurs, dans un contexte de transfusion sanguine, des Ag mineurs de GR peuvent être reconnus par les LT CD8 mais sans pour autant induire de fonction cytotoxique efficiente (Desmarests et al. 2011).

1.2.5.3 Rupture de la tolérance périphérique

Depuis de nombreuses années, l'implication des Treg dans la perte de la tolérance vis à vis des GR et dans le contrôle des clones autoréactifs est fortement suggérée au cours de l'AHAI et a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, la grande majorité des travaux ont été conduits dans les modèles murins et une confirmation de ces hypothèses dans la physiopathologie humaine est nécessaire.

Dès les premières descriptions du modèle de souris NZB, il a été rapporté un déficit quantitatif des populations T suppressives (Russell et al. 1981; Cooke, Hutchings, and Playfair 1978; Cooke, Hutchings, and Nayak 1980) et l'équipe de Barthold décrit en 1974 une altération de leur fonctionnalité, corrélée à l'âge des animaux, avec également une prédominance chez les femelles (Barthold, Kysela, and Steinberg 1974).

Le développement des modèles transgéniques a permis d'établir des arguments en faveur d'un rôle majeur des Treg dans la perte de la tolérance vis-à-vis des GR mais ils apportent également des éléments de contradiction. Dans le modèle murin *scurfy* tout d'abord, les souris portent une mutation invalidante de *Foxp3* (*Forkhead/winged-helix box protein 3*). Elles souffrent d'un syndrome IPEX et développent en quelques semaines de multiples désordres auto-immuns dont une AHA1 sévère (Godfrey, Rouse, and Wilkinson 1994).

Dans les modèles de souris transgéniques déficientes pour l'IL-2 ou pour son récepteur, l'AHAI est caractérisée par une prolifération incontrôlée et polyclonale de lymphocytes T activés en raison d'un défaut de Treg périphériques (Sadlack et al. 1995; Suzuki et al. 1995). Dans le modèle *IL2RB*^{-/-}, le transfert adoptif de LT provenant de souris non mutées, incluant des Treg, permet de maintenir l'homéostasie et prévient de l'auto-immunité (Suzuki et al. 1995). Ces observations ont été confirmées par la suite dans le modèle de Playfair et Marschall-Clark par l'équipe de Mqadmi en 2005. L'injection d'Ac ciblant le récepteur CD25 en amont de l'immunisation augmente l'incidence de l'AHAI de 30 à 90 % alors que le transfert adoptif de LT CD4⁺CD25⁺ spléniques de souris immunisées vers des souris naïves prévient l'induction des auto-Ac lors de leur xeno-immunisation par les GR (Mqadmi, Zheng, and Yazdanbakhsh 2005).

Par ailleurs dans le modèle *IL2RA*^{-/-} il a été décrit récemment une apoptose marquée des LT CD8⁺ régulateurs et une diminution de leur sécrétion d'IL-10 dans les ganglions des souris dont l'AHAI s'installe précocement (Mullins et al. 2020).

Plus récemment, les travaux entrepris dans le modèle HOD apportent des observations discordantes sur l'implication des Treg. Bien que la présence de LT autoréactifs soit confirmée en périphérie, la déplétion des Treg chez les souris HOD ne conduit pas à l'induction de l'AHAI suggérant que les Treg ne sont pas indispensables au maintien de la tolérance dans ce modèle (Richards 2016). Cette hypothèse est contredite par les travaux conduits par Hudson puis Wong sur les souris HOD⁺ OTII⁺. Les auteurs rapportent dans ce modèle l'absence de tolérance centrale vis-à-vis des GR en raison d'un défaut de présentation des Ag érythrocytaires dans le thymus et ils placent la tolérance périphérique au cœur de la régulation des populations autoréactives (Howie and Hudson 2018; Hudson et al. 2012; Wong et al. 2020).

Enfin, des expériences de transfert de tolérance dans le modèle de Playfair et Marshall-Clark menées par l'équipe de Dahal ont mis en évidence un rôle majeur deIDO (Indoléamine 2,3 dioxygénase) dans le maintien de la tolérance vis-à-vis des GR (Dahal et al. 2013).

IDO est une enzyme, principalement produite dans le microenvironnement par les macrophages et les DC, qui intervient dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel. Elle exerce un effet immunosuppresseur en entraînant un déficit local en tryptophane mais également en générant de l'acide 3-hydroxyanthranilique (*3-hydroxyanthranilic acid*, 3-HAA), un produit de dégradation aux propriétés immunorégulatrices, qui favorise la génération de Treg induits (Yan et al. 2010). Le blocage de l'activité de l'IDO par l'inhibiteur pharmacologique 1-MT (1-méthyl-D-tryptophan) abroge la génération et les fonctions suppressives des Treg (Chen et al. 2008).

Dans le modèle de Playfair et Marshall-Clark, l'administration de 1-MT empêche l'instauration d'une tolérance immunitaire efficace lors du transfert de Treg, et les souris développent rapidement une AHA (Dahal et al. 2013). Les auteurs s'appuient sur la littérature pour formuler l'hypothèse qu'une atteinte de l'activité deIDO pourrait être un des mécanismes mis en cause dans la rupture de tolérance vis-à-vis des GR.

Chez l'homme, les données sur l'implication des Treg dans la physiopathologie de l'AHAI sont parcellaires. En 2002, les travaux de Hall sur les PBMC de patients ont montré qu'après une stimulation par la protéine Rh, les Treg sont en mesure de réguler les Th1 par la sécrétion d'IL-10 (Hall et al. 2002).

Plus récemment, il a été décrit un déficit quantitatif des Treg circulants chez les patients au diagnostic d'AHAI, leur fréquence étant corrélée avec la concentration d'haptoglobine sérique (Ahmad, Elgohary, and Ibrahim 2011). De façon étonnante, les auteurs rapportent une augmentation de la sécrétion d'IL-10 dans le surnageant de culture des PBMC non stimulées comparativement aux PBMC de témoins, mais cette différence est annihilée lors de la stimulation des PBMC par du LPS.

Aucun article ne fait état des capacités fonctionnelles des Treg au cours de l'AHAI chez l'homme.

In fine, l'implication des populations lymphocytaires T CD4⁺ effectrices et régulatrices a été assez peu décrite au cours de l'AHAI chez l'homme. Bien que les LB autoréactifs jouent un rôle central dans la physiopathologie de l'AHAI et plus généralement au cours des MAI, leur maturation et leur activation sont conditionnées par la rupture de la tolérance des populations T vis-à-vis des Ag du soi. De plus, l'ensemble de la réponse auto-immune est influencé par l'équilibre de la balance pro/anti-inflammatoire des populations lymphocytaires T.

Les étapes de maturation des lymphocytes T sont intrinsèquement liées à l'établissement du répertoire du TCR et aux processus permettant la mise en place de la tolérance vis-à-vis des Ag du soi. De même, leur activation concourt directement à l'établissement de la tolérance périphérique garante du contrôle de l'homéostasie. C'est pourquoi nous poursuivrons cette introduction par un bref chapitre décrivant la tolérance des populations lymphocytaires T CD4⁺, leur différenciation et leur activation, puis nous terminerons par une revue approfondie des Treg, leurs caractéristiques et leurs propriétés fonctionnelles, dans un contexte physiologique et au cours de réponses auto-immunes.



2

La tolérance des lymphocytes T

2.1 Tolérance centrale de la lignée T	page 52
2.2 Activation et polarisation des populations lymphocytaires T CD4+	page 56
2.2.1 La synapse immunologique	page 56
2.2.2 Polarisation lymphocytaire	page 58
2.2.3 Différenciation des populations lymphocytaires T CD4+ mémoires	page 60
2.3 Tolérance périphérique	page 61

2 La tolérance des lymphocytes T

Même si les concepts sont constamment discutés et en permanente évolution, la tolérance immunitaire est définie comme le contrôle des réponses immunitaires dirigées contre les Ag du soi. Elle s'organise en deux processus successifs et complémentaires, la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

Les LT sont des acteurs de l'immunité adaptative et ils tirent leur capacité de reconnaissance antigénique de l'expression du TCR, chaque LT exprimant un TCR de spécificité unique. Tout le processus de maturation thymique des LT repose sur la création d'un répertoire antigénique *via* le réarrangement des chaînes du TCR puis sur l'élimination des lymphocytes aux potentiels autoréactifs, c'est la tolérance centrale. La tolérance périphérique intervient lors de l'activation des lymphocytes T. Elle permet de neutraliser les clones autoréactifs qui auraient échappés à la sélection thymique mais également de réguler la réaction immunitaire afin de préserver l'homéostasie des tissus inflammés. Les principales cellules effectrices de la tolérance périphérique sont les Treg.

2.1 Tolérance centrale de la lignée T conventionnelle

Les lymphocytes T sont issus d'un progéniteur hématopoïétique commun aux cellules myéloïdes et lymphoïdes, appelé MPP (*Multipotent Progenitor*) qui quitte la moelle osseuse pour rejoindre le thymus où il s'engage dans une différenciation lymphocytaire T. Dans le thymus, les progéniteurs des lymphocytes T sont appelés les *early thymic progenitors* (ETP) et ils s'organisent, dans la zone sous capsulaire, en niches cellulaires avec les cellules épithéliales thymiques (TEC) qui supportent leurs processus de différenciation (Klein et al. 2009; Buono et al. 2016).

Les ETP sont initialement qualifiés de cellules doubles négatives (DN) en raison de la non-expression des chaînes CD4 et CD8, puis elles entrent dans une première série de 4 stades de différenciation successifs, aboutissant à l'expression d'un TCR stable et fonctionnel (Godfrey, Rouse, and Wilkinson 1994)(**Figure 07**. Différenciation thymique des précurseurs lymphocytaires).

À mesure de leur différenciation, les précurseurs expriment progressivement la chémokine CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor*, Récepteur de Chémokine CXC) qui leur permet de rejoindre la zone corticale du thymus constituée des cellules stromales qui expriment son ligand CXCL12 (*C-X-C motif chemokine*, Chémokine à motif CXC). Ils perdent également l'expression de la molécule d'adhésion CD44 et expriment transitoirement la chaîne α du récepteur de l'IL-2, le CD25 (Godfrey, Rouse, and Wilkinson 1994). La différenciation est initiée par la signalisation de c-kit et la voie de Notch puis la transition du stade DN2 à DN3 est caractérisée par l'expression du gène *RAG* (*Recombination-Activating Gene*) ce qui permet le réarrangement des chaînes α et β du TCR (Schmitt et al. 2004; Buono et al. 2016). Ceci marque définitivement l'engagement dans la lignée lymphocytaire T (Mombaerts et al. 1992).

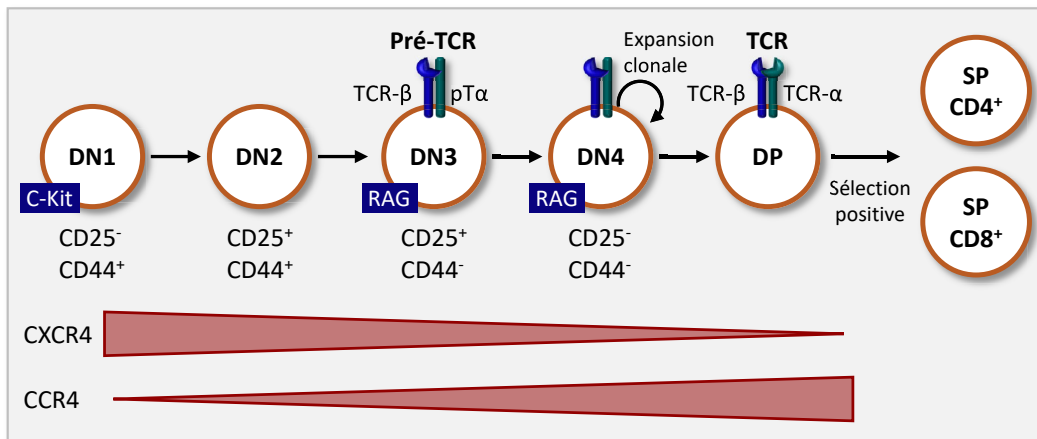


Figure 07. Différenciation thymique des précurseurs lymphocytaires

Adaptée de Fayard 2010 - En raison de la non-expression des chaînes CD4 et CD8, les précurseurs thymiques précoces sont qualifiés de cellules doubles négatives (DN). Quatre sous-populations DN évoluent séquentiellement et sont distinguées selon l'expression de CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) et CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique, de la fibronectine, du collagène). Les thymocytes au stade DN2 sont engagés dans la lignée T et initient le réarrangement de la chaîne β du TCR pour exprimer au stade DN3 un pré-TCR. S'il est fonctionnel, la signalisation du pré-TCR permet la progression vers le phénotype DN4 avec une expansion clonale et l'initiation du réarrangement de la chaîne α du TCR. Les cellules DP (double positive) sont caractérisées par l'expression concomitante de CD4 et de CD8 et entrent dans le processus de sélection positive basée sur l'affinité du TCR : les cellules DP dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe I reçoivent un signal de survie et perdent l'expression de CD4 : SP (*single positive*) CD8⁺; Les cellules DP dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe II reçoivent un signal de survie et perdent l'expression de CD8 : SP CD4⁺. Les cellules DP dont le TCR est non fonctionnel meurent par apoptose. Les cellules SP quittent le thymus vers la périphérie en tant que cellules T naïves. (c-Kit : Tyrosine-Protein Kinase Kit, RAG : *Recombination-Activating Gene*, TCR : *T cell receptor*)

Le TCR est un hétérodimère polymorphique formé, chez les LT conventionnels, par l'association des chaînes α et β , toutes deux constituées d'un domaine constant et d'un domaine variable (Dutta, Zhao, and Love 2021). Les cellules DN3 débutent par la synthèse de la chaîne β , dont le domaine variable est formé par le réarrangement des gènes variables fonctionnels D et J, puis V et DJ. Les enzymes RAG permettent les coupures aléatoires au niveau des séquences de recombinaison (RSS – *Recombination Signal Sequences*) encadrant les gènes V, D et J, puis les enzymes VDJ recombinases dirigent la ligature des séquences qui est accompagnée de l'excision ou de l'ajout aléatoire de nucléotides (Wilson, Held, and MacDonald 1994; McBlane et al. 1995; Dutta, Zhao, and Love 2021). La chaîne β se dimérise avec la pseudo-chaîne α (pT α), garante de sa stabilisation, et forme ainsi un pré-TCR permettant aux précurseurs d'accéder au stade DN4 (Fehling et al. 1995; Dutta, Zhao, and Love 2021). S'en suit une expansion clonale des cellules, l'activation des gènes codants pour les corécepteurs CD4 et CD8 puis la synthèse de la chaîne α selon un processus identique à la chaîne β , à l'exception du fait qu'elle est formée du réarrangement d'une séquence V et J uniquement. Le TCR final se forme ainsi par l'assemblage des chaînes α et β , avec CD3 qui transduit la signalisation du récepteur, et les corécepteurs CD4 et CD8 qui permettent respectivement la stabilisation de l'interaction du TCR avec les molécules du CMH de classe I ou II (Trop et al. 2000). Cette co-expression de CD4 et CD8 octroie aux précurseurs la qualification de cellules doubles positives (DP).

Le TCR ne reconnaît pas sa cible à l'état natif mais présentée par les molécules du CMH de classe I ou de classe II. Une première étape de sélection positive est alors nécessaire afin de sélectionner les précurseurs exprimant un TCR fonctionnel. Dans le cortex thymique, les cellules DP dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe I exprimées par les cTEC (*Cortical thymic epithelial cells*, cellules épithéliales thymiques de la zone corticale), reçoivent un signal de survie et perdent l'expression du corécepteur CD4, et les cellules dont le TCR reconnaît les molécules de CMH de classe II reçoivent un signal de survie et perdent l'expression du corécepteur CD8 (**Figure 08. Dynamique du développement lymphocytaire thymiques**). Les cellules DP dont le TCR est non fonctionnel ne reçoivent aucun signal et meurent par apoptose (Teh et al. 1988; Klein et al. 2009).

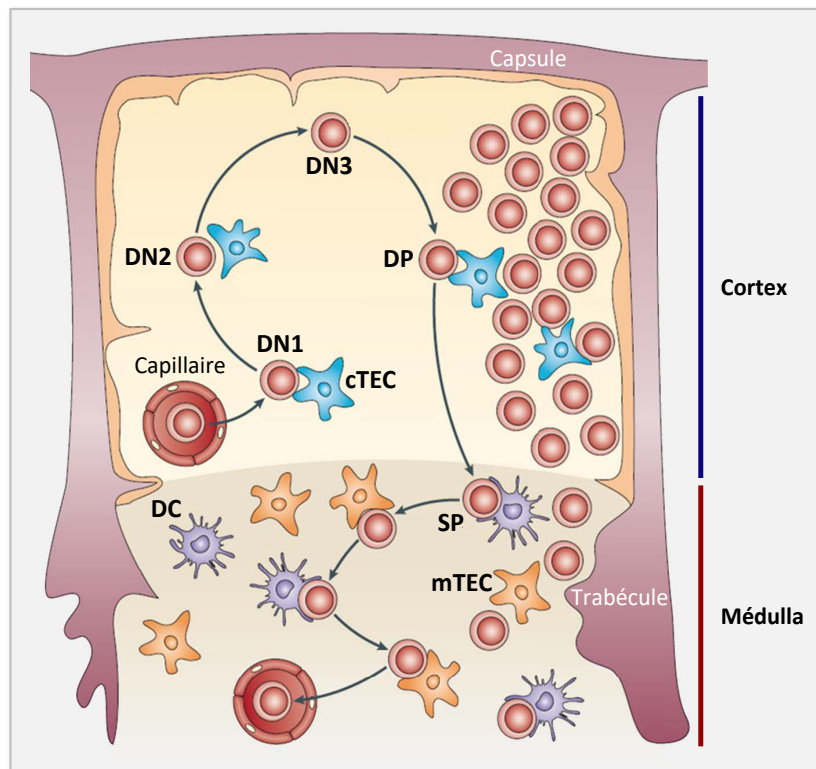


Figure 08. Dynamique du développement lymphocytaire thymique

Adaptée de Klein 2009 - Les précurseurs thymiques précoces entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire puis le développement des stade DN1 à DP est assisté par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) et s'accompagne d'une transmigration des précurseurs à travers la zone sous-capsulaire corticale. Après la sélection positive et l'engagement dans la lignée CD4 ou CD8, les thymocytes SP rejoignent la médulla où ils scannent pendant 3 à 4 jours les antigènes présentés par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et par les DC résidentes du thymus ou migratoires pour la sélection négative. Au terme de sa maturation, le thymocyte devient un lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ et quitte le thymus par la voie sanguine afin de gagner les organes lymphoïdes périphériques. (DN : Cellule Double Négative, DP : Cellule Double Positive, SP : Cellule Simple Positive)

Les précurseurs SP (*Single Positive*) diminuent l'expression de CXCR4 au profit de CCR4 (*C-C Chemokine Receptor*, Récepteur de Chémokine C-C) et CCR7 ce qui leur permet de quitter le cortex et de rejoindre la zone médullaire thymique (Campbell, Pan, and Butcher 1999). La variabilité combinatoire du réarrangement des gènes *VDJ* et la diversité jonctionnelle apportée par la ligature des séquences sont les sources de l'immense diversité des répertoires du TCR qui est estimé à 10^{18} chez l'homme (Mora and Walczak 2019). Etant donné le caractère stochastique de la génération du TCR, il s'en suit une étape finale de sélection négative qui permet d'éliminer les lymphocytes au potentiel autoréactif et de déterminer l'engagement vers la lignée des LT conventionnels ou régulateurs. La sélection négative thymique est un processus crucial pour prévenir le développement de pathologies auto-immunes. Elle est médiée par les cellules mTEC (*Medullary Thymic Epithelial Cells*) d'une part, qui présentent les Ag thymiques et dont l'expression des gènes *AIRE* (*Autoimmune regulator*) et *FEZF2* (*FEZ Family Zinc Finger 2*) leur permet également de présenter une très grande diversité d'Ag du soi d'origine extra-thymique (Anderson et al. 2002; Takaba et al. 2015). D'autre part, la médulla est infiltrée de DC résidentes du thymus ainsi que de DC migratoires et plasmacytoïdes qui présentent aux précurseurs les Ag ubiquitaires et les Ag du soi rencontrés en périphérie (Atibalentja, Byersdorfer, and Unanue 2009).

La spécificité du TCR avec les auto-Ag présentés, son affinité, son avidité (définie par l'ensemble des forces de liaison entre le TCR et le CMH) et la durée des interactions avec les molécules de CMH conditionnent le devenir possible des lymphocytes : la survie, la mort par apoptose ou la différenciation en Treg (**Figure 09**. Sélection négative thymique). Les lymphocytes ne reconnaissant pas les Ag du soi ou avec une très faible affinité, ne sont pas sélectionnés et survivent ; les lymphocytes ayant une forte affinité avec les Ag du soi mais dont l'interaction TCR/CMH est furtive reçoivent un signal d'activation modéré et s'orientent vers une différenciation en Treg thymique. Les lymphocytes ayant une interaction forte et prolongée avec les auto-Ag présentés sont hyperactivés et meurent par apoptose (Klein et al. 2009; Hinterberger et al. 2010).

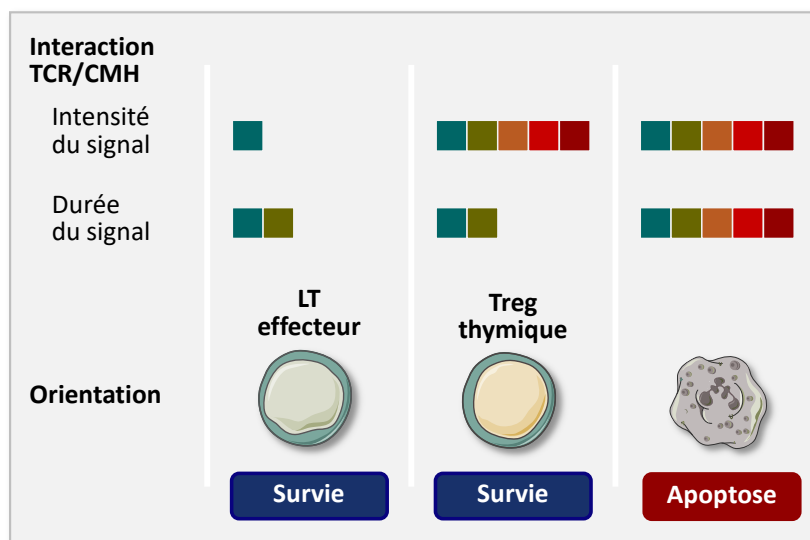


Figure 09. Sélection négative thymique.

Adaptée de Batignes 2019 - Lors de la sélection négative, l'intensité et la durée du signal émis par l'interaction entre le TCR des cellules SP et le CMH des mTEC détermine le devenir et l'orientation des précurseurs lymphocytaires. (CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, mTEC : cellules épithéliales thymiques de la zone médullaire, SP : *Single Positive*, TCR : *T Cell Receptor*, Treg : lymphocyte T régulateur)

Bien que la signalisation du TCR soit l'élément central de la sélection négative thymique, de nouveaux éléments rapportent que d'autres paramètres peuvent directement influencer le destin des lymphocytes, tels que la nature de l'auto-Ag et la nature de la cellule qui le présente. De même, l'ouverture du programme transcriptionnel des Treg thymiques requière très probablement un environnement cytokinique favorable, notamment la présence d'IL-2 et/ou d'IL-15 (Tai et al. 2013; Klein, Robey, and Hsieh 2019).

On estime que seul 5 % des lymphocytes différenciés dans le thymus sont ainsi sélectionnés et rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (OL2) (Thomas-Vaslin et al. 2008). Malgré cela, certains lymphocytes autoréactifs présentant un fort potentiel pathogène peuvent y échapper, en raison notamment de l'absence de présentation de certains peptides du soi. L'activation de ces populations sera contrôlée en périphérie par les Treg et les mécanismes de la tolérance périphérique.

A ce stade, les lymphocytes T effecteurs sont matures mais naïfs puisqu'ils n'ont jamais rencontré leur Ag. Ils sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD45RA, CD27 et CCR7. Les LT naïfs et les Treg thymiques expriment alors le récepteur de la sphingosine 1 phosphate (S1PR1, *Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1*) qui leur permet de rejoindre la jonction cortico-médullaire et de quitter le thymus par la circulation (Matloubian et al. 2004; Thangada et al. 2010).

2.2 Activation et polarisation des populations lymphocytaires T CD4⁺

Dans la circulation, les LT naïfs perdent l'expression de S1PR1 et rejoignent les OL2 par transmigration grâce à l'expression des récepteurs de domiciliation lymphatique CCR7 et CD62L (récepteurs respectifs de CXCL19, CXCL21 et de GlyCAM-1). Ils y circuleront continuellement jusqu'à leur rencontre avec une CPA dont ils sont spécifiques (Hwang et al. 2018). L'activation et la polarisation des lymphocytes peuvent également avoir lieu au sein des structures lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) qui constituent un réseau diffus de structures lymphoïdes secondaires situé sous l'épithélium de la muqueuse de différents organes, tel que les bronches, l'intestin grêle, la cavité nasale, la peau... (Coombes et al. 2007).

2.2.1 La synapse immunologique : reconnaissance de l'Ag et activation des LT CD4⁺

Lors de la détection d'un signal danger dans les tissus, les DC sont activées, rejoignent les OL2 et présentent les Ag rencontrés en périphérie. Dans les zones corticales des ganglions lymphatiques ou de la rate, les lymphocytes naïfs inspectent la surface des CPA matures à la recherche du complexe CMH-peptide de même spécificité que leur TCR. Dans le cas d'une rencontre spécifique, s'en suit la formation d'une synapse immunologique dont les différents récepteurs supportent les 3 étapes indispensables à l'activation complète des lymphocytes (Bakdash et al. 2013; Chen and Flies 2013) (**Figure 10**. Synapse immunologique).

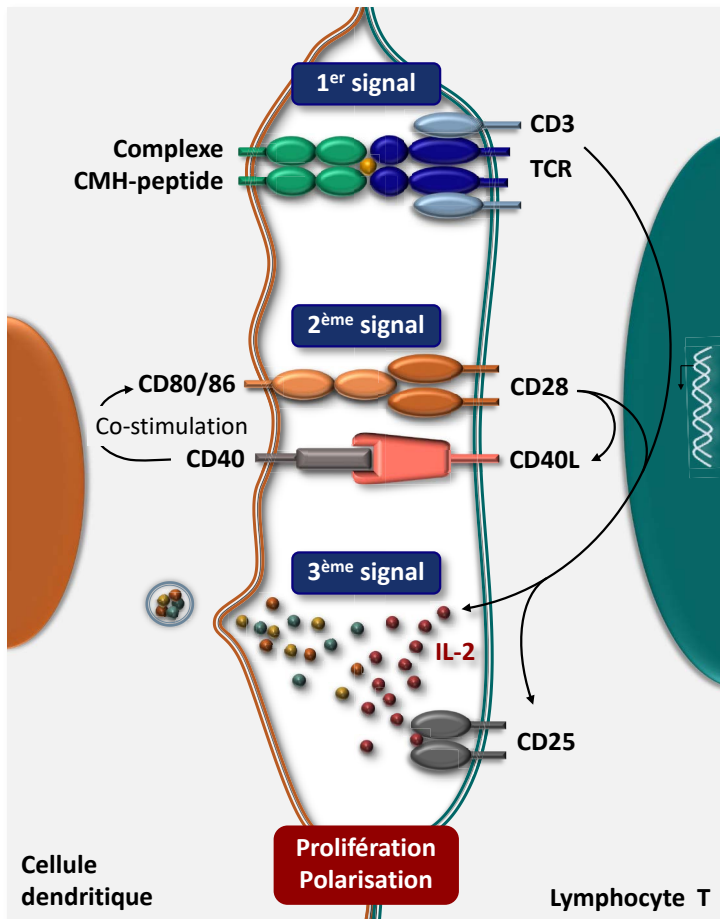


Figure 10. Synapse immunologique

Les trois signaux indispensables à l'activation complète des LT ont lieu au sein d'une synapse immunologique formée entre le LT et une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le premier signal engage le TCR qui se lie au complexe CMH-peptide dont il est spécifique. Le deuxième signal est délivré par l'axe de costimulation CD28 - CD80/CD86 qui entraîne une boucle d'amplification en augmentant l'expression de CD40L à la surface des LT qui, en se liant à CD40 induit à son tour l'augmentation de l'expression de CD80/CD86. Le troisième signal est médié par la signalisation du récepteur de l'IL-2 et des cytokines sécrétées dans le microenvironnement par les CPA qui permettent ainsi la prolifération des LT et l'orientation de leur polarisation. (CMH, Complexe Majeur d'Histocomptabilité, IL : interleukine, LT : Lymphocyte T, TCR : T Cell Receptor,)

Le premier signal engage le TCR qui se lie au complexe CMH-peptide, apprêté par la CPA, dont il est spécifique. La durée et la stabilité de cette interaction conditionnent l'efficacité du premier signal, qui dépend principalement de l'affinité du TCR pour l'Ag, mais également du nombre de molécules de CMH exprimées par la CPA, de l'ancrage des molécules corécepteurs CD4/CD8 et des molécules d'adhésion (Melief 2003). Le 1^{er} signal, nécessaire mais non suffisant, initie la formation de la synapse immunologique, l'activation des voies de transcriptions anti-apoptotiques et la production de l'IL-2, facteur de croissance majeur pour les LT (Chen and Flies 2013).

Simultanément, le deuxième signal est délivré par la molécule de costimulation CD28 qui se lie aux molécules CD80 et CD86 exprimées par la CPA. Cette interaction provoque l'expression de CD40L (CD154) à la surface des LT qui, en se liant à CD40 exprimé par les CPA, induit à son tour l'augmentation de l'expression de CD80/CD86. Cette boucle d'amplification est régulée par l'expression concomitante de CTLA-4 (CD152), corécepteur de très haute affinité, qui va entrer en compétition avec CD28 pour se lier à CD80/CD86 et transmettre un signal inhibiteur (Miller et al. 2009).

L'absence de second signal entraîne soit une anergie soit une apoptose des lymphocytes. En revanche, l'action conjointe des signaux délivrés par le TCR et des récepteurs de costimulation conduit à l'activation de la voie mTOR, à la sécrétion d'IL-2, et à l'expression de la chaîne α de son récepteur (chaîne de haute affinité - CD25) (Boise et al. 1995; Miller et al. 2009). Les cellules activées entrent en cycle cellulaire pour une phase d'expansion clonale.

Le troisième signal est médié par la signalisation du récepteur de l'IL-2 et des cytokines sécrétées dans le microenvironnement par les CPA qui orientent ainsi la polarisation des lymphocytes (de Jong, Smits, and Kapsenberg 2005). Les cellules perdent alors l'expression de CD45RA au profit de l'isoforme courte CD45RO.

2.2.2 Polarisation lymphocytaire

Le sécrétome des CPA diffère selon le contexte inflammatoire et notamment selon les signaux danger auxquels elles ont été exposées. Elles orientent ainsi la polarisation des LT CD4⁺ en sous-populations fonctionnelles, qui se distinguent par l'expression de programmes transcriptionnels différents et qui apportent une réponse adaptatrice optimisée (Zhu, Yamane, and Paul 2010; Fang and Zhu 2017).

On identifie trois voies majeures de polarisation fonctionnelle (Th1, Th2 et Th17) et les CPA orientent également vers deux voies de polarisation particulière : les TFH, indispensables à l'établissement d'une réponse humorale mémoire et les LT régulateurs induits (iTReg), essentiels à la régulation des réponses cellulaires et humorales (**Figure 11**. Polarisation lymphocytaire).

Dans un contexte d'infections bactériennes intracellulaires, virales, ou de réponse antitumorale, l'environnement cytokinique riche en IL-12 favorise la polarisation des LT activés vers la réponse Th1. Sous la dépendance du facteur de transcription T-bet (*T-box transcription factor*), les Th1 expriment

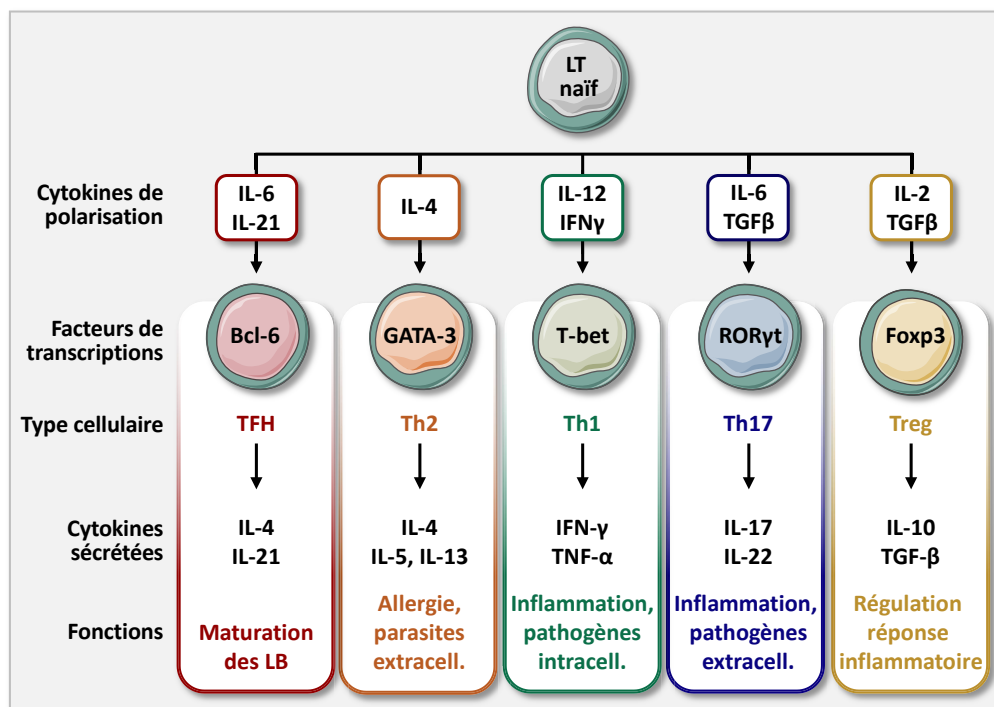


Figure 11. Polarisation lymphocytaire

Suite à la reconnaissance de l'antigène dont ils sont spécifiques, les lymphocytes T naïfs s'activent et se polarisent sous l'influence du microenvironnement cytokinique en différentes sous-populations aux fonctions effectrices spécialisées. (Bcl-6 : *B-cell Lymphoma-6*, Foxp3 : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3*, GATA-3 : *GATA Binding Protein 3*, IFN- γ : Interferon- γ , IL: Interleukine, LT : Lymphocyte T, ROR γ t : *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γ t*, T-bet : *T-box Transcription Factor*, TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* , TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*)

les récepteurs de chémokines CXCR3 et CCR5. Les Th1 vont produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*) et l'IL-2, qui vont participer à l'activation des LT cytotoxiques, des macrophages et des cellules NK (Wan 2010; Iwasaki and Medzhitov 2015).

La sécrétion d'IL-4 en réponse à une infection parasitaire ou au cours des maladies allergiques (atopie), favorise la polarisation Th2, sous la dépendance de *GATA3* (*GATA binding protein 3*) (Zhu et al. 2006). Les Th2 expriment le récepteur de la prostaglandine D2 (CD294 ou CRTh2, *Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on T-Helper type 2 cells*), et sécrètent de nombreuses cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 ou l'IL-13 qui vont orienter la commutation de classe isotypique des immunoglobulines vers la production d'IgE et entraîner le recrutement de polynucléaires éosinophiles et des mastocytes (Wan 2010; Iwasaki and Medzhitov 2015).

La polarisation des Th17 survient dans le cadre d'infection par des germes extracellulaires, sous l'influence de l'IL-6 et du TGF- β (Veldhoen et al. 2006). Ils sont caractérisés par l'expression de ROR- γ t (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γ t*), ils expriment CCR6, sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-17A, IL-17F ou IL-21 et amplifient la réaction inflammatoire aiguë en recrutant précocement des polynucléaires neutrophiles (Ivanov et al. 2006; Littman and Rudensky 2010).

L'engagement des LT CD4⁺ dans l'une de ces 3 voies réprime la polarisation des autres axes. Ainsi, la sécrétion d'IFN- γ ou d'IL-4 inhibe la polarisation Th17, alors que l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-12 est négativement régulée lors de l'engagement du lymphocyte vers la voie Th17 (Steinman 2007; Toh et al. 2010). T-bet réprime les gènes associés à la polarisation Th2 tels que *GATA3* et *IL4* alors que *GATA3* inhibe indirectement la transcription de l'IFN- γ (Hwang et al. 2005). Néanmoins, il ne s'agit pas d'une différenciation définitive et en fonction de l'environnement, un LT peut évoluer d'une polarisation à l'autre, ce qui traduit sa plasticité.

Les TFH sont définis comme la population lymphocytaire T spécialisée dans la maturation des LB (Crotty 2019). La stimulation concomitante du récepteur ICOS (*Inductible T cell COStimulator*) et du TCR par un antigène de très haute affinité induit l'expression du facteur de transcription Bcl-6 (*B-cell lymphoma-6*) qui va alors stimuler l'expression de CXCR5, récepteur de la chémokine CXCL13 (Choi et al. 2011). Alors que la production d'IL-6 et d'IL-21 soutient la polarisation des TFH, l'IL-2 en est un puissant inhibiteur (Ballesteros-Tato et al. 2012). Les TFH nouvellement différenciés expriment fortement CXCR5 et diminuent leur expression de CCR7 ce qui leur permet de rejoindre les zones B où ils sont colocalisés avec les DC folliculaires (FDC, *Follicular Dendritic Cells*) qui sécrètent CXCL13 (Crotty 2019).

En réponse à un microenvironnement riche en TGF- β et en l'IL-2, les LT sont polarisés en Treg induits qui permettront de réguler la réponse pro-inflammatoire et de maintenir l'homéostasie des tissus. Les LT activés ouvrent alors le programme transcriptionnel de Foxp3, augmentent l'expression du récepteur de l'IL-2 et produisent des cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et TGF- β (Chen et al. 2003). La discrimination en périphérie des Treg thymiques et des Treg induits est très difficile et les détails de leurs phénotypes et de leurs fonctions seront exposés dans le chapitre qui leur est consacré.

Quatre à cinq jours sont nécessaires à l'activation complète et à l'expansion clonale des LT effecteurs puis ils quittent les OL2 grâce à la diminution de l'expression de CCR7, de CD62L et à l'augmentation de S1PR1 (Krummel, Bartumeus, and Gérard 2016; Cyster and Schwab 2012). L'expression du programme d'adressage des LT effecteurs leur permettant de rejoindre le site d'inflammation dépend de la polarisation dans laquelle ils sont engagés et au site ganglionnaire d'activation du LT naïf (Krummel, Bartumeus, and Gérard 2016; Campbell and Butcher 2002).

2.2.3 Différenciation des populations lymphocytaires T CD4⁺ mémoires

La mise en place de la mémoire immunologique de long terme intervient au moment de la résolution de la réponse adaptatrice, plus précisément lors de la contraction clonale durant laquelle près de 90 % des LT effecteurs sont éliminés (Kaech, Wherry, and Ahmed 2002). Elle se traduit par la différenciation de populations LT CD4⁺ mémoires dont la fonction protectrice peut perdurer jusqu'à 30 années après le contact antigénique initial (Hsieh et al. 2004).

Les cellules immunitaires mémoires ont des caractéristiques fonctionnelles qui leurs permettent d'apporter une réponse secondaire à l'Ag plus rapide et plus efficace (London, Lodge, and Abbas 2000). Pour un Ag donné, la fréquence des populations mémoires est plus de 100 fois supérieure à celle des LT naïfs, et elles expriment un TCR de haute affinité du fait de leur mode de sélection (Blattman 2002). Elles expriment des marqueurs d'adhésion cellulaire qui facilitent l'inspection des CPA et elles ont une cinétique de sécrétion de cytokines et de prolifération plus rapide (Strutt et al. 2012; Rogers, Dubey, and Swain 2000).

La chronologie et les mécanismes impliqués dans la différenciation et le maintien des populations mémoires sont encore débattus mais une fois de plus, la force de l'engagement du TCR et l'environnement cytokinique semblent conditionner la distinction de 2 profils de LT effecteurs (**Figure 12. Populations lymphocytaires mémoires**) :

- Les cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC, *Short Lived Effector Cells*) destinée à exercer leurs fonctions effectrices puis à mourir par apoptose
- Les cellules précurseurs mémoires (MPEC, *Memory Precursor Effector Cells*) qui exercent leurs fonctions effectrices puis qui se différencient en populations mémoires (Cui 2010, Krueger 2021).

Les populations mémoires diffèrent par leur potentiel effecteur ou prolifératif et par leur localisation, ce qui se traduit par une expression différentielle des marqueurs de surface. On distingue classiquement 3 stades de LT CD4⁺ mémoires, les LT centraux mémoires (TCM), les LT effecteurs mémoires (TEM), les LT effecteurs terminaux (TEMRA, LT Effecteurs Mémoires CD45RA⁺) (Harari et al. 2006; Mueller et al. 2013).

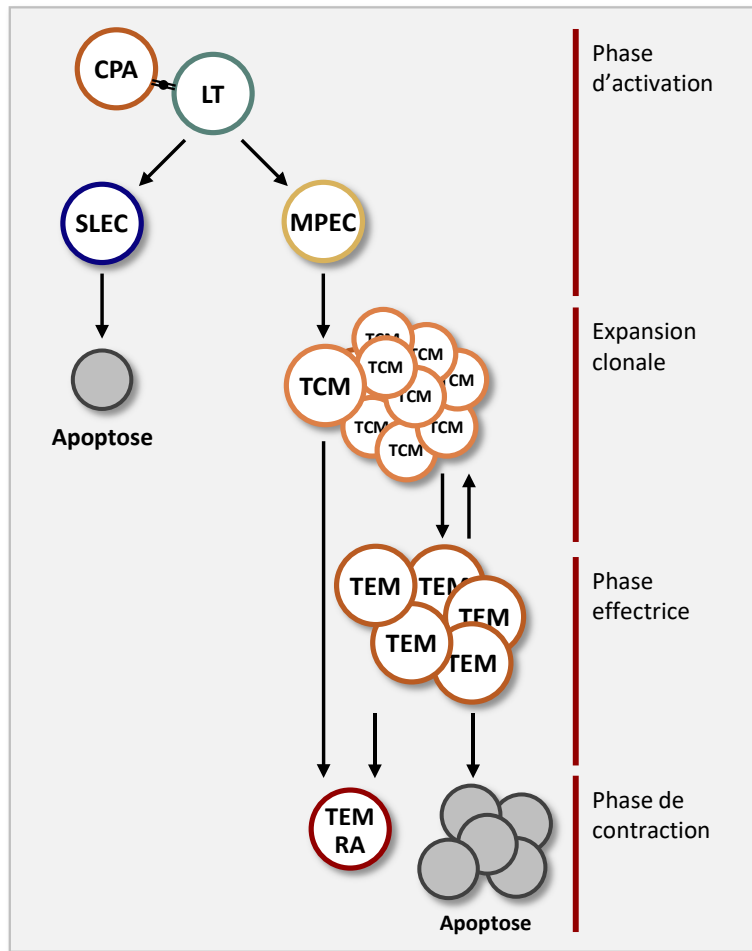


Figure 12. Populations lymphocytaires mémoires

Suite à l'activation des LT naïfs, les cellules s'orientent soit vers un profil de cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC, *Short-Lived Effector Cells*), destinées à exercer leurs fonctions effectrices puis à mourir par apoptose, soit vers un profil de cellules précurseuses mémoires (MPEC, *Memory Precursor Effector Cells*) qui exercent leurs fonctions effectrices puis se différencient en populations mémoires. On distingue parmi les populations mémoires les LT centraux mémoires (TCM), les LT effecteurs mémoires (TEM), les LT effecteurs terminaux (TEMRA, LT effecteurs mémoires CD45RA⁺). CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène.

Les TCM ont une localisation préférentiellement lymphatique, ils ne disposent pas de fonctions effectrices directes mais sont dotés de grandes capacités prolifératives. Ce sont eux qui assureront la mise en place de la réponse cellulaire lors de la prochaine rencontre antigénique et qui ont la capacité de se différencier en TEM ou TEMRA (Mueller et al. 2013). Ils ont le phénotype suivant : CD44^{high}CD45RA⁻CD45RO⁺CD95⁺CD27⁺CCR7⁺CD62L⁺.

Les TEM en revanche assurent des fonctions effectrices très efficaces par la sécrétion de cytokines, alors que leur capacité proliférative est limitée. Ils ont le phénotype suivant : CD44^{high}CD45RA⁻CD45RO⁺CD95⁺CD27⁻CCR7⁻CD62L⁻.

Les TEMRA enfin représentent le stade terminal de différenciation lymphocytaire. Ils disposent pour autant de fonctions effectrices importantes et sont caractérisés par le phénotype suivant : CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD95⁺KLRG1⁺CD27⁻CCR7⁻CD62L⁻.

2.3 Tolérance périphérique

Bien que la tolérance centrale mette en jeu des mécanismes très efficaces, il persiste en périphérie des lymphocytes T autoréactifs. La tolérance périphérique définit l'ensemble des processus qui d'une part interviennent pour empêcher l'activation de ces populations autoréactives et d'autre part permettent le contrôle de la réponse immunitaire jusqu'à sa résolution. Elle permet de limiter

l'endommagement des tissus adjacents et d'éviter une dérive vers un syndrome prolifératif, un syndrome auto-inflammatoire, ou une maladie auto-immune qui peuvent survenir lors de l'accumulation de lymphocytes activés. C'est le maintien de l'homéostasie.

On distingue les mécanismes de tolérance périphérique intrinsèque lorsqu'ils sont directement déclenchés par le LT en réponse à sa stimulation par la CPA, des mécanismes extrinsèques qui requièrent l'intervention de cellules tierces.

Quatre mécanismes intrinsèques sont décrits :

- L'apoptose : c'est probablement le mécanisme le plus important, il est indispensable à la contraction clonale des LT et son activation est en partie déterminée par l'avidité du TCR et la quantité d'Ag présents. Suite à l'activation répétée de leur TCR, les lymphocytes deviennent sensibles à l'apoptose notamment par la signalisation de l'axe Fas/FasL qui aboutit à l'activation des caspases 8 et/ou 10 (Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Morgan et al. 1999; Brenner, Krammer, and Arnold 2008).
- L'ignorance : elle se produit lorsque l'Ag n'est pas présent en quantité suffisante pour permettre l'activation du LT autologue ou lorsqu'il est présent dans les sanctuaires immunologiques (système nerveux central, œil, testicules, utérus) empêchant sa présentation par les CPA dans les OL2. Ce mécanisme peut toutefois être levé lorsqu'une rupture de la barrière anatomique du tissu intervient, exposant ainsi les Ag au système immunitaire (Miller and Heath 1993).
- L'anergie : il s'agit d'un état d'inactivation fonctionnelle des LT caractérisé par une répression de la signalisation du TCR, un blocage du cycle cellulaire et une inhibition de la production d'IL-2 (Harding et al. 1992; Chen and Flies 2013). Elle est déclenchée lorsque le TCR est activé par le CMH en l'absence de signal de costimulation médié par CD28, notamment lorsque les CPA n'expriment pas ou pas suffisamment CD80/86. Elle est également médiée par la signalisation des points de contrôles immunitaires tels que CTLA-4 ou PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) (Walunas and Bluestone 1998; Freeman et al. 2000).
- La déviation phénotypique : elle consiste en une déviation de la polarisation des LT effecteurs Th1 vers un profil Th2, moins pathogénique dans un contexte d'auto-immunité (Young et al. 2000; Pakala, Kurrer, and Katz 1997; Walker and Abbas 2002). Ce mécanisme est médié par la signalisation du TCR et par l'environnement cytokinique présent lors de la réponse immunitaire. Il repose sur la plasticité des cellules polarisées.

Le maintien de la tolérance périphérique nécessite par ailleurs l'intervention de cellules aux propriétés suppressives, qui s'organisent pour contrôler la réponse immunitaire jusqu'à sa résolution, pour limiter l'endommagement des tissus adjacents, et éviter une dérive vers un syndrome auto-inflammatoire ou une maladie auto-immune.

Les Treg sont les principaux garants du maintien de la tolérance périphérique mais il existe d'autres populations aux propriétés suppressives qui y concourent. Elles sont induites localement à partir des

populations lymphocytaires et myéloïdes présentent dans le tissu inflammé. La plupart tirent leurs propriétés fonctionnelles de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, de l'expression de ligands des points de contrôle immunitaires, ou d'enzymes (**Tableau 05**. Autres populations aux propriétés suppressives).

Type cellulaire	Molécules régulatrices	Fonctions	Références
cDC	CTLA-4, PD-1, ICOS, Fas, TRAIL, IDO, AR, TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anergie des lymphocytes T ▪ Induction d'apoptose ▪ Induction et entretien des Treg 	(Hasegawa and Matsumoto 2018)
pDC	IDO, PD-L1, IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires 	(Audiger et al. 2017)
Macrophage M2	IL-10, TGF- β , IL-1Ra	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induction et entretien des Treg 	(Murray 2017)
Mreg	TGF- β , AR, IDO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires ▪ Induction et entretien des Treg 	(Riquelme and Hutchinson 2018)
Neutrophiles supresseurs	IL-10, Arg-1, ROS, PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires ▪ Induction d'apoptose 	(Yang et al. 2017; de Kleijn et al. 2013)
NK	TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induction et entretien des Treg 	(Chong et al. 2010)
ILC3	CMH II	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anergie des lymphocytes T 	(Hepworth et al. 2013)
Breg	IL-10, IL-35, TGF- β , PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires ▪ Induction et entretien des Treg 	(Catalán et al. 2021)
Tr1	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires 	(Groux et al. 1997)
Th3	TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induction et entretien des Treg 	(Chen et al. 1994)
iT _R 35	IL-35	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suppression des réponses pro-inflammatoires ▪ Entretien des Treg 	(Collison et al. 2007)

Tableau 05. Autres populations aux propriétés suppressives

AR : Acide rétinolique, Breg : Lymphocyte B Régulateur, cDC : *Conventional Dendritic Cell*, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, CTLA-4 : *Cytotoxic-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein*, ICOS : *Inductible T cell COStimulator*, IDO : *Indoléamine 2,3 dioxygénase*, iT_R35 : *IL-35 Induced Regulatory T Cell Population*, Mreg : Macrophages Régulateurs, Arg-1 : arginase 1, NK : *Natural Killer*, ILC3 : *Innate lymphoid cells 3*, PD-1 : *Programmed Cell Death Protein 1*, pDC : *Plasmacytoid Dendritic Cell*, PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*, IL : Interleukine, ROS : *Reactive Oxygen Species*, TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* , Th3: Lymphocyte Helper 3, TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, Tr1 : Lymphocyte T Régulateur 1, Treg : LT régulateur.

L'efficacité de la tolérance périphérique est déterminante lors de la rencontre extra-thymique entre un LT naïf et son Ag, mais également lors de stimulations répétées dans un contexte d'infection chronique. Son altération peut conduire à une rupture de tolérance vis-à-vis des Ag du soi et au déclenchement d'une maladie auto-immune. Le rôle des Treg dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi est central et une altération quantitative ou fonctionnelle de leur lignée a été rapportée dans de nombreuses MAI telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus systémique, ou l'encéphalite auto-immune (Wing, Tanaka, and Sakaguchi 2019). Pour autant, il est généralement difficile de déterminer si une telle anomalie des Treg représente une cause ou une conséquence d'une réponse auto-immune.

Nous consacrerons par conséquent ce 3^{ème} et dernier chapitre d'introduction aux Treg.



3

Les Treg

3.1 Caractérisation des Treg	page 68
3.1.1 Découverte des Treg	page 68
3.1.2 Foxp3, le régulateur dominant des Treg	page 69
3.1.3 Phénotype des Treg	page 74
3.2 Mécanismes fonctionnels des Treg	page 79
3.2.1 Les cytokines anti-inflammatoires	page 80
3.2.2 Répression des cellules présentatrices d'antigènes	page 82
3.2.3 Perturbation métabolique	page 84
3.2.4 Cytolyse directe	page 86
3.2.5 Autres mécanismes immunosuppresseurs	page 86
3.2.6 Rôle non régulateur des Treg	page 87
3.3 Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg : adaptabilité, plasticité et stabilité	page 87
3.3.1 Stabilité des Treg	page 88
3.3.2 Plasticité et instabilité des Treg	page 90
3.3.3 Cas controversés de OX40L et du TNF- α	page 92

3 Les Treg

Les Treg sont les cellules suppressives les mieux caractérisées. Elles sont classiquement définies par la forte expression de CD25 et du facteur de transcription Foxp3 et jouent un rôle décisif dans le maintien de la tolérance vis-à-vis du soi et de l'homéostasie immunitaire. Elles exercent leurs fonctions suppressives sur l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices de l'ensemble des cellules immunitaires, et en tout premier lieu sur les LT.

La nomenclature des Treg peut être disparate dans la littérature, ainsi dans un souci de clarté, nous abrègerons ainsi les Treg thymiques (tTreg) et les Treg induits (iTreg) en rapport avec leur mode de développement puis les Treg effecteurs (eTreg) et les Treg naïfs (nTreg) selon leur état d'activation. Nous exposerons dans ce chapitre les caractéristiques des Treg et leurs propriétés fonctionnelles, agrémentées d'exemples de leur implication au cours de MAI ou de maladies inflammatoires.

3.1 Caractérisation des Treg

3.1.1 Découverte des Treg

Les premières expériences suggérant l'existence de cellules T suppressives datent du début des années 1970. Une partie des travaux se sont initialement concentrés sur l'induction expérimentale de populations lymphocytaires T suppressives capables soit d'instaurer un état de tolérance, soit de réguler une réponse vis-à-vis d'un Ag exogène (Gershon and Kondo 1970; Chen et al. 1994; Kuchroo et al. 1994).

Parallèlement, une seconde approche consistant à étudier le développement de maladies auto-immunes a permis de démontrer l'existence non seulement de cellules d'origine thymique autoréactives capables d'induire activement une réponse auto-immune, mais également de cellules T capables de contrôler cette réponse auto-immune. Les travaux pionniers de Nishizuka 1969 ont montré que la réalisation d'une thymectomie néonatale le 3^{ème} jour de la vie des souris conduisait au développement de manifestation auto-immunes (Nishizuka and Sakakura 1969; Taguchi and Nishizuka 1981). Ces observations ont été confirmées à plusieurs reprises dans différents modèles murins (Penhale et al. 1973; Taguchi and Nishizuka 1981; Kojima and Prehn 1981), puis il a été démontré que l'injection de LT CD4⁺ ou de thymocytes matures CD4⁺ issus de souris syngéniques saines permettaient de résorber ces manifestations (Penhale et al. 1976; Sakaguchi, Takahashi, and Nishizuka 1982). Inversement, le transfert adoptif des LT CD4⁺ des animaux malades à des souris syngéniques, dépourvues de LT, conduisait au développement des manifestations auto-immunes chez les souris receveuses (Sakaguchi, Takahashi, and Nishizuka 1982; Sakaguchi et al. 1985)

Sur la base de protocoles expérimentaux similaires, les équipes de Sakaguchi, Powrie et Morrissey ont précisé les caractéristiques phénotypiques des cellules aux propriétés suppressives en affinant le phénotype des populations transférées. Ils ont ainsi identifié les premiers marqueurs des populations régulatrices murines, le CD5 (Sugihara et al. 1988; Sakaguchi et al. 1985), le CD45RB (Morrissey et al. 1993; Powrie et al. 1993) puis à la fin des années 1990, la chaîne α du récepteur de l'IL-2, le CD25 (Asano et al. 1996; Sakaguchi et al. 1995; Takahashi et al. 1998; Itoh et al. 1999). Enfin, en 2001 une

série de travaux menés chez l'homme a permis d'isoler et de caractériser plus précisément une population lymphocytaire circulante, CD4⁺CD25^{high}, d'origine thymique, naturellement anergique et aux propriétés suppressives, les lymphocytes T régulateurs (Baecher-Allan et al. 2001; Dieckmann et al. 2001; Jonuleit et al. 2001; Levings, Sangregorio, and Roncarolo 2001).

De façon concomitante, la description de l'action des Treg a été étendue au-delà du contexte du maintien de la tolérance vis-à-vis du soi et de l'auto-immunité. Dans des modèles de greffe de peau allogénique et d'immunisation par des protéines exogènes, la reconstitution des populations lymphocytaires T des souris athymiques par des lymphocytes CD4⁺CD25⁻ intensifiait la réponse immunitaire tandis que la reconstitution par des lymphocytes CD4⁺CD25⁺ la diminuait (Sakaguchi et al. 1995; Modigliani et al. 1995).

3.1.2 Foxp3, le régulateur dominant des Treg

Foxhead box P3 (Foxp3) est le facteur de transcription dominant des Treg, son expression est essentielle à leur développement et il est indispensable au maintien de l'identité de la lignée Treg. Il a été découvert au début des années 2000 et son implication dans le développement des populations de Treg a été démontré par la description de l'altération fonctionnelle de son gène (*FOXP3*) dans le modèle de souris de phénotype scurfy puis chez les patients atteints du syndrome IPEX (Brunkow et al. 2001; Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001; Fontenot, Gavin, and Rudensky 2003; Hori, Nomura, and Sakaguchi 2003; Khattri et al. 2003). Au cours de ce syndrome, des mutations entraînent une perte de fonction du gène *FOXP3* ce qui conduit à un profond déficit en Treg fonctionnels, une rupture de la tolérance et au développement de multiples manifestations auto-immunes létales.

Le gène *FOXP3* est codé sur le bras court (p) du chromosome X, il est constitué de 11 exons, d'un promoteur à faible potentiel d'activation et de 4 séquences non codantes (*Conserved Non-Coding Sequences*, CNS) indispensables à l'initiation, à la régulation et au maintien de la transcription de Foxp3 (Zheng et al. 2010; Lu, Barbi, and Pan 2017) (**Figure 13**. Structure et régulation du gène FOXP3).

En réponse à la signalisation du TCR et des voies de costimulation, le promoteur de Foxp3 est activé par AP-1 (*Activating Protein-1*) et NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Mantel 2006), mais il peut également être initié par la liaison de Foxo1-Foxo3 (*Forkhead Box Class O*), ou de CREB-ATF1 (*C-AMP Response Element-binding protein - Activating Transcription Factor 1*) (Ouyang et al. 2010; Kim and Leonard 2007). Il a récemment été décrit, au cours de la différenciation des Treg thymiques, que l'amorçage du promoteur était rendu possible par CNS0, située en aval, et ciblée par Stab1 et MLL4 (*Mixed-Lineage Leukemia 4*) (Kitagawa et al. 2017; Placek et al. 2017).

C'est CNS3 qui joue le rôle de commutateur épigénétique, en réponse à la liaison de c-Rel, elle permet la modification des histones et initie la transcription de Foxp3 (Feng et al. 2015; Ruan et al.

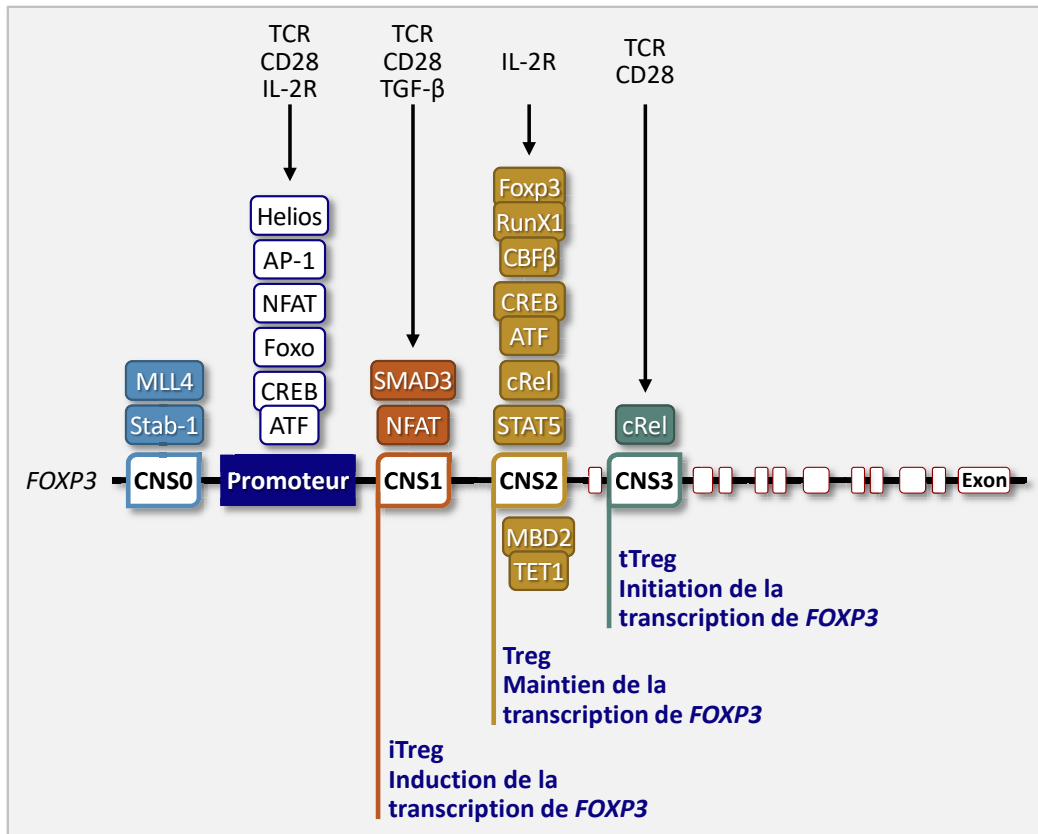


Figure 13. Structure et régulation du gène *FOXP3*

Adaptée de Lu 2017 - Représentation des séquences non codantes conservées (CNS), du promoteur et des exons du gène *FOXP3* ainsi que des facteurs de transcription qui activent sa transcription et leurs sites d'interaction. (AP-1 : *Activating Protein-1*, ATF : *Activating Transcription Factor*, CBFβ : *Core Binding Factor Subunit β*, CNS : *Conserved Non-Coding Sequences*, CREB : *C-AMP Response Element-Binding Protein*, Foxo : *Forkhead Box Class O*, *FOXP3* : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3*, iTreg : *Induced Regulatory T Cell*, MBD2 : *Methyl-CpG-binding domain protein 2*, MLL4 : *Mixed-Lineage Leukemia 4*, NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells*, RunX1 : *Runt-Related Transcription Factor 1*, SMAD3 : *Mothers Against DPP Homolog 3*, Stab-1 : *Stabilin 1*, STAT5 : *Signal Transducers and Activators of Transcription 5*, TCR : *T Cell Receptor*, IL-2R : *Interleukin 2 Receptor*, TET1 : *Ten-Eleven Translocation Demethylases 1*, TGF-β : *Transforming Growth Factor-β*, Treg : *LT régulateur*, tTreg : *Thymic Regulatory T Cell*)

2009). L'activation de CNS3 est essentielle au développement des Treg thymiques, elle ne semble en revanche pas nécessaire au maintien de l'expression de *Foxp3*.

A contrario, CNS1 soutient l'expression de *Foxp3* pendant la différenciation des Treg induits puisque les souris déficientes en CNS1 développent des troubles du maintien de la tolérance périphérique en raison de l'absence d'induction de Treg, mais elles ne développent pas de manifestations auto-immunes létales grâce à la persistance des Treg thymiques (Schlenner et al. 2012; Josefowicz et al. 2012). Lors de l'activation des lymphocytes T, la signalisation de la voie SMAD induite par le TGF-β conduit à la liaison de SMAD3 et NFAT avec CNS1 et ainsi à la transcription de *Foxp3* (Tone et al. 2008).

La séquence CNS2 permet la stabilisation et la régulation de la transcription de *FOXP3* par les Treg. Elle peut être ciblée par de nombreux effecteurs tels que c-Rel, CREB-ATF1, RunX1-CBFβ-*Foxp3* (*Runt-*

Related Transcription Factor 1 - Core Binding Factor Subunit θ) ou STAT5 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Zheng et al. 2010), elle se lie alors à MBD2 (*Methyl-CpG-binding domain protein 2*) et recrute TET1 (*Ten-Eleven Translocation Demethylases 1*), ce qui lui permet de maintenir un état hypométhylé des sites CpG (Wang et al. 2013; Toker et al. 2013). C'est ainsi que la signalisation conjointe du TCR et de TGF- β contribue à la stabilisation de l'expression de Foxp3, en réprimant la méthylation de CNS2 par l'inhibition de l'expression de la DNA méthyltransférase 1 (DNMT1) (Li, Ebert, and Li 2013). De même, la signalisation de la voie Jak3 (Janus Kinase 3) induite par l'IL-2 conduit au maintien de l'expression de Foxp3 par la phosphorylation et le recrutement de STAT5 d'une part et la mobilisation de TET1 au niveau de CNS2 (Nair et al. 2016).

La protéine Foxp3 est constituée de 431 acides aminés, structurés en 4 domaines (**Figure 14**. Structure de la protéine Foxp3) : sur la partie N-terminale le domaine fonctionnel de répression transcriptionnelle, suivi d'un domaine de liaison à l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) de type doigt de Zinc (*Zinc Finger*, ZnF), une hélice de type « leucine zipper » (Zip) permettant son homo ou hétérodimérisation, puis en C-terminal le domaine *ForkHead* permettant sa localisation nucléaire et sa liaison à l'ADN (Grover, Goel, and Greene 2021).

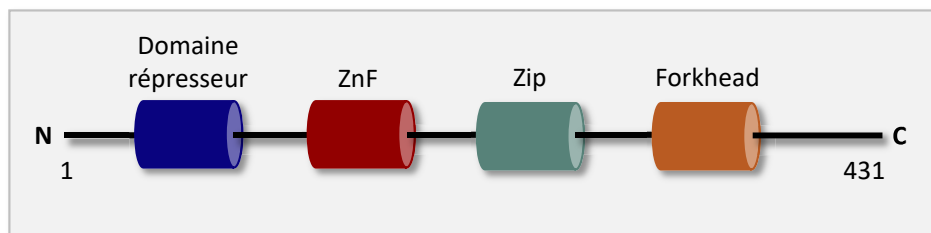


Figure 14. Structure de la protéine Foxp3

La protéine Foxp3 est constituée d'un domaine répresseur, suivi d'un domaine de liaison à l'ADN de type doigt de Zinc (*Zinc Finger*, ZnF), d'une hélice de type « leucine zipper » (Zip) puis d'un domaine *ForkHead*.

Foxp3 est capable de se lier à plus de 700 gènes, il orchestre la formation de grands complexes protéiques en interagissant avec de nombreux facteurs de transcriptions et diverses protéines de régulation de la chromatine telles que les HAT (*Histone Acétyltransférase*) et HDAC (*Histone Deacetylase*), RunX1, CBF β , NFAT, NF κ B (*Nuclear Factor-Kappa B*), IRF4 ou encore Eos (Wu et al. 2006; Zheng et al. 2007; Li et al. 2007; Georgiev, Charbonnier, and Chatila 2019). Il façonne ainsi la lignée Treg en agissant à la fois comme répresseur de transcription en bloquant l'expression des gènes de l'IL-2, de l'IFN- γ (Ono (Ono et al. 2007) 2007), et par antagonisme avec RORC de l'IL-17 (Zhou (Zhou et al. 2008) 2008), ou comme activateur transcriptionnel en potentialisant la transcription de *CTLA4*, de *IL2RA*, de *TNFRSF18* (codant pour CTLA-4, CD25 et GITR (*Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*)) (Wu et al. 2006; Zheng et al. 2007), ou de *FOXP3* lui-même (Rudra et al. 2009). Il contribue également à l'établissement du caractère anergique des Treg puisqu'il module directement les voies de signalisation en aval de l'engagement du TCR et du récepteur de l'IL-2 en restreignant l'activité de la

voie Akt (Protéine Kinase B)/mTOR (Han, Patterson, and Levings 2012) et en interrompant le signal calcique (Wu et al. 2006; Vaeth et al. 2012).

La régulation de l'expression de Foxp3 est également régie par des mécanismes post-traductionnels tels que l'ubiquitination (Ub), l'acétylation (Ac) ou la phosphorylation (P) de ces différents acides aminés (**Figure 15. Régulation post-traductionnelle de Foxp3**). Ces processus influencent principalement sa dégradation, sa localisation subcellulaire ou son activité fonctionnelle (Colamatteo et al. 2019).

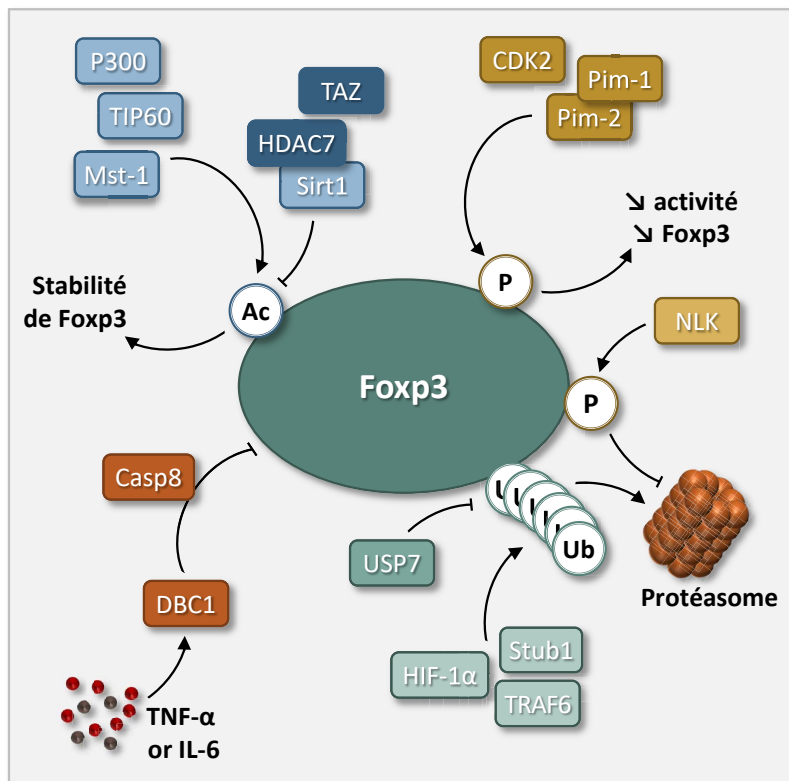


Figure 15. Régulation post-traductionnelle de Foxp3

Adaptée de Colamatteo 2020 - Ubiquitination (Ub) médiée par USP7 (Ubiquitin Specific-Processing Protease 7), Stub1 (STIP1 Homology and U-Box Containing Protein 1), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1). Acétylation (Ac) et désacétylation médiée par l'histone désacétylase 7 (HDAC7), TAZ (Tafazzin), P300 (E1A Binding Protein P300), Mst-1 (Mammalian Sterile 20-Like Kinase), TIP60 (Protéine Interactive Tat 60 kDa) et Sirt1 (Sirtuin 1). Phosphorylation (P) médiée par CDK2 (Kinase Cycline-Dépendante 2), NLK (Nemo-Like Kinase), PIM1 (Pim-1

Proto-Oncogène Serine/Threonine Kinase) et PIM2. Régulation médiée par DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) via la caspase 8 (Casp8) dans un contexte riche en TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) ou en IL-6.

La dégradation au sein du protéasome, des protéines en générale et de Foxp3 en particulier, est dictée par le niveau d'ubiquitination des résidus lysines. Dans les Treg, la stabilité de l'expression de Foxp3 et sa localisation nucléaire sont associées à une forte expression de la désubiquitinase USP7 (*Ubiquitin Specific-Processing Protease 7*) (van Loosdregt et al. 2013). Inversement, la polyubiquitination de la lysine 48 (K48) médiée par Stub-1 (*STIP1 Homology and U-Box Containing Protein 1*) ou de HIF-1α conduit à l'adressage de Foxp3 au Protéasome 26S (Dang et al. 2011; Chen and Flies 2013). Pour autant, les impacts de la polyubiquitination de Foxp3 ne se limitent pas à sa dégradation (Erpapazoglou, Walker, and Haguenaer-Tsapis 2014; Ni et al. 2019). L'ubiquitination intervient également dans la régulation du trafic protéique, la localisation nucléaire de Foxp3 impliquant sa polyubiquitination de K64 par TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) (Ni et al. 2019).

Les sites d'acétylation et d'ubiquitination étant en partie communs, il existe une compétition entre ces 2 mécanismes post traductionnels, ainsi une acétylation accrue de Foxp3 conduit à sa désubiquitination et à l'inhibition de sa dégradation par le protéasome (van Loosdregt et al. 2010). L'acétylation est médiée par les lysines acétyltransférases (KATs, ou histones acétyltransférases HATs), telles que la kinase Mst-1 (*Mammalian Sterile 20-Like Kinase*), ou la protéine interactive tat 60 kDa (TIP60) et la protéine P300 (*E1A Binding Protein P300*) (Li et al. 2007; Xiao et al. 2014; Li et al. 2015). Elle permet la stabilisation de l'expression de Foxp3 et favorise ses interactions avec l'ADN. A contrario, la désacétylation de Foxp3 par des lysines désacétylases (KDACs ou histones désacétylases HDACs) telles que HDAC7, TAZ (Tafazzin) ou la sirtuin (SIRT1) est associée à une réduction de l'expression de Foxp3 (van Loosdregt et al. 2011; Geng et al. 2017). L'altération de l'acétylation de Foxp3 a été observée dans plusieurs maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la thyroïdite de Hashimoto (Su et al. 2019; Yang et al. 2018).

La phosphorylation de Foxp3 est également un facteur de régulation important. Selon la localisation du site de phosphorylation, cela influence soit la dégradation protéasomique de Foxp3, soit sa fonctionnalité (Morawski et al. 2013; Fleskens et al. 2019). La phosphorylation de Foxp3 par la protéine CDK2 (*Kinase Cycline-Dépendante 2*) ou Pim-2 (*Pim-2 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*) intervient au niveau du domaine répresseur N-terminal et entraîne une diminution de l'expression de Foxp3 et une diminution des capacités suppressives des Treg (Morawski et al. 2013; Deng et al. 2015). Au cours de la PR, la présence de TNF- α dans le liquide synovial entraîne une déphosphorylation du domaine C-terminal de Foxp3 médiée par la protéine phosphatase 1 (PP1) et corrélée à l'altération de la fonction des cellules Treg (Nie 2013 (Nie et al. 2013)). Par ailleurs, en présence de TGF- β , la protéine kinase NLK activée (*Nemo-Like Kinase*) phosphoryle Foxp3 sur de multiples résidus, ce qui induit sa désubiquitination et l'inhibition de sa dégradation (Fleskens et al. 2019)).

D'autres mécanismes peuvent intervenir dans la régulation post-traductionnelle de Foxp3 sans pour autant que les processus aient été à ce jour parfaitement élucidés. Nous citerons parmi eux la dégradation de Foxp3 médiée par DBCA1 (*Deleted in Breast Cancer 1*) qui nécessite l'implication de la caspase 8 et qui intervient plus particulièrement dans des conditions inflammatoires, notamment en présence de d'IL-6 ou de TNF- α (Gao et al. 2015).

Bien que l'expression de Foxp3 soit indispensable à l'orchestration du programme transcriptionnel des Treg, elle n'est pas suffisante (Hill et al. 2007). D'autres facteurs de transcription tels que c-REL, NFAT ou AP-1, dont l'expression est indépendante de Foxp3, sont nécessaires et entrent en synergie avec Foxp3 pour permettre l'établissement du phénotype Treg complet (Luo and Li 2013; Oh et al. 2017).

Le programme transcriptionnel des Treg implique de très nombreux gènes, parmi les plus marquants on peut citer *FOXP3* bien entendu, *CTLA4*, *IKZF2*, *IL2RA* ou *IKZF4* (*IKAROS Family Zinc Finger 4*) qui codent respectivement pour les protéines CTLA-4, Helios, CD25 et Eos. Depuis quelques années, différents groupes de recherche se sont attachés à établir la signature transcriptomique des Treg circulants ou tissulaires (Ferraro et al. 2014; Arvey et al. 2015; Panduro, Benoist, and Mathis 2016;

Zemmour et al. 2018). Les travaux de l'équipe de Christophe Benoist ont permis d'identifier, dans des conditions physiologiques, plus de 190 gènes spécifiquement up régulés et 190 gènes down régulés dans les Treg circulants comparativement au profil transcriptomique des LT conventionnels (Ferraro et al. 2014).

3.1.3 Phénotype des Treg

3.1.3.1 Identification

Qu'ils soient d'origine thymique ou périphérique, au repos ou activés, les Treg partagent les mêmes marqueurs phénotypiques d'identification. Ils ne peuvent pas être caractérisés par un marqueur unique et exclusif, la stratégie d'identification des Treg repose sur la co-expression de plusieurs récepteurs membranaires et de leur facteur de transcription dominant, Foxp3.

Chez l'homme, Foxp3 est exprimé par 5 à 10 % des lymphocytes circulants mais son expression n'est pas exclusive à la lignée Treg puisque d'une part, l'ensemble des lymphocytes CD4⁺ activés peuvent exprimer Foxp3 de façon transitoire et d'autre part, il peut être exprimé par certains LT CD8⁺ ou cellules NK. De façon similaire, bien que les Treg expriment de façon constitutive et intense la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (Sakaguchi et al. 1995), leur identification ne peut reposer sur la simple expression de CD25 puisque les lymphocytes activés l'expriment également (Ortega et al. 1984). Par conséquent, la stratégie d'identification phénotypique la plus communément admise chez l'homme repose sur le phénotype CD3⁺CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺. Selon cette définition, les Treg représentent 4 à 8 % des lymphocytes circulants (Seddiki et al. 2006).

L'expression de CD127 permet également de distinguer les LT CD4⁺ des Treg, ces derniers n'exprimant que très peu la chaîne α du récepteur de l'IL-7 (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006). Bien que l'expression de ce marqueur soit conservée par un peu moins de 10 % des lymphocytes CD25^{high}Foxp3⁺, le phénotype CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} est très couramment utilisé pour trier les Treg circulants par cytométrie en flux. Il apporte en effet l'avantage de pouvoir isoler les Treg par un marquage membranaire qui ne porte pas atteinte à l'intégrité des cellules (Hartigan-O'Connor et al. 2007).

Les Treg expriment par ailleurs de nombreux autres marqueurs membranaires ou intracytoplasmiques tels que CTLA-4, CD45RO, GITR, CD39, TNFR2 (*Tumor Necrosis Factors Receptor*), ICOS... Cette expression n'est pas spécifique puisqu'elle est également partagée avec les lymphocytes T activés et leur niveau d'expression est variable selon le tissu étudié et l'âge des individus. Ces récepteurs confèrent aux Treg leurs propriétés fonctionnelles et seront par conséquent développés dans le paragraphe dédié aux récepteurs fonctionnels des Treg.

3.1.3.2 Les Treg d'origine thymique et périphérique

Aucun consensus n'est encore établi concernant les marqueurs d'expression membranaire, cytoplasmique ou nucléaire qui permettent de discerner spécifiquement les Treg d'origine thymique des Treg induits en périphérie. Il est de ce fait difficile de déterminer leurs prérogatives respectives.

Le répertoire antigénique permet de distinguer les tTreg des iTreg et leur confère des rôles différents. Les tTreg sont sélectionnés dans le thymus pour l'affinité de leur TCR avec des Ag du soi, ils sont ainsi les garants du maintien de la tolérance vis-à-vis du soi et leur dysfonctionnement ou leur défaut est à l'origine de manifestations auto-immunes (Haribhai et al. 2011). A l'inverse, les iTreg se différencient à partir de LT naïfs, et partagent de ce fait la spécificité antigénique des LT conventionnels. Leur rôle est essentiel dans le contrôle de l'homéostasie au cours des réponses immunitaires et des réactions inflammatoires liées aux pathogènes ainsi que dans le maintien de la tolérance vis-à-vis du microbiote (Haribhai et al. 2011; Josefowicz et al. 2012). Il ne s'agit pour autant pas d'une dualité mais d'une coopération ou d'une complémentarité fonctionnelle puisque les tTreg seraient capables de participer *in vitro* à l'induction de iTreg par l'expression membranaire du complexe latent LAP/TGF- β (*Latency-Associated Peptide*) (Andersson et al. 2008). Par ailleurs, le transfert néonatal de iTreg dans les souris de phénotype scurfy prévient de l'apparition des manifestations auto-immunes (Huter et al. 2008).

D'un point de vue génomique, la distinction des tTreg et iTreg peut s'appuyer sur le profil épigénétique du gène *FOXP3*.

La régulation épigénétique des régions CNS2 et CNS3 est relativement homogène (Zheng et al. 2010), en revanche le promoteur de *FOXP3* a un niveau de déméthylation dans la population de tTreg très élevé, rendant le promoteur très accessible, alors que son niveau de déméthylation au sein des iTreg est intermédiaire et favorisé par l'engagement concomitant des voies de signalisation du TCR et du TGF- β (Janson et al. 2008; Zheng et al. 2010). Inversement, la région CNS1 est régulée par signalisation du TGF- β lors de la différenciation des Treg en périphérie (Josefowicz et al. 2012).

D'un point de vue expérimental, les méthodes actuelles d'analyse de la méthylation d'un gène ne permettent pas de préserver l'intégrité des cellules, de ce fait cette approche ne permet pas d'envisager une exploration fonctionnelle et comparative des tTreg et des iTreg.

Phénotypiquement, les marqueurs Helios puis Nrp-1 ont été successivement proposés comme étant des marqueurs spécifiques des populations de tTreg, mais les nombreux travaux menés sur ce sujet ont rapporté des résultats discordants et leur qualification est toujours sujet à controverse (Thornton 2019, Weiss 2012).

Suite à l'étude des ARN messagers des Treg par l'équipe de Sugimoto en 2006, le facteur de transcription Helios a été identifié parmi les gènes de la signature transcriptomique Treg (Sugimoto et al. 2006), puis en 2010 l'équipe de Thornton a apporté la démonstration de l'origine thymique des Treg Helios⁺ par la description des caractéristiques suivantes (Thornton et al. 2010) :

- 100 % des Treg thymiques murins expriment Helios.
- Environ 70 % des Treg circulants expriment Helios chez la souris et chez l'homme adulte.
- Les Treg Helios⁻ murins n'apparaissent en périphérie qu'après la première semaine de vie.
- Les Treg induits *in vitro* par une stimulation TCR en présence de TGF- β n'expriment pas Helios.

De nombreuses études ont abondé en ce sens en associant notamment un déficit des facteurs de transcriptions BACH2 (*BTB Domain And CNC Homolog2*) ou KLF2 (*Kruppel-Like Factor 2*) avec une absence de iTreg et de Treg Helios⁻ circulants (Roychoudhuri et al. 2013; Pabbisetty et al. 2014). A contrario, les souris déficientes pour le facteur de transcription c-Rel ou Stab-1 (*Stabilin 1*) présentent un déficit en Treg Foxp3⁺ Helios⁺ mais développent en périphérie des Treg Foxp3⁺Helios⁻ et sont capables *in vitro* d'induire des Treg Helios⁻ en présence de TGF-β (Luu et al. 2017) (Kitagawa et al. 2017).

Néanmoins, plusieurs articles ont remis en cause la qualification de Helios comme marqueur spécifique des tTreg. Il a notamment été rapporté que l'induction de Helios était possible au cours de la différenciation des iTreg dans certains contextes de stimulation *in vivo* et *in vitro* (Verhagen and Wraith 2010; Zabransky et al. 2012; Gottschalk, Corse, and Allison 2012; Lu and Chen 2021). Il a également été observé que l'expression de Helios par les Treg était diminuée lorsque les Treg étaient au repos (Akimova et al. 2011). Par ailleurs, l'analyse comparative du répertoire antigénique des populations de Treg Helios⁺ et Helios⁻ a été réalisée par 3 fois mais ces 3 expériences, qui se sont déroulées avec des modalités expérimentales très différentes, ont conduit à des conclusions très discordantes (Szurek et al. 2015; Lord et al. 2015; Thornton et al. 2019). Deux premiers articles ont rapporté que Helios ne permettait pas d'identifier de manière univoque les clones Treg d'origine thymique, alors que le travail de Thornton en 2019 décrit un très faible chevauchement du répertoire TCR entre les Treg Helios⁺ et Helios⁻.

Un consensus a cependant établi le fait que les Treg Helios⁺ sont dotés de fonctions suppressives fortes, d'un phénotype de Treg activé et d'une expression de Foxp3 plus stable (Thornton et al. 2019) alors que les Treg Helios⁻ conservent une capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, l'IL-17, ou l'IFN-γ (Kim et al. 2012). De plus, dans des conditions inflammatoires, Helios participe activement à la stabilisation du phénotype des Treg. Il potentialise l'expression de Foxp3 en se liant à son promoteur mais il participe également à l'extinction du promoteur de l'IL-2 (Baine et al. 2013).

De façon relativement similaire à Helios, le récepteur Nrp-1 est fortement exprimé par les Treg, il potentialise leurs fonctions suppressives en raison de sa forte affinité avec le TGF-β (Glinka and Prud'homme 2008) et il permet de stabiliser la synapse immunologique avec les cellules dendritiques (Mizui and Kikutani 2008). Nrp-1 a été proposé comme marqueur spécifique des Treg d'origine thymique (Weiss et al. 2012) mais une fois de plus ceci a été contesté puisque l'expression de Nrp-1 peut être induite *in vitro* dans des conditions inflammatoires d'une part et que son expression semble hétérogène selon les tissus, les Treg du système nerveux central ne l'exprimant pas par exemple (Weiss et al. 2012). Par ailleurs, l'expression de Helios et Nrp-1 ne coïncide pas systématiquement.

3.1.3.3 Les populations fonctionnelles

Lorsque l'on s'appuie sur l'expression de l'isoforme RA de l'Ag commun des leucocytes (CD45RA) et de CD25, trois sous-ensembles fonctionnels et phénotypiques peuvent être distingués parmi les lymphocytes CD4⁺Foxp3⁺ circulants (**Figure 16**. Sous-populations de Treg circulants) (Miyara et al. 2009).

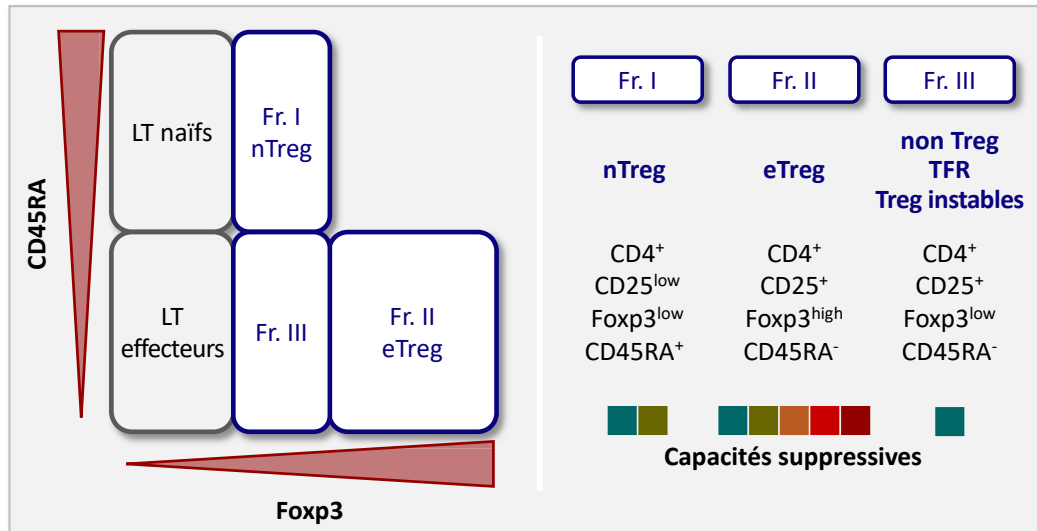


Figure 16. Sous-populations de lymphocytes T régulateurs circulants.

Adaptée de Wing 2019 - Les lymphocytes T régulateurs (Treg) circulants peuvent être divisés en trois groupes principaux selon le niveau d'expression de Foxp3 et CD45RA : les Treg naïfs (nTreg, Fr. I), les Treg effecteurs (eTreg, Fr. II) et un troisième groupe (Fr. III) regroupant des cellules non Treg, des Treg folliculaires (TFR) et des Treg instables. (Fr. : Fraction, LT : Lymphocyte T)

Les Treg naïfs (nTreg) sont identifiés dans la première fraction (Fr. I) selon le phénotype CD4⁺CD25^{low}Foxp3^{low}CD45RA⁺. Également appelés rTreg pour « *resting Treg* » (Treg au repos), ils expriment d'autres marqueurs associés aux cellules naïves tels que CCR7 ou CD62L et ils sont principalement constitués de Treg d'origine thymique nouvellement émigrants (Kimmig et al. 2002; Valmori et al. 2005; Miyara et al. 2009)(**Figure 17**. Différenciation des lymphocytes Treg). Les nTreg exercent leurs fonctions suppressives essentiellement par la production de cytokines anti-inflammatoires (tel que l'IL-10 ou le TGF-β) et ils sont dotés de capacités prolifératives en réponse à une stimulation de leur TCR, à la suite de laquelle ils acquièrent un phénotype de Treg effecteur.

Dans la Fr. II, les Treg effecteurs CD4⁺CD25⁺Foxp3^{high}CD45RA⁻ (eTreg) sont des Treg activés (Miyara (Miyara et al. 2009). Ils expriment fortement Foxp3, CTLA-4, le motif glycosidique sialyl Lewis x (CD15s) et le récepteur Fas (CD95), ils sont dotés de fortes capacités suppressives et d'une importante déméthylation des gènes spécifiques des Treg conduisant à leur forte expression (Sakaguchi et al. 2020). Parmi les eTreg, l'expression de HLA-DR ou de TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*) permet de distinguer des sous-populations aux très hautes capacités fonctionnelles qui ont atteint un stade final de différenciation (eTreg terminaux) (Baecher-Allan, Wolf, and Hafler 2006; Sakaguchi et al. 2010; Gautron et al. 2014)(**Figure 17**. Différenciation des lymphocytes Treg).

Concernant leur développement, une grande partie des eTreg sont issus de la différenciation des nTreg, et même s'ils expriment l'isoforme RO du marqueur CD45, aucun argument ne permet de considérer qu'il puisse s'agir d'une réponse Treg mémoire (Vukmanovic-Stejic et al. 2006; Sakaguchi et al. 2010). Les eTreg ont de fortes capacités prolifératives *in vivo*, et une susceptibilité accrue à l'apoptose lors de leur activité suppressive (Fritzsching et al. 2005; Miyara et al. 2009). Le stade eTreg est actuellement considéré comme le stade terminal de maturation des Treg (Vukmanovic-Stejic et al. 2006).

Les lymphocytes CD45RA⁻Foxp3^{low} de la fraction III sont quant à eux essentiellement constitués de LT conventionnels sans propriété immunosuppressive. Certains lymphocytes régulateurs aux capacités suppressives sont cependant inclus dans cette fraction, c'est notamment le cas d'une partie des TFR (CD4⁺CD25^{low}CXCR5⁺Foxp3^{low}) qui peuvent représenter jusqu'à 30 % des lymphocytes Fr. III chez l'homme. Les lymphocytes Foxp3^{low}ROR-γt⁺, Treg instables à fort potentiel de différenciation Th17, font également partie de cette fraction.

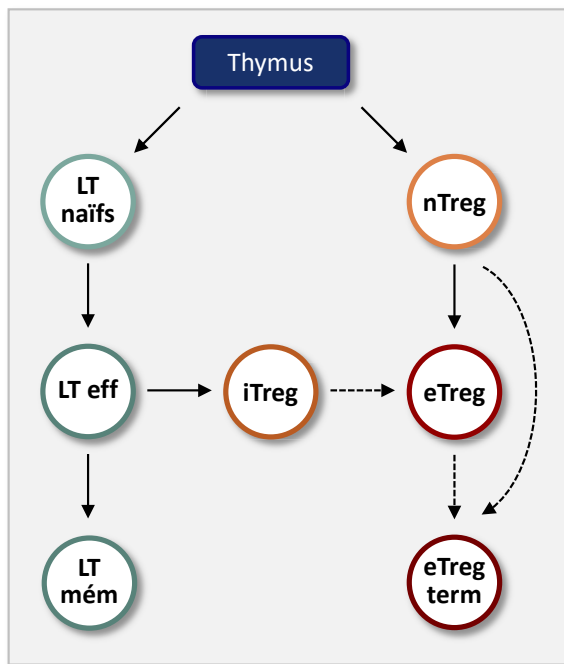


Figure 17. Différenciation des lymphocytes T régulateurs

Adaptée de Sakaguchi 2010 - La génération de lymphocytes T régulateurs effecteurs (eTreg) en périphérie peut provenir de l'activation de Treg naïfs (nTreg) d'origine thymique ou de Treg induits (iTreg) lors de la polarisation de LT effecteurs (LT eff) activés. Les Treg effecteurs terminaux (eTreg term) correspondent à un stade terminal de différenciation mais ne constituent pas une population de Treg « mémoires ».

La dynamique et la répartition des différentes populations de Treg sont variables selon l'âge de l'individu, le tissu considéré et le contexte physiologique ou physiopathologique. Les nTreg sont notamment très majoritaires dans le sang de cordon et la fréquence des eTreg circulants est croissante avec l'âge de l'individu (Seddiki et al. 2006; Miyara et al. 2009). Il a été décrit au cours du lupus systémique une diminution de la fraction Fr. II et une augmentation de la Fr. III, reflétant un déficit quantitatif des eTreg circulants et une expansion des LT conventionnels lors de la poussée de la maladie (Miyara et al. 2009).

Les Treg résidents sont présents dans les tissus dans des conditions homéostatiques (Sather et al. 2007) mais les étapes de leur différenciation sont partiellement déchiffrées. D'origine majoritairement thymique (Panduro, Benoist, and Mathis 2016), ils transiteraient initialement dans les OL2 avant d'être adressés dans leur tissu de résidence grâce à l'expression de récepteurs de chémokines, notamment CCR2, CCR4, CCR6, CCR8 ou CCR9 (Lee, Kang, and Kim 2007; Miragaia et al. 2019).

L'expression combinatoire des récepteurs de chémokines permettant leur adressage vers les différents tissus n'est pas encore déchiffrée mais les Treg tissulaires ont des signatures transcriptomiques très distinctes et ils expriment des marqueurs spécifiques selon leur localisation (Panduro, Benoist, and Mathis 2016). Ainsi les Treg de la peau sont caractérisés par l'expression de CCR4 et de l'intégrine alpha E (CD103) (Sather et al. 2007), les Treg présents dans les muscles produisent de l'amphiréguline (AREG) (Burzyn et al. 2013) ou encore, les Treg du tissu adipeux viscéral expriment PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) (Cipolletta et al. 2012). Ils peuvent également être impliqués dans des processus pathologiques tels que la résistance à l'insuline (Zhou et al. 2015).

3.2 Mécanismes fonctionnels des Treg

Les Treg disposent de plusieurs mécanismes immunosuppresseifs, ces fonctions immunorégulatrices étant identiques, qu'il s'agisse de Treg induits ou thymiques (**Figure 18**. Fonctions immunosuppresseives des Treg). Au sein des OL2 comme dans les tissus, ils préservent l'homéostasie en régulant localement l'activité des cellules du système immunitaire inné et adaptatif, par des mécanismes dépendants ou non de leur spécificité antigénique, par la sécrétion de molécules effectrices ou par des mécanismes dépendants d'un contact cellulaire. Ils exercent également des fonctions non immunologiques en participant notamment à la réparation tissulaire (Sakaguchi et al. 2020; Grover, Goel, and Greene 2021).

Une grande partie des études fonctionnelles des Treg ont été conduites *in vitro* et il est difficile d'évaluer *in situ* leur prédominance, leur coexistence ou leur temporalité de mise en jeu. Pour autant, les Treg font preuve d'une remarquable adaptabilité fonctionnelle et il est vraisemblable qu'ils modulent leur mode d'action selon l'environnement, le tissu et le contexte physiologique ou physiopathologique afin d'optimiser leur réponse.

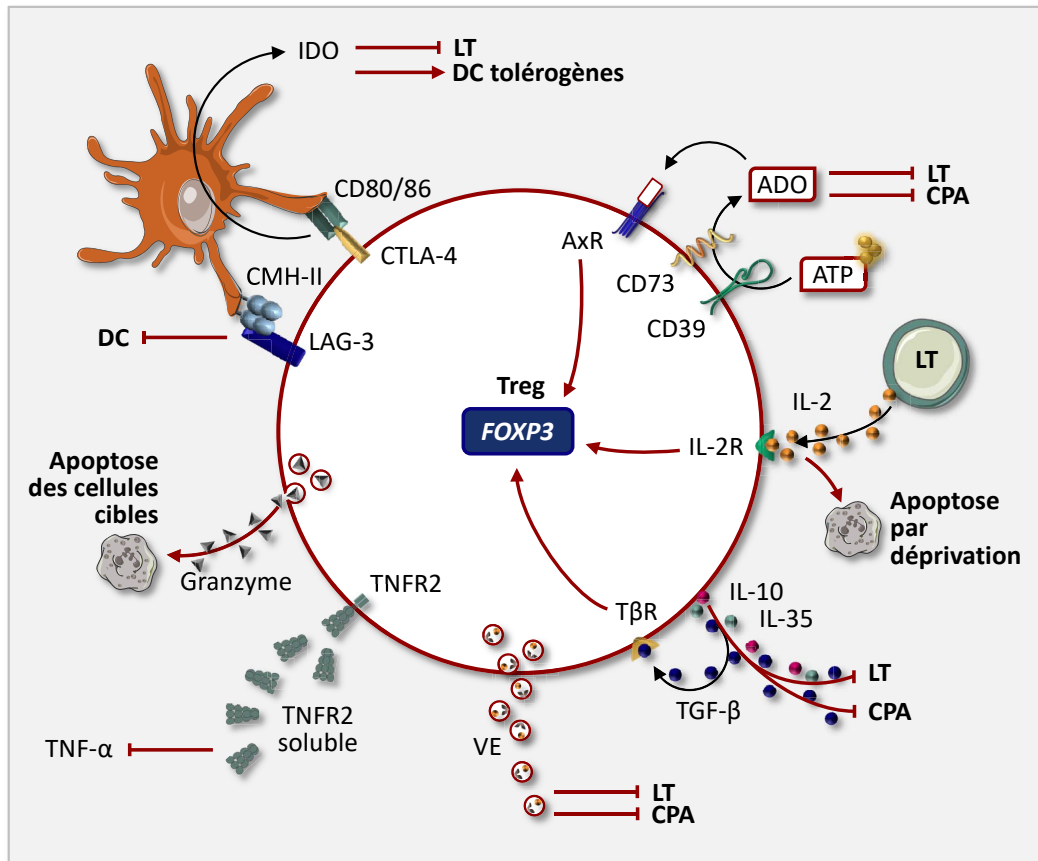


Figure 18. Fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs.

Représentation des principaux mécanismes régulateurs des Tregs. Perturbation de l'environnement métabolique : déprivation en IL-2 *via* l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2, déprivation en ATP par les ectonucléotidases CD39 et CD73. Sécrétion de cytokines inhibitrices : l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β . Libération de vésicules extracellulaires et de TNFR2 soluble. Mécanismes d'induction de mort cellulaire : cytolysse médiée par les granzymes. Modulation de la maturation des cellules dendritiques par l'inhibition du CMH-II par LAG3, ou par l'inhibition du signal de co-stimulation CD80/86 et l'induction d'IDO. (ADO : Adénosine, ATP : Adénosine Triphosphate, AxR : Adenosin x Receptor, DC : Dendritic Cell, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène, CTLA-4 : Cytotoxique-T-Lymphocyte-Antigen 4 protein, FOXP3 : Forkhead/winged-helix box protein 3 gene, IDO : Indoléamine 2,3 dioxygénase, IL : interleukine, IL-2R : Interleukin 2 Receptor, LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3, LT : Lymphocyte T, T β R : Récepteur de TGF- β , TGF- β : Transforming Growth Factor- β , TNF- α : Tumor Necrosis Factor α , TNFR2 : Tumor Necrosis Factor Receptor 2, VE : Vésicule Extracellulaire)

3.2.1 Les cytokines anti-inflammatoires

Les propriétés immunosuppressives des Treg peuvent être médiées par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β , l'IL-10, et l'IL-35. Ces cytokines exercent leurs fonctions d'une part en inhibant l'activation des LT effecteurs et d'autre part en soutenant la différenciation et la survie des Treg induits.

Les Treg produisent de fortes quantités de TGF- β , synthétisé sous forme de protéine latente, associé au peptide LAP par une liaison non-covalente. Le TGF- β latent est pris en charge par la protéine GARP (*Glycoprotein A Repetitions Predominant*), puis il est exprimé à la surface des Treg et peut être clivé et sécrété sous forme de TGF- β mature (Nakamura et al. 2004; Sun, Jin, and Li 2016) (**Figure 19**. Synthèse et expression de TGF- β).

La production de TGF- β est un mécanisme majeur impliqué dans le contrôle d'homéostasie et le maintien de la tolérance. Les souris déficientes pour le gène *TGFB1* (*Transforming Growth Factor Beta 1*) présentent un phénotype proche des souris scurfy, associant une production d'auto-Ac, une dysrégulation des réponses lymphocytaires T et B, et le développement de multiples manifestations auto-immunes létales (Shull et al. 1992; Turner et al. 2020).

Le TGF- β intervient sur 3 aspects différents de la réponse immunitaire. Il a tout d'abord un effet suppressif direct sur les LT effecteurs puisque l'utilisation d'Ac neutralisants conduit à une prolifération anarchique des LT *in vitro* (Nakamura et al. 2004). Il participe également à la régulation de l'activation des CPA, réprimant de ce fait leur dialogue avec les LT (Oh et al. 2017). Parallèlement, le TGF- β renforce par une boucle autocrine, le phénotype et les fonctions des Treg eux-mêmes en stabilisant l'expression de Foxp3 (Marie et al. 2005). En outre, il influe de façon quantitative sur la population de Treg, par conséquent sur le rapport Treg/Teff de la réponse immunitaire, puisque l'activation de LT naïfs en présence de TGF- β permet la génération de Treg induits (Fu et al. 2004).

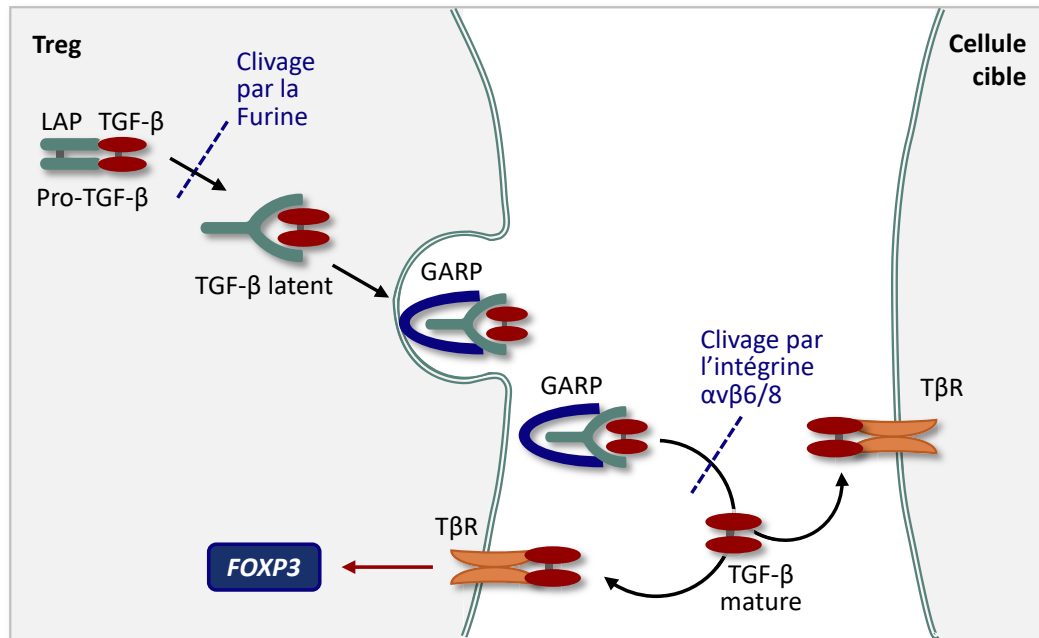


Figure 19. Synthèse et expression de TGF- β .

Adaptée de Sun 2016 - Le TGF- β est synthétisé sous la forme d'un homodimère LAP/TGF- β : le pro-TGF- β . Son clivage par la furine permet de former le TGF- β latent qui est pris en charge par la protéine membranaire GARP et transporté à la surface des Treg. La libération du TGF- β mature est médiée par les intégrines $\alpha\beta6$ et $\alpha\beta8$. (*FOXP3* : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3 gene*, GARP : *Glycoprotein A Repetitions Predominant*, LAP : *Latency-Associated Peptide*, T β R : Récepteur de TGF- β , TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*)

L'immunosuppression des Treg médiée par la sécrétion d'IL-10 semble être un mécanisme intrinsèquement lié à la régulation de l'inflammation des muqueuses notamment intestinales et respiratoires ainsi que dans le maintien de la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Les souris *IL10*^{-/-}, tout comme les souris *IL10*^{flox/flox} × *FOXP3*^{YFP-Cre} dont la production d'IL-10 est inactivée dans les lymphocytes *Foxp3*⁺, développent spontanément des colites, des pathologies inflammatoires des voies respiratoires et ont une susceptibilité accrue aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Kuhn (Kühn et al. 1993) 1993, Rubtsov (Rubtsov et al. 2008) 2008). Par ailleurs, l'inactivation de la production d'IL-10 par les LT *Foxp3*⁺ au cours des glomérulonéphrites aiguës entrave la capacité des Treg à réguler la réponse Th17 au niveau rénal mais également de façon systémique (Ostmann et al. 2013). L'IL-10, par une boucle autocrine, potentialiserait la capacité des Treg à contrôler la réponse inflammatoire de type Th17 (Chaudhry et al. 2011). Pour autant, l'inactivation de la production d'IL-10 par les Treg ne conduit pas au développement de syndrome auto-immun systémique (Rubtsov et al. 2008).

En 2007, les travaux menés par l'équipe de Collison ont permis de décrire une nouvelle cytokine inhibitrice, l'IL-35 (Collison et al. 2007). Cette cytokine dimérique est constituée de la chaîne α de l'IL-12 (p35) et de la chaîne β de l'IL-27 codée par le gène *EBI3* (*Epstein-Barr Virus Induced 3*). Les Treg issus de souris *IL12A*^{-/-} ou *EBI3*^{-/-} ont des capacités fonctionnelles altérées *in vitro*, elles ne parviennent pas à réguler *in vivo* la prolifération des LT effecteurs et à contrôler le développement de MICI ou d'encéphalites auto-immunes (Collison et al. 2007; Liu et al. 2012).

L'IL-35 exerce ses fonctions immunosuppressives en inhibant directement la prolifération des LT effecteurs d'une part, en bloquant la polarisation Th17, ainsi qu'en favorisant la prolifération des Treg (Collison et al. 2007; Niedbala et al. 2007). Dans un premier temps, on pensait que la production d'IL-35 était restreinte aux Treg puisque *EBI3* est directement régulé par *Foxp3*, cependant des travaux récents ont montré que l'IL-35 était capable de soutenir la génération de cellules aux propriétés suppressives, les *iTR35* (*IL-35 Induced Regulatory T Cell Population*), et ce indépendamment de l'IL-10, du TGF- β ou de *Foxp3* (Collison et al. 2007).

3.2.2 Répression des cellules présentatrices d'antigènes

Les Treg exercent un effet immunosuppresseur direct sur les cellules dendritiques, par l'expression de récepteurs membranaires au niveau de la synapse immunologique. Ils inhibent leur maturation et leurs fonctions de présentation antigénique. Deux axes sont principalement impliqués, l'axe CTLA-4/CD80-CD86 et l'axe LAG-3/CMH II.

Le récepteur inhibiteur de costimulation CTLA-4 est un homologue de CD28. Ils partagent les mêmes ligands, CD80 et CD86, mais l'affinité de CTLA-4 est environ 20 fois supérieure à celle de CD28, ceci lui donne un avantage compétitif (van der Merwe et al. 1997; Onishi et al. 2008; Yokosuka et al. 2010). Contrairement aux LT effecteurs, les Treg expriment CTLA-4 de façon constitutive et la signalisation de l'axe CTLA-4/CD80-CD86 confère aux DC des propriétés tolérogènes par la production de IDO. La sécrétion de IDO dans le micro-environnement provoque un déficit local en tryptophane

qui contraint les LT effecteurs à un arrêt de la synthèse de protéines et donc un arrêt du cycle cellulaire (Yan et al. 2010). L'acide 3-hydroxyanthranilique (3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAA), un produit de dégradation du tryptophane, entraîne par ailleurs une augmentation de la sécrétion de TGF- β par les DC associé à une diminution de la sécrétion d'IL-6, favorisant la génération de Treg induits et l'inhibition de la polarisation Th17.

Il apparaît également que les Treg sont à l'origine d'une diminution de l'expression des récepteurs CD80 et CD86 des DC par un phénomène de trans-endocytose médié par CTLA-4 (Qureshi et al. 2011).

La régulation des DC médiée par CTLA-4 est un des mécanismes fonctionnels majeurs, les souris dont le gène *CTLA4* est invalidé dans les Treg développent une maladie lymphoproliférative auto-immune systémique et létale (Wing et al. 2008). Un phénotype similaire, associant une perturbation de l'homéostasie des lymphocytes T et B et un syndrome complexe de dysrégulation immunitaire, a été décrit chez des patients portant des mutations hétérozygotes de *CTLA4* (Schubert et al. 2014). De plus, une faible expression de CTLA-4 est associée à une diminution de la capacité suppressive des Treg vis-à-vis des LT effecteurs au cours de la PR (Flores-Borja et al. 2008).

Le récepteur LAG-3 (*Lymphocyte-activation Gene 3*) est un récepteur transmembranaire associé au CD4 et de très haute affinité avec le CMH de classe II, il peut être exprimé par les Treg et il participe à leurs fonctions immunosuppressives (Huang et al. 2004; Workman and Vignali 2005). Au cours de l'interaction DC/Treg, l'engagement de LAG-3 avec le CMH de classe II inhibe la maturation des DC, entrave l'expression de CD80 et CD86 ce qui altère leurs capacités immunostimulatrices (Liang et al. 2008).

L'expression de ces récepteurs de costimulation confère aux Treg une propriété encore peu décrite mais probablement majeure : comme les LT CD4⁺, ils ont la capacité de capturer spécifiquement certains récepteurs membranaires de leurs partenaires par trogocytose (Nakayama et al. 2021). La trogocytose des Treg est un mécanisme puissant du fait de la grande stabilité de leurs synapses immunologiques, il cible les CPA de même spécificité antigénique et contribue à l'induction de la tolérance spécifique aux antigènes.

Par la liaison de CTLA-4, ou de 4-1BB (récepteur de costimulation inductible TNFR9, CD137) les Treg sont capables de soustraire CD80/CD86 ou 4-1BB-L à la surface des DC, limitant ainsi leur capacité de costimulation (Qureshi et al. 2011; Luu et al. 2021). La trogocytose de CD80/CD86 dépendante de CTLA-4 induit par ailleurs une augmentation de l'expression de PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) dans les DC, ce qui déséquilibre la proportion d'hétérodimères CD80/PD-L1 à leur surface et renforce leur profil tolérogène, PD-L1 ayant une action inhibitrice sur les LT (Tekguc et al. 2021). Il a également été observé que les Treg ayant une très forte spécificité antigénique étaient capables d'éliminer le CMH de classe II de la surface des DC, empêchant ainsi la présentation antigénique (Akkaya et al. 2019).

3.2.3 Perturbation métabolique

Etant donné l'identification précoce de CD25 en tant que marqueur des cellules suppressives, la déprivation du microenvironnement en IL-2 par les Treg a été l'un des premiers mécanismes fonctionnels immunosuppresseurs décrits.

Le récepteur de l'IL-2 est un récepteur hétérotrimérique qui selon le stade d'activation des lymphocytes, est exprimé sous des combinaisons différentes, ce qui module son affinité pour l'IL-2 (**Figure 20**. Configuration du récepteur de l'IL-2) (Spolski, Li, and Leonard 2018). Le lymphocyte T naïf exprime un récepteur dimérique d'affinité intermédiaire, constitué de la chaîne β (IL-2R β , CD122) et de la chaîne γ (IL-2R γ , CD132). Après activation et engagement de la signalisation du TCR et/ou du récepteur de l'IL-2 lui-même, les LT expriment la chaîne α et le récepteur prend alors sa forme trimérique, de haute affinité pour l'IL-2. Les Treg, qui expriment le CD25 de façon constitutive et intense, vont lier et séquestrer l'IL-2 présente dans le microenvironnement. Ils restreignent ainsi l'activation et la prolifération des LT effecteurs, et le défaut d'engagement de la voie de signalisation Akt entraîne l'apoptose des LT (Duthoit et al. 2005; Oberle et al. 2007; Pandiyan et al. 2007).

Bien que ce mécanisme ait été récemment corroboré par une étude de modélisation de la consommation de l'IL-2 dans les niches immunologiques (Oyler-Yaniv et al. 2017), l'importance de cette déprivation en IL-2 est souvent relativisée. D'une part l'appauvrissement du microenvironnement en IL-2 tiendrait également de la capacité des Treg à directement inhiber la sécrétion d'IL-2 par les LT effecteurs eux-mêmes (Thornton and Shevach 1998), et d'autre part, ce mécanisme semblerait plus particulièrement impliqué dans la régulation de la prolifération des LT CD8⁺ (Chinen et al. 2016). En revanche, la signalisation de la forme complète du récepteur de l'IL-2 est indispensable à la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Treg (Setoguchi et al. 2005).

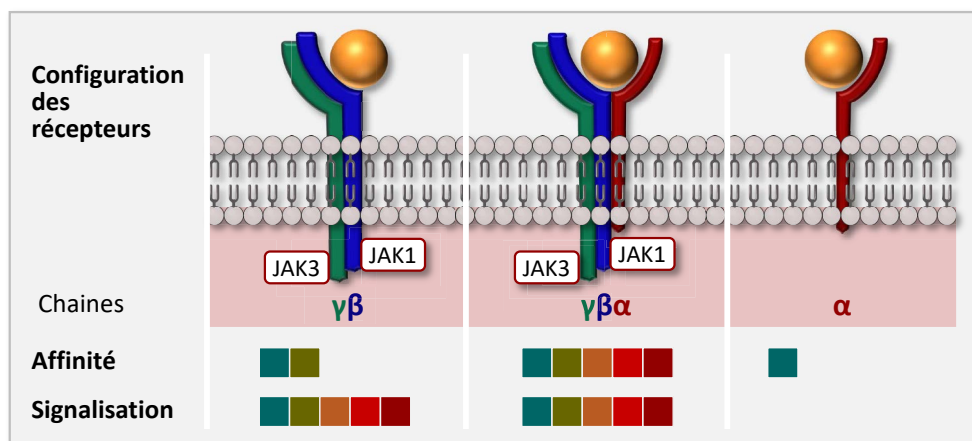


Figure 20. Configuration du récepteur de l'interleukine-2.

Adaptée de Spolski 2018 - Représentation des trois configurations du récepteur de l'interleukine-2 et de ses affinités. (JAK : Janus Kinase)

Le second mécanisme mis en jeu par les Treg est la perturbation du métabolisme des purines, elle est médiée par les étonucléotidases CD39 et CD73 qui agissent sur l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine Triphosphate) et c'est un mécanisme majeur dans la résolution de l'inflammation.

Sous forme libre dans la matrice extracellulaire, l'ATP agit comme un puissant motif moléculaire associé au danger (DAMP - *Damage Associated Molecular Pattern*), c'est une molécule hautement pro-inflammatoire avec d'importantes propriétés chimioattractante (Junger 2011). Les Treg catalysent la dégradation de l'ATP en AMP (Adénosine Monophosphate) *via* CD39 puis CD73 hydrolyse l'AMP en adénosine (ADO) qui pour sa part est dotée de propriétés anti-inflammatoires (Deaglio et al. 2007) (**Figure 21. Mode d'action des ectonucléotidases CD39 et CD73**). Les récepteurs de l'adénosine (A1R, A2AR, A2BR ou A3R) sont des récepteurs purinergiques P1 couplés à la protéine G et dans la majorité des cellules immunitaires, leur signalisation conduit à une augmentation de l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) puis à l'activation de la voie PKA (Protéine kinase A) (Allard et al. 2020; Spolski, Li, and Leonard 2018).

Dans les LT, l'activation de la voie PKA conduit à un blocage complet de leur activation par l'inhibition de la voie de signalisation de NFκB, du TCR, et des récepteurs calciques (Ohta and Sitkovsky 2001; Wehbi and Taskén 2016). La signalisation de PKA permet par ailleurs la phosphorylation de CREB, son recrutement au niveau du promoteur et des CSN de Foxp3, ce qui d'une part favorise la conversion de LT naïfs en iTreg, et d'autre part stabilise l'expression de Foxp3 dans les Treg (Guereschi et al. 2013; Kim and Leonard 2007; Zheng et al. 2010). De façon similaire, l'activation de PKA dépendante de l'AMPc conduit à la conversion des DC et des macrophages vers un profil tolérogène et elle inhibe l'activation des PNN et des LB (Allard et al. 2020). Par ailleurs, les Treg sont capables de directement transférer de l'AMPc à leurs partenaires, notamment aux LT par des jonctions communicantes de type GAP et de ce fait d'induire l'activation de la voie PKA (Bopp et al. 2007).

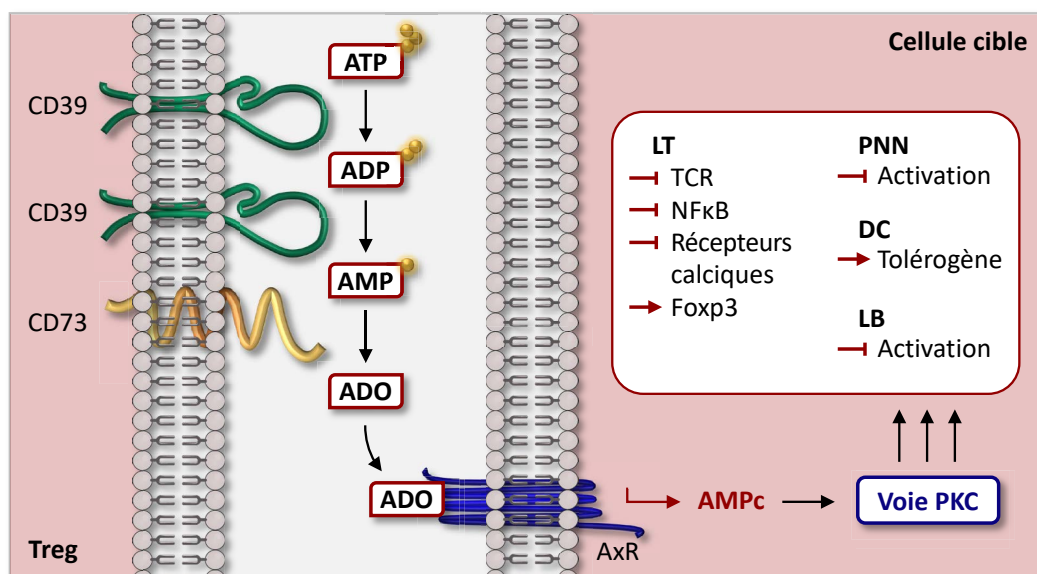


Figure 21. Mode d'action des ectonucléotidases CD39 et CD73.

Adaptée de Passarelli 2019 - Par l'expression membranaire des ectonucléotidases CD39 et CD73, les Treg déphosphorylent successivement l'ATP en ADP, AMP puis en Adénosine (ADO). L'ADO est dotée d'importantes propriétés anti-inflammatoires, sa liaison avec ses récepteurs conduit à la production d'AMPc et à l'activation de la voie PKC qui inhibe l'activation des LT, des NK, des PNN et favorise la conversion de DC tolérogènes et l'induction de Treg. (ADM : Adénosine Diphosphate, AMP : Adénosine Monophosphate, ATP : Adénosine Triphosphate, AxR : *Adenosin x Receptor*, LT : Lymphocyte T, TCR : *T Cell Receptor*, Treg : LT régulateur)

3.2.4 Cytolyse directe

Si l'activité cytolytique des cellules NK ou des LT cytotoxiques est bien décrite, elle n'est pas restreinte à ces deux types cellulaires. En effet, les Treg activés peuvent également être dotés de capacités lytiques, impliquant notamment le système granzyme/perforine.

De façon similaire aux LT CD8⁺, les Treg libèrent dans l'espace interstitiel des synapses immunologiques des granules cytolytiques contenant de la perforine, qui après polymérisation crée des pores dans la cellule cible. Les granzymes qui diffusent à travers les pores vont activer les programmes apoptotiques de la cellule cible (Hay 2022 ds autre). Chez l'homme, les Treg activés sont capables d'induire une apoptose des LT effecteurs, des LT CD8⁺ ou des CPA autologues, indépendamment de FasL et l'implication de granzyme A semble prépondérante (Grossman et al. 2004).

Etonnement, dans les modèles murins, les Treg exercent leurs fonctions cytolytiques sur les LT *via* granzyme B préférentiellement et indépendamment de l'implication de la perforine (Gondek et al. 2005; Cao et al. 2007). La cytolyse de LB par des Treg murins a également été observée *in vitro* (Zhao et al. 2006).

L'effet cytolytique des Treg peut également être médié par d'autres mécanismes. Il a été décrit par exemple que les Treg pouvaient induire la mort des LT CD4⁺ par l'activation de la voie TRAIL-DR5 (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand - Death Receptor 5*) (Ren et al. 2007) ou pouvaient directement activer la voie Fas/FasL des LT CD8⁺ (Strauss, Bergmann, and Whiteside 2009).

3.2.5 Autres mécanismes immunosuppresseurs

D'autres mécanismes immunosuppresseurs des Treg ont été récemment décrits, comme notamment l'inhibition des LT CD8⁺ par PD-1. Bien que l'expression intracellulaire de PD-1 soit importante dans les Treg, la proportion de Treg qui exprime PD-1 à la surface membranaire est relativement faible (moins de 15 %), qu'ils soient circulants ou qu'ils proviennent des OL2 (Rodríguez-Perea et al. 2016) (Raimondi et al. 2006). L'induction de l'expression membranaire de PD-1 semble dépendante de l'activation du TCR des Treg et il a été décrit dans un contexte d'infection virale chronique, que les Treg PD-1⁺ augmentaient et inhibaient l'activation et la prolifération des LT CD8⁺ qui expriment son ligand PD-L1 ((Park et al. 2015).

Les Treg sont également capables d'excréter des proportions importantes de récepteur 2 du TNF- α (TNFR2), sous forme soluble, après stimulation de leur TCR (van Mierlo et al. 2008). Dans un contexte inflammatoire, ils neutralisent ainsi le TNF- α présent dans le microenvironnement et inhibent ses propriétés pro-inflammatoires.

Enfin, la sécrétion de VE par les Treg participe également au contrôle des réponses inflammatoires et à l'établissement d'un environnement tolérogène (Grover, Goel, and Greene 2021). Chez l'homme

comme chez les rongeurs, les Treg produisent des vésicules extracellulaires suite à l'activation de leur TCR et ces vésicules présentent *in vitro* des propriétés immunomodulatrices similaires aux cellules dont elles sont issues : elles sont capables de réguler la prolifération des LT effecteurs, elles limitent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ ou l'IL-2, et elles participent à la conversion des DC tolérogènes (Torri et al. 2017; Smyth et al. 2013; Okoye et al. 2014).

Les VE tirent en partie leurs fonctions des récepteurs membranaires qu'elles expriment, notamment des ectoenzymes CD39 et CD73 (Smyth et al. 2013). Elles constituent également un mécanisme d'échanges intercellulaires puisqu'elles permettent aux Treg de directement transférer à leurs cellules cibles des molécules effectrices telles que des miRNA (ou miR, micro-RNA). Ainsi, la présence de miR-150-5p et de miR-142-3p dans les VE conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et à l'inhibition de l'IL-6 dans les DC activées (Tung et al. 2018), tandis que le miRNA Let-7d permet de réguler la polarisation Th1 des LT effecteurs (Okoye et al. 2014) et miR-146a-5p inhibe la prolifération des LT CD4⁺ (Torri et al. 2017).

3.2.6 Rôle non régulateur des Treg

Le rôle des Treg ne se limite pas au contrôle des réponses inflammatoires et au maintien de l'homéostasie. Les Treg résidant dans les tissus participent activement à la réparation tissulaire par des mécanismes distincts de leurs fonctions régulatrices et adaptés au tissu lésé (Zhou et al. 2015). A titre d'exemple, les Treg résidant des muscles participent à la réparation musculaire par la sécrétion de facteur de croissance tel que l'AREG (Burzyn et al. 2013), les Treg présents dans le système nerveux centrale favorisent pour leur part la différenciation des progéniteurs des oligodendrocytes et ils interviennent dans les processus de myélinisation par la production de CCN3 (*Cellular Communication Network Factor 3*) (Dombrowski et al. 2017).

3.3 Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg : adaptabilité, plasticité et stabilité

Bien que cela puisse sembler antagonique, les concepts de stabilité et de plasticité des Treg sont intrinsèquement liés. La stabilité des Treg est relative au maintien de leur potentiel régulateur, quel que soit l'environnement dans lequel ils évoluent et elle repose en grande partie sur la stabilité de l'expression de Foxp3. En revanche, la plasticité des Treg se rapporte à leur adaptabilité fonctionnelle, elle se traduit par une évolution phénotypique qui leur permet d'ajuster leur réponse au contexte inflammatoire, tout en maintenant leur stabilité. Cependant, l'équilibre est fragile et la plasticité des Treg peut conduire à une instabilité phénotypique, à la perte de l'expression de Foxp3 et par conséquent la perte de leurs fonctions immunorégulatrices (**Figure 22**. Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg).

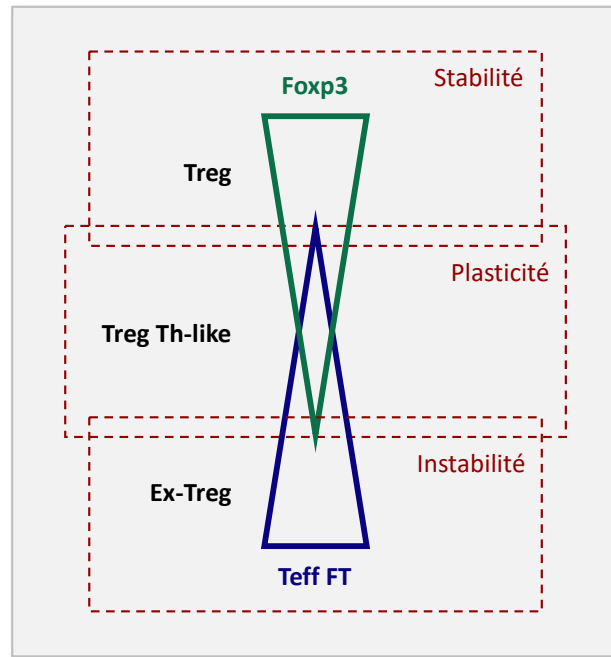


Figure 22. Régulation phénotypique et fonctionnelle des Treg.

Représentation conceptuelle de la stabilité et de la plasticité fonctionnelle et phénotypique des Treg. (Foxp3 : *Forkhead/ Winged-Helix Box Protein 3*, FT : Facteur de transcription, Teff : LT effecteur, Treg : LT régulateur)

3.3.1 Stabilité des Treg

La stabilité des Treg est régie par différents mécanismes qui impliquent une régulation épigénétique du gène de Foxp3. Le niveau de déméthylation du promoteur de Foxp3 et des CNS conditionne directement la stabilité de son expression : plus le gène de Foxp3 est déméthylé, plus il est accessible à la transcription (Grover, Goel, and Greene 2021).

Les processus permettant la stabilisation de Foxp3 sont nombreux et loin d'être complètement élucidés. Nous développerons dans ce chapitre 4 mécanismes d'implication majeur.

Le premier des mécanismes impliqués est l'engagement du TCR. En raison de la spécificité de leur répertoire notamment, les Treg ont une stimulation de leur TCR en périphérie très soutenue comparativement aux LT conventionnels et elle est déterminante pour le maintien de l'expression de Foxp3 (Moran et al. 2011; Vahl et al. 2014). Dans le cas d'un modèle murin de KO (*Knock-out*) conditionnel pour le TCR, la perte de son expression dans la population de Treg mature conduit à un effondrement des populations de Treg circulants et à une perte de leur fonction malgré l'expression normale de leurs molécules fonctionnelles. En l'absence du TCR, la stabilisation de Foxp3 ne peut être compensée par d'autres mécanismes. La signalisation du TCR et de ces corécepteurs permettent notamment le recrutement de l'enzyme EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) qui inhibe l'expression des gènes répresseurs de *FOXP3* par la méthylation de leur histones (DuPage et al. 2015; Yang et al. 2015).

Le second mécanisme indispensable à la survie et à la stabilité des Treg est l'engagement du récepteur de l'IL-2 (Setoguchi et al. 2005). Il participe à la stabilisation de l'expression de Foxp3 par l'activation de la voie Jak, permettant la phosphorylation de STAT5 et son recrutement sur la CNS2 (Nair et al. 2016). La délétion conditionnelle de l'IL-2R α dans les populations de Treg périphériques murins conduit au dysfonctionnement mitochondrial des Treg et à une augmentation de leur apoptose (Toomer et al. 2019).

Les Treg ne sécrètent pas d'IL-2, le gène *IL2A* est notamment réprimé par Foxp3 et Helios (Wu et al. 2006; Baine et al. 2013). Ils sont de ce fait hautement dépendant de la sécrétion paracrine d'IL-2 des LT CD4⁺ et de façon intéressante, les Treg exercent une boucle de rétrocontrôle négative en réprimant la production d'IL-2 par les LT effecteurs (Thornton and Shevach 1998).

Depuis quelques années à présents, des liens directs entre les différentes voies métaboliques et la fonction des cellules immunitaires ont été établis (Atif et al. 2020) et selon leur statut, leur polarisation ou leur état d'activation, les populations lymphocytaires T présentent un profil métabolique spécifique. Notamment, la différenciation et la survie des Treg sont principalement dépendant de l'oxydation des acides gras (FAO, *Fatty Acid Oxidation*), tandis que la prolifération et la polarisation des LT conventionnels dépendent préférentiellement de la glycolyse (Michalek et al. 2011; Shi and Chi 2019). Les différents métabolites générés tels que l'acétyl-coenzyme A (acétyl CoA) ou les acides gras ne participent pas seulement aux différents programmes métaboliques mais ils modulent le statut épigénétique des cellules en générale, en influençant notamment la stabilité de l'expression de *FOXP3* dans les Treg (Peng et al. 2016; Chapman et al. 2018; Pacella et al. 2018).

L'impact des miRNA est également majeur dans la stabilisation de l'expression de Foxp3. Dans le modèle de KO conditionnel Dicer, qui permet de bloquer le processus de maturation des miRNA, les Treg sont instables et leurs fonctions sont altérées (Zhou et al. 2008). Les miRNA préférentiellement exprimés par les Treg et modulant leur activité sont nombreux. Parmi eux miR-155, dont la synthèse dépend directement de Foxp3, agit sur la stabilisation de l'expression de Foxp3 par l'IL-2 en ciblant la traduction de SOCS1 (*Suppressor of Cytokine Signaling Protein 1*), une protéine inhibitrice de la signalisation de STAT5 (Lu et al. 2009). On citera également miR-142 et miR-151-5p qui permettent le maintien de l'homéostasie des Treg en ciblant notamment les voies de signalisation Pi3K (Phosphoinositide 3-Kinase)/Akt (Wang et al. 2022; Cao et al. 2021).

Bien que le phénotype et la fonctionnalité des Treg soient strictement conditionnés à l'expression de Foxp3, une régulation dynamique et adaptée à l'environnement inflammatoire dans lequel ils évoluent est possible.

3.3.2 Plasticité et instabilité des Treg

Tout en maintenant leurs fonctions suppressives et l'expression de Foxp3, les Treg peuvent exprimer des facteurs de transcription et des récepteurs de chimiokines associés aux populations de LT effecteurs polarisés. Ce gain d'expression permet aux Treg de rejoindre le site d'inflammation de façon conjointe avec les LT effecteurs et de réguler spécifiquement ces populations polarisées (Duhon et al. 2012).

Ainsi, exposés à l'IFN- γ ou à l'IL-12, les Treg acquièrent l'expression de T-bet et CXCR3, ce qui leur permet de migrer vers les sites inflammatoires à médiation Th1 (Koch et al. 2012; Koch et al. 2009; Levine et al. 2017). Cette population de Treg « Th1-like » est notamment décisive dans la prévention de la GvHD (*Graft-Versus-Host Disease*, maladie du greffon contre hôte) et du rejet d'allogreffe (Koenecke et al. 2012). Il existe également une coopération transcriptionnelle entre Foxp3 et les facteurs de transcription associés à la polarisation Th2 (GATA3 et IRF4), cette association étant indispensable à la régulation de la réponse de type Th2 (Zheng et al. 2009; Wohlfert et al. 2011). De la même façon, l'activité des TFH au sein des centres germinatifs est spécifiquement régulée par une population de Treg exprimant Bcl-6 et CXCR5, les TFR (Chung et al. 2011).

Le cas des Treg « Th17-like » est le plus signifiant car, bien qu'il existe une réelle dualité identitaire entre les Treg et les Th17, les Treg ont une aptitude particulière à se polariser en Th17. A nouveau, la co-expression de Foxp3, STAT3 et de CCR6 confère aux Treg une plus grande propension à réguler la réponse Th17 (Chaudhry et al. 2009; Sefik et al. 2015) mais il est important de noter que *in vitro*, les Treg ROR- γ t⁺ seraient capables de sécréter de l'IL-17 tout en conservant leur activité suppressive (Koenen et al. 2008; Voo et al. 2009). La polarisation des Treg « Th17-like » survient en réponse à un environnement pro-inflammatoire, notamment riche en IL-6 et en IL-23, mais elle est interdépendante de la concentration en TGF- β . Moins la concentration en TGF- β est importante dans le microenvironnement, moins Foxp3 exerce son effet suppresseur sur ROR- γ t et moins il réprime la production d'IL-17 (Zhou et al. 2008).

La provenance même des Treg « Th17-like » porte à discussion car cette population peut avoir diverses origines. Chez l'homme notamment, une sous-population de Treg exprime une isoforme épissée de Foxp3 (Foxp3 Δ 2, Foxp3 delta2), dépourvue de l'exon 2, donc ne possédant pas le site de liaison de ROR- γ t, indispensable à la régulation de la polarisation des Treg « Th17-like » (Zhou et al. 2008). Ces cellules ont une plus grande propension à exprimer ROR- γ t, et leur présence est indispensable pour conduire une régulation optimum de la réponse inflammatoire médiée par l'IL-17 (Sato et al. 2021). Par ailleurs, les Treg « Th17-like » peuvent également être issus de lymphocytes Th17 ayant transitoirement acquis l'expression de Foxp3 (McMurchy et al. 2013).

Bien qu'elle permette d'optimiser la réponse régulatrice, le phénomène de plasticité peut être préjudiciable à la fonctionnalité des Treg et les Treg « Th-like » peuvent devenir pathogéniques et contribuer aux processus auto-immuns. Au cours de la sclérose en plaques ou du diabète auto-immun notamment, les Treg circulants des patients sont en partie producteurs d'IFN- γ et ont des capacités suppressives altérées (Dominguez-Villar, Baecher-Allan, and Hafler 2011; McClymont et al. 2011). De

façon similaire, les Treg « Th17-like » sont fréquemment incriminés dans la physiopathologie des MAI ou inflammatoires, c'est notamment le cas au cours de la PR, du psoriasis ou de l'artérite à cellules géantes (Bovenschen et al. 2011; Komatsu et al. 2009; Miyabe et al. 2017; Samson et al. 2021).

Pour une partie des « Treg Th-like », s'en suit un déséquilibre de l'expression de facteurs de transcription, en la défaveur de Foxp3, ce qui conduit à une instabilité phénotypique des Treg et *in fine* à la perte totale de l'expression de Foxp3. Ces ex-Treg ont alors un phénotype et des fonctionnalités de LT effecteurs polarisés (Gaddis et al. 2018; Zhou et al. 2009; Bovenschen et al. 2011; Komatsu et al. 2014).

Toutes les populations de Treg n'ont pas la même susceptibilité à la polarisation et toutes ne subissent pas de déviation phénotypique et fonctionnelle lorsqu'elles évoluent dans un environnement inflammatoire. Tout comme leur stabilité, l'instabilité des Treg est relative au niveau de déméthylation de *FOXP3* mais les mécanismes de régulation post traductionnels de Foxp3 peuvent également être mis en jeu (Miyao et al. 2012). Du fait de leur différenciation périphérique à partir de LT conventionnels, et de l'avidité plus faible de leur TCR, les iTreg ont un niveau de déméthylation de *FOXP3* moins important que les tTreg. Les iTreg seraient ainsi plus sensibles à la polarisation (Ohkura et al. 2012). Par ailleurs, l'intensité d'expression de CD25 pourrait permettre de discriminer les Treg les plus instables, les Treg CD25^{low} semblant être les plus sensibles à une conversion en LT effecteurs (Komatsu et al. 2009).

Quelques-uns des mécanismes impliqués dans la plasticité des Treg ont été décryptés, l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-6, l'IL-12 ou l'IL-23 ont notamment été identifiées parmi les cytokines pouvant intervenir lors de ce phénomène (Shi and Chi 2019).

Les travaux décrivant les aspects moléculaires de l'influence de l'IL-6 sur le destin des lignées Treg « Th17-like » sont nombreux. D'une part, l'activation du récepteur de l'IL-6 et plus spécifiquement la signalisation de la glycoprotéine GP130 (IL-6R β) conduit à l'activation de la voie Jak2/STAT3 (Hirano 2021). STAT3 neutralise alors les effets de la signalisation de l'IL-2 puisqu'il entrave la liaison de STAT5 sur CNS2, ce qui inhibe la transcription de Foxp3 (Laurence et al. 2012). L'IL-6 induit également l'expression du régulateur de transcription ID-2 (*Inhibitor Of DNA Binding 2*) qui par l'inhibition de la liaison de EA2 (*Endophilin A2*) au promoteur de Foxp3, freine également la transcription de Foxp3 (Laurence et al. 2012). Par ailleurs, l'IL-6 favorise l'expression de Pim-1 (*Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*) qui par la phosphorylation de la partie C-terminale de Foxp3 altère ses capacités de liaison à l'ADN et inhibe l'induction de l'expression de CD25 ou de CTLA-4 (Li et al. 2014).

Sans surprise, les régulateurs post traductionnels de Foxp3 font partie des mécanismes régulant directement la plasticité des Treg. A titre d'exemple, dans des conditions d'hypoxie, HIF-1 intervient sur deux aspects importants de la conversion des Treg en Th17. D'une part elle initie le passage du métabolisme oxydatif à la glycolyse aérobie, plus favorable à l'activité Th17. D'autre part, HIF-1 induit la polyubiquitination de Foxp3 et sa dégradation par le protéasome (Kim et al. 2006; Dang et al. 2011).

3.3.3 Cas controversés de OX40L et du TNF- α

Il existe des molécules qui exercent des rôles ambivalents vis-à-vis de la stabilité des Treg, c'est notamment le cas de OX40L et du TNF- α . Tous deux sont des ligands de récepteurs de la superfamille du TNF (respectivement OX40, et TNFR1 et TNFR2), et ont des propriétés pléiotropes. Leur fonctions précises dans l'homéostasie des Treg restent controversées.

OX40 est une molécule de costimulation secondaire exprimée par environ 10 % des Treg humains (Rodríguez-Perea et al. 2016). Plusieurs études ont rapporté que son activation dans les Treg était associée à une instabilité du phénotype et à une altération de leur capacité suppressive (Vu et al. 2007; Valzasina et al. 2005). A l'opposé, des travaux décrivent un rôle positif de OX40 sur l'homéostasie des Treg et leur prolifération (Takeda et al. 2004; Griseri et al. 2010; Xiao et al. 2012). Parmi eux, les travaux de Xiao ont confirmé que la stimulation *in vitro* des Treg par OX40 diminuait le niveau d'expression de Foxp3, mais combinée à une stimulation par l'IL-2 cela permet leur expansion et le maintien de leurs capacités fonctionnelles (Xiao et al. 2012).

Par ailleurs l'axe OX40/OX40L serait impliqué dans le dysfonctionnement des Treg au cours du lupus par la régulation négative de l'expression de Foxp3 (Jacquemin et al. 2018).

Le TNF- α est une cytokine majeure de l'inflammation et elle est incriminée dans la physiopathologie de nombreuses MAI ou inflammatoires (Aggarwal 2003). Pour autant, les arguments en faveur de propriétés immunosuppressives du TNF- α sont nombreux (Zakharova and Ziegler 2005) et le rôle du TNF- α vis-à-vis de la stabilité des Treg est controversé (Salomon 2021).

Différentes études conduites *in vitro* ont montré que la présence de TNF- α dans les cocultures conduisait à une diminution de l'expression de Foxp3 et à une inhibition des propriétés suppressives des Treg (Valencia et al. 2006; Nie et al. 2013). De plus, l'administration d'anti-TNF- α à des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde permet d'augmenter la fréquence des Treg circulants, de diminuer leur apoptose spontanée, de restaurer une expression intense de Foxp3 et de rétablir les capacités suppressives des Treg des patients (Ehrenstein et al. 2004; Toubi et al. 2005; Valencia et al. 2006; Nguyen and Ehrenstein 2016).

De façon tout à fait antinomique, il a été décrit que le TNF- α par son effet anti-inflammatoire pouvait retarder *in vivo* le développement de néphropathie lupique ou du diabète (Jacob 1988, Jacob 1990). De plus, les patients recevant un traitement par des anti-TNF- α peuvent développer des anticorps antinucléaires et diverses manifestations auto-immunes telles que des lésions de vascularites ou des lésions évocatrices de lupus (Ramos-Casals et al. 2007; Sfrikakis 2010). La signalisation du TNF- α jouerait un rôle direct dans la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Treg en maintenant l'expression de Foxp3 dans un contexte inflammatoire (Chen et al. 2007; Hamano et al. 2011; Chen and Flies 2013).

Cette dualité fonctionnelle du TNF- α à l'égard des Treg pourrait reposer sur la nature de ses deux récepteurs, le récepteur au TNF- α de type 1 (TNFR1) ou de type 2 (TNFR2) (Hohmann et al. 1989; Salomon 2021) (**Figure 23**. Dualité fonctionnelle de TNFR1 & TNFR2 dans les Treg).

L'expression de TNFR1 est ubiquitaire, il est activé par sa liaison avec le TNF- α soluble et il est constitué d'un domaine de mort permettant le recrutement des protéines adaptatrices TRADD (*Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein*) et FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) et la constitution du DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Une signalisation exclusive de TNFR1 dans les lymphocytes conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire par apoptose (Faustman and Davis 2010). Inversement le TNFR2 est exprimé par les cellules endothéliales, par les cellules immunitaires et par la majorité des Treg circulants (Chen et al. 2010). Il est spécifique du TNF- α membranaire et schématiquement sa signalisation aboutit à l'activation de la voie NF κ B, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et/ou AP-1 qui promeut la survie cellulaire (Grell et al. 1998), (Faustman and Davis 2010). Bien qu'il existe probablement des liens et une coopération entre ces deux récepteurs et leurs voies de signalisation (Weiss et al. 1998) (Faustman and Davis 2013), le TNFR1 est associé à la médiation de l'effet cytotoxique induit par le TNF- α et l'induction de l'apoptose, tandis que le TNFR2 est associé à des fonctions de survie cellulaire (Faustman and Davis 2013).

Il existe chez l'homme une corrélation positive entre l'expression de Foxp3 et de TNFR2 (Chen et al. 2010) et c'est par la signalisation du TNFR2 que le TNF- α stabiliserait l'expression de Foxp3, et qu'il renforcerait les propriétés fonctionnelles des Treg (Hamano et al. 2011; Chen and Flies 2013).

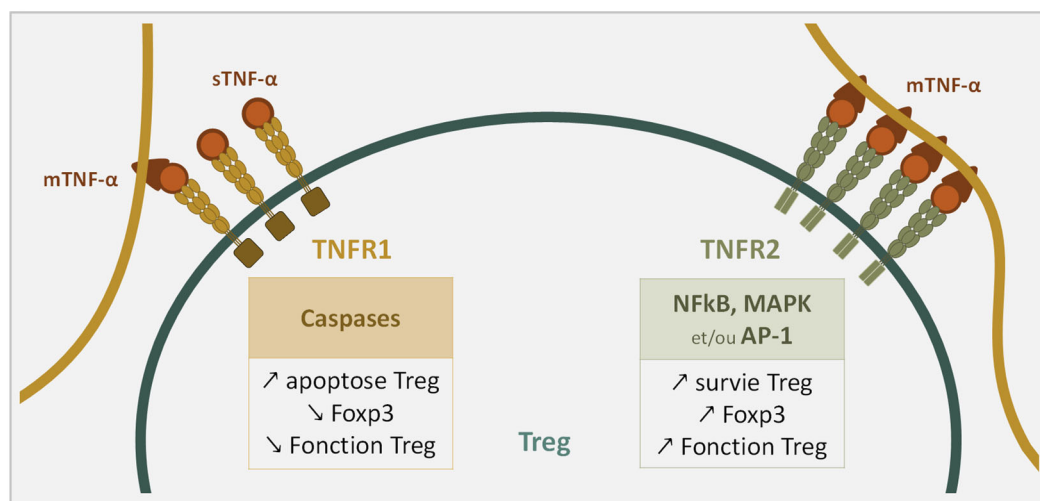


Figure 23. Dualité fonctionnelle des récepteurs 1 et 2 du TNF (TNFR1 & TNFR2) dans les Treg

La signalisation de la voie du TNFR1 est activée par la liaison du TNF- α membranaire ou soluble. Elle peut conduire à une diminution des fonctions des Treg, à une diminution de l'expression de Foxp3 et à une augmentation de l'apoptose par l'activation des caspases. En opposition, la signalisation de la voie TNFR2 est permise par la liaison du TNF- α membranaire et active les voies NF κ B et MAPK. TNFR2 jouerait un rôle direct dans la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Treg. (AP-1 : *Activating Protein-1*, Foxp3 : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3*, MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*, mTNF- α : *membrane Tumor Necrosis Factors α* , NF κ B : *Nuclear Factor-Kappa B*, sTNF- α : *Soluble Tumor Necrosis Factors α* , TNFR : *Tumor Necrosis Factors Receptor*, Treg : LT régulateur)



4

Problématique

4 Problématique

L'AHAI à auto-Ac chauds est responsable d'une destruction des GR par des auto-Ac ciblant certains Ag érythrocytaires membranaires (protéines Rhésus, protéine bande 3, glycophorine A). Les LB autoréactifs et les macrophages spléniques occupent une place centrale dans la physiopathologie de l'AHAI puisqu'ils sont respectivement à l'origine de la sécrétion des auto-Ac et de la phagocytose des GR opsonisés.

L'étude de l'implication des LT CD4⁺ dans la physiopathologie est parcellaire et nous l'avons constaté au cours de cette introduction, la plupart des résultats sont extrapolés de modèles murins. De plus, les mécanismes conduisant à la rupture de tolérance sont encore inconnus.

La question du déséquilibre de la polarisation des LT au cours de l'AHAI est toujours débattu et les données concernant les Treg nécessitent d'être consolidées chez l'homme. Un déficit quantitatif des Treg circulants chez les patients a été rapporté dans une seule étude, et aucune ne fait état des capacités fonctionnelles des Treg au cours de l'AHAI.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude globale de la réponse lymphocytaire T en intégrant ses acteurs effecteurs et régulateurs. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur cette dernière en apportant une étude fonctionnelle et en explorant les mécanismes impliqués dans son potentiel dysfonctionnement. Notre hypothèse principale est qu'il existe au cours de l'AHAI un déséquilibre de la balance lymphocytaire pro- et anti-inflammatoire qui participe à la réaction auto-immune.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'AHAI permettrait d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques indispensables pour améliorer la réponse aux traitements, augmenter les rémissions et apporter des alternatives thérapeutiques aux patients multiréfractaires.

La première partie de ce travail avait pour objectif initial de réaliser une étude concomitante des populations circulantes de LT effecteurs et régulateurs afin d'évaluer l'équilibre de la réponse lymphocytaire T au cours de l'AHAI.

Sur la base d'une cohorte de 20 patients, inclus dans notre protocole d'étude au diagnostic et exempts de tout traitement, appareillés avec 30 témoins sur l'âge et le sexe, ce premier axe d'étude s'est organisé en 4 phases distinctes :

- Une étude phénotypique des LT effecteurs et de leur polarisation
- Une étude phénotypique des Treg circulants
- Une étude fonctionnelle des Treg circulants en évaluant leur capacité à inhiber la prolifération et la sécrétion de cytokines de LT effecteurs autologues (n= 9 patients vs. 9 témoins)
- Une étude transcriptomique comparative de Treg des patients (n=4) et de témoins (n=4)

Dans un second temps, nous avons pour objectif de réaliser un parallèle avec le compartiment splénique, principale foyer de destruction des GR, d'activation et de maturation des clones lymphocytaires autoréactifs et site de synthèse des auto-Ac. Nous avons 3 objectifs principaux :

- Evaluer l'équilibre de la balance pro- et anti- inflammatoire lymphocytaire T splénique
- Etudier les particularités des lymphocytes T spléniques des patients non répondeurs à la splénectomie
- Evaluer l'impact des thérapeutiques administrées en amont de la splénectomie sur les populations T.

RÉSULTATS

1

L’AHAI & la réponse lymphocytaire T périphérique

1.1 Résumé de l'article page 100

1.2 Article page 101

Autoimmune hemolytic anemia is associated with Th17 polarization, regulatory T cell dysfunctions and TNF- α increase. Ciudad M, Ouandji S, Lamarthée B, Cladière C, Ghesquière T, Nivet M, Thébault M, Boidot R, Soudry-Faure A, Chevrier S, Richard C, Maillet T, Maurier F, Greigert H, Genet C, Ramon A, Trad M, Predan V, Saas P, Samson M, Bonnotte B, Audia S.

The Journal of clinical Investigation,
first submission on 29.07.2022 (164062-JCI-RG-1)

1 L'AHAI & la réponse lymphocytaire T périphérique

1.1 Résumé de l'article

L'anémie hémolytique auto-immune à auto-Ac chaud (AIHA) est une maladie auto-immune rare et acquise, médiée par des auto-anticorps ciblant les globules rouges. L'implication des lymphocytes T helper (Th) CD4⁺ dans la physiopathologie a été peu étudiée et la plupart des résultats sont extrapolés de modèles murins. Bien que cela soit encore débattu, l'AIHA pourrait être associée à une polarisation pro-inflammatoire de type Th17 et à un déficit quantitatif en lymphocytes T régulateurs (Treg).

Nous avons réalisé la première quantification concomitante des LT effecteurs et des Treg, ainsi qu'une étude fonctionnelle et transcriptomique des Treg de patients atteints d'AHAI au diagnostic.

Nous avons observé une orientation des LT effecteurs vers une polarisation Th17 accompagnée d'une diminution des Treg circulants, principalement des Treg effecteurs. Ce déficit quantitatif est associé à une diminution de la capacité des Treg à inhiber la prolifération des LT effecteurs, ce qui semble favoriser d'avantage la polarisation Th17. Le déficit en Treg est associé à une diminution du niveau d'expression de la protéine Foxp3, le facteur de transcription dominant des Treg, qui assure le maintien de la stabilité de leur phénotype et de leurs fonctions suppressives. Le profil transcriptomique des Treg des patients a révélé :

1. Un fort engagement des voies de signalisation du TNF dans les Treg, en accordance avec une augmentation significative du TNF- α sérique chez les patients
2. Un rôle possible de mécanismes post-traductionnels conduisant à la dégradation de Foxp3 à l'origine des dysfonctionnements des Treg

In vitro, nous avons montré qu'en plus de l'inhibition de la phagocytose des érythrocytes par les monocytes, le fostamatinib, un inhibiteur de SYK, était également capable de freiner la production de TNF- α . Cette thérapeutique, qui semble ainsi cibler plusieurs versants de la physiopathologie, apparaît comme une approche prometteuse dans l'AIHA.

1.2 Article

Submit In progress (1) History (1)

Autoimmune hemolytic anemia is associated with Th17 polarization, regulatory T cell dysfunctions and TNF- α increase

In external peer review

Marion Ciudad, Sethi Ouandji, Baptiste Lamarthée, Claudie Cladière, Thibault Ghesquière, Martin Nivet, Marine Thébault, Romain Boidot, Agnès Soudry-Faure, Sandy Chevrier, Corentin Richard, Thibault Maillet, Francois Maurier, Hélène Greigert, Coraline Genet, André Ramon, Malika Trad, Valérie Predan, Philippe Saas, Maxime Samson, Bernard Bonnotte, Sylvain Audia. (corresponding author)

JCI reference: **164062-JCI-RG-1** | [Submission details](#)

Submitted: July 29, 2022

JCI: Research first submission (164062-JCI-RG-1)

Submission metadata	[+]
Manuscript type	[+]
Title	[-]
Autoimmune hemolytic anemia is associated with Th17 polarization, regulatory T cell dysfunctions and TNF- α increase	
Authors	[+]
Abstract	[-]
<p>Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) is a rare acquired autoimmune disease mediated by antibodies targeting red blood cells. The involvement of CD4 T helper (Th) cells has been scarcely explored, with most findings extrapolated from animal models.</p> <p>Here, we performed the first concomitant quantification of effector T lymphocytes (Teff) and Treg, associated with functional and transcriptomic analyses of Treg in human wAIHA. We observed a shift of Teff toward a Th17 polarization and a decrease in circulating Treg, notably effector Treg. This quantitative deficit was associated with an impairment of Treg capability to inhibit Teff proliferation and promoted Th17 skewing. Treg deficiency was related to the diminished Foxp3 protein level, the master transcription factor maintaining phenotype stability and suppressive functions of Treg. Transcriptomic profiling revealed 1) a strong TNF-α response in Treg in accordance with serum TNF-α increase, and 2) a possible role of post-translational mechanisms leading to Foxp3 downregulation accounting for Treg dysfunctions. In vitro, we showed that besides the inhibition of erythrocyte phagocytosis by monocytes, fostamatinib, a SYK inhibitor, was also able to dampen TNF-α production in vitro, thus appearing as a promising multitargeting therapy in wAIHA.</p>	
Brief summary	[-]
Cover letter	[+]
Files	[+]

Title

Autoimmune hemolytic anemia is associated with Th17 polarization, regulatory T cell dysfunctions and TNF- α increase.

Authors

Marion Ciudad,^{1,2} Sethi Ouandji,^{1,2} Baptiste Lamarthée,² Claudie Cladière,^{1,2} Thibault Ghesquière,^{1,2} Martin Nivet,^{1,2} Marine Thébault,^{1,2} Romain Boidot,³ Agnès Soudry-Faure,⁴ Sandy Chevrier,³ Corentin Richard,³ Thibault Maillet,⁵ François Maurier,⁶ Hélène Greigert,^{1,2} Coraline Genet,² André Ramon,² Malika Trad,² Valérie Predan,¹ Philippe Saas,² Maxime Samson,^{1,2} Bernard Bonnotte,^{1,2} Sylvain Audia.^{1,2}

¹Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Referral Center for adults autoimmune cytopenia (CeReCAI) - Dijon University Hospital - F-21000 Dijon, France.

²Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique - F-21000 Dijon/Besançon, France.

³Unit of Molecular Biology, Georges-François Leclerc Cancer Center - F-21000 Dijon, France.

⁴Department of Clinical Research and Innovation (DRCI), Clinical Research Unit-Methodological Support Network (USMR), Dijon Bourgogne University Hospital, Dijon, France

⁵Department of Internal Medicine - Centre Hospitalier de Mâcon, Groupe Hospitalier Bourgogne Méridionale - F-71000 Macon, France.

⁶Department of Internal Medicine, Groupe Hospitalier UNEOS - F-57000 Metz, France.

Corresponding author: Sylvain Audia, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Referral Center for Autoimmune Cytopenia, Dijon University Hospital, UMR

Inserm 1098 RIGHT, University of Bourgogne Franche-Comté, 14 rue Paul Gaffarel, F-21000
Dijon, France. Email: sylvain.audia@u-bourgogne.fr

Conflict-of-interest statement:

S.A. served on advisory committee boards for Novartis and SOBI, received consultancy from Amgen and Novartis, lecture fee/congress support from Amgen, Grifols and Novartis, and received research grant from Novartis.

B.B. served on advisory committee boards for Novartis, received consultancy from Amgen and Novartis, lecture fee/congress support from Amgen and Novartis.

M.S. received consultancy from Abbvie, Boehringer Ingelheim, Novartis, Roche Chugai and Vifor.

The other authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) is a rare acquired autoimmune disease mediated by antibodies targeting red blood cells. The involvement of CD4 T helper (Th) cells has been scarcely explored, with most findings extrapolated from animal models.

Here, we performed the first concomitant quantification of effector T lymphocytes (Teff) and Treg, associated with functional and transcriptomic analyses of Treg in human wAIHA. We observed a shift of Teff toward a Th17 polarization and a decrease in circulating Treg, notably effector Treg. This quantitative deficit was associated with an impairment of Treg capability to inhibit Teff proliferation and promoted Th17 skewing. Treg deficiency was related to the diminished Foxp3 protein level, the master transcription factor maintaining phenotype stability and suppressive functions of Treg. Transcriptomic profiling revealed 1) a strong TNF- α response in Treg in accordance with serum TNF- α increase, and 2) a possible role of post-translational mechanisms leading to Foxp3 downregulation accounting for Treg dysfunctions. *In vitro*, we showed that besides the inhibition of erythrocyte phagocytosis by monocytes, fostamatinib, a SYK inhibitor, was also able to dampen TNF- α production *in vitro*, thus appearing as a promising multitargeting therapy in wAIHA.

Introduction

Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) is a rare acquired autoimmune disease due to antibodies that target red blood cell (RBC) antigens such as Rhesus system, protein band 3 and glycophorin A (1-3). Anti-RBC antibodies are mostly IgG, which reflects a class-switch recombination, a mechanism that involves the cooperation between B and T cells. Until now, the involvement of helper CD4 T cells (Th) has been scarcely studied in humans during wAIHA, and most of the conclusions have been derived from animal models. In mice, a Th1 polarization has been first observed (4), with an improvement of the disease by Th2 cytokines such as interleukin (IL)-4 (5). On the opposite, human wAIHA was first thought to be associated with a Th2 skewing as suggested by an increased production of IL-4 while interferon (IFN)- γ was reduced (6). However, when CD4 T cells from patients were stimulated with specific RBC antigens, IFN- γ secretion was enhanced whereas IL-4 was not detected, arguing for a Th1 polarization (7). This was secondly amended by the fact that IL-17 was increased and associated with wAIHA severity (8).

Together with the activation of the pro-inflammatory T cell response, a defect in regulatory T cells (Treg) has commonly been observed in various autoimmune diseases (9). However, the literature shows contradictory results in wAIHA. In animals, the role of Treg has been shown in a xenogeneic model based on the immunization of mice by transfusion of rat RBC. In this model, the depletion of Treg enhanced the incidence of wAIHA while their adoptive transfer prevented its establishment (10). However, such a role for Treg was not confirmed in a non-xenogeneic model as Treg depletion was not sufficient to break tolerance and to induce wAIHA (11). In humans, circulating Treg were reported to be twice less frequent than in controls, but their function has never been investigated (12). Interestingly, CD4 T cell clones specific of a

dominant Rhesus antigen and harboring regulatory properties mediated by IL-10 have been identified in a wAIHA patient, suggesting the participation of Treg in the pathogenesis (13).

For a better comprehensive appraisal of the T cell immune response during wAIHA, we performed for the first time a concurrent quantification of circulating Teff and Treg, with an assessment of Treg functions and a transcriptomic analysis.

Results

Patients

Twenty-two wAIHA patients were enrolled at diagnosis, before any treatment (**Table 1**). Their median age was 65 [53-76] years with a female/male ratio of 2.1. Secondary wAIHA was diagnosed in 5 patients (22,7%), associated with lupus (n=1), immune thrombocytopenia (n=1) or B cell lymphoproliferation (n=2, B-cell monoclonal lymphocytosis; n=1, indolent marginal zone B cell). Patients were compared to 30 HC, with a median age of 67 [58-77] (P=0.9) and a female/male ratio of 1.5 (P=0.6). Hemoglobin was lower in wAIHA patients than HC (7.4 vs. 14.2 g/dL, P<0.0001) while total leukocyte and lymphocyte counts were similar. The flowchart of the study is depicted in **Figure 1A**.

Quantitative and functional alterations of circulating Treg in wAIHA

The frequency of circulating Treg (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) was lower in wAIHA (3.2% vs. 4.5% of CD4 T cells, P=0.01; **Figure 1B**). Moreover, the quantification of Treg subtypes (14) showed that CD4⁺CD45RA⁻Foxp3^{hi} effector Treg (Fr.II/eTreg), known to harbor the strongest suppressive capabilities, were twice less frequent in wAIHA (1.1% vs. 2.1%, P=0.0008; **Figure 1C**), while the proportions of naive Treg (CD45RA⁺Foxp3^{lo}, Fr.I/nTreg) were similar. The

proportion of Treg expressing Helios was not different between the two groups (around 80% of Treg were Helios⁺), but when the frequency of CD25^{hi}Foxp3⁺Helios⁺ cells among total CD4 T cells was considered, we observed a lower proportion in wAIHA patients (2.4 vs. 3.1%; P=0.007; **Figure 1D**). As lymphocyte count and the proportion of CD4 T cells were similar between patients and controls, the decrease in total circulating Treg, eTreg and Helios⁺Treg was also observed when considering cell absolute numbers (**Table 2**).

Associated with this quantitative defect, the suppressive function of Treg was also reduced in wAIHA, as showed by a decreased ability to inhibit Teff proliferation (51% vs. 73%, P=0.003; **Figure 1E**).

wAIHA is associated with a Th17 polarization.

Concomitantly to Treg evaluation, Teff phenotype was also investigated. The expression of CD45RA and CCR7 was used to quantify naive (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻) and terminally differentiated effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻) CD4 T cells (15, 16). The proportions of the different subsets were similar between HC and patients (**Figure 2A**). Similar results were obtained when considering absolute values (**Table 2**).

We then focused on Teff polarization determined by their cytokine production. Measurement of cytokines in culture supernatants of Teff activated for 4 days showed a higher production of IL-17 in wAIHA (25.5 pg/mL vs. 7.5 pg/mL, P=0.02; **Figure 2B**), whereas IFN- γ concentration was similar and IL-4 was not detected. In contrast, when another conventional approach was used, *i.e.* after a polyclonal stimulation with PMA and ionomycin for 4 hours with blockade of excretion by brefeldin A, the percentages of the different Th subset determined by intracellular cytokines were equivalent between HC and patients (**Figure 2C**). However, when

the balance between the pro- and anti-inflammatory responses was assessed by the ratio of Th/Treg, the skewing to a Th17 polarization was confirmed, with a twice higher Th17/Treg ratio during wAIHA compared to HC (0.22 vs. 0.11, $P=0.02$; **Figure 2D**), while the Th1/Treg and Th2/Treg ratios were similar.

In addition, IL-17 production tended to be further enhanced in coculture of Teff/Treg from patients (93.1 pg/mL vs. 25.5 pg/mL, $P=0.055$; **Figure 2E**).

Altogether, these results showed that in addition to the quantitative deficiency of circulating Treg, their functional defect leads to a lower capability to inhibit Teff proliferation and even more promotes Th17 polarization, resulting in an imbalance between the pro- and anti-inflammatory immune responses in wAIHA.

Transcriptomic profiling showed Treg activation during wAIHA

To further characterize the mechanisms involved in Treg dysfunctions, a transcriptomic analysis was performed on sorted $CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ Treg obtained from 4 representative patients and 4 HC.

The isolated cells were first confirmed to be Treg as shown by the specific upregulation of 194 genes and downregulation of 192 genes (**Figure 3A**) consistent with the previously described Treg signature (17). The transcriptomic profile of Treg from patients was distinct from the one of HC, as revealed by the differential expression of 455 genes, some of which being implicated in transcription or translation processes or reflecting the activation of the T cell receptor (TCR) and TNF pathways (**Figure 3B**).

The activation of Treg by recognition of self-antigens during wAIHA was supported by the activation of the TCR pathway (**Figure 3C**), as demonstrated by the overexpression of 16 genes

such as *CD247* (TCR zeta-chain), *ZAP70* (zeta-chain associated protein 70), *CD4*, and *JAK3* (Janus kinase 3).

Unsurprisingly, in conjunction with this activated status, an activation of the transcription and translational processes were observed (**Figure 3B**) as revealed by increased transcription of RNA splicing proteins (*DHX38*, *U2AF1*, *PNN*), transcription elongation or termination factors (*SUPT6H*, *XRN2*), ribosomal proteins (*RPL*, *RPS*) and translation initiation factor (*EIF3B*).

Upon activation, various mechanisms are implicated in the suppressive functions of Treg (18, 19). Although our functional analysis showed an impairment of Treg function, a 1.5-fold increase in the transcripts of CTLA-4 (*CTLA4*), CD25 (*IL2RA*), TIGIT (*TIGIT*), and GARP (*LRRC32*), the protein binding latent TGF- β at cell surface, was observed, while others were expressed at similar rates (**Figure 3D**). As the level transcripts do not always correlate with protein expression, the level of Foxp3 protein was determined by flow cytometry and found to be diminished in patients (**discussed below, Figure 4D**), while the expression of TIGIT and GARP were not evaluated at a protein level.

Considering the Th17 polarization and the enhancement of IL-17 production in coculture of Teff with Treg during wAIHA, we hypothesized that due to their plasticity in a specific environment, Treg could have differentiate into IL-17 producing cells (20-22). We thus investigated transcripts related to Th17 polarization such as *RORC* (ROR- γ t), *CCR6* and *IL17A*. Using this strategy, we did not observe a clear skewing of Treg polarization during wAIHA (**Figure 3E**).

TNF-  signaling pathway is engaged in Treg and is correlated with the diminished Foxp3 expression.

Transcriptomic analyses showed a strong engagement of TNF-  signaling pathway in wAIHA Treg, as supported by the overexpression of 10 genes such as *MADD* (MAP kinase-activating death domain), *CASP8* (caspase 8), *TAB2* and *TRAF1* ($P < 0.0001$, **Figure 4A**). To better understand these results, TNF-  was measured in the sera and found to be higher in wAIHA patients (5.7 pg/mL vs. 3.0 pg/mL, $P < 0.0001$; **Figure 4B**).

The effects of TNF-  on T cells are complex and depend on the receptor engaged (23). TNFR1 is thought to mediate pro-inflammatory phenomena while TNFR2 supports regulatory functions (23). Treg, and most specifically eTreg, are known to preferentially express TNFR2 (24, 25). In line with this, *TNFR2* transcripts were twice higher than the ones of *TNFR1* in Treg, both in HC and patients (**Table 3**). The effects of TNFR2 ligation on Treg is controversial and has been reported to either foster their expansion and functions (24, 26) or to inhibit their regulatory properties (25, 27). In Treg of wAIHA patients, the expression of *TNFR2* was higher (average expression of 138 vs. 103, $P = 0.02$; **Table 3**). As a previous publications showed that the ligation of TNFR2 in human Treg triggered the activation of the NF- B pathway, with the transcription of *NFLB2* and *RELB* (26), these transcripts were quantified in Treg of wAIHA patients, and found to be increased by 1.4 fold ($P = 0.04$ and $P = 0.07$, respectively; **Table 3**). These results were surprising as they could argue for stimulatory effects of TNF-  on Treg, although we clearly observed both a quantitative deficiency and a functional dysfunction of Treg, associated with a decreased expression of Foxp3 at a protein level. In fact, besides the positive effects of TNFR2 ligation on Treg, negative effects have also been reported (23), involving the NF- B pathway (25) or molecules such as DBC1 (deleted breast cancer 1) (28) and PP1 (protein phosphatase 1) (29). Interestingly, the transcripts of these genes were

increased in wAIHA patients (**Table 3**), thus supporting the fact that both activating and negative pathways were engaged in Treg during wAIHA upon TNF- α stimulation.

In order to determine the possible correlation between TNF- α engagement and Treg deficiencies, a TNF index, based on the expression of the transcripts encoding molecules involved in its pathway, was calculated similarly to Treg signature (17, 30). Interestingly, TNF index inversely correlated with the frequency of circulating Treg ($R=-0.89$, $P=0.01$; **Figure 4C**), notably with the frequency of eTreg ($R=-0.79$, $P=0.05$; **Figure 4C**), thus supporting a negative role of TNF- α on Treg during wAIHA, rather than positive effects that have been shown *in vitro* on Treg from healthy subjects (24). Considering the major role of Foxp3 in the maintenance of Treg phenotype and functions (31) and that TNF- α could participate to its downregulation *in vitro* (27), Foxp3 protein level was measured in Treg by flow cytometry based on the median fluorescence intensity (MFI). Interestingly, in wAIHA patients, Foxp3 protein level was lower (MFI: 662 vs. 1149, $P=0.012$; **Figure 4D**). Consistently, the TNF index inversely correlated with the Foxp3 protein level ($R=-0.89$, $P=0.01$; **Figure 4E**), although there was an increase in *FOXP3* transcripts (**Figure 4F**). As the maintenance of Treg functions is strengthened by the interaction of Foxp3 with Helios (32, 33), its expression was also determined and found to be decreased in wAIHA (291 vs. 1346, $P=0.002$; **Figure 4G**). In contrast to Foxp3, the decrease in Helios protein level was not related to TNF- α as no correlation with TNF index was observed (**Figure 4H**). This modulation is probably due to transcriptional or posttranscriptional regulation, as the expression of *IKZF2* (encoding Helios) was comparable between patients and HC (**Figure 4I**).

Post-translational mechanisms may downregulate Foxp3 expression in Treg

The maintenance of Foxp3 expression is crucial to ensure a stable pool of functional Treg and relies on multiple mechanisms such as transcriptional, translational and post-translational regulation (34). The fact that *FOXP3* transcripts were increased during wAIHA while Foxp3 protein was diminished argued for translational or post-translational regulatory dysfunctions rather than transcriptional alterations. We thus investigated post-translational mechanisms known to regulate Foxp3 protein expression or function, such as ubiquitination, acetylation and phosphorylation (**Figure 5A and Table 4**) (34). Ubiquitination of Foxp3 promotes its degradation by the proteasome. Our transcriptomic analysis did not give formal results concerning Foxp3 ubiquitination during wAIHA, as the transcripts of genes encoding for two proteins with antagonist functions were increased, the ubiquitin ligase Stub1 (35) and the ubiquitin-specific-processing protease (USP)7 (36). On the opposite, transcripts of histone deacetylase 7 (*HDAC7*), responsible for Foxp3 deacetylation that promotes its degradation (37), were increased. We also observed a two-fold increase in the transcripts of the proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (*PIM*)2 (38), but not of *PIM1* (39), both proteins phosphorylating Foxp3, leading to its downregulation and to an impairment of Treg functions. Although its precise mechanism of action is not fully understood, DBC1 interacts with Foxp3 and triggers its degradation in a caspase 8-dependent mechanism, most particularly upon TNF- α stimulation (28). Consistent with the activation of TNF- α pathway in wAIHA Treg, an increase in transcripts of both *DBC1* and *CASP8* was observed (**Table 4, Figure 5B**).

Most importantly, supporting the role of TNF- α in all these post-translational regulatory mechanisms of Foxp3, a positive correlation was observed between TNF index and the expression of their corresponding transcripts, while they negatively correlated with the expression of Foxp3 protein and circulating Treg frequency (**Figure 5B**).

Altogether, these results strongly suggest that although the activation of *TNFR2* has been reported to foster Treg functions in previous publications, during wAIHA other mechanisms are also engaged, leading to Treg dysfunctions. This could be supported by the initiation of post-transcriptional regulation of Foxp3 expression upon TNF- α stimulation, most probably involving the phosphorylation and deacetylation of Foxp3 mediated by Pim-2 and HDAC7 respectively, and its degradation by DBC1 and caspase-8.

The Syk inhibitor fostamatinib decreased both the phagocytosis of RBC and the production of TNF- α by monocytes *in vitro*

TNF- α has been targeted in clinical practice for years, notably in rheumatoid arthritis, in which anti-TNF monoclonal antibodies have shown very good clinical results and are also able to restore Treg functions (40). Considering that during wAIHA monocytes and macrophages that are activated after phagocytosis of RBC represent an important source of TNF- α (41-43) and that the spleen tyrosine kinase SYK participates to the downstream signaling of the Fc portion of immunoglobulin G receptor (Fc γ R), we investigated the effects of fostamatinib, a SYK inhibitor, on monocyte functions *in vitro*. Indeed, fostamatinib is known to impair the phagocytosis of RBC by monocytes and showed promising results in wAIHA (44). As SYK is also involved in the production of TNF- α by monocytes (45, 46), we thought that investigating the effects of fostamatinib on monocytes would be more interesting than using specific anti-TNF monoclonal antibody. As expected, R406, the active metabolite of fostamatinib, decreased by half the phagocytosis of RBC by monocytes (11.6% vs. 5.3% of monocytes, P=0.03; **Figure 6A**). More interestingly, it also diminished the production of TNF- α induced by heme and by IgG-coated RBC (1.84 vs. 0.96-fold change compared to unstimulated monocytes, P=0.01 and 2.36% vs. 0.55, P=0.01, respectively; **Figure 6B**).

Thus, fostamatinib inhibits both RBC phagocytosis by monocytes and also TNF- α production. This double action affects effector mechanisms of RBC destruction but also the production of the cytokine that seems to play part in Treg dysfunctions during wAIHA, conferring to fostamatinib an interesting therapeutic profile, if confirmed in clinical practice.

Discussion

Our study confirmed a decrease in circulating Treg in human wAIHA (12), and showed that this quantitative deficit mainly affects eTreg, the population with the most intense inhibitory activity (14), whose frequency was two-times lower in wAIHA. We also provide the first functional evaluation of Treg in wAIHA and observed altered functions characterized by the failure to inhibit Teff proliferation and by the promotion of IL-17 production. This increased IL-17 production observed in cocultures of Teff with Treg could be either due to the conversion of Treg into IL-17⁺ Treg (20, 47) or to an enhancement of IL-17 secretion by Teff. A dysfunction of Treg has been implicated in the occurrence and the maintenance of multiple autoimmune diseases (9), although the underlying mechanisms are still puzzling. We showed that in wAIHA, Treg dysfunctions are most likely due to the decreased level of the major transcription factor Foxp3, whose stable expression is critical for Treg survival and the maintenance of their inhibitory functions (31, 48), but also to prevent their conversion toward Teff (49). The lower level of the transcription factor Helios, which associates with Foxp3 and enhances Treg functions (32, 33), might also participate in these Treg dysfunctions. This downregulation of Foxp3 level participates in the absence of formal induction of the transcription of Treg inhibitory molecules, as supported by a moderate increase in *CD25*, *CTLA4*, *TIGIT* and *GARP* transcripts despite TCR activation of Treg.

To determine the processes involved in the decrease in Foxp3 protein level in wAIHA Treg, the mechanisms that have been described to date as key regulators of Foxp3 (34, 50, 51) were investigated by transcriptomic analysis and underlined a possible dysfunction of post-translational regulatory mechanisms. Indeed, we observed a higher transcription of genes coding for Pim-2, a protein involved in Foxp3 phosphorylation, and for HDAC7, responsible for its deacetylation. These results suggest the participation of post-translational regulatory mechanisms to the decreased Foxp3 protein level and consequently the loss of Treg functions (34) in wAIHA. A direct study of Foxp3 acetylation and phosphorylation would be required to formally confirm it.

Given the increase in serum TNF- α associated with the activation of the TNF- α pathway in wAIHA Treg, together with previous reports showing that TNF- α could alter Treg functions (25, 40, 52) and could down-modulate Foxp3 expression (27), we investigated the potential link between this inflammatory cytokine and post-translational regulatory mechanisms of Foxp3. Indeed, the more the TNF- α signaling pathway was engaged, the more the number of circulating Treg was reduced, together with Foxp3 protein level, highly suggesting a pivotal role of TNF- α in Treg dysregulation in wAIHA. Our results could appear controversial, as it is increasingly recognized that TNF- α has a positive effect on Treg mediated by the ligation of TNFR2 that increases the expression of CD25 and Foxp3, promotes Treg expansion and foster their inhibitory properties in presence of IL-2 (23, 24). This was shown that the activation of the NF- κ B pathway participates in this mechanism (26). In Treg of wAIHA patients, an overexpression of *TNFR11* transcripts and an activation of the NF- κ B pathway, as reflected by the increase in *RELB* and *NFKB2* transcripts were in line with this report. However, our functional assay clearly demonstrated a dysfunction of Treg, that were also diminished in blood and had a lower expression of Foxp3. To explain these controversial results, we also

investigate pathways that have been reported to negatively regulate Treg upon TNF- α stimulation. We thus focused on DBC1, a protein able to bind Foxp3 and enhancing its degradation by a mechanism implying caspase 8 (28). This pathway is initiated in an inflammatory environment, *i.e.* in the presence of IL-6 or TNF- α . Interestingly, we observed an increase in the transcripts of both DBC1 and caspase 8, which strongly suggests that they also participate to the reduction of Foxp3 protein level and contribute to the lower number of Treg and their loss of function in wAIHA.

The increase in TNF- α is not a hallmark of wAIHA and has been observed in other hemolytic conditions such as sickle cell disease (SCD) (53, 54) and spherocytosis (55). Indeed, the release of heme from RBC can activate toll-like receptor (TLR)-4 and induces TNF- α secretion by macrophages, through a mechanism involving free radical oxygen species and the adaptor protein SYK (45, 46). Although the primary triggering factor of wAIHA is not known, hemolysis may sustain by itself the autoimmune process by the secretion of TNF- α by monocytes, resulting in Treg dysfunctions. Of note, Treg impairments have been observed in other hemolytic diseases, with Treg dysfunctions observed during SCD (56) and lower circulating Treg frequency in paroxysmal nocturne hemoglobinuria (57). The results of a phase 2 clinical trial of fostamatinib showed promising results with a response achieved in nearly half of the patients (44). Its primary mechanism of action is the inhibition of SYK which is necessary for Fc γ R signaling pathway and thus phagocytosis of autoantibody-recognized RBC (58). SYK inhibition also impairs BCR downstream signaling, B cell survival, activation and antibody production *in vitro* (59), suggesting that fostamatinib might reduce anti-RBC antibodies *in vivo* although no data are available yet (44). Since SYK is involved in the production of TNF- α by monocytes (46), we investigated the effect of fostamatinib on monocytes *in vitro*. We observed a decrease in RBC phagocytosis associated with an inhibition of TNF- α production.

Thus, fostamatinib may play a broader action than previously thought, by acting on multiple pathways of wAIHA pathogenesis. Altogether, these multiple effects could confer to fostamatinib both a short-term effect by reducing RBC phagocytosis and anti-RBC antibody production, but also a long-term effect by restoring the immune tolerance mediated by Treg, which could allow its discontinuation overtime.

The interest of our work also relies on the concomitant evaluation of the anti-inflammatory and the pro-inflammatory responses, as an imbalance is observed in various autoimmune diseases, the pro-inflammatory response being mostly characterized by Th1 and Th17 lymphocytes. To date, T cell polarization in wAIHA was not formally established in humans. It was successively suspected a Th2 polarization (6), then a Th1 (7) and finally a Th17 skewing (8). Our results strongly support the latter as evidenced by the increase in IL-17 secretion by Teff, with a clear imbalance of the Th17/Treg ratio in wAIHA, whereas Th1/Treg and Th2/Treg ratios were unaffected.

Taken altogether, our results show that in wAIHA, Treg harbor both quantitative and functional dysfunctions that cannot counteract the pro-inflammatory Th17 polarization of Teff. These Treg defects are associated with a downmodulation of Foxp3 expression that is most probably driven by post-translational mechanisms such as deacetylation and phosphorylation of Foxp3, and also involved DBC1 and caspase 8. The activation of these mechanisms positively correlates with the engagement of the TNF- α pathway in Treg, whose serum concentrations are increased during wAIHA. This suggests that targeting TNF- α could be a novel approach complementary to current treatments to restore immune tolerance in wAIHA. Along this line, fostamatinib could be a promising treatment in wAIHA as it reduces both the production of TNF- α and the phagocytosis of RBC by monocytes.

Methods

Patients

Healthy controls (HC) and patients with newly diagnosed wAIHA referred to our center were proposed to be enrolled. The diagnosis of wAIHA was defined as hemoglobin <11 g/dL, with increased reticulocyte count, low haptoglobin level and a positive direct antiglobulin test (IgG +/- complement). The diagnosis of primary wAIHA was retained after exclusion of lymphoproliferative malignancies, other autoimmune diseases, primary immunodeficiency and infections, as recommended (60, 61).

Cell isolation, culture, and storage.

Whole blood from patients or HC was collected in lithium heparin tubes and processed within hour. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient medium (Lymphoprep, Eurobio) and split for immunophenotyping, cell culture and storage. Cell cultures were performed in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Eurobio), and 1% penicillin, streptavidin and fungizone (Lonza). A fraction of PBMC were stored in medium supplemented with 10% DMSO (Sigma-Aldrich) in liquid nitrogen.

Immunophenotyping

Immunophenotyping was performed on fresh PBMC, antibodies and reagents used are detailed in **supplemental Table S1**. Intracellular cytokine production was measured after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 g/mL, Sigma-Aldrich), for 4 hours, in the presence of brefeldin A (GolgiPlug,

0.1%, BD Biosciences). Data were acquired on BD Biosciences LSRII cytometer and analyzed with FlowJo® v10 software (BD Biosciences).

T cell proliferation suppression assay

Teff (CD4⁺CD25⁻) and Treg (CD4⁺CD25^{hi}) were purified from fresh PBMC by magnetic cell isolation (CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec). Teff were labeled with CellTrace violet (Invitrogen), seeded at 5x10⁴ cells/wells in 96-wells plate. Cells were activated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (Treg suppression inspector, Miltenyi Biotec) and cultured for 4 days with or without Treg (Teff/Treg ratio=2/1). Proliferation was measured by flow cytometry based on CellTrace dilution. The proliferation index (PI) was computed from ModFit LT software (Verity Software House).

Assessment of monocyte function during hemolysis

Monocytes were isolated by positive magnetic selection using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec) and seeded at 10⁶ cells/wells in 24-wells plate. Cells were cultured during 24h alone or stimulated with hemin (40 µM, Sigma-Aldrich) or allogenic RBC (5.10⁶ cells/wells) labeled with CellTrace and coated with anti-glycophorin A (R&D systems), in presence or not of the fostamatinib-derived active metabolite R406 (2 µM, Invivogen). Flow cytometry was used to quantify TNF-α production and RBC phagocytosis. Data were acquired on Attune NxT flow cytometer (Invitrogen) and analyzed with FlowJo® v10 software.

RNA sequencing

Frozen PBMC samples from 4 patients and 4 sex- and age-matched HC were used for RNA sequencing (RNAseq). After dead cell removal (Dead Cell Removal Kit, Miltenyi Biotech), Fluorescent activated cell sorting (FACS) of Treg (FVS780⁺CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) was performed on FACSAria III sorter (BD Biosciences). Cells were recovered into lysis buffer (RLT Buffer, Qiagen) and stored at -80°C.

Total RNA was extracted using the Maxwell RSC RNA FFPE kit (Promega) and RNAseq was processed in one batch. Ribosomal RNA-depleted RNA was used for library preparation with the NEBNext Ultra II Directional RNA library prep kit for Illumina (New England BioLabs). Libraries were paired and sequenced (2x76 base pairs) on a NextSeq500 device (Illumina), with a read depth of 40 million. Kallisto software was used for quantifying transcript abundance from RNA-seq data against GRCh38 cDNA reference transcriptome from the Ensembl database (v96). Only protein-coding transcripts and genes were included in the downstream analysis. Differential expression analysis was performed using DEseq-2 R script and SARTools package in R environment (Galaxy, Galaxy instance). Genes with a P-value below 0.05 and normalized read count greater than 25 were considered as significantly differentially expressed. RNA-sequencing data are available in the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE195791).

Gene Ontology Terms, Treg signature, and index computations

Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using DAVID Bioinformatics Resources website (v6.8) for all differentially expressed. Treg transcriptomic identity was assessed by referring to the Treg-signature genes (17). To reduce noise, genes with an inter-replicate CV

intra-replicate <0.7 and an expression level >20 in either comparison groups were selected.

The overlap significance into our dataset was assessed by Chi square test.

Tumor necrosis factor (TNF) index was calculated for each subject by averaging the normalized expression of all genes belonging to TNF pathway (normalized expression *versus* mean expression of all HC) similarly to published data on Treg signature (17, 30).

Cytokine assays

IFN- γ , IL-4, IL-17 and TNF- α were quantified in sera and culture supernatants using multiplex immunoassay (Luminex Human Discovery Assay, R&D systems). Data were acquired on Bio-Plex® 200 system (Bio-Rad) and analyzed with Bio-Plex Manager software (Bio-Rad).

Statistics

Statistical analyses and graphs were performed with Prism v9.3.0 (GraphPad Software), R Studio (1.4.1717 "Juliet Rose") and Heatmaper. Data are reported as the median with interquartile range, except for box plots that expressed the median with min and max values. Data were compared using non-parametric tests: Mann-Whitney test for independent data, Wilcoxon signed rank test for paired conditions, and Spearman's rank correlation test for correlation analyses. P-value <0.05 was considered significant.

Study approval

All patients gave a written informed consent in accordance with the declaration of Helsinki before participating to this prospective study (NCT02158195). The research was approved by

the Institutional Review Board and the Independent Ethics Committee (*Comité de Protection des Personnes*, CPP Est 1).

Authorship contributions

S.A., B.B., M.C., and A.S.F. designed the study; S.A., P.S., and B.B. funded the research; S.A., B.B., T.M., V.P., M.S. and F.M. recruited patients and provided clinical information; S.A. and M.C. designed the experiments; M.C., S.O., C.C., T.G., M.N., M.T., H.G., C.G., A.R., and M.T. performed experiments; R.B., S.C., and C.R. performed RNA sequencing; M.C., B.L. and S.A. analyzed data; M.C., B.L., and S.A. drew the figures; S.A. and M.C. wrote the manuscript; S.A., M.C., M.S., B.L., P.S, and B.B. edited the paper.

Acknowledgments

This study was funded by a research grant (2012-A001154-39) from the GIRCI Est (*Groupement Interrégional pour la Recherche Clinique et l'Innovation*), by the French ministry of health and solidarity (Referral Centers for Rare Diseases), and by the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

We thank Y. Duffourd and Dr. H. Begue for their valuable advice for RNAseq analysis.

We thank Dr. A. Legrand, N. Pernet and S. Monier, from the flow cytometry core facility (Inserm UMR1231, Université de Bourgogne Franche-Comté), for their technical support for flow cytometry and cell sorting. The flow cytometry core facility is supported by the Burgundy Regional Council.

References

1. Michel, M. 2014. Warm autoimmune hemolytic anemia: advances in pathophysiology and treatment. *Presse Med* 43:e97-e104.
2. Barcellini, W., Zaninoni, A., Giannotta, J.A., and Fattizzo, B. 2020. New Insights in Autoimmune Hemolytic Anemia: From Pathogenesis to Therapy Stage 1. *J Clin Med* 9.
3. Mahevas, M., Michel, M., Vingert, B., Moroch, J., Boutboul, D., Audia, S., Cagnard, N., Ripa, J., Menard, C., Tarte, K., et al. 2015. Emergence of long-lived autoreactive plasma cells in the spleen of primary warm auto-immune hemolytic anemia patients treated with rituximab. *J Autoimmun* 62:22-30.
4. Shen, C.R., Mazza, G., Perry, F.E., Beech, J.T., Thompson, S.J., Corato, A., Newton, S., Barker, R.N., and Elson, C.J. 1996. T-helper 1 dominated responses to erythrocyte Band 3 in NZB mice. *Immunology* 89:195-199.
5. Youssef, A.R., Shen, C.R., Lin, C.L., Barker, R.N., and Elson, C.J. 2005. IL-4 and IL-10 modulate autoimmune haemolytic anaemia in NZB mice. *Clin Exp Immunol* 139:84-89.
6. Fagiolo, E., and Toriani-Terenzi, C. 2002. Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity* 35:39-44.
7. Hall, A.M., Ward, F.J., Vickers, M.A., Stott, L.M., Urbaniak, S.J., and Barker, R.N. 2002. Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen. *Blood* 100:4529-4536.
8. Hall, A.M., Zamzami, O.M., Whibley, N., Hampsey, D.P., Haggart, A.M., Vickers, M.A., and Barker, R.N. 2012. Production of the effector cytokine interleukin-17, rather than interferon-gamma, is more strongly associated with autoimmune hemolytic anemia. *Haematologica* 97:1494-1500.

9. Grant, C.R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., and Longhi, M.S. 2015. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev* 14:105-116.
10. Mqadmi, A., Zheng, X., and Yazdanbakhsh, K. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 105:3746-3748.
11. Richards, A.L., Kapp, L.M., Wang, X., Howie, H.L., and Hudson, K.E. 2016. Regulatory T Cells Are Dispensable for Tolerance to RBC Antigens. *Front Immunol* 7:348.
12. Ahmad, E., Elgohary, T., and Ibrahim, H. 2011. Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21:297-304.
13. Ward, F.J., Hall, A.M., Cairns, L.S., Leggat, A.S., Urbaniak, S.J., Vickers, M.A., and Barker, R.N. 2008. Clonal regulatory T cells specific for a red blood cell autoantigen in human autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 111:680-687.
14. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911.
15. Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., et al. 2013. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38:187-197.
16. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.

17. Ferraro, A., D'Alise, A.M., Raj, T., Asinovski, N., Phillips, R., Ergun, A., Replogle, J.M., Bernier, A., Laffel, L., Stranger, B.E., et al. 2014. Interindividual variation in human T regulatory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E1111-1120.
18. Grover, P., Goel, P.N., and Greene, M.I. 2021. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol* 12:750542.
19. Miyara, M., and Sakaguchi, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116.
20. Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A., and Takayanagi, H. 2014. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 20:62-68.
21. Saxena, V., Lakhan, R., Iyyathurai, J., and Bromberg, J.S. 2021. Mechanisms of exTreg induction. *Eur J Immunol* 51:1956-1967.
22. Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J.B., Tanaka, A., Ichiyama, K., and Ohkura, N. 2020. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol* 38:541-566.
23. Salomon, B.L. 2021. Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells. *Nat Rev Rheumatol* 17:487-504.
24. Zaragoza, B., Chen, X., Oppenheim, J.J., Baeyens, A., Gregoire, S., Chader, D., Gorochov, G., Miyara, M., and Salomon, B.L. 2016. Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat Med* 22:16-17.
25. Nagar, M., Jacob-Hirsch, J., Vernitsky, H., Berkun, Y., Ben-Horin, S., Amariglio, N., Bank, I., Kloog, Y., Rechavi, G., and Goldstein, I. 2010. TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol* 184:3570-3581.

26. Wang, J., Ferreira, R., Lu, W., Farrow, S., Downes, K., Jermutus, L., Minter, R., Al-Lamki, R.S., Pober, J.S., and Bradley, J.R. 2018. TNFR2 ligation in human T regulatory cells enhances IL2-induced cell proliferation through the non-canonical NF- B pathway. *Sci Rep* 8:12079.
27. Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M., and Lipsky, P.E. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108:253-261.
28. Gao, Y., Tang, J., Chen, W., Li, Q., Nie, J., Lin, F., Wu, Q., Chen, Z., Gao, Z., Fan, H., et al. 2015. Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3246-3254.
29. Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., et al. 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 19:322-328.
30. Galvan-Pena, S., Leon, J., Chowdhary, K., Michelson, D.A., Vijaykumar, B., Yang, L., Magnuson, A.M., Chen, F., Manickas-Hill, Z., Piechocka-Trocha, A., et al. 2021. Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.
31. Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 8:277-284.
32. Seng, A., Krausz, K.L., Pei, D., Koestler, D.C., Fischer, R.T., Yankee, T.M., and Markiewicz, M.A. 2020. Coexpression of FOXP3 and a Helios isoform enhances the effectiveness of human engineered regulatory T cells. *Blood Adv* 4:1325-1339.

33. Takatori, H., Kawashima, H., Matsuki, A., Meguro, K., Tanaka, S., Iwamoto, T., Sanayama, Y., Nishikawa, N., Tamachi, T., Ikeda, K., et al. 2015. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis Rheumatol* 67:1491-1502.
34. Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G.T., Di Rella, F., de Candia, P., and De Rosa, V. 2019. Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Front Immunol* 10:3136.
35. Chen, Z., Barbi, J., Bu, S., Yang, H.Y., Li, Z., Gao, Y., Jinasena, D., Fu, J., Lin, F., Chen, C., et al. 2013. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* 39:272-285.
36. van Loosdregt, J., Fleskens, V., Fu, J., Brenkman, A.B., Bekker, C.P., Pals, C.E., Meeding, J., Berkers, C.R., Barbi, J., Grone, A., et al. 2013. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity* 39:259-271.
37. Beier, U.H., Akimova, T., Liu, Y., Wang, L., and Hancock, W.W. 2011. Histone/protein deacetylases control Foxp3 expression and the heat shock response of T-regulatory cells. *Curr Opin Immunol* 23:670-678.
38. Deng, G., Nagai, Y., Xiao, Y., Li, Z., Dai, S., Ohtani, T., Banham, A., Li, B., Wu, S.L., Hancock, W., et al. 2015. Pim-2 Kinase Influences Regulatory T Cell Function and Stability by Mediating Foxp3 Protein N-terminal Phosphorylation. *J Biol Chem* 290:20211-20220.
39. Li, Z., Lin, F., Zhuo, C., Deng, G., Chen, Z., Yin, S., Gao, Z., Piccioni, M., Tsun, A., Cai, S., et al. 2014. PIM1 kinase phosphorylates the human transcription factor FOXP3 at

- serine 422 to negatively regulate its activity under inflammation. *J Biol Chem* 289:26872-26881.
40. Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200:277-285.
41. Gallagher, M.T., Branch, D.R., Mison, A., and Petz, L.D. 1983. Evaluation of reticuloendothelial function in autoimmune hemolytic anemia using an in vitro assay of monocyte-macrophage interaction with erythrocytes. *Exp Hematol* 11:82-89.
42. Meinderts, S.M., Oldenburg, P.A., Beuger, B.M., Klei, T.R.L., Johansson, J., Kuijpers, T.W., Matozaki, T., Huisman, E.J., de Haas, M., van den Berg, T.K., et al. 2017. Human and murine splenic neutrophils are potent phagocytes of IgG-opsonized red blood cells. *Blood Adv* 1:875-886.
43. Oldenburg, P.A., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. 2001. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 193:855-862.
44. Kuter, D.J., Rogers, K.A., Boxer, M.A., Choi, M., Agajanian, R., Arnold, D., Broome, C.M., Field, J.J., Murakhovskaya, I., Numerof, R., et al. 2022. Fostamatinib for the treatment of warm antibody autoimmune hemolytic anemia: Phase 2, multicenter, open-label study. *Am J Hematol*.
45. Fortes, G.B., Alves, L.S., de Oliveira, R., Dutra, F.F., Rodrigues, D., Fernandez, P.L., Souto-Padron, T., De Rosa, M.J., Kelliher, M., Golenbock, D., et al. 2012. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood* 119:2368-2375.

46. Prestes, E.B., Alves, L.S., Rodrigues, D.A.S., Dutra, F.F., Fernandez, P.L., Paiva, C.N., Kagan, J.C., and Bozza, M.T. 2020. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Participate in Signaling Triggered by Heme in Macrophages and upon Hemolysis. *J Immunol* 205:2795-2805.
47. Hori, S. 2014. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunol Rev* 259:159-172.
48. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L.T., and Bluestone, J.A. 2009. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
49. Bailey-Bucktrout, S.L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Luche, H., Fehling, H.J., and Bluestone, J.A. 2013. Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* 39:949-962.
50. Ohkura, N., and Sakaguchi, S. 2020. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res* 30:465-474.
51. Dong, Y., Yang, C., and Pan, F. 2021. Post-Translational Regulations of Foxp3 in Treg Cells and Their Therapeutic Applications. *Front Immunol* 12:626172.
52. Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. 2010. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* 328:372-376.
53. Bowers, A.S., Reid, H.L., Greenidge, A., Landis, C., and Reid, M. 2013. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLoS One* 8:e68929.

54. Belcher, J.D., Marker, P.H., Weber, J.P., Hebbel, R.P., and Vercellotti, G.M. 2000. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 96:2451-2459.
55. Rocha, S., Costa, E., Rocha-Pereira, P., Ferreira, F., Cleto, E., Barbot, J., Quintanilha, A., Belo, L., and Santos-Silva, A. 2011. Erythropoiesis versus inflammation in Hereditary Spherocytosis clinical outcome. *Clin Biochem* 44:1137-1143.
56. Bao, W., Zhong, H., Li, X., Lee, M.T., Schwartz, J., Sheth, S., and Yazdanbakhsh, K. 2011. Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and beta-thalassemia major. *Am J Hematol* 86:1001-1006.
57. Alfinito, F., Ruggiero, G., Sica, M., Udhayachandran, A., Rubino, V., Della Pepa, R., Palatucci, A.T., Annunziatella, M., Notaro, R., Risitano, A.M., et al. 2012. Eculizumab treatment modifies the immune profile of PNH patients. *Immunobiology* 217:698-703.
58. Nichola Cooper, Robert P. Numerof, Sandra Tong, and David J. Kuter. 2020. Fostamatinib for the Treatment of Warm Antibody Autoimmune Hemolytic Anemia (wAIHA): A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Global Study. *Blood* 136:1-3.
59. Roders, N., Herr, F., Ambroise, G., Thauinat, O., Portier, A., Vazquez, A., and Durrbach, A. 2018. SYK Inhibition Induces Apoptosis in Germinal Center-Like B Cells by Modulating the Antiapoptotic Protein Myeloid Cell Leukemia-1, Affecting B-Cell Activation and Antibody Production. *Front Immunol* 9:787.
60. Barcellini, W., and Fattizzo, B. 2020. The Changing Landscape of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Front Immunol* 11:946.

61. Jager, U., Barcellini, W., Broome, C.M., Gertz, M.A., Hill, A., Hill, Q.A., Jilma, B., Kuter, D.J., Michel, M., Montillo, M., et al. 2019. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Rev* 41:100648.

Figures

Figure 1

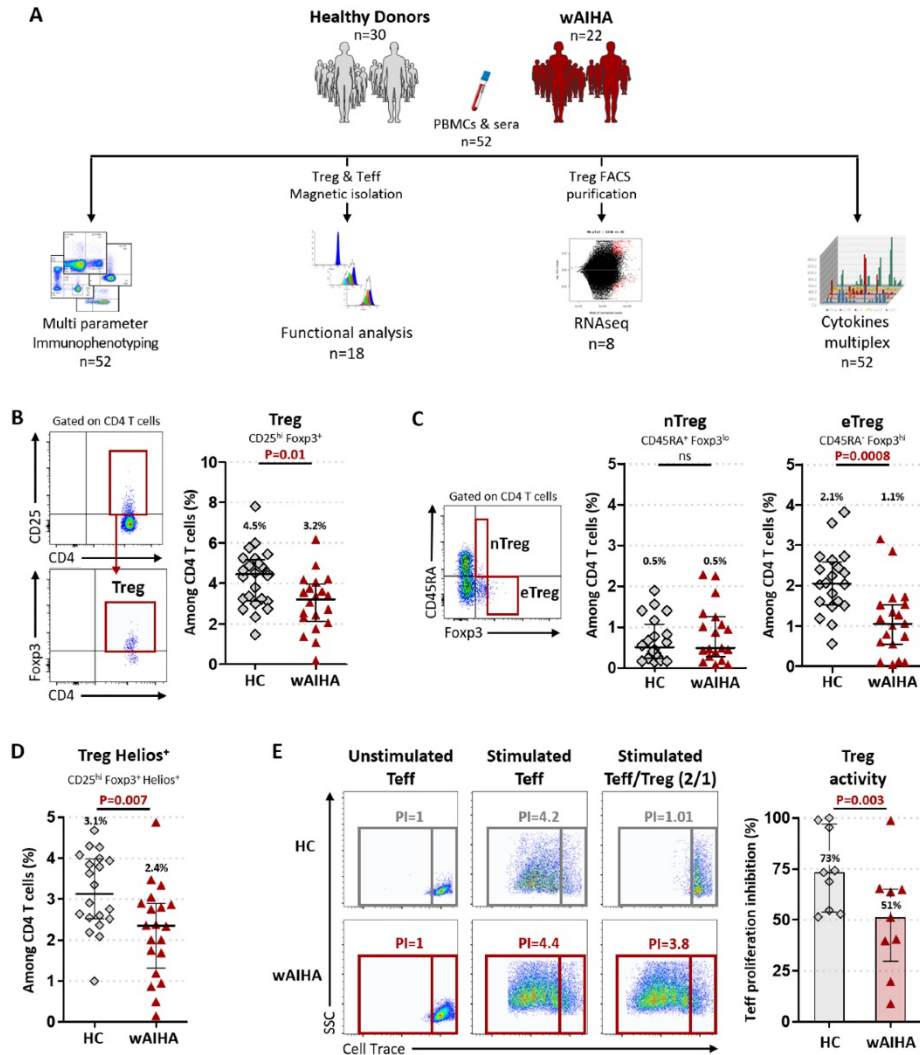


Figure 1. Quantitative and functional alterations of circulating Treg in wAIHA

(A) Flowchart of the overall experimental approach. (B) Dot plot showing the gating strategy for the quantification of Treg, defined as CD4⁺CD25^{hi}Fop3⁺ lymphocytes, by flow cytometry (left panel). Scatter dot plot showing Treg frequencies of HC (n=24) and wAIHA patients (n=20) among circulating CD4 T cells (right panel). (C) Dot plot showing the gating strategy for the determination of naive Treg (CD45RA⁺Fop3^{low}; Fr. I/nTreg) and effector Treg (CD45RA⁺Fop3^{hi}; Fr. II/eTreg) by flow cytometry (left panel; HC n=20; wAIHA n=19). Scatter dot plots showing the frequency of Treg subsets among circulating CD4 T cells (right panel). (D) Scatter dot plots showing the frequency of Treg expressing Helios among circulating CD4 T cells. (E) Effector T cell proliferation assay. Representative dot plots showing the proliferation of effector T cells (Teff) stimulated or not with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads, in presence or not of Treg (Teff/Treg ratio: 2/1), assessed by CellTrace dilution by flow cytometry after 4 days of culture, for one representative HC and one representative wAIHA patient. Proliferation index (PI) is mentioned (left panel). Scatter dot plot showing Treg function as determined by the inhibition of Teff proliferation for 9 HC and 9 wAIHA patients (right panel). The proliferation index of stimulated Teff alone is used as reference. P-values derived from Mann-Whitney test. HC, healthy controls; eTreg, effector Treg; nTreg, naive Treg; ns, not significant; PI, proliferation index; Teff, effector T cells.

Figure 2

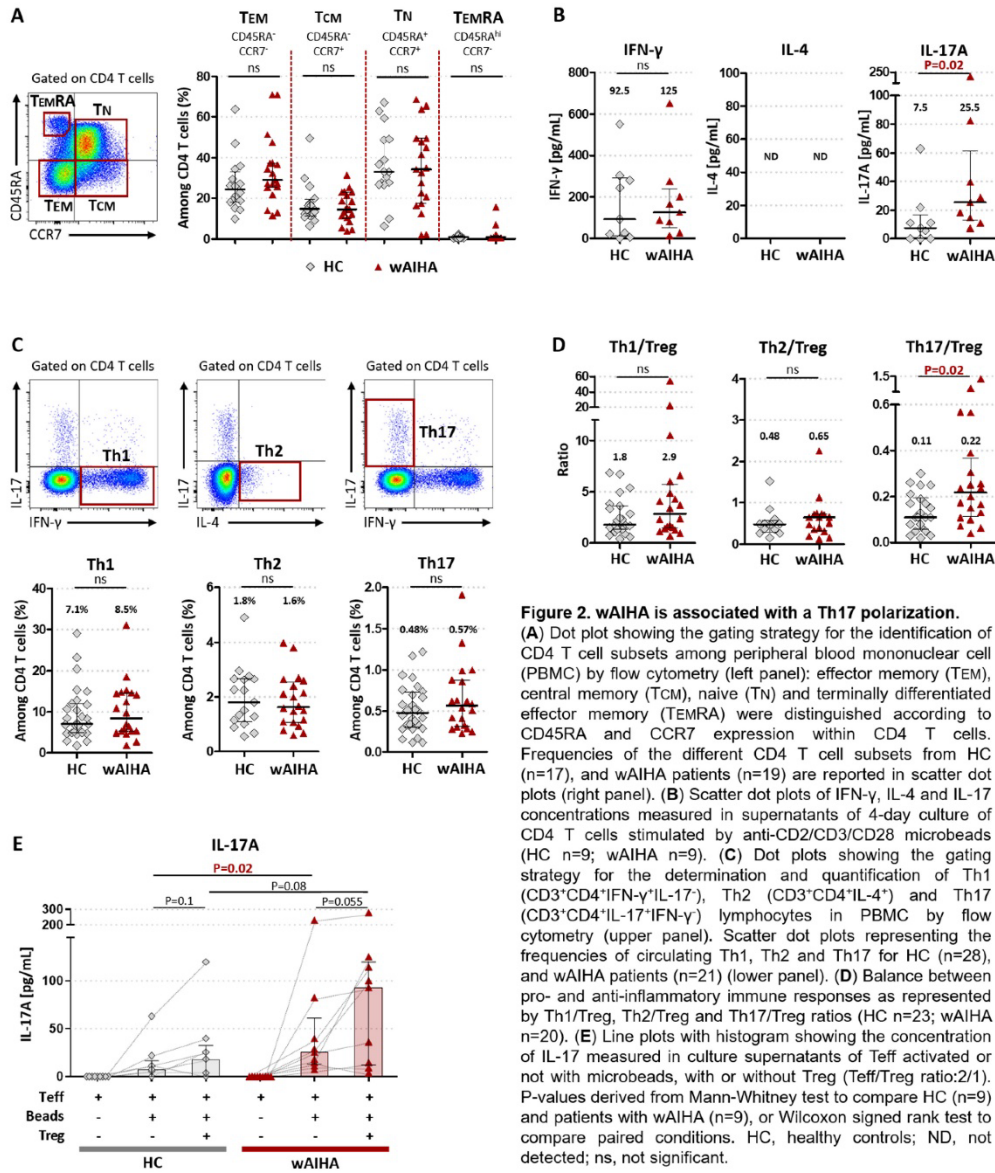


Figure 2. wAIHA is associated with a Th17 polarization. (A) Dot plot showing the gating strategy for the identification of CD4 T cell subsets among peripheral blood mononuclear cell (PBMC) by flow cytometry (left panel): effector memory (TEM), central memory (Tcm), naive (TN) and terminally differentiated effector memory (TEMRA) were distinguished according to CD45RA and CCR7 expression within CD4 T cells. Frequencies of the different CD4 T cell subsets from HC (n=17), and wAIHA patients (n=19) are reported in scatter dot plots (right panel). (B) Scatter dot plots of IFN- γ , IL-4 and IL-17 concentrations measured in supernatants of 4-day culture of CD4 T cells stimulated by anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (HC n=9; wAIHA n=9). (C) Dot plots showing the gating strategy for the determination and quantification of Th1 (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁻), Th2 (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺) and Th17 (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻) lymphocytes in PBMC by flow cytometry (upper panel). Scatter dot plots representing the frequencies of circulating Th1, Th2 and Th17 for HC (n=28), and wAIHA patients (n=21) (lower panel). (D) Balance between pro- and anti-inflammatory immune responses as represented by Th1/Treg, Th2/Treg and Th17/Treg ratios (HC n=23; wAIHA n=20). (E) Line plots with histogram showing the concentration of IL-17 measured in culture supernatants of Teff activated or not with microbeads, with or without Treg (Teff/Treg ratio:2/1). P-values derived from Mann-Whitney test to compare HC (n=9) and patients with wAIHA (n=9), or Wilcoxon signed rank test to compare paired conditions. HC, healthy controls; ND, not detected; ns, not significant.

Figure 3

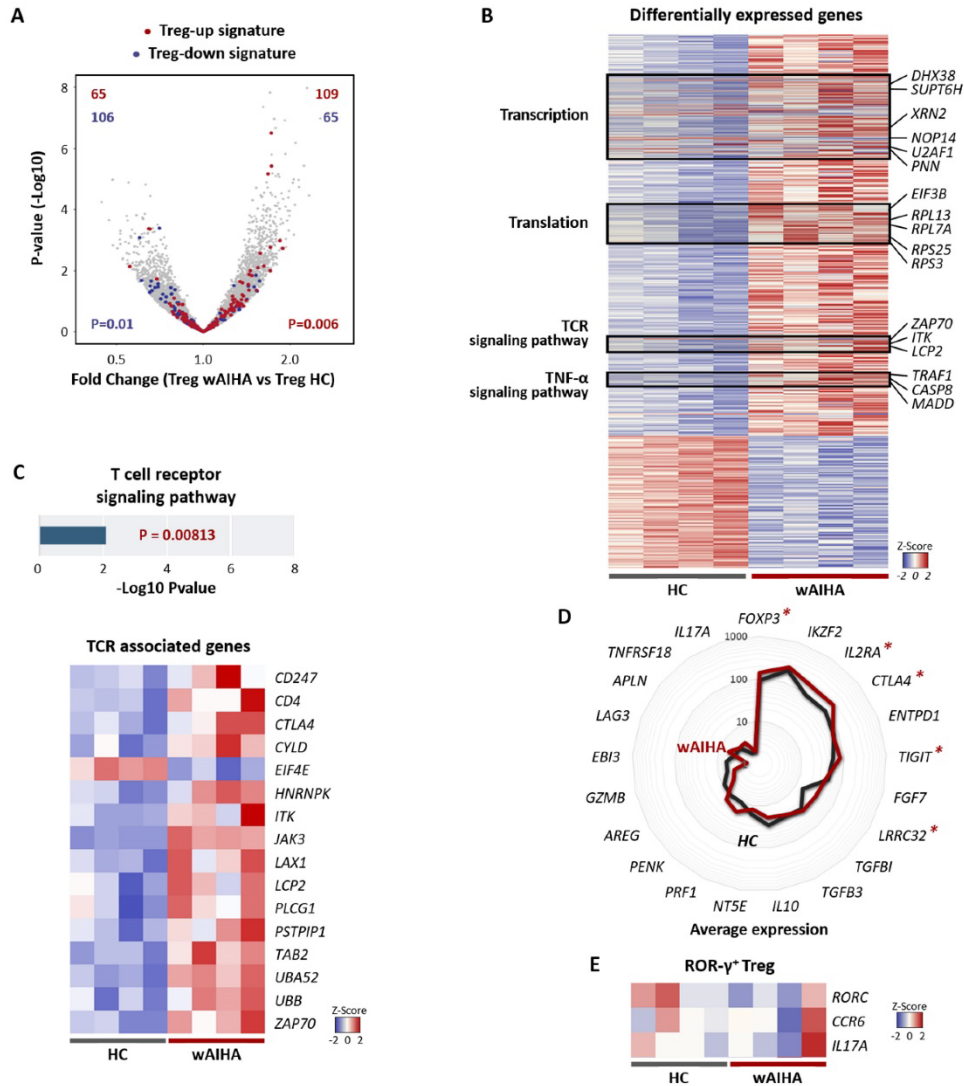


Figure 3. Transcriptomic profiling of Treg showing TCR-activated Treg with engagement of transcriptional and translational processes.

(A) Volcano plot (fold change vs. P-value) displaying the transcriptomes of Treg from patients with wAIHA compared to HC. Genes that are part of the Treg signature are highlighted in red and blue when their expression is increased or decreased in wAIHA, respectively. P-values derived from Chi-Square test. (B) Heat map showing Treg genes that are differentially expressed between HC (n=4) and wAIHA patients (n=4). The relative gene expression (Z-Score) is represented by color gradient (decreased expression in blue and increased in red). Four of the key terms predicted by the Gene Ontology Analysis are annotated along with the main genes implicated. (C) Enrichment of T cell receptor (TCR) signaling pathway was evaluated by gene ontology analysis. P value is shown (upper panel). Heat map of differentially expressed genes associated with T cell receptor signaling pathway is shown in the lower panel. (D) Radar chart showing the average expression of transcripts of Treg effector molecules (HC n=4; wAIHA n=4). (E) Heat map showing the relative expression of transcripts used for the identification of ROR- γ^+ Treg between HC (n=4) and wAIHA patients (n=4). The relative gene expression (Z-Score) is depicted by color gradient of blue (downregulated) and red (upregulated). HC, healthy controls; * P < 0.05.

Figure 4

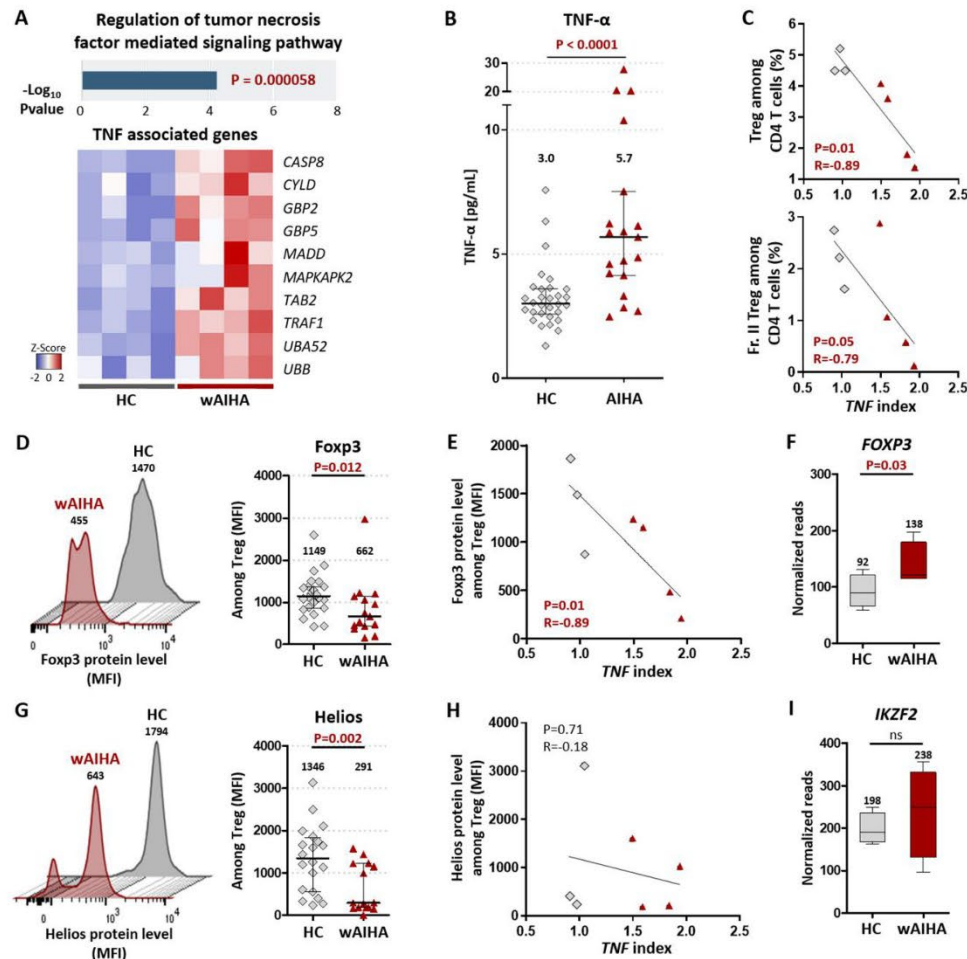


Figure 4. TNF- α signaling engagement correlates with Treg dysfunctions.

(A) Enrichment of Tumor necrosis factor (TNF)-mediated signaling pathway was evaluated by gene ontology analysis. P value is shown (upper panel). Heat map showing the relative expression of genes associated with TNF signaling pathway, between HC (n=4) and wAIHA patients (n=4) (lower panel). The relative gene expression (Z-Score) is depicted by color gradient of blue (downregulated) and red (upregulated). (B) Scatter dot plot of TNF- α concentration measured in sera from HC (n=26) and wAIHA patients (n=20). P-values derived from Mann-Whitney test. (C) The activation of the TNF pathway is represented as TNF index, calculated by averaging the normalized expression of TNF-associated genes differentially expressed in Treg. Correlation of the TNF index with Treg frequency (upper panel) and Fr. II/eTreg frequency (lower panel) among circulating CD4 T cells from HC (grey diamonds, n=3) and wAIHA patients (red triangles, n=4). P- and R-values derived from Spearman correlation analysis. (D) Nuclear Foxp3 protein expression assessed by the mean fluorescence intensity (MFI) measured by flow cytometry in circulating Treg from HC (n=24) and wAIHA patients (n=15). Representative histogram of nuclear expression (left panel). Scatter dot plots of Foxp3 MFI among circulating Treg (right panel). (E) Correlation between TNF index and Foxp3 MFI in circulating Treg (HC n=3; wAIHA n=4). P- and R-values derived from Spearman correlation analysis. (F) Box-and-whiskers plots of normalized expression of *FOXP3* transcripts in Treg (HC n=4; wAIHA n=4). P-values derived from Mann-Whitney test. (G) Nuclear Helios protein expression assessed by the MFI measured in circulating Treg from HC (n=24) and wAIHA patients (n=15). Representative histogram of its nuclear expression (left panel). Scatter dot plots of Helios MFI among circulating Treg (right panel). P-values derived from Mann-Whitney test. (H) Correlation between TNF index and Helios MFI in circulating Treg from HC and wAIHA patients (HC n=3; wAIHA n=4). P- and R-values derived from Spearman correlation analysis. (I) Box-and-whiskers plots of normalized expression of *IKZF2* transcript, encoding for Helios (HC n=4; wAIHA n=4). P-values derived from Mann-Whitney test. HC, healthy controls; ns, not significant.

Figure 5

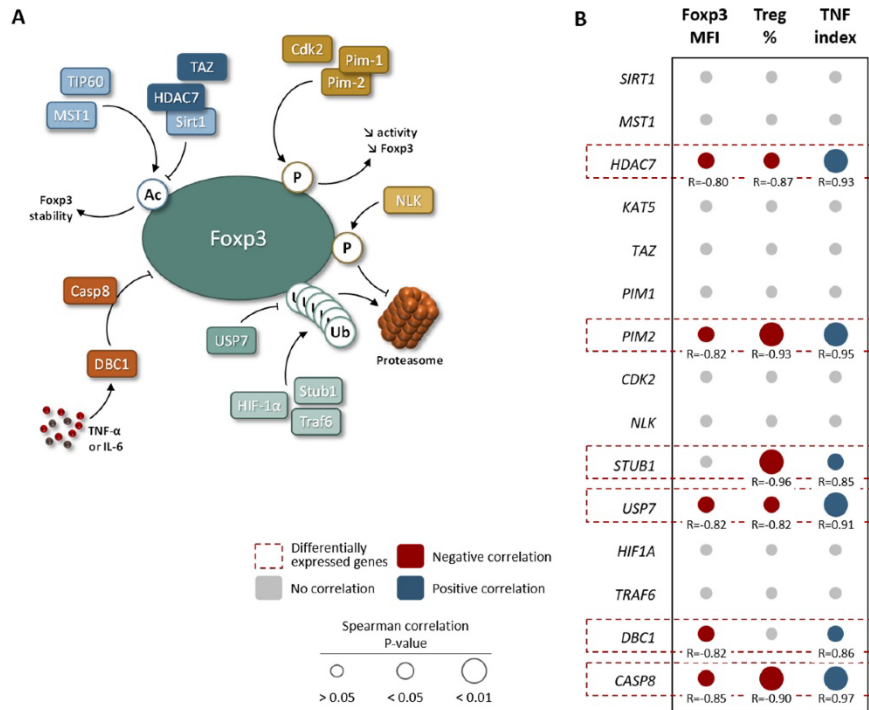


Figure 5. STUB1, USP7, DBC1, and CASP8 transcript overexpression is correlated with the frequency of circulating Treg, with Fcpx3 protein level in Treg, and with the activation of TNF pathway.

(A) Post-transcriptional mechanisms involved in Fcpx3 regulation, adapted from Colamatteo *et al.* Ubiquitination (Ub) mediated by ubiquitin-specific protease (USP)7, STIP1 homology and U-Box containing protein (Stub1), TNF receptor associated factor (Traf)6, and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α ; Acetylation (Ac) mediated by tat-interactive protein 60 kDa (TIP60), or Mammalian Sterile 20-like Kinase 1 (MST1) and deacetylation performed by Histone deacetylase (HDAC)7, sirtuin (Sirt)1, transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ); Phosphorylation (P) supported by cyclin-dependent kinase (Cdk)2, proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (Pim)-1, Pim-2, and Nemo-like kinase (NLK); and degradation of Fcpx3 involving deleted breast cancer (DBC)1 and caspase (Casp)8. (B) Dot plots showing the correlation between the expression of Fcpx3 post-translational regulator transcripts and Fcpx3 MFI of circulating Treg, the frequency of circulating Treg, and with TNF index. Only R-values of significant correlations are shown. Positive correlations are depicted in blue, and negative correlations in red. P- and R-values derived from Spearman correlation analysis.

Figure 6

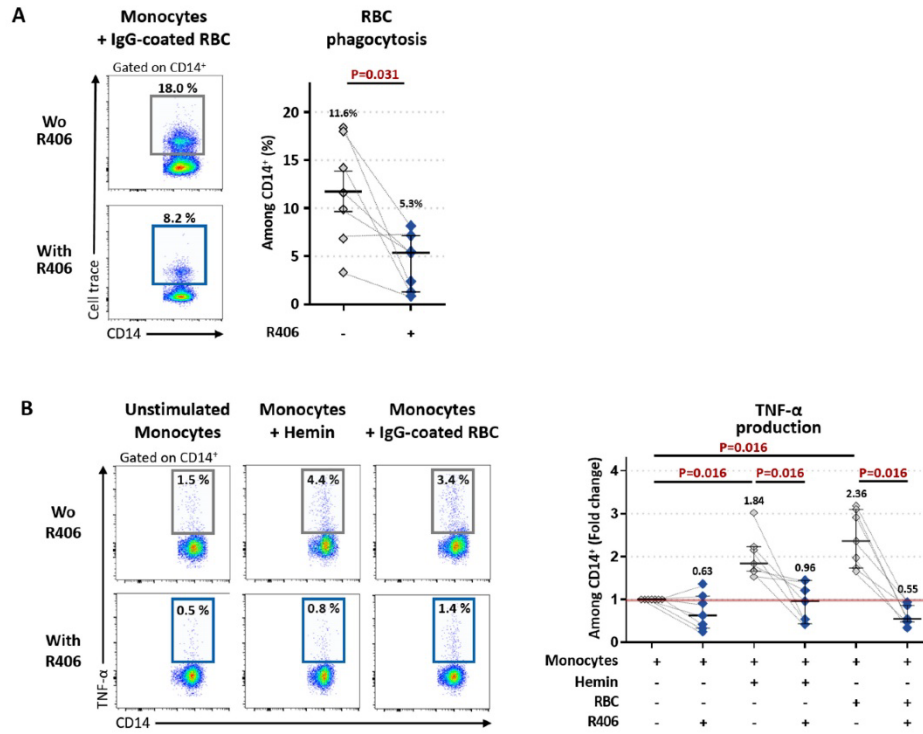


Figure 6. R406 reduced RBC phagocytosis and TNF- α production by monocytes *in vitro*. Monocytes from seven HC were cultured 24h alone or conditions mimicking hemolysis, *i.e.* in presence of hemin or RBC labeled with CellTrace and coated with IgG anti-glycophorin A (RBC/monocytes ratio: 5/1), in presence or not of R406 (2 μ M), the active metabolite of fostamatinib. To exclude RBCs attached to monocyte membrane during phagocytosis assay, RBC lysis was performed before flow cytometry. (A) Representative dot plots showing the phagocytosis of RBC by monocytes with or without R406, assessed by flow cytometry (left panel). Scatter dot plots showing the proportion of RBC phagocytosis among CD14⁺ monocytes (right panel, n=7). (B) Representative dot plots showing production of TNF- α by CD14⁺ monocytes assessed by flow cytometry (left panel). Dot plots representing the fold change of TNF- α production in hemolysis-like conditions, with or without R406 (right panel, n=7). The production of TNF- α by unstimulated monocytes was used as reference. P-values derived from Wilcoxon matched-pairs test. RBC, red blood cells; Wo, without.

Tables

Table 1.

Baseline characteristics of wAIHA patients and healthy controls.

	HC n=30	wAIHA n=22	P-value
Age, years - Median [IQR]	67 [58 - 77]	65 [53 - 76]	0.95
Sex ratio, Female/Male	18/12	15/7	0.63
Primary AIHA, n (%)	na	17 (77)	na
Hemoglobin, g/dL - Median [IQR]	14.2 [13.2 - 15.2]	7.4 [6.4 - 9.5]	<0.0001
Reticulocytes, x10 ⁹ /L - Median [IQR]	na	189 [139 - 324]	na
Leukocytes, x10 ⁹ /L - Median [IQR]	5.8 [4.9 - 7.0]	5.8 [4.6 - 8.5]	0.97
Lymphocytes, x10 ⁹ /L - Median [IQR]	1.6 [1.2 - 2.1]	1.3 [0.7 - 2.5]	0.31
Platelets, x10 ⁹ /L - Median [IQR]	224 [204 - 296]	191 [162 - 314]	0.47
Haptoglobin, g/L - Median [IQR]	na	0 [0.0 - 0.2]	na
Direct antiglobulin test, n (%)		22 (100)	
IgG with C3d	na	15 (68)	na
IgG without C3d		7 (32)	

HC : healthy controls; IQR : interquartile range ; na : not applicable.

Table 2.

Absolute values of circulating CD4 T cell populations.

	HC	wAIHA	P-value
CD4 T cells, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.86 [0.62 - 1.28]	0.59 [0.36 - 1.46]	0.14
Treg, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.038 [0.026 - 0.048]	0.011 [0.007 - 0.042]	0.008
nTreg, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.005 [0.002 - 0.009]	0.005 [0.001 - 0.008]	0.76
eTreg, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.018 [0.014 - 0.024]	0.004 [0.001 - 0.010]	<0.0001
Treg Helios ⁺ , x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.028 [0.020 - 0.035]	0.008 [0.004 - 0.034]	0.02
TEM, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.23 [0.15 - 0.36]	0.26 [0.08 - 0.40]	0.87
TCM, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.15 [0.10 - 0.20]	0.10 [0.05 - 0.18]	0.14
TN, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.31 [0.18 - 0.55]	0.21 [0.05 - 0.51]	0.26
TEMRA, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.010 [0.006 - 0.018]	0.010 [0.004 - 0.019]	0.77
Th1, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.094 [0.055 - 0.130]	0.081 [0.017 - 0.116]	0.47
Th2, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.018 [0.010 - 0.023]	0.01 [0.006 - 0.021]	0.25
Th17, x10 ⁹ /L - Median [25 and 75% percentile]	0.004 [0.002 - 0.007]	0.003 [0.002 - 0.005]	0.43

nTreg: naive Treg (CD45RA⁺Foxp3^{lo}); eTreg: effector Treg (CD45RA⁺Foxp3^{hi}); TEM: effector memory T cells; TCM: central memory T cells; TN: naive T cells; TEMRA: terminally differentiated effector memory.

Table 3

Expression of genes coding for TNFR pathway effectors involved in Treg function.

Effectors	Genes	Average expression			
		HC	wAIHA	Fold-change	P-value
TNFR1	<i>TNFRSF1A</i>	49	37	0.78	0.117
TNFR2	<i>TNFRSF1B</i>	103	138	1.34	0.023
NF-kB	<i>NFKB2</i>	66	97	1.34	0.041
RelB	<i>RELB</i>	26	50	1.47	0.074
DBC1	<i>CCAR2</i>	61	81	1.33	0.030
PP1	<i>PPP1CA</i>	24	40	1.44	0.032

Table 4.

Expression of genes coding for proteins involved in post-translational regulation of Foxp3.

Effectors	Impact on Foxp3	Effects on Treg	Genes	Average expression			
				HC	wAIHA	Fold-change	P-value
Acetylation							
Sirtuin 1	-	↘ Foxp3, ↘ Treg function	<i>SIRT1</i>	57	60	1.11	0.549
MST1	+	↗ Foxp3, ↗ Treg function	<i>MST1</i>	23	24	1.02	0.930
HDAC7	-	↘ Foxp3	<i>HDAC7</i>	46	68	1.40	0.022
TIP60	+	↗ Foxp3 stability	<i>KAT5</i>	20	22	1.02	0.917
TAZ	-	↘ Foxp3 stability	<i>TAZ</i>	16	18	1.11	0.591
p300	+	↗ Foxp3 stability	<i>P300</i>	198	254	1.24	nc
Phosphorylation							
Pim-1	+	↘ Foxp3, ↘ Treg function	<i>PIM1</i>	65	85	1.32	0.121
Pim-2	+	↘ Treg stability, ↘ Treg function	<i>PIM2</i>	50	118	2.04	0.000013
Cdk2	+	↘ Foxp3, ↘ Treg function	<i>CDK2</i>	14	24	1.42	0.100
NLK	+	↗ Foxp3	<i>NLK</i>	21	23	1.16	0.484
Ubiquitination							
Stub1	+	↘ Foxp3, ↘ Treg function	<i>STUB1</i>	14	32	1.71	0.008
USP7	-	↗ Foxp3 expression	<i>USP7</i>	142	212	1.42	0.009
HIF-1α	+	↘ Foxp3, ↗ Th17/Treg ratio	<i>HIF1A</i>	114	125	1.03	0.837
Traf6	+	↘ Treg function	<i>TRAF6</i>	27	30	0.98	0.929
Other mechanism							
DBC1		↘ Foxp3 upon TNF-α stimulation, ↘ Treg function	<i>DBC1</i>	61	81	1.33	0.030
Caspase 8			<i>CASP8</i>	200	288	1.39	0.0002

nc: not calculated due to outlier



2

Evaluation des populations Lymphocytaires T spléniques

2.1 La rate, anatomie et fonctions	page 144
2.2 Rationnel	page 147
2.3 Matériel et méthode	page 148
2.4 Résultats	page 151
2.4.1 Fréquence des lymphocytes T régulateurs spléniques...	page 151
2.4.2 Polarisation lymphocytaire T et balance pro-/ anti-inflammatoire.....	page 152
2.4.3 Autres résultats	page 154

2 Evaluation des populations Lymphocytaires T spléniques

2.1 La rate, anatomie et fonctions

La rate est l'organe lymphoïde secondaire le plus volumineux et mesure chez l'homme 12 cm de long, 8 cm de large et 4 cm d'épaisseur en moyenne. De forme ovoïde, encapsulé, et située dans l'hypocondre gauche, elle est directement connectée au réseau sanguin et son débit sanguin moyen est de 300 ml/min, ce qui lui permet chaque jour de filtrer plusieurs fois l'ensemble de la masse sanguine.

Le hile est constitué de l'artère splénique afférente et de la veine splénique efférente. La capsule, très dense, donne naissance aux travées spléniques qui cloisonnent partiellement la rate et permettent la distribution des gros vaisseaux au centre de l'organe (Chadburn 2000; Steiniger 2015). La différence majeure entre l'organisation générale des ganglions et de la rate est caractérisée par l'absence de connexion directe avec le système lymphatique puisque le hile splénique est dépourvu de canaux lymphatiques (**Figure 24**. Structure macroscopique de la rate).

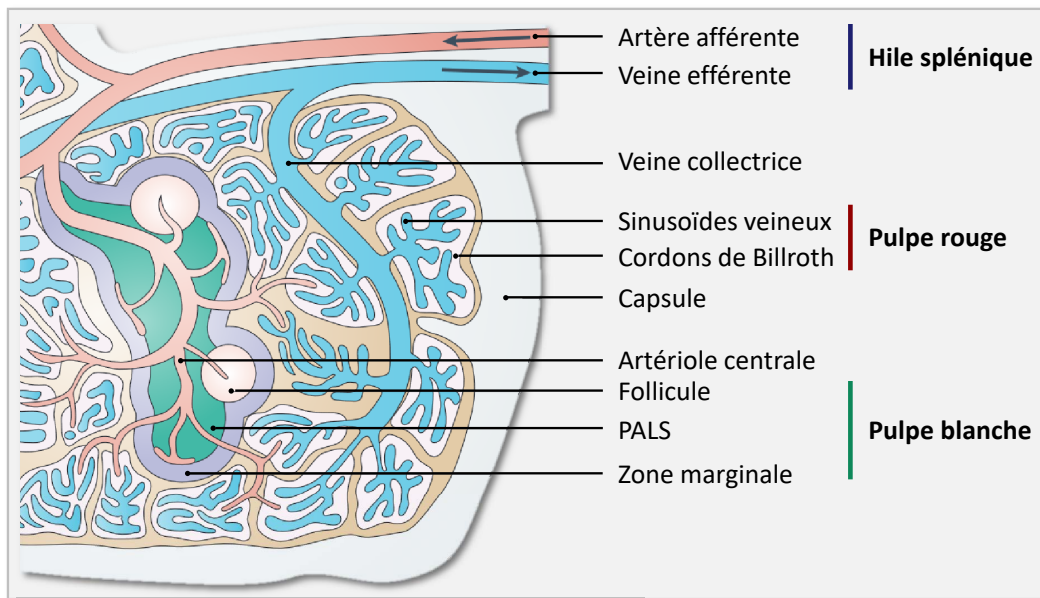


Figure 24. Structure macroscopique de la rate.

Adaptée de Mebius 2005 - L'artère splénique afférente se ramifie en artérioles centrales enveloppées par la pulpe blanche, elle-même organisée en manchons lymphoïdes périartériolaires (PALS, *PeriArteriolar Lymphoid Sheaths*), follicules et zones marginales. La pulpe rouge est constituée des cordons de Billroth et d'un réseau de sinusoides veineux qui se rassemblent dans la veine splénique efférente.

Deux compartiments spléniques se distinguent macroscopiquement :

1. La pulpe rouge, qui représente 75 % de la masse splénique, est constituée d'un vaste réseau veineux délimité par un endothélium discontinu appelé sinusoides veineux. Les cordons de Billroth situés entre les sinusoides veineux contiennent de nombreux fibroblastes et macrophages (Steiniger 2015). La pulpe rouge fait le lien entre les réseaux artériel et veineux splénique et elle doit sa pigmentation aux érythrocytes qui la constituent (Mebius and Kraal 2005; Turner and Mabbott 2017).

2. Disséminée dans tout le tissu splénique, la pulpe blanche est constituée de lymphocytes T, organisés en manchons lymphoïdes périartériolaires (*PeriArteriolar Lymphoid Sheaths* ; PALS) autour des petites branches artérielles, et de LB organisés en follicules et attenants aux PALS. La pulpe blanche est cernée par la zone marginale. La structure des centres germinatifs est similaire dans la rate et dans les ganglions lymphatiques : ils sont délimités par les lymphocytes du manteau, composés d'une zone claire riche en LT, LB et DC folliculaires (*Follicular Dendritic cells* - FDC) et d'une zone sombre principalement constituée de centroblastes en prolifération. L'ensemble du follicule est délimité par une zone périfolliculaire infiltrée d'érythrocytes, de granulocytes, de monocytes et de macrophages (Mebius and Kraal 2005; Steiniger 2015; Turner and Mabbott 2017) (**Figure 25**. Micro-anatomie de la pulpe blanche splénique humaine).

Etant donné sa localisation sur le réseau artériel et la spécificité de son architecture, la rate ou plus précisément, la pulpe rouge splénique confère à la rate des propriétés particulières telles que l'immuno-surveillance et la filtration du compartiment sanguin (Chadburn 2000; Mebius and Kraal 2005).

Bien qu'elle contienne toutes les lignées hématopoïétiques, la fonction immunologique de la pulpe rouge en condition physiologique est essentiellement assurée par les macrophages résidents qui éliminent par phagocytose les cellules sénescents, les particules opsonisées et les microorganismes circulants *via* leurs TLR et les récepteurs Fc des immunoglobulines (Medzhitov and Janeway 1997; Ravetch 1997). Les LB naïfs et mémoires également présents, reconnaissent les Ag circulants sous leur forme native, les capturent, puis rejoignent la pulpe blanche pour achever leur différenciation et leur maturation (Harms Pritchard and Pepper 2018; Steiniger et al. 2014).

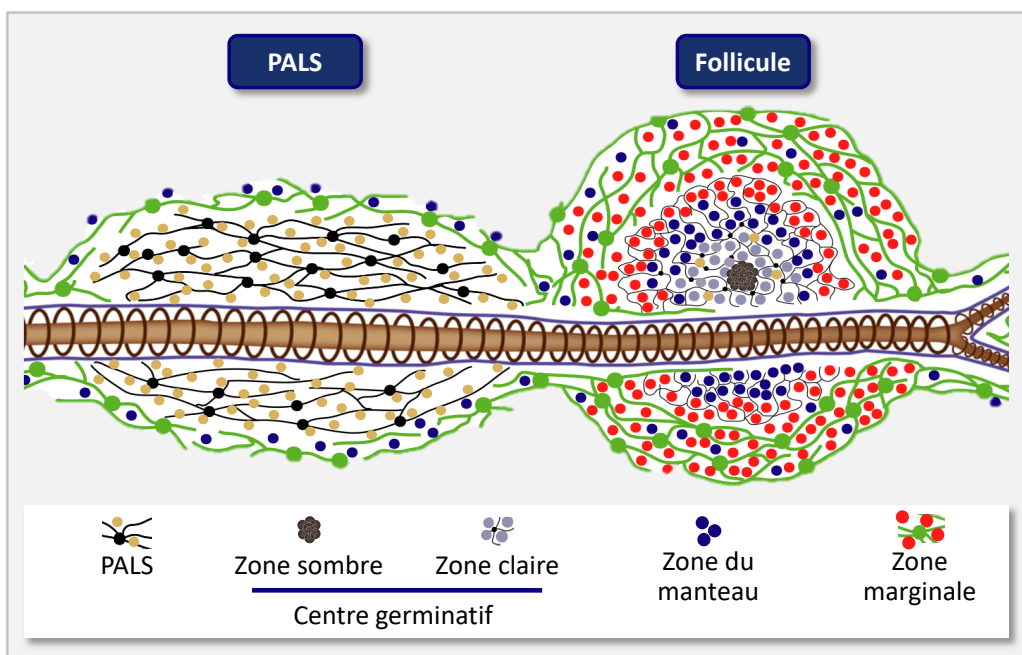


Figure 25. Micro-anatomie de la pulpe blanche splénique humaine.

Adaptée de Steiniger 2015 - Schématisation d'un manchon lymphoïde périartériolaire (PALS, *PeriArteriolar Lymphoid Sheaths*) et d'un follicule lymphoïde.

La pulpe rouge est également une niche pour les plasmocytes de longue durée de vie et elle contient des LT CD8⁺ qui y exercent leur action cytotoxique (Chadburn, 2000). Elle constitue un réservoir cellulaire important, près d'un tiers des plaquettes sont séquestrées dans les cordons de Billroth et elle contient un contingent important de monocytes rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire ou d'inflammation (van der Laan et al. 2014; Kotzé et al. 1986).

La rate exerce également les fonctions conventionnelles des organes lymphoïdes secondaires au sein de la pulpe blanche.

De part et d'autre des artérioles spléniques, les cellules stromales expriment les chémokines CXCL21 et CXCL19, à l'origine du recrutement des CPA, des LT naïfs, ou des LB ayant reconnu leur Ag et qui expriment CCR7. Tout comme les zones corticales des ganglions lymphatiques, les PALS constituent une structure anatomique centrale pour l'activation et la polarisation des LT telle que nous l'avons précédemment décrite dans le second chapitre de l'introduction.

Les LB activés et les TFH expriment CXCR5, récepteur de CXCL13, produit par les FDC. Ils rejoignent ainsi les follicules primaires, adjacents aux PALS et sites de la réponse adaptative humorale. La nature des interactions (intensité, durée, fréquence) entre les LB, les TFH et les FDC de même spécificité oriente les LB vers deux voies de maturation (Mesin, Ersching, and Victora 2016; Shulman et al. 2014; Weinstein et al. 2016) :

- Une maturation extra-folliculaire qui se traduit *in fine* par la génération, dans les zones marginales, de plasmocytes de courte durée de vie et la sécrétion d'Ig de faible affinité.
- Une maturation T dépendante dans les centres germinatifs conduisant à une maturation de l'affinité des Ig, à la sélection de cellules B de haute affinité, de leur expansion clonale et de leur différenciation en cellules B mémoires et plasmocytes de longue durée de vie.

2.2 Rationnel

Pour des raisons évidentes d'accessibilité du matériel biologique, nous avons débuté ce projet par l'étude des populations circulantes, qui permet une description de la physiopathologie pendant la phase active de la maladie, mais qui ne reflète que partiellement les mécanismes impliqués dans la réaction auto-immune.

Au cours des cytopénies auto-immunes, la destruction des plaquettes lors du PTI ou des globules rouges au cours de l'AHAI, est majoritairement intratissulaire et splénique (Audia et al. 2017; Michalak et al. 2020). La rate constitue le principal foyer d'activation et de maturation des clones lymphocytaires autoréactifs et elle est le site de synthèse des auto-Ac.

Alors que plusieurs articles rapportent des descriptions de la fréquence et de l'état d'activation des populations myéloïdes et lymphoïdes spléniques au cours du PTI chez l'homme (Audia et al. 2021), la description du compartiment splénique humain au cours de l'AHAI est restreinte. Deux articles ont apporté une description des populations lymphocytaires B et des plasmocytes de longue durée de vie (Mahévas et al. 2015) (Thai et al. 2018). Ils ont d'une part observé une augmentation des CG spléniques dans les rates des patients ayant reçu une courte corticothérapie et d'autre part, ils ont observé que la déplétion des cellules B par le RTX conduisait à processus de sélection et de maturation des plasmocytes à longue durée de vie autoréactifs, médié par BAFF.

En revanche, aucune étude ne fait état des populations lymphocytaires T CD4⁺ spléniques au cours de l'AHAI.

Bien qu'elle soit de moins en moins indiquée en raison de l'efficacité des thérapeutiques médicamenteuses et du fait du risque infectieux auxquels elle expose, la splénectomie était historiquement proposée en deuxième ou troisième intention aux patients atteints d'AHAI (Jäger et al. 2020). Nous avons tiré l'avantage de cette thérapeutique pour proposer une description quantitative des lymphocytes T spléniques au cours de l'AHAI. Afin de réaliser un parallèle avec les observations faites dans le compartiment sanguin, un immunophénotypage des LT CD4⁺ a été réalisé et trois indicateurs ont été ciblés :

- La fréquence des LT régulateurs
- La polarisation des LT effecteurs
- L'équilibre de la balance pro/anti-inflammatoire

Nous avons pour objectif de réaliser une étude comparative de ces marqueurs entre des prélèvements spléniques de patients atteints d'AHAI et des rates contrôles ; de rechercher un potentiel lien entre l'expression de ces marqueurs et la réponse des patients à la splénectomie ; d'observer l'impact des thérapeutiques administrées en amont de la splénectomie sur ces indicateurs.

2.3 Matériel et méthode

2.3.1 Cohorte de patients

Les patients et les témoins ayant participé à cette étude prospective ont donné leur consentement éclairé en conformité avec les principes éthiques de la déclaration d'Helsinki et ils ont été inclus dans un protocole de recherche clinique (*Clinical Trial* : NCT02828670). Les caractéristiques cliniques des patients et témoins splénectomisés sont renseignés dans le tableau 06 (**Tableau 06**. Caractéristiques des sujets splénectomisés).

	Contrôles n=10	AHAI n=11	P
Informations générales			
Age médian, année [IQR]	57 [46 - 62]	68 [51 - 72]	0,04
Sex ratio, Femme/Homme	4/6	5/6	1
AHAI primitive, n (%)	-	6 (54,5)	-
Durée médiane de la maladie, mois [IQR]	-	22 [14 - 49]	-
Traitements antérieurs, n (%)			
Corticoïde	-	10 (90,9)	-
Rituximab	-	9 (81,8)	-
Azathioprine	-	1 (9,1)	-
Réponse à la splénectomie, n (%)	-	6 (54,5)	-

Tableau 06. Caractéristiques des sujets splénectomisés.

IQR : Interquartile Range

L'âge médian des 11 patients était de 68 ans, le rapport femmes/hommes de 1,2 et le diagnostic de wAIHA a été défini par un taux d'hémoglobine inférieure à 11 g/dL, avec une augmentation du nombre de réticulocytes, une diminution de l'haptoglobine et un test direct à l'antiglobuline positif (IgG +/- complément).

Parmi les 11 patients splénectomisés, 5 présentaient une AHAI secondaire, associée à un lupus systémique (n=1), à une thrombopénie immunologique (c'est-à-dire syndrome d'Evans, n=1), ou à un lymphome malin non hodgkiniens de bas grade (n=3). La qualification d'AIHA primitive a été retenue pour les 6 autres patients, après exclusion des tumeurs malignes lymphoprolifératives, des autres maladies auto-immunes, d'une infection VIH et des autres pathologies infectieuses associées aux AHAI, conformément aux recommandations.

Les splénectomies ont été réalisées dans le cadre de la prise en charge thérapeutique habituelle des patients. En première ligne thérapeutique, 10 des 11 patients avaient reçu des corticoïdes, 2 patients du rituximab, et préalablement à la splénectomie, 7 patients avaient reçu du RTX en 2nde ligne de traitement, et 1 patient de l'Azathioprine.

La comparaison des patients a été effectuée avec des prélèvements spléniques contrôles, issus de splénectomies d'hémostase post-traumatiques de 10 témoins, dont l'âge médian était de 57 ans (P=0,04) avec un ratio femmes/hommes de 1,5 (P=1.0).

2.3.2 Dissociation et conservation des prélèvements spléniques

Dans l'heure suivant la splénectomie, les fragments de rate stériles ont été dissociés mécaniquement à l'aide d'un piston de seringue. La suspension cellulaire a été filtrée à travers un tamis cellulaire en nylon de 100 µm puis les hématies ont été hémolysées 10 min à température ambiante dans une solution hypotonique (Lysing Buffer, BD Pharm Lyse). Enfin, les splénocytes ont été cryoconservés dans une solution cryoprotectrice de SVF (Sérum de Veau Foetal, Eurobio) et DMSO 10 % (Diméthylsulfoxyde) jusqu'à leur utilisation.

2.3.3 Immunophénotypage

Les anticorps et les réactifs utilisés pour l'immunophénotypage sont détaillés dans le tableau 07 (**Tableau 07**. Réactifs utilisés pour l'immunophénotypage). La veille de l'immunophénotypage, les splénocytes ont été décongelés puis conservés une nuit à 37°C, à la concentration de 10⁶ cellules/ml dans un milieu RPMI 1640 (Lonza) supplémenté par 10 % de SVF et 1 % d'un cocktail de pénicilline, streptavidine et fongizone (Lonza).

Anticorps	Fluorochromes	Clones	Fournisseurs	Références
CD3	BV510	OKT3	BioLegend	317332
CD4	PECy7	SK3	eBiosciences	25-0047-42
CD4/CD25	PECy5/PE	nc.	BioLegend	320403
CD45RA	APC eFluor780	HI100	eBiosciences	47-0458-42
Foxp3	PB	259D	BioLegend	320216
Foxp3	AF488	150D	BioLegend	320212
IFN-γ	APC	4S.B3	eBiosciences	17-7319-82
IL-17	PE	eBio64CAP17	eBiosciences	12-7178-42
IL-4	AF488	8D4-8	eBiosciences	53-7049-42
Réactifs			Fournisseurs	Références
Fixable Viability Stain 780			BD Biosciences	565388
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set			eBiosciences	88-8824-00
True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set			BioLegend	424401

Tableau 07. Réactifs utilisés pour l'immunophénotypage.

AF : Alexa Fluor, APC : Allophycocyanin, BV : Brilliant Violet, Cy : Cyanine, Foxp3 : Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3, IFN-γ : Interféron γ, IL: Interleukine, PB : Pacific Blue, PE : Phycoerythrin.

Les splénocytes morts ont été éliminés par tri magnétique (*Dead Cell removal kit* – Miltenyi) et le phénotypage membranaire a été réalisé à 4°C, dans du PBS SVF 1 % et en présence d'un colorant vital d'exclusion de type Zombie (*Fixable Viability Stain* - BD) afin d'exclure les cellules mortes résiduelles lors de l'analyse.

Afin de stimuler la production des cytokines par les populations lymphocytaires, les splénocytes ont été cultivés 4h en présence de phorbol-12-myristate-23-acétate (PMA, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich) et de ionomycine (1µg/mL, Sigma-Aldrich) et l'activité de leur appareil de golgi a été inhibé par la bréfeldine A (GolgiPlug, 0.1 %, BD Biosciences). La production intracellulaire des cytokines a été mesurée après fixation et perméabilisation des membranes cytoplasmiques (*Intracellular fixation and permeabilization buffer*, eBioscience).

Le marquage du facteur de transcription Foxp3 a été réalisé après fixation et perméabilisation des membranes cytoplasmiques et nucléaires par l'utilisation du kit *True Nuclear transcription factor buffer set* (BioLegend).

Les données ont été acquises avec le cytomètre BD LSRFortessa Cell Analyzer (BD Biosciences).

2.3.4 Analyses et statistiques

L'analyse des données brutes de cytométrie a été réalisée avec le logiciel FlowJo® v10 software (BD Biosciences), les résultats sont exprimés en % de cellules positives, ou en intensité médiane de fluorescence (*Median Fluorescence Intensity* – MFI) avec dans ce cas un retranchement des valeurs de MFI des isotypes contrôles. Les analyses statistiques et les représentations graphiques ont été générées avec le logiciel Prism v9.3.0 (GraphPad Software).

Compte tenu de la distribution non normale des variables étudiées, les comparaisons des données quantitatives ont été réalisées par des tests non paramétriques de Mann-Whitney. Les résultats sont exprimés par leur médiane [interquartiles] et les valeurs $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

2.4 Résultats

2.4.1 Fréquence des lymphocytes T régulateurs spléniques

Les Treg spléniques totaux ont été identifiés par le phénotype $CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ et leur fréquence parmi les LT $CD4^+$ est similaire entre les patients et les témoins (1,8 % vs. 2,5 %, $P=0,47$) (**Figure 26A**).

La distinction des populations fonctionnelles de Treg, selon l'expression de CD45RA et Foxp3, montre que la fréquence des nTreg ($CD45RA^+Foxp3^{low}$, Fr. I) et des eTreg ($CD4^+CD45RA^-Foxp3^{high}$, Fr. II) n'est pas différente entre les patients et les témoins (nTreg : 0,3 % vs. 0,3 %, $P=0,96$; eTreg : 0,5 % vs. 0,4 %, $P=0,25$; **Figure 26B**).

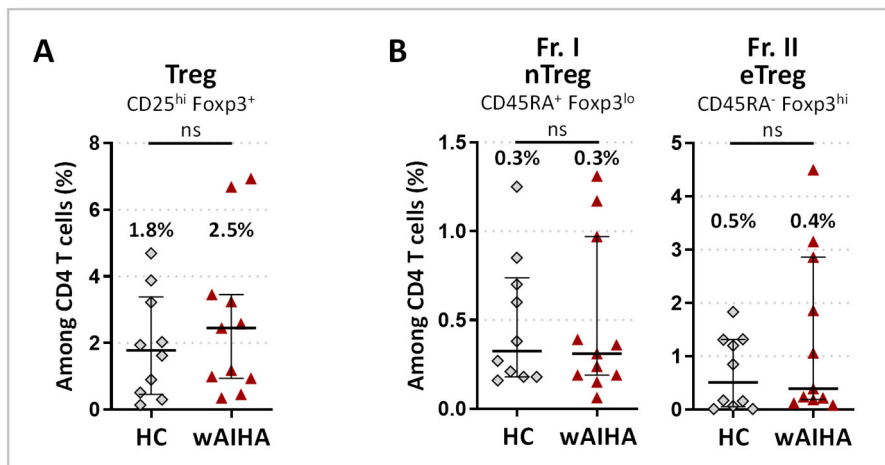


Figure 26. Quantification des Treg spléniques.

A | Diagramme en points représentant les fréquences des Treg des témoins ($n=10$) et des patients ($n=11$) parmi les LT $CD4^+$ spléniques. B | Diagrammes en points montrant la fréquence des Tregs naïfs ($CD45RA^+Foxp3^{low}$: Fr. I/nTreg) et des Treg effecteurs ($CD45RA^-Foxp3^{hi}$: Fr. II/eTreg) parmi les LT $CD4^+$ spléniques. Les valeurs de P ont été calculées par le test non paramétrique de Mann-Whitney, les valeurs médianes sont indiquées en noir. (eTreg : *Effector Regulatory T Cell*, Foxp3 : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3*, Fr : *Fraction*, HC : *Healthy control*, ns : *Non Significatif*, nTreg : *Naive Regulatory T Cell*, Treg : *LT régulateur*, wAIHA : *Warm Autoimmune Hemolytic Anemia*)

Nous avons également mesuré l'expression de Foxp3 afin de déterminer si une diminution d'expression similaire à ce que nous avons observé dans le sang existait. Il existe en effet une tendance à une moindre expression comme en témoigne la MFI de Foxp3 qui tend à être moins importante chez les patients que chez les témoins (314 vs. 433, $P=0,25$; **Figure 27A**).

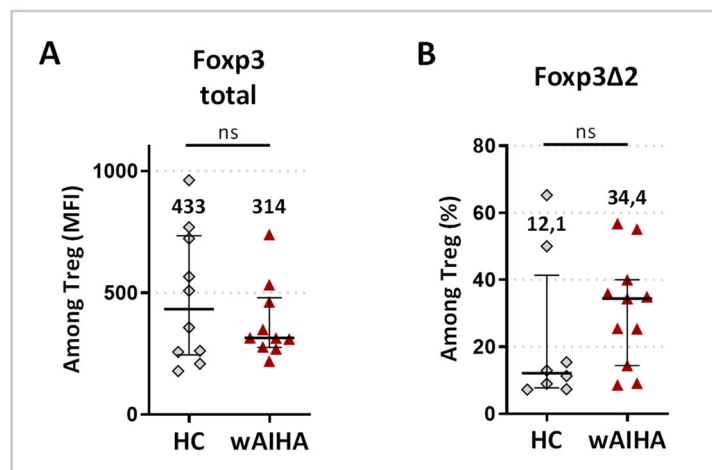


Figure 27. Evaluation de l'expression de Foxp3 et Foxp3Δ2 au sein des Treg spléniques.

A| Diagramme en points représentant l'expression nucléaire de Foxp3, évaluée par l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) mesurée en cytométrie en flux, parmi les Treg spléniques de sujets témoins (n=10) et de patients (n=11). B| Diagrammes en points représentant la fréquence des Tregs déficients pour l'exon 2 du gène FOXP3 (Treg Foxp3Δ2) parmi les Treg totaux spléniques. Les valeurs de P ont été calculées par le test non paramétrique de Mann-Whitney, les valeurs médianes sont indiquées en noir. (Foxp3 : *Forkhead/Winged-Helix Box Protein 3*, Foxp3Δ2 : Foxp3 dépourvue de l'exon 2, HC : *Healthy control*, ns : Non Significatif, Treg : LT régulateur, wAIHA : *Warm Autoimmune Hemolytic Anemia*)

Etant donné la prédominance de la polarisation Th17 parmi les lymphocytes circulants des patients, nous avons quantifiés la sous-population de Treg déficients pour l'exon 2 du gène *FOXP3* (Treg Foxp3Δ2) puisque cette population présente une susceptibilité accrue à une différenciation Th17.

On observe dans la rate que la fréquence des Treg Foxp3Δ2 tend à être plus importante que chez les patients (34,4 % vs. 12,1 %, P=0,2 ; **Figure 27B**).

2.4.2 Polarisation lymphocytaire T et balance pro/anti-inflammatoire

Parallèlement à l'évaluation des Treg, nous avons caractérisé la polarisation des LT effecteurs selon leur production de cytokines après 4 heures de stimulation polyclonale.

Classiquement, les LT Th1 ont été identifiés par leur production d'IFN- γ , les Th2 par leur production d'IL-4 et les Th17 par leur production d'IL-17. Identifiés de cette façon, les proportions des différentes populations lymphocytaires n'étaient pas différentes entre les patients et les témoins (Th1 : 7,9 vs. 12,2 %, P=0,43 ; Th2 : 16,3 vs. 22,0 %, P=0,50 ; Th17 : 0,50 vs. 0,31 %, P=0,10 ; **Figure 28A**).

Enfin, nous avons mesuré les ratio Th1/Treg, Th2/Treg et Th17/Treg, qui permettent d'évaluer l'équilibre de la balance pro/anti-inflammatoire et contrairement aux observations faites dans le compartiment sanguin, les ratios étaient similaires entre les patients et les témoins (Th1/Treg : 3,1 vs. 3,5 %, P=0,86 ; Th2/Treg : 10,1 vs. 10,2 %, P=0,60 ; Th17/Treg : 0,34 vs. 0,18 %, P=0,7 ; **Figure 28B**).

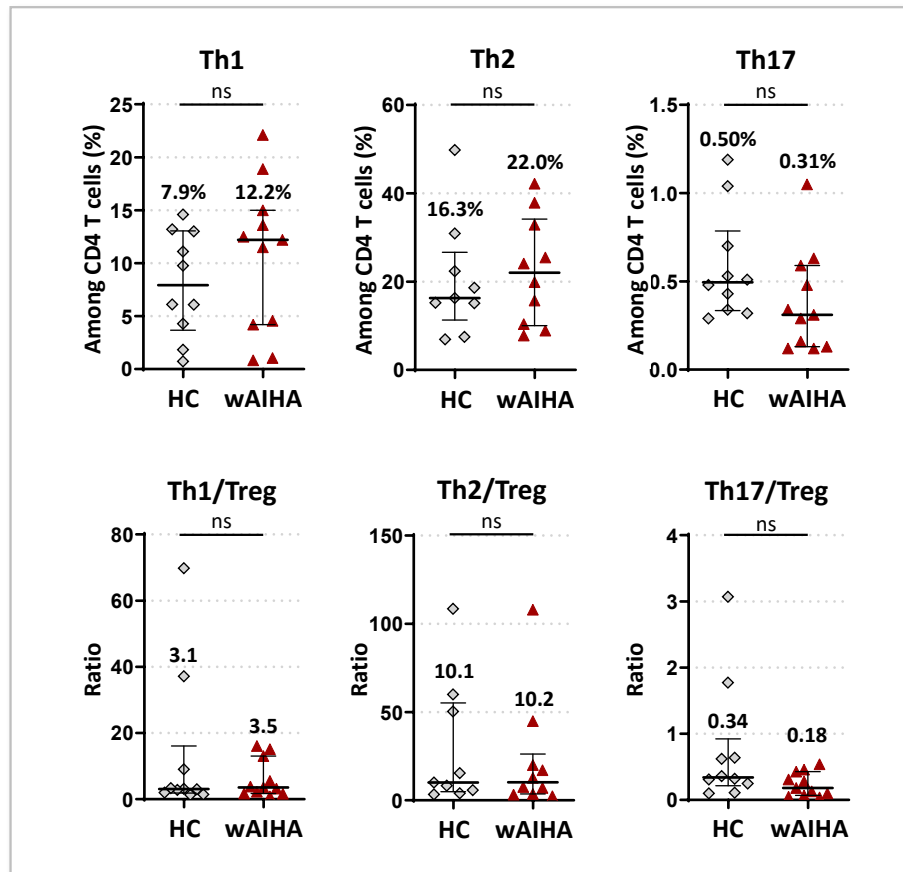


Figure 28. Evaluation de la polarisation des LT CD4⁺ spléniques et des rapports Treg/Th

A| Quantification des lymphocytes Th1 (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁻), Th2 (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺) et Th17 (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻) par cytométrie de flux après stimulation polyclonale de 4h des splénocytes de sujets témoins (n=10) et de patients (n=11). Diagramme en points représentant les fréquences des Th1, Th2 et Th17 spléniques parmi les LT CD4⁺ spléniques. B| Représentation de l'équilibre de la balance pro- et anti-inflammatoire, évaluée par la mesure des ratios Th1/Treg, Th2/Treg et Th17/Treg (HC n=10 ; wAIHA n=11). (HC : *Healthy control*, ns : Non Significatif, Th : Lymphocyte T Helper, Treg : LT régulateur, wAIHA : *Warm Autoimmune Hemolytic Anemia*)

2.4.3 Autres résultats

Par la suite, nous avons effectué des comparaisons de ces populations lymphocytaires spléniques en considérant la réponse ou non des patients à la splénectomie dans le but de caractériser un profil cellulaire particulier chez les patients non répondeurs, ce qui permettrait d'aider la compréhension de l'échec de cette thérapeutique.

L'appréciation de la réponse des patients à la splénectomie a été déterminée en fonction de l'évolution de l'Hb sanguine, 3 mois après la splénectomie. La réponse était définie comme un gain d'Hb \geq 2g/dL (par rapport aux taux avant traitement) et/ou un taux d'Hb \geq 11 g/dL chez la femme et \geq 12 g/dL chez l'homme.

La fréquence des Treg et leurs sous-populations, la proportion des lymphocytes polarisés et les ratio Th/Treg ont été comparés pour 6 patients répondeurs et 4 patients non répondeurs et aucune différence ou tendance n'a pu être identifiée (données non présentées).

Pour finir, nous avons effectué des comparaisons de ces différentes populations lymphocytaires selon le type de traitement reçu avant la splénectomie et de nouveau aucune différence ou tendance n'a pu être identifiée entre ces groupes de patients (données non présentées).

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire en périphérie	page 158
2. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire splénique	page 161
3. Atteinte fonctionnelle des Treg circulants	page 162
2.1 Profil transcriptomique des Treg	page 162
2.2 Impact du TNF- α sur les Treg	page 163
2.3 Régulation post traductionnelle de Foxp3	page 165
4. Provenance et incidence du TNF-α	page 166
5. Les thérapeutiques	page 167
4.1 Stratégies de renforcement des populations Treg	page 168
4.2 Neutralisation du TNF- α ou de sa signalisation	page 169

Les résultats de notre travail sur la physiopathologie de l’AHAI chez l’homme viennent enrichir et préciser les données de la littérature concernant la réponse lymphocytaire et sa régulation. Ils suggèrent également de nouvelles hypothèses physiopathologiques avec l’implication du TNF- α , ce qui permet d’envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

1. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire en périphérie

Le premier intérêt de notre travail repose sur l’évaluation concomitante des réponses lymphocytaires T anti-inflammatoires et pro-inflammatoires au cours de l’anémie hémolytique auto-immune.

La quantification des Treg totaux circulants chez les patients au diagnostic nous a permis de confirmer la diminution de leur fréquence, telle qu’observée dans les travaux de Ahmad *et al.* (Ahmad, Elgohary, and Ibrahim 2011). Notre travail a permis de préciser que ce déficit quantitatif affecte principalement les Treg effecteurs, la sous-population de Treg activés, aux hautes capacités suppressives et dont la fréquence est deux fois plus faible chez les patients (Miyara et al. 2009).

Parallèlement à la quantification des Treg, nous avons évalué la polarisation des LT circulants des patients au diagnostic car cela constitue un aspect essentiel de la physiopathologie des maladies auto-immunes.

D’un point de vue historique, la polarisation de type Th1 était associée à la physiopathologie de nombreuses MAI. Elle joue un rôle déterminant notamment au cours de l’artérite à cellules géantes ou de la SEP (Sclérose en Plaques), la production d’IFN- γ étant primordiale dans l’activation des CPA, dans la réaction auto-immune à médiation cellulaire et dans la chronicisation de l’inflammation (Ly et al. 2010; Kaskow and Baecher-Allan 2018). La polarisation Th2 est plus particulièrement impliquée dans la physiopathologie de l’allergie, la production d’IL-4, d’IL-5 et d’IL-13 des lymphocytes Th2 favorise la production d’IgE par les plasmocytes et l’activation des éosinophiles (Romagnani 2000).

Suite à la découverte de la polarisation Th17 en 2005, la dualité Th1/Th2 a été bouleversée et il est à présent établi que les lymphocytes Th17 jouent un rôle capital dans les mécanismes auto-immuns de nombreuses MAI ou auto-inflammatoires tels que le PR, la SEP, la maladie de Crohn, le psoriasis, ou l’asthme (Samson et al. 2011; Li et al. 2020; Moser et al. 2020; Ueno et al. 2018). Même si une polarisation lymphocytaire prédomine au cours d’une réponse auto-immune, les lymphocytes Th1 et Th17 agissent probablement de manière séquentielle et synergique (Bettelli et al. 2008; Santarlasci et al. 2009). Ainsi, en influençant la nature des chémokines secrétées par les cellules épithéliales et endothéliales locales, les Th17 agissent directement sur le recrutement des CPA, des cellules cytotoxiques, et des cellules de type Th1. Ils amplifient la réponse immunitaire et contribuent à l’installation d’un état inflammatoire chronique (Bettelli et al. 2008; Santarlasci et al. 2009).

Le statut de la polarisation dans l’AHAI est encore très discuté dans la littérature. Dans le modèle NZB la polarisation Th1 semble majeure (Shen et al. 1996) mais il a initialement été décrit chez l’homme une prédominance de la polarisation de type Th2 au détriment des Th1. Dans les années 2000, plusieurs études menées sur le secrétome des PBMC, ou dans les sérums de patients, ont

rapporté une augmentation de l'IL-4 associée à une diminution de l'IFN- γ comparativement aux sujets sains (Fagiolo, Vigevani, and Pozzetto 1994; Barcellini et al. 2000; Fagiolo and Toriani-Terenzi 2002).

Un unique article rapporte chez l'homme une production importante d'IFN- γ par les LT de patients suite à une stimulation de 5 jours par des peptides dérivants de la protéine Rh. Cependant, ces résultats doivent être nuancés car cette étude portait sur des échantillons de patients dans la phase active de leur maladie non traitée ou recevant des corticostéroïdes (Hall et al. 2012).

Depuis quelques années, un rôle prépondérant de la polarisation Th17 au cours de l'AHAI est présumé. Les travaux de A. Hall et L. Xu publiés en 2012 ont indépendamment décrit une augmentation du taux d'IL-17 sérique chez les patients au diagnostic d'AHAI (0,4 pg/ml vs. 0,02 pg/ml) ainsi qu'une augmentation de la proportion de lymphocytes Th17 après stimulation (Hall et al. 2012; Xu et al. 2012).

Nos résultats ne révèlent pas d'implication particulière de la population Th1 ou Th2, mais ils apportent des arguments forts en la faveur d'une polarisation de type Th17 prédominante au cours de l'AHAI.

En effet, les taux d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-17 étaient non détectables par technique Luminex dans les sérums de nos patients au diagnostic mais dans le cas de l'IL-17 la limite de détection de notre kit était inférieure aux taux mesurés dans le sérum des patients de l'étude de A.Hall (résultats non présentés, limite de détection respectives : 0,4 pg/ml, 9,3 pg/ml et 1,8 pg/ml). Concernant les fréquences des Th1, des Th2 et des Th17 parmi les PBMC après 4 heures de stimulation polyclonale, elles étaient équivalentes chez les patients et les témoins.

Après 4 jours de stimulation par des billes ciblant CD2/CD3/CD28 en revanche, la sécrétion d'IL-17 par les LT CD4⁺ effecteurs des patients était trois fois supérieure à celle des témoins, là où les taux étaient non différents pour l'IFN- γ et non détectables pour l'IL-4. De plus, l'analyse des ratios Th/Treg qui permettent d'évaluer la balance de la réponse pro/anti-inflammatoire, montrent un net déséquilibre du ratio Th17/Treg dans l'AIHA, alors que les ratios Th1/Treg et Th2/Treg ne sont pas affectés.

La difficulté à établir un consensus à propos de la polarisation lymphocytaire au cours de l'AHAI tient en partie du fait d'une grande disparité des protocoles expérimentaux. Bien que seulement 7 articles étudient cet aspect de la physiopathologie, la méthodologie des études est hétérogène notamment en ce qui concerne les techniques d'analyses (dosage ELISA, quantification par cytométrie en flux, Luminex), le matériel biologique (sérum de patients, PBMC, LT CD4⁺) ou le type de stimulation appliqué *in vitro* (non stimulés, agents mitogènes, GR opsonisés, peptides Rh).

Cependant, ces résultats pourraient également refléter une polarisation en périphérie moins franche au cours de l'AHAI que celle observée par exemple dans certaines maladies auto-immunes telle que la PR (Miossec 2007). On retrouve également cet aspect lors du PTI, une autre cytopénie auto-immune pour laquelle, malgré une littérature plus riche, la polarisation des populations LT circulants est toujours discutée. Le PTI est considéré comme une MAI de type Th1 mais il s'agit d'une polarisation relative, principalement liée à un déséquilibre du rapport Th1/Th2 par diminution de la polarisation Th2 (Ogawara et al. 2003; Stasi et al. 2007). De plus, aucun consensus n'a pu être établi

quant à la fréquence des Th17 parmi les LT circulants, qui est indifféremment rapportée augmentée ou stable chez les patients atteints PTI au diagnostic (Zhang et al. 2009; Guo et al. 2009; Ma et al. 2008).

Au cours de ces deux cytopénies auto-immunes, la rate est le principal site de la réaction auto-immune. Elle est le lieu de destruction des plaquettes lors du PTI et des GR lors de l'AHAI et il semblerait que l'étude de la polarisation des populations circulantes ne soit pas une approche idéale pour refléter le microenvironnement des follicules spléniques.

Le ratio Th/Treg est le reflet de l'équilibre de la représentation des acteurs pro et anti-inflammatoires de la réponse immunitaire. Il est utilisé au cours des MAI pour évaluer la réponse lymphocytaire T auto-immune, où il apparaît fréquemment déséquilibré (Wang et al. 2012; Yan et al. 2020). Dans notre étude les balances Th1/Treg et Th2/Treg chez nos patients sont identiques à celles des sujets témoins. En revanche, le ratio Th17/Treg est augmenté, ce qui appuie d'avantage la polarisation Th17 dominante au cours de l'AHAI.

Outre l'évaluation quantitative de la balance immunitaire, le ratio Th17/Treg peut également indiquer une instabilité phénotypique des Treg. Dans des conditions physiologiques, les Treg sont capables d'orienter leur phénotype vers un profil Treg « Th17 like » afin de réguler spécifiquement la réponse Th17 (Chaudhry et al. 2009; Sefik et al. 2015). Dans de nombreuses MAI, cette plasticité peut conduire à une instabilité de l'expression de Foxp3 en la faveur de ROR- γ t, conduisant *in fine* à une dérive des Treg « Th17 like » en « ex-Treg Th17⁺ », ce qui se traduit directement par une augmentation du ratio Th17/Treg (Gaddis et al. 2018; Zhou et al. 2009; Bovenschen et al. 2011; Komatsu et al. 2014).

Cette polarisation est particulièrement observée parmi les Treg Foxp3 Δ 2 ainsi que par les Treg présentant une faible déméthylation du promoteur de Foxp3, ce qui est un état non favorable à sa transcription (Zhou et al. 2008; Sato et al. 2021; Miyao et al. 2012). D'un point de vue moléculaire ces cellules sont de ce fait caractérisées par une diminution progressive de la transcription et donc de l'expression de Foxp3, contrebalancée par l'expression de ROR- γ t, CCR6, STAT3 et par la production d'IL-17.

Dans notre étude, nous ne sommes pas en mesure de statuer sur l'état de conversion des Treg des patients mais plusieurs éléments laissent à penser que la population Treg « Th17 like » n'est pas sur-représentée parmi les Treg circulants des patients. D'une part, le ratio Th17/Treg est déséquilibré mais nous n'observons pas de corrélation directe entre le taux de Treg circulants et la fréquence des Th17 (corrélation de Spearman : $P=0.70$, $R^2=0.007$, résultat non présenté). La faible intensité d'expression de Foxp3 par les Treg des patients pourrait présager d'une instabilité phénotypique des Treg. Cependant le RNAseq rapporte une augmentation des transcrits de Foxp3 dans les Treg des patients, laissant penser un niveau de déméthylation de son promoteur important. Enfin, les Treg des patients produisent des taux équivalents de transcrits des gènes de CCR6, de STAT3, de ROR- γ t et de l'IL-17, comparativement aux Treg des témoins.

Des investigations complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'implication de la polarisation ou de l'instabilité des Treg circulants au cours de l'AHAI. La quantification de la population de Treg Foxp3 Δ 2 chez les patients constituerait un élément important, tout comme l'évaluation du taux de méthylation du promoteur de Foxp3 et de la sécrétion d'IL-17 par les Treg.

2. Evaluation globale de la réponse pro et anti-inflammatoire splénique

A l'heure actuelle, aucun article publié n'apporte de description des populations lymphocytaires T CD4⁺ spléniques humaines au cours de l'AHAI. Sur la base de l'immunophénotypage réalisé sur les PBMC, nous avons étudiés les LT CD4⁺ spléniques des patients afin de préciser cet aspect de la physiopathologie. Cependant nos résultats sont d'interprétation délicate et nous permettent pas d'établir des connexions avec les observations faites dans le compartiment sanguin. En effet, la splénectomie est un traitement de dernière ligne, les patients ont donc reçu de multiples traitements, ou ont été traités de façon très prolongée par corticoïdes, ce qui impacte sans nul doute la réponse immunitaire.

L'évaluation de la fréquence des Treg totaux, des Treg Foxp3 Δ 2, et des sous-populations fonctionnelles nTreg et eTreg ne révèle pas de déficit quantitatif des populations régulatrices spléniques. Seules quelques tendances ont été observées, l'expression de Foxp3 paraît plus faible parmi les Treg totaux spléniques des patients et la proportion de Treg Foxp3 Δ 2 semble être augmentée.

Concernant les populations de LT polarisés, nous n'observons aucune prédominance chez les patients comparativement aux témoins. La polarisation Th1 et Th2 semblent augmenter chez les patients, au détriment des Th17 mais de nouveau sans être significatif et aucun des 3 ratio Th/Treg n'était déséquilibré.

Durant cette analyse du compartiment splénique, nous avons observé une très grande dispersion des valeurs mesurées, aussi bien parmi les témoins que les patients, témoignant de la grande hétérogénéité des individus au sein de chaque groupe.

En effet, la splénectomie constitue généralement la troisième ligne thérapeutique au cours de l'AHAI et bien que l'ensemble des patients soient dans une phase de rechute ou d'échec de thérapeutique, ils ont reçu au préalable de fortes doses de corticoïdes et/ou du rituximab. Ils ont d'autre part une durée d'évolution de leur maladie qui s'étend de 2 à 50 mois et seulement 6 d'entre eux ont présenté une réponse complète à la splénectomie. Ces éléments peuvent modifier la représentation des différentes sous-populations lymphocytaires dans la rate des patients, la prise de glucocorticoïdes au long cours entraine notamment une apoptose importante des populations lymphocytaire T et B ce qui perturbe l'architecture splénique de la pulpe blanche (Andréau et al. 1998; Herold, McPherson, and Reichardt 2006).

Du fait de cette dispersion, nous avons réalisé des analyses en sous-groupes, en prenant en compte les traitements reçus avant la splénectomie et la réponse à la splénectomie. Malgré cela, aucune différence ou tendance n'a pu être identifiée.

Etant donné le caractère rare de l'AHAI et la diminution du recours à la splénectomie, cette étude phénotypique n'a pu être réalisée que sur un petit nombre de prélèvements de patients et de témoins (11 et 10 respectivement). Augmenter les effectifs nous permettrait de renforcer les sous-groupes de patients, d'augmenter la puissance de nos tests statistiques et nous permettrait peut-être de confirmer les tendances observées.

3. Atteinte fonctionnelle des Treg circulants

Nous avons par ailleurs conduit la première exploration fonctionnelle des Treg circulants au cours de l'AHAI, chez l'Homme. Nos résultats montrent qu'outre le déficit quantitatif, les Treg des patients au diagnostic présentent un déficit fonctionnel qui se traduit par une moindre capacité à inhiber la prolifération des LT effecteurs et leur production de cytokines Th17.

Au cours des expériences de cocultures Teff/Treg, nous avons mesuré chez les patients une augmentation de la sécrétion d'IL-17 par les LT effecteurs stimulés comparativement aux témoins, et cette sécrétion était amplifiée par la présence des Treg autologues.

La production accrue d'IL-17 pourrait être révélatrice d'une conversion importante des Treg des patients en Treg « Th17 like » ou ex-Treg mais comme discuté précédemment, le profil transcriptomique des Treg des patients n'est pas en faveur à cette hypothèse. Nous nous orientons de ce fait davantage vers l'hypothèse que cette surproduction d'IL-17 tient d'une altération de la capacité des Treg à réguler la production d'IL-17 par les LT effecteurs, favorisant ainsi la polarisation de type Th17.

L'évaluation de la sécrétion des cytokines a été réalisée de manière globale au cours du test fonctionnel, en dosant les cytokines des surnageants par méthode Luminex. Une analyse des cellules en coculture par cytométrie en flux nous aurait permis d'apprécier indépendamment la production de cytokines par les LT effecteurs et les Treg, mais nous ne disposions pas de suffisamment de cellules pour entreprendre ce type d'analyses.

3.1. Profil transcriptomique des Treg

L'altération fonctionnelle des populations régulatrices a été impliquée dans le déclenchement et l'entretien de multiples MAI (Grant et al. 2015) bien que pour la plupart, les mécanismes sous-jacents restent à déterminer. Nous avons montré que, dans le cas de l'AIHA, les dysfonctionnements des Treg sont très probablement liés à la diminution du niveau d'expression du facteur de transcription Foxp3.

L'expression de Foxp3 est indispensable à l'orchestration du programme transcriptionnel des Treg (Colamatteo et al. 2019). En tant que régulateur principal, il façonne la lignée Treg, en permettant de maintenir leur phénotype et leur fonctionnalité.

Outre le développement du syndrome IPEX chez les patients porteurs d'une mutation invalidante pour le gène *FOXP3*, une altération de l'expression de Foxp3 a été associée à la physiopathologie de plusieurs maladies auto-immunes telles que la PR ou la thyroïdite de Hashimoto (Su et al. 2019; Yang et al. 2018; Nie et al. 2013). De façon importante, nous avons observé pour la 1^{ère} fois au cours de l'AHAI que l'intensité de son expression était 2 fois moindre dans les Treg des patients AHAI au diagnostic comparativement aux témoins.

A cela s'ajoute une diminution de l'intensité d'expression de Helios qui est un marqueur de Treg dotés de hautes fonctions immunosuppressives (Thornton et al. 2019), puisqu'en s'associant avec Foxp3 il potentialise la fonctionnalité des Treg (Seng et al. 2020).

L'analyse fonctionnelle du RNAseq (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*) nous indique que les Treg des patients ont un profil transcriptionnel de cellules activées. Cela se traduit par une augmentation générale de la transcription, un fort engagement des voies de signalisation du TCR et l'augmentation de l'expression des transcrits de *FOXP3* comparativement aux Treg témoin.

L'activation importante du TCR est supportée par une expression différentielle des transcrits de 16 gènes effecteurs. Elle est cohérente avec l'augmentation de la transcription de *Foxp3* puisque l'activation du TCR agit directement sur le niveau de déméthylation du promoteur et des CSN de *FOXP3* (Grover, Goel, and Greene 2021). Ainsi, lorsqu'un Treg reconnaît un antigène, son expression de *Foxp3* augmente, ce qui vise à stabiliser son phénotype et ces fonctions. Cet aspect est en revanche en contradiction avec ce que nous observons concernant le niveau d'expression protéique de *Foxp3* et sur les fonctions inhibitrices évaluées *in vitro*.

Nous constatons également que la moindre expression de la protéine *Foxp3* se répercute probablement sur le niveau d'expression des molécules effectrices des Treg. Malgré l'activation importante du TCR, seul les transcrits de CD25, CTLA-4, TIGIT et GARP sont augmentés et de façon modérée. Il est absolument nécessaire à présent de mesurer l'expression protéique des molécules effectrices des Treg, afin d'identifier plus précisément les mécanismes dysfonctionnant chez les patients. Une analyse plus approfondie du phénotype des Treg par cytométrie en flux permettrait d'apporter certains éléments de réponse.

Bien que l'analyse transcriptomique des Treg ne nous permette pas d'identifier précisément les mécanismes impliqués dans l'atteinte fonctionnelle observée chez les Treg des patients, elle nous apporte cependant plusieurs indications sur le profil des Treg.

3.2. Impact du TNF- α sur les Treg

Le rôle du TNF- α à l'égard des Treg est une question délicate. Cette cytokine pléiotrope a indiscutablement des propriétés pro-inflammatoires et elle est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes ou inflammatoires (Salomon 2021). Les premiers articles parus s'accordaient sur son rôle délétère vis-à-vis de la fonction des Treg mais depuis une dizaine d'année, les études en faveur d'un rôle bénéfique de la signalisation de TNFR2 sur les Treg sont nombreuses (Hamano et al. 2011; Okubo et al. 2013; Yang et al. 2019; Lamontain et al. 2019; Lubrano di Ricco et al. 2020; Salomon 2021).

Dans le cas de notre étude, l'analyse GSEA des données du transcriptome nous a révélé un engagement important de la voie de signalisation du TNF dans les Treg des patients comparativement aux témoins, ce qui est en cohérence avec l'augmentation des concentrations sériques du TNF- α chez les patients AHAI.

A ce stade de notre étude, nous n'apportons pas la démonstration d'une implication directe du TNF- α sur le déficit quantitatif ou fonctionnel des Treg, pour autant nous avons des arguments forts

nous permettant d'envisager sa participation dans l'atteinte des Treg au cours de l'AHAI. Sur la base des travaux réalisés par l'équipe de Christophe Benoist, nous avons calculé un indice d'activation de la signalisation du TNF dans le but d'évaluer quantitativement l'engagement de cette voie et de la comparer avec les données issues de l'immunophénotypage (Galván-Peña et al. 2021). Cet indice TNF a été calculé en réalisant, pour chaque donneur, la moyenne de l'expression normalisée de tous les gènes par rapport à l'expression moyenne des sujets contrôles. Nous avons observé des corrélations négatives entre l'intensité de l'engagement de la voie du TNF dans les Treg et leur fréquence en périphérie et également avec le niveau d'expression de Foxp3.

La dichotomie des rôles du TNF- α vis-à-vis des Treg s'appuie principalement sur l'antagonisme fonctionnel de ses deux récepteurs.

La signalisation de TNFR1 et TNFR2 est très complexe et il existe une interaction entre ces deux voies qui partagent de nombreux effecteurs (Yang et al. 2019; Faustman and Davis 2010). Très schématiquement, le TNFR1 est constitué d'un domaine de mort intracytoplasmique permettant l'activation de voies apoptotiques dépendantes des caspases, son activation conduit à la mort cellulaire par apoptose. Parallèlement, la signalisation de TNFR2 aboutit notamment à l'activation de NF κ B qui promeut la survie cellulaire (Grell et al. 1998; Faustman and Davis 2010). Dans les Treg, elle favorise leur expansion, renforce leur signature phénotypique en augmentant l'expression de Foxp3 notamment et elle potentialise leurs fonctions. De façon importante, il semblerait que TNFR1 ait une plus grande affinité pour le TNF- α soluble tandis que la formation d'agrégats avec le TNF- α membranaire est probablement nécessaire à la transduction du signal *via* TNFR2 (Mukai et al. 2010).

Ces observations divergentes ne sont pas pour autant à opposer, il est possible de réunir ces deux hypothèses en considérant que la co-expression de TNFR1 et TNFR2 par les Treg permet l'activation concomitante des deux voies mais que probablement l'une est dominante.

Dans des conditions physiologiques, l'expression de TNFR1 est ubiquitaire mais de faible intensité parmi les Treg, contrairement à l'expression TNFR2 qui est intense. Dans cette configuration, on peut penser que la signalisation de TNFR2 soit dominante et qu'elle permette une action « positive » du TNF- α sur les Treg.

A l'inverse, il est tout à fait envisageable qu'il puisse exister dans un contexte pathologique un déséquilibre de la signalisation des récepteurs TNFR1 et TNFR2 dans les Treg. Ce déséquilibre pourrait être le fait soit d'une modification de l'expression des deux récepteurs (augmentation de l'expression de TNFR1 et/ou effondrement de TNFR2), ou dépendre de la forme selon laquelle le TNF- α est disponible, soluble ou membranaire, dans le microenvironnement des Treg. Dans ce contexte, la signalisation de TNFR1 serait dominante et l'effet globale du TNF- α sur les Treg délétère (Faustman and Davis 2010). A ce jour, aucune étude n'a évalué concomitamment l'expression de TNFR1 et TNFR2 par les Treg au cours de MAI.

Dans le cas de notre étude, nous n'avons pas suffisamment d'éléments pour évaluer l'activation des voies TNFR1/TNFR2 des Treg des patients comparativement aux témoins.

Les deux récepteurs sont transcrits dans les Treg des patients et des témoins, et les transcrits de TNFR2 sont augmentés chez les patients comparativement aux témoins. Il serait important de quantifier leur expression membranaire par cytométrie en flux par exemple et de comparer le rapport TNFR1/TNFR2.

Il serait également intéressant de mesurer l'activation des deux voies de signalisation chez les patients et les témoins en suivant par exemple le recrutement de certaines molécules effectrices spécifiques de la voie TNFR2 tels que TRAF1 et certaines cIAP (*Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1*), ou de FADD et TRADD pour la voie TNFR1 (Brenner, Blaser, and Mak 2015).

Enfin, si un déséquilibre de l'activation des voies TNFR1/TNFR2 était observé, il serait pertinent de renouveler les tests fonctionnels des Treg en présence d'agonistes de TNFR2, tels que les anticorps MR2-1, TNCscTNF80 ou STAR2 (Lamontain et al. 2019; Salomon 2021), pour rééquilibrer la signalisation du TNF- α et déterminer si cela permet de restaurer *in vitro* la fonctionnalité des Treg des patients atteints d'AHAI.

3.3. Régulation post traductionnelle de Foxp3

Etant donné l'expression élevée des transcrits de *FOXP3* alors que son expression protéique est diminuée chez les patients nous avons orienté nos investigations sur sa régulation post-traductionnelle.

Des dysfonctions de la régulation post traductionnelle de Foxp3 ont été associées à la physiopathologie de plusieurs maladies auto-immunes telles que la PR ou la thyroïdite de Hashimoto (Nie et al. 2013; Yang et al. 2018; Su et al. 2019). Près d'une vingtaine de régulateurs post traductionnels de Foxp3 ont été décrits jusqu'à présent et ils agissent pour la plupart sur le niveau de d'ubiquitination, d'acétylation ou de phosphorylation de Foxp3 (Colamatteo et al. 2019). Pour six d'entre eux, nous avons observé une augmentation de leur transcription dans les Treg des patients atteints d'AHAI. Par ailleurs, leur niveau de transcription est négativement corrélé avec la fréquence des Treg circulants, la MFI de Foxp3, tandis qu'ils présentent une corrélation positive avec l'activation de la voie de signalisation du TNF. En d'autres termes, plus les Treg sont exposés au TNF- α , plus ces gènes régulateurs de Foxp3 sont transcrits et ils pourraient donc participer à la dégradation de Foxp3, entraînant un dysfonctionnement des Treg. Etant donné le faible nombre de Treg que nous avons triés pour chaque prélèvement de patients, nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser sur les mêmes échantillons le test fonctionnel Treg et le RNAseq. Nous ne sommes, de ce fait, pas en mesure d'évaluer directement la corrélation entre l'expression des transcrits des régulateurs post-traductionnels de Foxp3 et la capacité fonctionnelle des Treg.

Parmi les régulateurs post-traductionnels de Foxp3 différenciellement exprimés, Pim-2 permet la phosphorylation de Foxp3 ce qui conduit à l'instabilité de son expression et à une réduction de la fonction des Treg (Deng et al. 2015). Le niveau de transcription de Pim-2 est 2 fois supérieurs chez les patients comparativement aux témoins.

L'histone désacétylase *HADAC7* entraîne une diminution du niveau d'acétylation de Foxp3 conduisant à une augmentation de sa dégradation par le protéasome (Colamatteo et al. 2019; Li et al. 2007). Le niveau de transcription de HDAC7 est augmenté dans les Treg des patients atteints d'AHAI.

Il est en revanche difficile de prédire l'impact des régulateurs de l'ubiquitination de Foxp3 car Stub1 et USP7 sont tous les deux augmentés dans les Treg des patients mais ils ont des rôles antagonistes vis-à-vis de Foxp3. La polyubiquitination K48 médiée par Stub1 conduit à l'adressage de Foxp3 au Protéasome 26S et à sa dégradation (Dang et al. 2011; Chen and Flies 2013). *A contrario*, la désubiquitinase USP7 renforce la stabilité de l'expression de Foxp3 et sa localisation nucléaire (van Loosdregt et al. 2013).

Sans que l'on connaisse précisément leur mode d'action, d'autres protéines peuvent intervenir dans la régulation post-traductionnelle de Foxp3. Il a notamment été décrit que, dans un environnement inflammatoire riche en TNF- α ou en IL-6, la dégradation de Foxp3 pouvait être médiée par la protéine DBC1, en association avec la caspase 8 (Gao et al. 2015).

Dans les Treg des patients nous avons observé une augmentation significative des transcrits de DBC1 et de la caspase 8. Leur niveau de transcription est également négativement corrélé avec l'intensité d'expression de Foxp3 et positivement corrélé avec l'engagement de la voie du TNF, ce qui suggère également leur implication dans la diminution d'expression de la protéine Foxp3.

Dans l'ensemble, l'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle de Foxp3 au cours de l'AHAI paraît pertinente. Elle est soutenue par l'augmentation des niveaux d'expression transcriptionnelle de ces régulateurs qui est corrélée négativement avec l'expression protéique de Foxp3 dans les Treg des patients.

Il est à présent nécessaire de démontrer formellement l'implication de ces régulateurs, en confirmant l'augmentation de leur expression protéique dans les Treg des patients. De plus, l'évaluation de l'état de phosphorylation, d'acétylation et d'ubiquitination de Foxp3 dans les Treg des patients comparativement à des témoins serait également utile.

4. Provenance et incidence du TNF- α

Un autre élément de notre travail à discuter concerne l'origine de l'augmentation du TNF- α sérique, qui a été très récemment observé dans une cohorte canadienne de 54 patients atteint d'AHAI et que nous confirmons par nos travaux (Branch et al. 2022).

De façon générale, le TNF- α est produit par les cellules myéloïdes, les NK et par les lymphocytes T activés. Il est synthétisé sous forme d'une protéine trimérique transmembranaire qui peut être clivée par la métalloprotéase TACE (*TNF- α Converting Enzyme* ou ADAM17) pour générer le TNF- α soluble, les deux formes étant biologiquement actives (Brenner, Blaser, and Mak 2015).

Au cours de notre travail, nous avons concentré nos recherches sur les populations lymphocytaires T et nous n'avons pas mesuré la production de TNF- α par les populations myéloïdes. Nous avons en revanche mesuré la sécrétion de TNF- α soluble par les LT effecteurs après 4 jours de stimulation par

des billes d'activation. La médiane des concentrations de TNF- α produites par les lymphocytes des patients tendaient à être plus élevées que celles des témoins (59,1pg/ml vs. 24,1pg/ml, P=0,19).

De nouvelles investigations portant sur la production de TNF- α soluble ou membranaire par les monocytes circulants, les PNN ou les macrophages spléniques de patients atteint d'AHAI seraient utiles afin d'en préciser la source. Deux aspects importants de la physiopathologie de l'AHAI sont à éclaircir : quelles sont les cellules à l'origine de cette production accrue de TNF- α ? Quel en est la cause ?

La littérature nous apporte à ce sujet quelques éléments permettant de penser que les macrophages spléniques pourraient être impliqués. Une augmentation du TNF- α sérique a été observée au cours d'autres anémies telles que la drépanocytose ou la sphérocytose (Belcher et al. 2000; Rocha et al. 2011; Bowers et al. 2013) et il a été décrit dans des modèles murins que l'hème libre, issu de l'hémolyse des GR, activait les macrophages et impactait leur production de cytokines. Sans que les mécanismes ne soient complètement décryptés, l'hème serait susceptible d'activer le TLR-4 et par un mécanisme impliquant la production d'espèces radicalaires d'oxygène (ROS) et la protéine adaptatrice SYK, l'hème stimulerait directement la production de TNF- α (Fortes et al. 2012; Prestes et al. 2020).

Bien que le principal facteur de déclenchement de l'AHAI ne soit pas connu, l'hémolyse en elle-même pourrait ainsi entretenir le processus auto-immun en favorisant la sécrétion de TNF- α par les monocytes, les macrophages ou les PNN spléniques.

Afin de confirmer ces observations chez l'homme, nous avons quantifié la production de TNF- α par des monocytes issus de donneurs sains, cultivés *in vitro* dans des conditions artificielles d'hémolyse. Nos observations confirment que chez l'homme, comme cela avait été observé chez la souris (Fortes et al. 2012), l'hème libre augmente la production de TNF- α par les monocytes. De même, une augmentation de TNF- α est également observées lorsque les monocytes sont cultivés en présence de GR opsonisés.

5. Les thérapeutiques

Au cours de notre travail, nous avons rapporté une augmentation du TNF- α sérique chez les patients AHAH au diagnostic ainsi qu'un déficit fonctionnel des Treg circulants, deux observations majeures venant compléter la compréhension de la physiopathologie de l'AHAI. Bien que de nombreuses questions restent en suspens concernant les aspects mécanistiques ou les liens entre ces deux observations, elles nous permettent d'ores et déjà d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques pour les patients : le renforcement des populations Treg et la neutralisation de la production du TNF- α ou de sa signalisation.

Le rééquilibrage de la réponse lymphocytaire T et la stabilisation de la tolérance chez les patients AHAH permettrait d'améliorer la réponse aux thérapeutiques classiques, et pourrait leur permettre une rémission complète et prolongée.

5.1. Stratégies de renforcement des populations Treg

Les thérapies basées sur la génération des Treg ou sur le renforcement de leurs fonctions suscitent un grand intérêt pour traiter les maladies auto-immunes, les maladies auto-inflammatoires et prévenir le rejet de greffe en restaurant un état de tolérance.

La thérapie cellulaire adoptive est une des approches à l'étude. Elle consiste à purifier les Treg circulants, le plus souvent des Treg naïfs, de les expandre *in vitro* par une co-stimulation TCR/CD28/IL-2 puis de les administrer aux patients (Hippen et al. 2011; Arroyo Hornero et al. 2017; Sakaguchi et al. 2020). Les Treg ainsi transférés persistent chez les patients receveurs pendant plus de 1 an et des essais de phase I ont rapporté une bonne tolérance et une bonne efficacité dans un contexte de prévention de l'apparition de GvHD ou de traitement du diabète de type 1 (Brunstein et al. 2016; Bluestone et al. 2015). Malgré cela, la thérapie adoptive se heurte à des limites techniques due à la rareté des Treg dans le sang, à la diversité de leur spécificité et à leur faible capacité proliférative *in vitro*, ce qui rend difficile et coûteuse l'application clinique de cette thérapeutique.

Face à l'essor de l'ingénierie génétique, et l'inestimable apport des CAR T (*Chimeric Antigen Receptor*) dans le domaine de l'onco-hématologie, le développement de CAR Treg autoréactifs est à présent pressentie au cours des MAI.

Cette approche consiste à développer *in vitro* des LT exprimant Foxp3 et un TCR artificiel de spécificité définie et indépendant de la reconnaissance au CMH. Elle présage d'une plus grande efficacité thérapeutique comparativement aux stratégies thérapie cellulaire adoptive polyclonale non spécifique. L'administration de CAR Treg autoréactifs aux patients atteint de MAI permettrait de restaurer une tolérance spécifique vis-à-vis des Ag ciblés par la réaction auto-immune (Riet and Chmielewski 2022).

Les thérapies cellulaires sont des approches intéressantes pour compléter l'arsenal thérapeutique des patients atteint d'AHAI mais elles sont encore dans un processus développemental et leur utilisation en clinique pour le plus grand nombre n'est pas une perspective que l'on peut envisager à court terme.

La seconde stratégie visant à renforcer la population Treg consiste à la stimuler son expansion *in situ*, directement chez le patient. L'administration d'IL-2 à faible dose est la principale approche actuellement envisagée. Elle permet de développer les Treg tout en évitant les complications liées à la signalisation de l'IL-2 sur les cellules NK ou les cellules T effectrices (Sakaguchi et al. 2020). Le bénéfice apporté aux patients atteint de MAI est actuellement évalué au cours de nombreux essais cliniques de phase I/II et cette stratégie thérapeutique a déjà montré des perspectives intéressantes notamment dans le cas de patients atteint de diabète de type 1, de LS, de PR ou de GvHD (Yuan et al. 2022).

A titre d'exemple, plusieurs études ont rapporté au cours du lupus une bonne tolérance des patients à l'IL-2 faible dose associée à une réduction significative du score d'activité de la maladie (SELENA-SLEDAI), une augmentation des scores de réponse au traitement (SRI-4) ainsi qu'une réduction de la dose de corticothérapie d'au moins 50 % (Rosenzweig et al. 2019; He et al. 2016; Zhao et al. 2019; Yuan et al. 2022).

D'un point de vue physiopathologique, l'IL-2 faible dose permet d'augmenter le nombre de Treg circulants, mais également d'empêcher la polarisation des TFH et des Th17 en inhibant les facteurs de transcription ROR- γ t et Bcl-6 (Zhao et al. 2019; Miao et al. 2021). Elle permet ainsi de rééquilibrer les ratio Treg/Th17 et TFR/TFH et de rétablir l'homéostasie immunitaire.

Etant donnée le déficit quantitatif en Treg associé au déséquilibre du ratio Treg/Th17 que nous avons observé au cours de ce travail, l'utilisation d'IL-2 à faible dose pourrait être une approche thérapeutique tout à fait pertinente au cours de l'AHAI.

Depuis quelques années, une nouvelle approche visant à expandre *in situ* les Treg de patients atteint de MAI par l'administration d'agonistes de TNFR2 est envisagé. Etant donné l'expression importante de TNFR2 par les Treg effecteurs comparativement aux LT conventionnels, son action positive sur la prolifération des Treg et le renforcement de leurs capacités suppressives, des expériences sur différents modèles de MAI ont été conduits. Il a notamment été observé dans un modèle murin d'arthrite que l'administration d'agoniste de TNFR2 augmentait la fréquence des Treg dans la rate et les ganglions lymphatiques inguinaux, et améliorait le score clinique et histologique des animaux (Lamontain et al. 2019). A ce jour, 3 molécules ont prouvé leur efficacité chez l'homme *in vitro* (MR2-1, TNF07 et TNC- scTNFR2), mais aucun essai clinique n'a débuté pour évaluer l'utilisation d'agonistes du TNFR2 au cours de MAI (Salomon 2021).

Au cours de l'AHAI, si l'hypothèse selon laquelle l'activation des voies du TNF est déséquilibrée en faveur de TNFR1 et entraîne la perte de l'expression de Foxp3 par les Treg des patients était confirmé, l'utilisation d'agonistes de TNFR2 pourrait être pertinente. Cette approche permettrait de rééquilibrer l'activation des voies de signalisation du TNF en la faveur de TNFR2, favorable aux Treg, et pourrait peut-être restaurer la fonctionnalité des Treg des patients.

5.2. Neutralisation du TNF- α ou de sa signalisation

La seconde stratégie thérapeutique que les résultats de notre travail suggère est la neutralisation du TNF- α .

Aucun article n'avait jusqu'à présent rapporté un rôle du TNF- α dans la physiopathologie de l'AHAI et les inhibiteurs de TNF- α ne font, par conséquent, pas partie de l'arsenal thérapeutique disponible. Les inhibiteurs de TNF- α ont été développés durant la fin des années 90 et ils occupent une place centrale dans la prise en charge de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes telles que les MICI, la PR, le psoriasis, ou le lupus (Evangelatos et al. 2022). Actuellement, cinq inhibiteurs sont approuvés cliniquement, quatre Ac monoclonaux et une protéine de fusion (**Tableau 08**. Inhibiteurs de TNF- α). Sur le plan biologique général, ils ciblent directement le TNF- α soluble ou membranaire et inactivent son action pro-inflammatoire vis-à-vis des cellules myéloïdes, des LT effecteurs et des cellules endothéliales (Salomon 2021).

Étanercept	Protéine de fusion TNFR2-IgG1 Fc
Infliximab	Ac monoclonal chimérique humanisé IgG1κ anti-TNF
Adalimumab	Ac monoclonal humain IgG1κ anti-TNF
Golimumab	Ac monoclonal humain IgG1κ anti-TNF
Certolizumab	Ac monoclonal humain PEGylé IgG1κ anti-TNF

Tableau 08. Inhibiteurs de TNF-α

Fc : Fragment Cristallisable, Ig : Immunoglobuline, TNF-α : *Tumor Necrosis Factors α*, TNFR2 : *Tumor Necrosis Factors Receptor 2*.

Du fait notamment de l'antagonisme fonctionnel de TNFR1 et TNFR2 précédemment discuté, il est tout aussi délicat de décrire l'effet du TNF-α sur les Treg que de déchiffrer les conséquences de son inactivation. Pour autant, quelle que soit la molécule utilisée ou la pathologie ciblée, une grande majorité des publications décrivent, après traitement par un inhibiteur de TNF-α :

- Une augmentation de la proportion de Treg circulants dans le sang
- Une augmentation des capacités suppressives des Treg ou une intensification de la sensibilité des LT effecteurs vis-à-vis de l'effet supprimeur des Treg (Salomon 2021)

Etant donné l'implication du TNF-α dans la physiopathologie de l'AHAI et de l'altération quantitative et fonctionnelle des Treg, l'inactivation du TNF-α par des inhibiteurs est une perspective thérapeutique prometteuse tout comme celle du blocage de sa production. Le ciblage du TNF-α pourrait être une approche complémentaire aux traitements actuels, avec l'optique de restaurer la tolérance immunitaire et de ce fait améliorer la rémission complète prolongée des patients.

Il existe actuellement plusieurs molécules permettant d'inhiber la production de TNF-α telle que la chloroquine, la thalidomide ou ses dérivés (lénalidomide et pomalidomide). Nous avons observé au cours de notre travail que le fostamatinib était également capable *in vitro* d'inhiber la production de TNF-α de monocytes sains activés dans un contexte hémolytique artificielle.

Le fostamatinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase SYK, qui permet de bloquer la signalisation des FcγR et d'inhiber l'activation et la phagocytose des macrophages spléniques (Kuter et al. 2022) et depuis quelques années, il dispose d'une AMM pour le PTI (Bussel et al. 2019). Son efficacité au cours de l'AHAI a été évaluée lors d'une étude clinique de phase II en 2019 et il a montré des effets prometteurs avec une réponse obtenue pour 46 % des patients (Kuter et al. 2022).

Il est intéressant de noter que l'inhibition de SYK altère également la signalisation du BCR et de ce fait, la survie des lymphocytes B, leur maturation et la production d'anticorps *in vitro* (Roders et al. 2018). Cet aspect suggère que le fostamatinib pourrait également réduire la production d'auto-Ac chez les patients, bien que cette hypothèse nécessite d'être confirmée chez l'Homme.

Ainsi, le fostamatinib pourrait exercer, au cours de l'AHAI, une action étendue en agissant sur 3 volets différents de la physiopathologie :

- L'inhibition de la capacité phagocytaire des macrophages spléniques
- La réduction de la production des auto-Ac
- L'inhibition de la production de TNF- α par les macrophages spléniques

La diversité de son action pourrait lui conférer un effet à court terme en réduisant directement la clairance des GR, mais également un effet à long terme en restaurant un état de tolérance stable par le rétablissement du déficit quantitatif et fonctionnel des Treg.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons réalisé pour la première fois une étude simultanée des populations de LT effecteurs et des Treg circulants au cours de l'AHAI, ainsi qu'une étude fonctionnelle et transcriptomique des Treg au diagnostic.

Nos travaux ont tout d'abord permis de confirmer l'existence d'un déficit quantitatif en Treg circulants chez les patients au diagnostic associé à une polarisation de type Th17 prédominante.

Nous rapportons par ailleurs deux faits importants venant compléter la compréhension de la physiopathologie de l'AHAI :

- Un déficit fonctionnel des Treg circulants lié à la diminution du niveau d'expression de Foxp3.
- Une augmentation du TNF- α sérique chez les patients AHAJ au diagnostic

Des investigations complémentaires sont à présent nécessaires pour comprendre les liens entre ces deux observations et en déchiffrer les mécanismes. Pour autant, nos résultats nous permettent d'ores et déjà d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques pour les patients tels que le renforcement des populations Treg et/ou la neutralisation de la production du TNF- α .

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal, B. B. 2003. 'Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword', *Nat Rev Immunol*, 3: 745-56.
- Ahmad, E., T. Elgohary, and H. Ibrahim. 2011. 'Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia', *J Investig Allergol Clin Immunol*, 21: 297-304.
- Akimova, T., U. H. Beier, L. Wang, M. H. Levine, and W. W. Hancock. 2011. 'Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation', *PLoS One*, 6: e24226.
- Akkaya, B., Y. Oya, M. Akkaya, J. Al Souz, A. H. Holstein, O. Kamenyeva, J. Kabat, R. Matsumura, D. W. Dorward, D. D. Glass, and E. M. Shevach. 2019. 'Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells', *Nat Immunol*, 20: 218-31.
- Allard, B., D. Allard, L. Buisseret, and J. Stagg. 2020. 'The adenosine pathway in immuno-oncology', *Nat Rev Clin Oncol*, 17: 611-29.
- Allgood, J. W., and H. Chaplin, Jr. 1967. 'Idiopathic acquired autoimmune hemolytic anemia. A review of forty-seven cases treated from 1955 through 1965', *Am J Med*, 43: 254-73.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. 'Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein', *Science*, 298: 1395-401.
- Andersson, J., D. Q. Tran, M. Pesu, T. S. Davidson, H. Ramsey, J. J. O'Shea, and E. M. Shevach. 2008. 'CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner', *J Exp Med*, 205: 1975-81.
- Andréau, K., C. Lemaire, V. Souvannavong, and A. Adam. 1998. 'Induction of apoptosis by dexamethasone in the B cell lineage', *Immunopharmacology*, 40: 67-76.
- Arroyo Hornero, R., G. J. Betts, B. Sawitzki, K. Vogt, P. N. Harden, and K. J. Wood. 2017. 'CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression', *Transplantation*, 101: 302-09.
- Arvey, A., J. van der Veeke, G. Plitas, S. S. Rich, P. Concannon, and A. Y. Rudensky. 2015. 'Genetic and epigenetic variation in the lineage specification of regulatory T cells', *Elife*, 4: e07571.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. 'Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation', *J Exp Med*, 184: 387-96.
- Atibalentja, D. F., C. A. Byersdorfer, and E. R. Unanue. 2009. 'Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction', *J Immunol*, 183: 7909-18.
- Atif, M., A. Mohr, F. Conti, O. Scatton, G. Gorochov, and M. Miyara. 2020. 'Metabolic Optimisation of Regulatory T Cells in Transplantation', *Front Immunol*, 11: 2005.
- Audia, S., B. Bach, M. Samson, D. Lakomy, J. B. Bour, B. Burlet, J. Guy, L. Duveillard, M. Branger, V. Leguy-Seguin, S. Berthier, M. Michel, and B. Bonnotte. 2018. 'Venous thromboembolic events during warm autoimmune hemolytic anemia', *PLoS One*, 13: e0207218.
- Audia, S., N. Grienay, M. Mounier, M. Michel, and B. Bonnotte. 2020. 'Evans' Syndrome: From Diagnosis to Treatment', *J Clin Med*, 9.
- Audia, S., M. Mahévas, M. Nivet, S. Ouandji, M. Ciudad, and B. Bonnotte. 2021. 'Immune Thrombocytopenia: Recent Advances in Pathogenesis and Treatments', *Hemasphere*, 5: e574.
- Audia, S., M. Mahévas, M. Samson, B. Godeau, and B. Bonnotte. 2017. 'Pathogenesis of immune thrombocytopenia', *Autoimmun Rev*, 16: 620-32.
- Audiger, C., M. J. Rahman, T. J. Yun, K. V. Tarbell, and S. Lesage. 2017. 'The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance', *J Immunol*, 198: 2223-31.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. 2001. 'CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood', *J Immunol*, 167: 1245-53.
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D. A. Hafler. 2006. 'MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells', *J Immunol*, 176: 4622-31.

- Baine, I., S. Basu, R. Ames, R. S. Sellers, and F. Macian. 2013. 'Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells', *J Immunol*, 190: 1008-16.
- Bakdash, G., S. P. Sittig, T. van Dijk, C. G. Figdor, and I. J. de Vries. 2013. 'The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II', *Front Immunol*, 4: 53.
- Ballesteros-Tato, A., B. León, B. A. Graf, A. Moquin, P. S. Adams, F. E. Lund, and T. D. Randall. 2012. 'Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation', *Immunity*, 36: 847-56.
- Barcellini, W., G. Clerici, R. Montesano, E. Taioli, F. Morelati, P. Rebulli, and A. Zanella. 2000. 'In vitro quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation', *Br J Haematol*, 111: 452-60.
- Barcellini, W., B. Fattizzo, and A. Cortelezzi. 2018. 'Autoimmune hemolytic anemia, autoimmune neutropenia and aplastic anemia in the elderly', *Eur J Intern Med*, 58: 77-83.
- Barcellini, W., B. Fattizzo, A. Zaninoni, T. Radice, I. Nichele, E. Di Bona, M. Lunghi, C. Tassinari, F. Alfinito, A. Ferrari, A. P. Leporace, P. Niscola, M. Carpenedo, C. Boschetti, N. Revelli, M. A. Villa, D. Consonni, L. Scaramucci, P. De Fabritiis, G. Tagariello, G. Gaidano, F. Rodeghiero, A. Cortelezzi, and A. Zanella. 2014. 'Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients', *Blood*, 124: 2930-6.
- Barcellini, W., F. Zaja, A. Zaninoni, F. G. Imperiali, E. Di Bona, B. Fattizzo, D. Consonni, A. Cortelezzi, and A. Zanella. 2013. 'Sustained response to low-dose rituximab in idiopathic autoimmune hemolytic anemia', *Eur J Haematol*, 91: 546-51.
- Barcellini, W., A. Zaninoni, J. A. Giannotta, G. Merati, M. Capecchi, B. Fattizzo, E. Trombetta, and A. Artoni. 2021. 'Circulating extracellular vesicles and cytokines in congenital and acquired hemolytic anemias', *Am J Hematol*, 96: E129-e32.
- Barker, R. N., and C. J. Elson. 1994. 'Multiple self epitopes on the Rhesus polypeptides stimulate immunologically ignorant human T cells in vitro', *Eur J Immunol*, 24: 1578-82.
- Barker, R. N., C. R. Shen, and C. J. Elson. 2002. 'T-cell specificity in murine autoimmune haemolytic anaemia induced by rat red blood cells', *Clin Exp Immunol*, 129: 208-13.
- Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. 'Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements', *Immunol Cell Biol*, 76: 34-40.
- Barros, M. M., M. Yamamoto, M. S. Figueiredo, R. Cançado, E. Y. Kimura, D. M. Langhi, Jr., C. S. Chiattonne, and J. O. Bordin. 2009. 'Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-alpha,beta on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia', *Transfusion*, 49: 154-60.
- Barthold, D. R., S. Kysela, and A. D. Steinberg. 1974. 'Decline in suppressor T cell function with age in female NZB mice', *J Immunol*, 112: 9-16.
- Belcher, J. D., P. H. Marker, J. P. Weber, R. P. Hebbel, and G. M. Vercellotti. 2000. 'Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion', *Blood*, 96: 2451-9.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. 'The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3', *Nat Genet*, 27: 20-1.
- Berentsen, S., A. Hill, Q. A. Hill, T. H. A. Tvedt, and M. Michel. 2019. 'Novel insights into the treatment of complement-mediated hemolytic anemias', *Ther Adv Hematol*, 10: 2040620719873321.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. 'Induction and effector functions of T(H)17 cells', *Nature*, 453: 1051-7.
- Birgens, H., H. Frederiksen, H. C. Hasselbalch, I. H. Rasmussen, O. J. Nielsen, L. Kjeldsen, H. Larsen, T. Mourits-Andersen, T. Plesner, D. Rønnow-Jessen, H. Vestergaard, T. W. Klausen, and C. Schöllkopf. 2013. 'A phase III randomized trial comparing glucocorticoid monotherapy versus glucocorticoid and rituximab in patients with autoimmune haemolytic anaemia', *Br J Haematol*, 163: 393-9.

- Bisharat, N., H. Omari, I. Lavi, and R. Raz. 2001. 'Risk of infection and death among post-splenectomy patients', *J Infect*, 43: 182-6.
- Björk, A., J. Mofors, and M. Wahren-Herlenius. 2020. 'Environmental factors in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome', *J Intern Med*, 287: 475-92.
- Bloch, E. M., H. A. Branch, D. Sakac, R. M. Leger, and D. R. Branch. 2020. 'Differential red blood cell age fractionation and Band 3 phosphorylation distinguish two different subtypes of warm autoimmune hemolytic anemia', *Transfusion*, 60: 1856-66.
- Bluestone, J. A., J. H. Buckner, M. Fitch, S. E. Gitelman, S. Gupta, M. K. Hellerstein, K. C. Herold, A. Lares, M. R. Lee, K. Li, W. Liu, S. A. Long, L. M. Masiello, V. Nguyen, A. L. Putnam, M. Rieck, P. H. Sayre, and Q. Tang. 2015. 'Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells', *Sci Transl Med*, 7: 315ra189.
- Blumberg, L. J., J. E. Humphries, S. D. Jones, L. B. Pearce, R. Holgate, A. Hearn, J. Cheung, A. Mahmood, B. Del Tito, J. S. Graydon, L. E. Stolz, A. Bitonti, S. Purohit, D. de Graaf, K. Kacena, J. T. Andersen, G. J. Christianson, D. C. Roopenian, J. J. Hubbard, A. K. Gandhi, K. Lasseter, M. Pyzik, and R. S. Blumberg. 2019. 'Blocking FcRn in humans reduces circulating IgG levels and inhibits IgG immune complex-mediated immune responses', *Sci Adv*, 5: eaax9586.
- Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten, and C. B. Thompson. 1995. 'CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL', *Immunity*, 3: 87-98.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. 'Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression', *J Exp Med*, 204: 1303-10.
- Bouvier, A., M. Gout, S. Audia, C. Chalumeau, P. Rat, and O. Deballon. 2017. '[Routine screening of splenic or portal vein thrombosis after splenectomy]', *Rev Med Interne*, 38: 3-7.
- Bovenschen, H. J., P. C. van de Kerkhof, P. E. van Erp, R. Woestenenk, I. Joosten, and H. J. Koenen. 2011. 'Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin', *J Invest Dermatol*, 131: 1853-60.
- Bowers, A. S., H. L. Reid, A. Greenidge, C. Landis, and M. Reid. 2013. 'Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers', *PLoS One*, 8: e68929.
- Branch, D. R., R. M. Leger, D. Sakac, Q. Yi, T. Duong, R. S. M. Yeung, B. Binnington, and E. M. Bloch. 2022. 'Chemokines IP-10/CXCL10 and IL-8/CXCL8 are potential novel biomarkers of warm autoimmune hemolytic anemia', *Blood Adv*.
- Bratosin, D., J. Mazurier, J. P. Tissier, J. Estaquier, J. J. Huart, J. C. Ameisen, D. Aminoff, and J. Montreuil. 1998. 'Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review', *Biochimie*, 80: 173-95.
- Brenner, D., H. Blaser, and T. W. Mak. 2015. 'Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die', *Nat Rev Immunol*, 15: 362-74.
- Brenner, D., P. H. Krammer, and R. Arnold. 2008. 'Concepts of activated T cell death', *Crit Rev Oncol Hematol*, 66: 52-64.
- Breunis, W. B., E. van Mirre, M. Bruin, J. Geissler, M. de Boer, M. Peters, D. Roos, M. de Haas, H. R. Koene, and T. W. Kuijpers. 2008. 'Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura', *Blood*, 111: 1029-38.
- Bride, K. L., T. Vincent, K. Smith-Whitley, M. P. Lambert, J. J. Bleesing, A. E. Seif, C. S. Manno, J. Casper, S. A. Grupp, and D. T. Teachey. 2016. 'Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial', *Blood*, 127: 17-28.
- Brodsky, R. A. 2019. 'Warm Autoimmune Hemolytic Anemia', *N Engl J Med*, 381: 647-54.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. 'Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse', *Nat Genet*, 27: 68-73.

- Brunstein, C. G., J. S. Miller, D. H. McKenna, K. L. Hippen, T. E. DeFor, D. Sumstad, J. Curtsinger, M. R. Verneris, M. L. MacMillan, B. L. Levine, J. L. Riley, C. H. June, C. Le, D. J. Weisdorf, P. B. McGlave, B. R. Blazar, and J. E. Wagner. 2016. 'Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect', *Blood*, 127: 1044-51.
- Buono, M., R. Facchini, S. Matsuoka, S. Thongjuea, D. Waithe, T. C. Luis, A. Giustacchini, P. Besmer, A. J. Mead, S. E. Jacobsen, and C. Nerlov. 2016. 'A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors', *Nat Cell Biol*, 18: 157-67.
- Burger, P., P. Hilarius-Stokman, D. de Korte, T. K. van den Berg, and R. van Bruggen. 2012. 'CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis', *Blood*, 119: 5512-21.
- Burzyn, D., W. Kuswanto, D. Kolodin, J. L. Shadrach, M. Cerletti, Y. Jang, E. Sefik, T. G. Tan, A. J. Wagers, C. Benoist, and D. Mathis. 2013. 'A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair', *Cell*, 155: 1282-95.
- Bussel, J. B., D. M. Arnold, M. A. Boxer, N. Cooper, J. Mayer, H. Zayed, S. Tong, and A. M. Duliege. 2019. 'Long-term fostamatinib treatment of adults with immune thrombocytopenia during the phase 3 clinical trial program', *Am J Hematol*, 94: 546-53.
- Bussone, G., E. Ribeiro, A. Dechartres, J. F. Viillard, B. Bonnotte, O. Fain, B. Godeau, and M. Michel. 2009. 'Efficacy and safety of rituximab in adults' warm antibody autoimmune haemolytic anemia: retrospective analysis of 27 cases', *Am J Hematol*, 84: 153-7.
- Campbell, D. J., and E. C. Butcher. 2002. 'Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues', *J Exp Med*, 195: 135-41.
- Campbell, J. J., J. Pan, and E. C. Butcher. 1999. 'Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation', *J Immunol*, 163: 2353-7.
- Cao, Q., Y. Li, Y. Li, and L. Li. 2021. 'miR-151-5p alleviates corneal allograft rejection by activating PI3K/AKT signaling pathway and balancing Th17/Treg after corneal transplantation via targeting IL-2Ra', *Ann Transl Med*, 9: 1410.
- Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. 'Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance', *Immunity*, 27: 635-46.
- Catalán, D., M. A. Mansilla, A. Ferrier, L. Soto, K. Oleinika, J. C. Aguillón, and O. Aravena. 2021. 'Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells', *Front Immunol*, 12: 611795.
- Chadburn, A. 2000. 'The spleen: anatomy and anatomical function', *Semin Hematol*, 37: 13-21.
- Chadebech, P., V. Loustau, D. Janvier, L. Languille, J. Ripa, M. Tamagne, P. Bierling, R. Djoudi, B. Godeau, M. Michel, F. Pirenne, and M. Mahévas. 2018. 'Clinical severity in adult warm autoimmune hemolytic anemia and its relationship to antibody specificity', *Haematologica*, 103: e35-e38.
- Chadebech, P., M. Michel, D. Janvier, K. Yamada, C. Copie-Bergman, G. Bodivit, A. Bensussan, J. J. Fournie, B. Godeau, P. Bierling, S. Izui, and F. Noizat-Pirenne. 2010. 'IgA-mediated human autoimmune hemolytic anemia as a result of hemagglutination in the spleen, but independent of complement activation and FcαRI', *Blood*, 116: 4141-7.
- Chandrashekar, V., and M. Soni. 2012. 'Florid erythrophagocytosis on the peripheral smear', *J Lab Physicians*, 4: 59-61.
- Chapman, N. M., H. Zeng, T. M. Nguyen, Y. Wang, P. Vogel, Y. Dhungana, X. Liu, G. Neale, J. W. Locasale, and H. Chi. 2018. 'mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated T(reg) subsets to protect tissue homeostasis', *Nat Commun*, 9: 2095.
- Chatterjee, S., N. Bhardwaj, and R. K. Saxena. 2016. 'Identification of Stages of Erythroid Differentiation in Bone Marrow and Erythrocyte Subpopulations in Blood Circulation that Are Preferentially Lost in Autoimmune Hemolytic Anemia in Mouse', *PLoS One*, 11: e0166878.
- Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas, and A. Y. Rudensky. 2009. 'CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner', *Science*, 326: 986-91.
- Chaudhry, A., R. M. Samstein, P. Treuting, Y. Liang, M. C. Pils, J. M. Heinrich, R. S. Jack, F. T. Wunderlich, J. C. Brüning, W. Müller, and A. Y. Rudensky. 2011. 'Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation', *Immunity*, 34: 566-78.

- Chen, G., D. Zhang, T. A. Fuchs, D. Manwani, D. D. Wagner, and P. S. Frenette. 2014. 'Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease', *Blood*, 123: 3818-27.
- Chen, L., and D. B. Flies. 2013. 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nat Rev Immunol*, 13: 227-42.
- Chen, S. Y., Y. Takeoka, A. A. Ansari, R. Boyd, D. M. Klinman, and M. E. Gershwin. 1996. 'The natural history of disease expression in CD4 and CD8 gene-deleted New Zealand black (NZB) mice', *J Immunol*, 157: 2676-84.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3', *J Exp Med*, 198: 1875-86.
- Chen, W., X. Liang, A. J. Peterson, D. H. Munn, and B. R. Blazar. 2008. 'The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation', *J Immunol*, 181: 5396-404.
- Chen, X., M. Bäuml, D. N. Männel, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 2007. 'Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells', *J Immunol*, 179: 154-61.
- Chen, X., J. J. Subleski, R. Hamano, O. M. Howard, R. H. Wiltrot, and J. J. Oppenheim. 2010. 'Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood', *Eur J Immunol*, 40: 1099-106.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. 'Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis', *Science*, 265: 1237-40.
- Chinen, T., A. K. Kannan, A. G. Levine, X. Fan, U. Klein, Y. Zheng, G. Gasteiger, Y. Feng, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. 2016. 'An essential role for the IL-2 receptor in T(reg) cell function', *Nat Immunol*, 17: 1322-33.
- Choi, Y. S., R. Kageyama, D. Eto, T. C. Escobar, R. J. Johnston, L. Monticelli, C. Lao, and S. Crotty. 2011. 'ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6', *Immunity*, 34: 932-46.
- Chong, W. P., J. Zhou, H. K. Law, W. Tu, and Y. L. Lau. 2010. 'Natural killer cells become tolerogenic after interaction with apoptotic cells', *Eur J Immunol*, 40: 1718-27.
- Chung, Y., S. Tanaka, F. Chu, R. I. Nurieva, G. J. Martinez, S. Rawal, Y. H. Wang, H. Lim, J. M. Reynolds, X. H. Zhou, H. M. Fan, Z. M. Liu, S. S. Neelapu, and C. Dong. 2011. 'Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions', *Nat Med*, 17: 983-8.
- Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. 'PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells', *Nature*, 486: 549-53.
- Colamatteo, A., F. Carbone, S. Bruzzaniti, M. Galgani, C. Fusco, G. T. Maniscalco, F. Di Rella, P. de Candia, and V. De Rosa. 2019. 'Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation', *Front Immunol*, 10: 3136.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. 'The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function', *Nature*, 450: 566-9.
- Cooke, A., P. Hutchings, and R. Nayak. 1980. 'Specific and non-specific suppressor cell activity in NZB mice', *Immunology*, 40: 335-42.
- Cooke, A., P. R. Hutchings, and J. H. Playfair. 1978. 'Suppressor T cells in experimental autoimmune haemolytic anaemia', *Nature*, 273: 154-5.
- Coombs, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Cárcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. 'A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism', *J Exp Med*, 204: 1757-64.
- Coombs, R. R., A. E. Mourant, and R. R. Race. 1945. 'A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins', *Br J Exp Pathol*, 26: 255-66.

- Cox, K. O., and D. Keast. 1974. 'Autoimmune haemolytic anaemia induced in mice immunized with rat erythrocytes', *Clin Exp Immunol*, 17: 319-27.
- Crickx, E., S. Audia, A. Robbins, D. Boutboul, T. Comont, M. Cheminant, E. Oksenhendler, B. Godeau, M. Michel, and M. Mahevas. 2021. 'Daratumumab, an original approach for treating multi-refractory autoimmune cytopenia', *Haematologica*, 106: 3198-201.
- Crotty, S. 2019. 'T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases', *Immunity*, 50: 1132-48.
- Crowther, M., Y. L. Chan, I. K. Garbett, W. Lim, M. A. Vickers, and M. A. Crowther. 2011. 'Evidence-based focused review of the treatment of idiopathic warm immune hemolytic anemia in adults', *Blood*, 118: 4036-40.
- Cyster, J. G., and S. R. Schwab. 2012. 'Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs', *Annu Rev Immunol*, 30: 69-94.
- D'Abronzio, L. S., M. M. Barros, J. O. Bordin, and M. S. Figueiredo. 2012. 'Analysis of polymorphisms of TNF- α , LT- α , IL-10, IL-12 and CTLA-4 in patients with warm autoimmune haemolytic anaemia', *Int J Lab Hematol*, 34: 356-61.
- Da Costa, L., N. Mohandas, M. Sorette, M. J. Grange, G. Tchernia, and T. Cynober. 2001. 'Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia', *Blood*, 98: 2894-9.
- Dahal, L. N., L. S. Hall, R. N. Barker, and F. J. Ward. 2013. 'Indoleamine 2,3 dioxygenase contributes to transferable tolerance in rat red blood cell inducible model of experimental autoimmune haemolytic anaemia', *Clin Exp Immunol*, 173: 58-66.
- Dang, E. V., J. Barbi, H. Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, J. Fu, Y. Kim, H. R. Yen, W. Luo, K. Zeller, L. Shimoda, S. L. Topalian, G. L. Semenza, C. V. Dang, D. M. Pardoll, and F. Pan. 2011. 'Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1', *Cell*, 146: 772-84.
- de Almeida, A. C., S. M. Barbosa, L. Barjas-Castro Mde, S. T. Olalla-Saad, and A. Condino-Neto. 2009. 'The role of glucocorticoid in SIRP alpha and SHP-1 gene expression in AIHA patients', *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 31: 636-40.
- de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. 'Dendritic cell-mediated T cell polarization', *Springer Semin Immunopathol*, 26: 289-307.
- de Kleijn, S., J. D. Langereis, J. Leentjens, M. Kox, M. G. Netea, L. Koenderman, G. Ferwerda, P. Pickkers, and P. W. Hermans. 2013. 'IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1', *PLoS One*, 8: e72249.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. 'Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression', *J Exp Med*, 204: 1257-65.
- Dei Zotti, F., A. Qiu, F. La Carpia, C. Moriconi, and K. E. Hudson. 2021. 'A New Murine Model of Primary Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA)', *Front Immunol*, 12: 752330.
- Delgado Alves, J., M. Inanc, R. Diz-Kucukkaya, B. Grima, F. Soromenho, and D. A. Isenberg. 2004. 'Thrombotic risk in patients submitted to splenectomy for systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome-related thrombocytopenia', *Eur J Intern Med*, 15: 162-67.
- Deng, G., Y. Nagai, Y. Xiao, Z. Li, S. Dai, T. Ohtani, A. Banham, B. Li, S. L. Wu, W. Hancock, A. Samanta, H. Zhang, and M. I. Greene. 2015. 'Pim-2 Kinase Influences Regulatory T Cell Function and Stability by Mediating Foxp3 Protein N-terminal Phosphorylation', *J Biol Chem*, 290: 20211-20.
- Desmarests, M., C. M. Cadwell, K. R. Peterson, R. Neades, and J. C. Zimring. 2009. 'Minor histocompatibility antigens on transfused leukoreduced units of red blood cells induce bone marrow transplant rejection in a mouse model', *Blood*, 114: 2315-22.
- Desmarests, M., G. Mylvaganam, E. K. Waller, C. D. Josephson, C. Pack, A. E. Lukacher, and J. C. Zimring. 2011. 'Minor antigens on transfused RBCs crossprime CD8 T cells but do not induce full effector function', *Am J Transplant*, 11: 1825-34.

- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. 'Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood', *J Exp Med*, 193: 1303-10.
- Dombrowski, Y., T. O'Hagan, M. Dittmer, R. Penalva, S. R. Mayoral, P. Bankhead, S. Fleville, G. Eleftheriadis, C. Zhao, M. Naughton, R. Hassan, J. Moffat, J. Falconer, A. Boyd, P. Hamilton, I. V. Allen, A. Kissenpfennig, P. N. Moynagh, E. Evergren, B. Perbal, A. C. Williams, R. J. Ingram, J. R. Chan, R. J. M. Franklin, and D. C. Fitzgerald. 2017. 'Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system', *Nat Neurosci*, 20: 674-80.
- Dominguez-Villar, M., C. M. Baecher-Allan, and D. A. Hafler. 2011. 'Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease', *Nat Med*, 17: 673-5.
- Duhen, T., R. Duhen, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and D. J. Campbell. 2012. 'Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells', *Blood*, 119: 4430-40.
- Dunkelberger, J. R., and W. C. Song. 2010. 'Complement and its role in innate and adaptive immune responses', *Cell Res*, 20: 34-50.
- DuPage, M., G. Chopra, J. Quiros, W. L. Rosenthal, M. M. Morar, D. Holohan, R. Zhang, L. Turka, A. Marson, and J. A. Bluestone. 2015. 'The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation', *Immunity*, 42: 227-38.
- Duthoit, C. T., D. J. Mekala, R. S. Alli, and T. L. Geiger. 2005. 'Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes', *J Immunol*, 174: 155-63.
- Dutta, A., B. Zhao, and P. E. Love. 2021. 'New insights into TCR β -selection', *Trends Immunol*, 42: 735-50.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. 'Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy', *J Exp Med*, 200: 277-85.
- Erpapazoglou, Z., O. Walker, and R. Haguenaer-Tsapis. 2014. 'Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking', *Cells*, 3: 1027-88.
- Etzell, J., C. M. Lu, L. W. Browne, and E. Wang. 2005. 'Erythrophagocytosis by dysplastic neutrophils in chronic myelomonocytic leukemia and subsequent transformation to acute myeloid leukemia', *Am J Hematol*, 79: 340-2.
- Evangelatos, G., G. Bamias, G. D. Kitis, G. Kollias, and P. P. Sfikakis. 2022. 'The second decade of anti-TNF- α therapy in clinical practice: new lessons and future directions in the COVID-19 era', *Rheumatol Int*, 42: 1493-511.
- Evans, R. S., K. Takahashi, R. T. Duane, R. Payne, and C. Liu. 1951. 'Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia; evidence for a common etiology', *AMA Arch Intern Med*, 87: 48-65.
- Fadlallah, J., M. Michel, E. Crickx, N. Limal, N. Costedoat, M. Malphettes, C. Fieschi, L. Galicier, E. Oksenhendler, B. Godeau, S. Audia, and M. Mahévas. 2019. 'Bortezomib and dexamethasone, an original approach for treating multi-refractory warm autoimmune haemolytic anaemia', *Br J Haematol*, 187: 124-28.
- Fagiolo, E., and C. Toriani-Terenzi. 2002. 'Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA)', *Autoimmunity*, 35: 39-44.
- Fagiolo, E., F. Vigevani, and U. Pozzetto. 1994. 'High cytokine serum levels in patients with autoimmune hemolytic anemia (AIHA)', *Immunol Invest*, 23: 449-56.
- Fang, D., and J. Zhu. 2017. 'Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets', *J Exp Med*, 214: 1861-76.
- Fattizzo, B., S. Cantoni, J. A. Giannotta, L. Bandiera, R. Zavaglia, M. Bortolotti, and W. Barcellini. 2022. 'Efficacy and safety of cyclosporine A treatment in autoimmune cytopenias: the experience of two Italian reference centers', *Ther Adv Hematol*, 13: 20406207221097780.
- Fattizzo, B., M. Michel, A. Zaninoni, J. Giannotta, S. Guillet, H. Frederiksen, J. M. I. Vos, F. R. Mauro, B. Jilma, A. Patriarca, F. Zaja, A. Hill, S. Berentsen, and W. Barcellini. 2021. 'Efficacy of

- recombinant erythropoietin in autoimmune hemolytic anemia: a multicenter international study', *Haematologica*, 106: 622-25.
- Fattizzo, B., A. Zaninoni, U. Gianelli, A. Zanella, A. Cortelezzi, A. G. Kulasekararaj, and W. Barcellini. 2018. 'Prognostic impact of bone marrow fibrosis and dyserythropoiesis in autoimmune hemolytic anemia', *Am J Hematol*, 93: E88-e91.
- Faustman, D., and M. Davis. 2010. 'TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 482-93.
- Faustman, D. L., and M. Davis. 2013. 'TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine', *Front Immunol*, 4: 478.
- Fehling, H. J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, and H. von Boehmer. 1995. 'Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells', *Nature*, 375: 795-8.
- Feng, Y., J. van der Veecken, M. Shugay, E. V. Putintseva, H. U. Osmanbeyoglu, S. Dikiy, B. E. Hoyos, B. Moltedo, S. Hemmers, P. Treuting, C. S. Leslie, D. M. Chudakov, and A. Y. Rudensky. 2015. 'A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance', *Nature*, 528: 132-36.
- Ferraro, A., A. M. D'Alise, T. Raj, N. Asinovski, R. Phillips, A. Ergun, J. M. Replogle, A. Bernier, L. Laffel, B. E. Stranger, P. L. De Jager, D. Mathis, and C. Benoist. 2014. 'Interindividual variation in human T regulatory cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E1111-20.
- Ferrer, G., A. Navarro, K. Hodgson, M. Aymerich, A. Pereira, T. Baumann, M. Monzo, C. Moreno, and E. Montserrat. 2013. 'MicroRNA expression in chronic lymphocytic leukemia developing autoimmune hemolytic anemia', *Leuk Lymphoma*, 54: 2016-22.
- Fibach, E. 2021. 'The Redox Balance and Membrane Shedding in RBC Production, Maturation, and Senescence', *Front Physiol*, 12: 604738.
- Fleskens, V., C. M. Minutti, X. Wu, P. Wei, Cegm Pals, J. McCrae, S. Hemmers, V. Groenewold, H. J. Vos, A. Rudensky, F. Pan, H. Li, D. M. Zaiss, and P. J. Coffey. 2019. 'Nemo-like Kinase Drives Foxp3 Stability and Is Critical for Maintenance of Immune Tolerance by Regulatory T Cells', *Cell Rep*, 26: 3600-12.e6.
- Flores-Borja, F., E. C. Jury, C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2008. 'Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 19396-401.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. 'Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells', *Nat Immunol*, 4: 330-6.
- Fortes, G. B., L. S. Alves, R. de Oliveira, F. F. Dutra, D. Rodrigues, P. L. Fernandez, T. Souto-Padron, M. J. De Rosa, M. Kelliher, D. Golenbock, F. K. Chan, and M. T. Bozza. 2012. 'Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production', *Blood*, 119: 2368-75.
- Foster, C. B., S. Zhu, H. C. Erichsen, T. Lehrnbecher, E. S. Hart, E. Choi, S. Stein, M. W. Smith, S. M. Steinberg, P. Imbach, T. Kühne, and S. J. Chanock. 2001. 'Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcγ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study', *Br J Haematol*, 113: 596-9.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. 'Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation', *J Exp Med*, 192: 1027-34.
- Fritzsching, B., N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P. H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2005. '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*, 175: 32-6.
- Fu, S., N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2004. 'TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors', *Am J Transplant*, 4: 1614-27.

- Gaddis, D. E., L. E. Padgett, R. Wu, C. McSkimming, V. Romines, A. M. Taylor, C. A. McNamara, M. Kronenberg, S. Crotty, M. J. Thomas, M. G. Sorci-Thomas, and C. C. Hedrick. 2018. 'Apolipoprotein AI prevents regulatory to follicular helper T cell switching during atherosclerosis', *Nat Commun*, 9: 1095.
- Gallagher, M. T., D. R. Branch, A. Mison, and L. D. Petz. 1983. 'Evaluation of reticuloendothelial function in autoimmune hemolytic anemia using an in vitro assay of monocyte-macrophage interaction with erythrocytes', *Exp Hematol*, 11: 82-9.
- Galván-Peña, S., J. Leon, K. Chowdhary, D. A. Michelson, B. Vijaykumar, L. Yang, A. M. Magnuson, F. Chen, Z. Manickas-Hill, A. Piechocka-Trocha, D. P. Worrall, K. E. Hall, M. Ghebremichael, B. D. Walker, J. Z. Li, X. G. Yu, D. Mathis, and C. Benoist. 2021. 'Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Gao, Y., H. Jin, D. Nan, W. Yu, J. Zhang, Y. Yang, R. Hou, R. Qin, H. Hao, Y. Sun, and W. Tian. 2019. 'The Role of T Follicular Helper Cells and T Follicular Regulatory Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia', *Sci Rep*, 9: 19767.
- Gao, Y., J. Tang, W. Chen, Q. Li, J. Nie, F. Lin, Q. Wu, Z. Chen, Z. Gao, H. Fan, A. Tsun, J. Shen, G. Chen, Z. Liu, Z. Lou, N. J. Olsen, S. G. Zheng, and B. Li. 2015. 'Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E3246-54.
- García-García, I., J. Cid, A. Palomino, E. Giné, A. Alvarez-Larrán, M. T. Cibeira, and M. Lozano. 2020. 'Role of therapeutic plasma exchanges in refractory severe warm autoimmune hemolytic anemia: Presentation of two case reports', *Transfusion*, 60: 2753-57.
- Garratty, G. 2012. 'Immune hemolytic anemia caused by drugs', *Expert Opin Drug Saf*, 11: 635-42.
- Gauchy, A. C., M. Hentzien, A. Wynckel, V. de Marcellus, C. Rodier, A. Delmer, and A. Quinquenel. 2020. 'Efficacy of eculizumab in refractory life-threatening warm autoimmune hemolytic anemia associated with chronic myelomonocytic leukemia', *Clin Case Rep*, 8: 2641-44.
- Gautron, A. S., M. Dominguez-Villar, M. de Marcken, and D. A. Hafler. 2014. 'Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells', *Eur J Immunol*, 44: 2703-11.
- Geng, J., S. Yu, H. Zhao, X. Sun, X. Li, P. Wang, X. Xiong, L. Hong, C. Xie, J. Gao, Y. Shi, J. Peng, R. L. Johnson, N. Xiao, L. Lu, J. Han, D. Zhou, and L. Chen. 2017. 'The transcriptional coactivator TAZ regulates reciprocal differentiation of T(H)17 cells and T(reg) cells', *Nat Immunol*, 18: 800-12.
- Georgiev, P., L. M. Charbonnier, and T. A. Chatila. 2019. 'Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3', *J Clin Immunol*, 39: 623-40.
- Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. 'Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes', *Immunology*, 18: 723-37.
- Gilsanz, F., J. De La Serna, L. Moltó, and M. Alvarez-Mon. 1996. 'Hemolytic anemia in chronic large granular lymphocytic leukemia of natural killer cells: cytotoxicity of natural killer cells against autologous red cells is associated with hemolysis', *Transfusion*, 36: 463-6.
- Gleicher, N., and D. H. Barad. 2007. 'Gender as risk factor for autoimmune diseases', *J Autoimmun*, 28: 1-6.
- Glinka, Y., and G. J. Prud'homme. 2008. 'Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity', *J Leukoc Biol*, 84: 302-10.
- Gobert, D., J. B. Bussel, C. Cunningham-Rundles, L. Galicier, A. Dechartres, A. Berezne, B. Bonnotte, T. DeRevel, C. Auzary, R. Jaussaud, C. Larroche, A. LeQuellec, M. Ruivard, P. Seve, A. Smail, J. F. Viallard, B. Godeau, O. Hermine, and M. Michel. 2011. 'Efficacy and safety of rituximab in common variable immunodeficiency-associated immune cytopenias: a retrospective multicentre study on 33 patients', *Br J Haematol*, 155: 498-508.
- Godfrey, V. L., B. T. Rouse, and J. E. Wilkinson. 1994. 'Transplantation of T cell-mediated, lymphoreticular disease from the scurfy (sf) mouse', *Am J Pathol*, 145: 281-6.
- Goltz, D. 1982. '[The Donath-Landsteiner hemolysin. The origin of a myth in 20th century medicine]', *Clio Med*, 16: 193-217.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. 'Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism', *J Immunol*, 174: 1783-6.

- Gottschalk, R. A., E. Corse, and J. P. Allison. 2012. 'Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells', *J Immunol*, 188: 976-80.
- Grant, C. R., R. Liberal, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, and M. S. Longhi. 2015. 'Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions', *Autoimmun Rev*, 14: 105-16.
- Gravano, D. M., and K. K. Hoyer. 2013. 'Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells', *J Autoimmun*, 45: 68-79.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. 'The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 570-5.
- Griseri, T., M. Asquith, C. Thompson, and F. Powrie. 2010. 'OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis', *J Exp Med*, 207: 699-709.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. 'Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death', *Immunity*, 21: 589-601.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. 'A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis', *Nature*, 389: 737-42.
- Grover, P., P. N. Goel, and M. I. Greene. 2021. 'Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function', *Front Immunol*, 12: 750542.
- Guereschi, M. G., L. P. Araujo, J. T. Maricato, M. C. Takenaka, V. M. Nascimento, B. C. Vivanco, V. O. Reis, A. C. Keller, P. C. Brum, and A. S. Basso. 2013. 'Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner', *Eur J Immunol*, 43: 1001-12.
- Guo, Z. X., Z. P. Chen, C. L. Zheng, H. R. Jia, J. Ge, D. S. Gu, W. T. Du, X. Y. Wang, H. F. Zhao, and R. C. Yang. 2009. 'The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura', *Eur J Haematol*, 82: 488-9.
- Hadley, A. G. 2002. 'Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn', *Transpl Immunol*, 10: 191-8.
- Hall, A. M., F. J. Ward, M. A. Vickers, L. M. Stott, S. J. Urbaniak, and R. N. Barker. 2002. 'Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen', *Blood*, 100: 4529-36.
- Hall, A. M., O. M. Zamzami, N. Whibley, D. P. Hampsey, A. M. Haggart, M. A. Vickers, and R. N. Barker. 2012. 'Production of the effector cytokine interleukin-17, rather than interferon- γ , is more strongly associated with autoimmune hemolytic anemia', *Haematologica*, 97: 1494-500.
- Hamano, R., J. Huang, T. Yoshimura, J. J. Oppenheim, and X. Chen. 2011. 'TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40', *Eur J Immunol*, 41: 2010-20.
- Han, J. M., S. J. Patterson, and M. K. Levings. 2012. 'The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4(+) T Cell Differentiation and Function', *Front Immunol*, 3: 245.
- Hansen, D. L., S. Möller, K. Andersen, D. Gaist, and H. Frederiksen. 2020. 'Increasing Incidence and Prevalence of Acquired Hemolytic Anemias in Denmark, 1980-2016', *Clin Epidemiol*, 12: 497-508.
- Harari, A., V. Dutoit, C. Cellerai, P. A. Bart, R. A. Du Pasquier, and G. Pantaleo. 2006. 'Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections', *Immunol Rev*, 211: 236-54.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, and J. P. Allison. 1992. 'CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones', *Nature*, 356: 607-9.
- Haribhai, D., J. B. Williams, S. Jia, D. Nickerson, E. G. Schmitt, B. Edwards, J. Ziegelbauer, M. Yassai, S. H. Li, L. M. Relland, P. M. Wise, A. Chen, Y. Q. Zheng, P. M. Simpson, J. Gorski, N. H. Salzman, M. J. Hessner, T. A. Chatila, and C. B. Williams. 2011. 'A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity', *Immunity*, 35: 109-22.

- Harms Pritchard, G., and M. Pepper. 2018. 'Memory B cell heterogeneity: Remembrance of things past', *J Leukoc Biol*, 103: 269-74.
- Hartigan-O'Connor, D. J., C. Poon, E. Sinclair, and J. M. McCune. 2007. 'Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells', *J Immunol Methods*, 319: 41-52.
- Hartley, S. B., J. Crosbie, R. Brink, A. B. Kantor, A. Basten, and C. C. Goodnow. 1991. 'Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens', *Nature*, 353: 765-9.
- Hasegawa, H., and T. Matsumoto. 2018. 'Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo', *Front Immunol*, 9: 350.
- He, J., X. Zhang, Y. Wei, X. Sun, Y. Chen, J. Deng, Y. Jin, Y. Gan, X. Hu, R. Jia, C. Xu, Z. Hou, Y. A. Leong, L. Zhu, J. Feng, Y. An, Y. Jia, C. Li, X. Liu, H. Ye, L. Ren, R. Li, H. Yao, Y. Li, S. Chen, X. Zhang, Y. Su, J. Guo, N. Shen, E. F. Morand, D. Yu, and Z. Li. 2016. 'Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus', *Nat Med*, 22: 991-3.
- Helyer, B. J., and J. B. Howie. 1963. 'Spontaneous auto-immune disease in NZB/BL mice', *Br J Haematol*, 9: 119-31.
- Hepworth, M. R., L. A. Monticelli, T. C. Fung, C. G. Ziegler, S. Grunberg, R. Sinha, A. R. Mantegazza, H. L. Ma, A. Crawford, J. M. Angelosanto, E. J. Wherry, P. A. Koni, F. D. Bushman, C. O. Elson, G. Eberl, D. Artis, and G. F. Sonnenberg. 2013. 'Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria', *Nature*, 498: 113-7.
- Herold, M. J., K. G. McPherson, and H. M. Reichardt. 2006. 'Glucocorticoids in T cell apoptosis and function', *Cell Mol Life Sci*, 63: 60-72.
- Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. 'Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature', *Immunity*, 27: 786-800.
- Hinterberger, M., M. Aichinger, O. Prazeres da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann, and L. Klein. 2010. 'Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance', *Nat Immunol*, 11: 512-9.
- Hippen, K. L., S. C. Merkel, D. K. Schirm, C. M. Sieben, D. Sumstad, D. M. Kadidlo, D. H. McKenna, J. S. Bromberg, B. L. Levine, J. L. Riley, C. H. June, P. Scheinberg, D. C. Douek, J. S. Miller, J. E. Wagner, and B. R. Blazar. 2011. 'Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity', *Sci Transl Med*, 3: 83ra41.
- Hirano, T. 2021. 'IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer', *Int Immunol*, 33: 127-48.
- Hohmann, H. P., R. Remy, M. Brockhaus, and A. P. van Loon. 1989. 'Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha)', *J Biol Chem*, 264: 14927-34.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', *Science*, 299: 1057-61.
- Howard, J., A. V. Hoffbrand, H. G. Prentice, and A. Mehta. 2002. 'Mycophenolate mofetil for the treatment of refractory auto-immune haemolytic anaemia and auto-immune thrombocytopenia purpura', *Br J Haematol*, 117: 712-5.
- Howie, H. L., and K. E. Hudson. 2018. 'Murine models of autoimmune hemolytic anemia', *Curr Opin Hematol*, 25: 473-81.
- Hsieh, S. M., S. C. Pan, S. Y. Chen, P. F. Huang, and S. C. Chang. 2004. 'Age distribution for T cell reactivity to vaccinia virus in a healthy population', *Clin Infect Dis*, 38: 86-9.
- Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2004. 'Role of LAG-3 in regulatory T cells', *Immunity*, 21: 503-13.
- Hudson, K. E., J. E. Hendrickson, C. M. Cadwell, N. N. Iwakoshi, and J. C. Zimring. 2012. 'Partial tolerance of autoreactive B and T cells to erythrocyte-specific self-antigens in mice', *Haematologica*, 97: 1836-44.

- Huter, E. N., G. A. Punkosdy, D. D. Glass, L. I. Cheng, J. M. Ward, and E. M. Shevach. 2008. 'TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice', *Eur J Immunol*, 38: 1814-21.
- Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg, and L. H. Glimcher. 2005. 'T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3', *Science*, 307: 430-3.
- Hwang, S. M., G. Sharma, R. Verma, S. Byun, D. Rudra, and S. H. Im. 2018. 'Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells', *Nat Commun*, 9: 4736.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. 'Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance', *J Immunol*, 162: 5317-26.
- Iuchi, Y., N. Kibe, S. Tsunoda, S. Suzuki, T. Mikami, F. Okada, K. Uchida, and J. Fujii. 2010. 'Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in NZB mice', *Free Radic Biol Med*, 48: 935-44.
- Iuchi, Y., F. Okada, K. Onuma, T. Onoda, H. Asao, M. Kobayashi, and J. Fujii. 2007. 'Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production', *Biochem J*, 402: 219-27.
- Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. 'The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells', *Cell*, 126: 1121-33.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2015. 'Control of adaptive immunity by the innate immune system', *Nat Immunol*, 16: 343-53.
- Jacquemin, C., J. F. Augusto, M. Scherlinger, N. Gensous, E. Forcade, I. Douchet, E. Levionnois, C. Richez, E. Lazaro, P. Duffau, M. E. Truchetet, J. Seneschal, L. Couzi, J. L. Pellegrin, J. F. Viallard, T. Schaefferbeke, V. Pascual, C. Contin-Bordes, and P. Blanco. 2018. 'OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE', *JCI Insight*, 3.
- Jäger, U., W. Barcellini, C. M. Broome, M. A. Gertz, A. Hill, Q. A. Hill, B. Jilma, D. J. Kuter, M. Michel, M. Montillo, A. Röth, S. S. Zeerleder, and S. Berentsen. 2020. 'Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting', *Blood Rev*, 41: 100648.
- Janson, P. C., M. E. Winerdal, P. Marits, M. Thörn, R. Ohlsson, and O. Winqvist. 2008. 'FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans', *PLoS One*, 3: e1612.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. 'Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood', *J Exp Med*, 193: 1285-94.
- Jordan, M. B., N. van Rooijen, S. Izui, J. Kappler, and P. Marrack. 2003. 'Liposomal clodronate as a novel agent for treating autoimmune hemolytic anemia in a mouse model', *Blood*, 101: 594-601.
- Josefowicz, S. Z., R. E. Niec, H. Y. Kim, P. Treuting, T. Chinen, Y. Zheng, D. T. Umetsu, and A. Y. Rudensky. 2012. 'Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation', *Nature*, 482: 395-9.
- Junger, W. G. 2011. 'Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling', *Nat Rev Immunol*, 11: 201-12.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. 'Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development', *Nat Rev Immunol*, 2: 251-62.
- Kalfa, T. A. 2016. 'Warm antibody autoimmune hemolytic anemia', *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016: 690-97.
- Kapur, R., H. K. Einarsdottir, and G. Vidarsson. 2014. 'IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly"', *Immunol Lett*, 160: 139-44.
- Kaskow, B. J., and C. Baecher-Allan. 2018. 'Effector T Cells in Multiple Sclerosis', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. 'An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells', *Nat Immunol*, 4: 337-42.

- Kikuchi, S., H. Amano, E. Amano, L. Fossati-Jimack, M. L. Santiago-Raber, T. Moll, A. Ida, B. L. Kotzin, and S. Izui. 2005. 'Identification of 2 major loci linked to autoimmune hemolytic anemia in NZB mice', *Blood*, 106: 1323-9.
- Kim, H. P., and W. J. Leonard. 2007. 'CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation', *J Exp Med*, 204: 1543-51.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, and C. V. Dang. 2006. 'HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia', *Cell Metab*, 3: 177-85.
- Kim, Y. C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A. M. Thornton, D. Q. Tran, and E. M. Shevach. 2012. 'Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion', *Blood*, 119: 2810-8.
- Kimball, A. S., A. T. Obi, J. A. Diaz, and P. K. Henke. 2016. 'The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis', *Front Immunol*, 7: 236.
- Kimmig, S., G. K. Przybylski, C. A. Schmidt, K. Laurisch, B. Möwes, A. Radbruch, and A. Thiel. 2002. 'Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood', *J Exp Med*, 195: 789-94.
- Kitagawa, Y., N. Ohkura, Y. Kidani, A. Vandenbon, K. Hirota, R. Kawakami, K. Yasuda, D. Motooka, S. Nakamura, M. Kondo, I. Taniuchi, T. Kohwi-Shigematsu, and S. Sakaguchi. 2017. 'Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment', *Nat Immunol*, 18: 173-83.
- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. 'Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction', *Nat Rev Immunol*, 9: 833-44.
- Klein, L., E. A. Robey, and C. S. Hsieh. 2019. 'Central CD4(+) T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation', *Nat Rev Immunol*, 19: 7-18.
- Knight, J. G., and D. D. Adams. 1981. 'Genes determining autoimmune disease in New Zealand mice', *J Clin Lab Immunol*, 5: 165-70.
- Koch, M. A., K. R. Thomas, N. R. Perdue, K. S. Smigielski, S. Srivastava, and D. J. Campbell. 2012. 'T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor $\beta 2$ ', *Immunity*, 37: 501-10.
- Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. 'The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation', *Nat Immunol*, 10: 595-602.
- Koenecke, C., C. W. Lee, K. Thamm, L. Föhse, M. Schafferus, H. W. Mittrücker, S. Floess, J. Huehn, A. Ganser, R. Förster, and I. Prinz. 2012. 'IFN- γ production by allogeneic Foxp3+ regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease', *J Immunol*, 189: 2890-6.
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. 'Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells', *Blood*, 112: 2340-52.
- Kojima, A., and R. T. Prehn. 1981. 'Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice', *Immunogenetics*, 14: 15-27.
- Kokori, S. I., J. P. Ioannidis, M. Voulgarelis, A. G. Tzioufas, and H. M. Moutsopoulos. 2000. 'Autoimmune hemolytic anemia in patients with systemic lupus erythematosus', *Am J Med*, 108: 198-204.
- Komatsu, N., M. E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. 'Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 1903-8.
- Komatsu, N., K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama, S. Tanaka, J. A. Bluestone, and H. Takayanagi. 2014. 'Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis', *Nat Med*, 20: 62-8.
- Kotzé, H. F., A. D. Heyns, P. Wessels, H. Pieters, P. N. Badenhorst, and M. G. Lötter. 1986. 'Evidence that ¹¹¹In-labelled platelets pool in the spleen, but not in the liver of normal humans and baboons', *Scand J Haematol*, 37: 259-64.

- Krummel, M. F., F. Bartumeus, and A. Gérard. 2016. 'T cell migration, search strategies and mechanisms', *Nat Rev Immunol*, 16: 193-201.
- Kuchroo, V. K., J. M. Greer, D. Kaul, G. Ishioka, A. Franco, A. Sette, R. A. Sobel, and M. B. Lees. 1994. 'A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire', *J Immunol*, 153: 3326-36.
- Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Müller. 1993. 'Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis', *Cell*, 75: 263-74.
- Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise. 2015. 'Memory B cells', *Nat Rev Immunol*, 15: 149-59.
- Kusakari, S., H. Ohnishi, F. J. Jin, Y. Kaneko, T. Murata, Y. Murata, H. Okazawa, and T. Matozaki. 2008. 'Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system', *J Cell Sci*, 121: 1213-23.
- Kuter, D. J., K. A. Rogers, M. A. Boxer, M. Choi, R. Agajanian, D. M. Arnold, C. M. Broome, J. J. Field, I. Murakhovskaya, R. Numerof, and S. Tong. 2022. 'Fostamatinib for the treatment of warm antibody autoimmune hemolytic anemia: Phase 2, multicenter, open-label study', *Am J Hematol*, 97: 691-99.
- Lamontain, V., T. Schmid, D. Weber-Steffens, D. Zeller, Z. Jenei-Lanzl, H. Wajant, R. H. Straub, and D. N. Männel. 2019. 'Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice', *Cell Mol Immunol*, 16: 65-74.
- Laurence, A., S. Amarnath, J. Mariotti, Y. C. Kim, J. Foley, M. Eckhaus, J. J. O'Shea, and D. H. Fowler. 2012. 'STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease', *Immunity*, 37: 209-22.
- Leddy, J. P., J. L. Falany, G. E. Kissel, S. T. Passador, and S. I. Rosenfeld. 1993. 'Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies', *J Clin Invest*, 91: 1672-80.
- Lee, J. H., S. G. Kang, and C. H. Kim. 2007. 'FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues', *J Immunol*, 178: 301-11.
- Levine, A. G., A. Mendoza, S. Hemmers, B. Moltedo, R. E. Niec, M. Schizas, B. E. Hoyos, E. V. Putintseva, A. Chaudhry, S. Dikiy, S. Fujisawa, D. M. Chudakov, P. M. Treuting, and A. Y. Rudensky. 2017. 'Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet', *Nature*, 546: 421-25.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, and M. G. Roncarolo. 2001. 'Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function', *J Exp Med*, 193: 1295-302.
- Lewandowski, K., W. Homenda, A. Mital, A. Complak, and A. Hellmann. 2011. 'Erythrophagocytosis by neutrophils--a rare morphological phenomenon resulting in acquired haemolytic anaemia?', *Int J Lab Hematol*, 33: 447-50.
- Li, B., L. Huang, P. Lv, X. Li, G. Liu, Y. Chen, Z. Wang, X. Qian, Y. Shen, Y. Li, and W. Fang. 2020. 'The role of Th17 cells in psoriasis', *Immunol Res*, 68: 296-309.
- Li, B., A. Samanta, X. Song, K. T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J. L. Riley, W. W. Hancock, Y. Shen, S. J. Saouaf, and M. I. Greene. 2007. 'FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 4571-6.
- Li, C., P. J. Ebert, and Q. J. Li. 2013. 'T cell receptor (TCR) and transforming growth factor β (TGF- β) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation', *J Biol Chem*, 288: 19127-39.
- Li, J., X. Du, H. Shi, K. Deng, H. Chi, and W. Tao. 2015. 'Mammalian Sterile 20-like Kinase 1 (Mst1) Enhances the Stability of Forkhead Box P3 (Foxp3) and the Function of Regulatory T Cells by Modulating Foxp3 Acetylation', *J Biol Chem*, 290: 30762-70.

- Li, Z., F. Lin, C. Zhuo, G. Deng, Z. Chen, S. Yin, Z. Gao, M. Piccioni, A. Tsun, S. Cai, S. G. Zheng, Y. Zhang, and B. Li. 2014. 'PIM1 kinase phosphorylates the human transcription factor FOXP3 at serine 422 to negatively regulate its activity under inflammation', *J Biol Chem*, 289: 26872-81.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. 'Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II', *J Immunol*, 180: 5916-26.
- Littman, D. R., and A. Y. Rudensky. 2010. 'Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation', *Cell*, 140: 845-58.
- Liu, J. Q., Z. Liu, X. Zhang, Y. Shi, F. Talebian, J. W. Carl, Jr., C. Yu, F. D. Shi, C. C. Whitacre, J. Trgovcich, and X. F. Bai. 2012. 'Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 188: 3099-106.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, and J. A. Bluestone. 2006. 'CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells', *J Exp Med*, 203: 1701-11.
- Lobreglio, G., and A. Valacca. 2001. 'Images in clinical medicine. Erythrophagocytosis', *N Engl J Med*, 344: 897.
- London, C. A., M. P. Lodge, and A. K. Abbas. 2000. 'Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells', *J Immunol*, 164: 265-72.
- Lord, J., J. Chen, R. C. Thirlby, A. M. Sherwood, and C. S. Carlson. 2015. 'T-cell receptor sequencing reveals the clonal diversity and overlap of colonic effector and FOXP3+ T cells in ulcerative colitis', *Inflamm Bowel Dis*, 21: 19-30.
- Lu, C., and W. Chen. 2021. 'Influenza virus infection selectively triggers the accumulation and persistence of more potent Helios-expressing Foxp3(+) regulatory T cells in the lungs', *Immunol Cell Biol*, 99: 1011-25.
- Lu, L., J. Barbi, and F. Pan. 2017. 'The regulation of immune tolerance by FOXP3', *Nat Rev Immunol*, 17: 703-17.
- Lu, L. F., T. H. Thai, D. P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G. B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A. Y. Rudensky. 2009. 'Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein', *Immunity*, 30: 80-91.
- Lubrano di Ricco, M., E. Ronin, D. Collares, J. Divoux, S. Grégoire, H. Wajant, T. Gomes, Y. Grinberg-Bleyer, V. Baud, G. Marodon, and B. L. Salomon. 2020. 'Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- κ B', *Eur J Immunol*, 50: 972-85.
- Luo, C. T., and M. O. Li. 2013. 'Transcriptional control of regulatory T cell development and function', *Trends Immunol*, 34: 531-9.
- Lussana, F., S. Caberlon, S. Altomare, M. Lanfredini, and M. Cattaneo. 2007. 'A rare case of autoimmune haemolytic anaemia due to warm IgA autoantibodies with reticulocytopenia', *Intern Emerg Med*, 2: 153-6.
- Luu, K., M. V. Patwardhan, Q. Zeng, S. L. Wickström, A. Lundqvist, and H. Schwarz. 2021. 'Regulatory T Cells Inhibit T Cell Activity by Downregulating CD137 Ligand via CD137 Trogocytosis', *Cells*, 10.
- Luu, M., E. Jenike, N. Vachharajani, and A. Visekruna. 2017. 'Transcription factor c-Rel is indispensable for generation of thymic but not of peripheral Foxp3(+) regulatory T cells', *Oncotarget*, 8: 52678-89.
- Ly, K. H., A. Régent, M. C. Tamby, and L. Mouthon. 2010. 'Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition?', *Autoimmun Rev*, 9: 635-45.
- Ma, D., X. Zhu, P. Zhao, C. Zhao, X. Li, Y. Zhu, L. Li, J. Sun, J. Peng, C. Ji, and M. Hou. 2008. 'Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura', *Ann Hematol*, 87: 899-904.

- Ma, K., and S. Caplan. 2016. 'Refractory IgG Warm Autoimmune Hemolytic Anemia Treated with Eculizumab: A Novel Application of Anticomplement Therapy', *Case Rep Hematol*, 2016: 9181698.
- Mahévas, M., M. Michel, B. Vingert, J. Moroch, D. Boutboul, S. Audia, N. Cagnard, J. Ripa, C. Menard, K. Tarte, J. Mégret, S. Le Gallou, P. Patin, L. Thai, L. Galicier, B. Bonnotte, B. Godeau, F. Noizat-Pirenne, J. C. Weill, and C. A. Reynaud. 2015. 'Emergence of long-lived autoreactive plasma cells in the spleen of primary warm auto-immune hemolytic anemia patients treated with rituximab', *J Autoimmun*, 62: 22-30.
- Mahévas, M., P. Patin, F. Huetz, M. Descatoire, N. Cagnard, C. Bole-Feysot, S. Le Gallou, M. Khellaf, O. Fain, D. Boutboul, L. Galicier, M. Ebbo, O. Lambotte, M. Hamidou, P. Bierling, B. Godeau, M. Michel, J. C. Weill, and C. A. Reynaud. 2013. 'B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells', *J Clin Invest*, 123: 432-42.
- Małecka, A., G. Trøen, A. Tierens, I. Østlie, J. Małeckki, U. Randen, J. Wang, S. Berentsen, G. E. Tjønnfjord, and J. M. A. Delabie. 2018. 'Frequent somatic mutations of KMT2D (MLL2) and CARD11 genes in primary cold agglutinin disease', *Br J Haematol*, 183: 838-42.
- Malek, T. R. 2008. 'The biology of interleukin-2', *Annu Rev Immunol*, 26: 453-79.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. 'TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells', *J Exp Med*, 201: 1061-7.
- Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. 'Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1', *Nature*, 427: 355-60.
- Maung, S. W., M. Leahy, H. M. O'Leary, I. Khan, M. R. Cahill, O. Gilligan, P. Murphy, S. McPherson, F. Jackson, M. Ryan, B. Hennessy, J. McHugh, M. Goodyer, L. Bacon, P. O'Gorman, A. Nee, M. O'Dwyer, H. Enright, J. Saunders, and D. O'Keefe. 2013. 'A multi-centre retrospective study of rituximab use in the treatment of relapsed or resistant warm autoimmune haemolytic anaemia', *Br J Haematol*, 163: 118-22.
- McBlane, J. F., D. C. van Gent, D. A. Ramsden, C. Romeo, C. A. Cuomo, M. Gellert, and M. A. Oettinger. 1995. 'Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps', *Cell*, 83: 387-95.
- McClymont, S. A., A. L. Putnam, M. R. Lee, J. H. Esensten, W. Liu, M. A. Hulme, U. Hoffmüller, U. Baron, S. Olek, J. A. Bluestone, and T. M. Brusko. 2011. 'Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes', *J Immunol*, 186: 3918-26.
- McMurchy, A. N., J. Gillies, M. C. Gizzi, M. Riba, J. M. Garcia-Manteiga, D. Cittaro, D. Lazarevic, S. Di Nunzio, I. S. Piras, A. Bulfone, M. G. Roncarolo, E. Stupka, R. Bacchetta, and M. K. Levings. 2013. 'A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells', *Blood*, 121: 1265-75.
- Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. 'Structure and function of the spleen', *Nat Rev Immunol*, 5: 606-16.
- Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 1997. 'Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition', *Cell*, 91: 295-8.
- Meinderts, S. M., P. A. Oldenburg, B. M. Beuger, T. R. L. Kleij, J. Johansson, T. W. Kuijpers, T. Matozaki, E. J. Huisman, M. de Haas, T. K. van den Berg, and R. van Bruggen. 2017. 'Human and murine splenic neutrophils are potent phagocytes of IgG-opsonized red blood cells', *Blood Adv*, 1: 875-86.
- Melief, C. J. 2003. 'Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?', *Eur J Immunol*, 33: 2645-54.
- Mesin, L., J. Ersching, and G. D. Victora. 2016. 'Germinal Center B Cell Dynamics', *Immunity*, 45: 471-82.
- Meulenbroek, E. M., D. Wouters, and S. S. Zeerleder. 2015. 'Lyse or not to lyse: Clinical significance of red blood cell autoantibodies', *Blood Rev*, 29: 369-76.
- Meunier, B., M. Loosveld, A. Grados, A. Rico, M. Ebbo, and N. Schleinitz. 2017. 'Bone marrow erythrophagocytosis and reticulocytopenia in autoimmune haemolytic anaemia', *Br J Haematol*, 177: 346.

- Miano, M. 2016. 'How I manage Evans Syndrome and AIHA cases in children', *Br J Haematol*, 172: 524-34.
- Miao, M., X. Xiao, J. Tian, Y. Zhufeng, R. Feng, R. Zhang, J. Chen, X. Zhang, B. Huang, Y. Jin, X. Sun, J. He, and Z. Li. 2021. 'Therapeutic potential of targeting Tfr/Tfh cell balance by low-dose-IL-2 in active SLE: a post hoc analysis from a double-blind RCT study', *Arthritis Res Ther*, 23: 167.
- Michalak, S. S., A. Olewicz-Gawlik, J. Rupa-Matysek, E. Wolny-Rokicka, E. Nowakowska, and L. Gil. 2020. 'Autoimmune hemolytic anemia: current knowledge and perspectives', *Immun Ageing*, 17: 38.
- Michalek, R. D., V. A. Gerriets, S. R. Jacobs, A. N. Macintyre, N. J. MacIver, E. F. Mason, S. A. Sullivan, A. G. Nichols, and J. C. Rathmell. 2011. 'Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets', *J Immunol*, 186: 3299-303.
- Michaux, L., J. Dierlamm, I. Wlodarska, M. Stul, A. Bosly, A. Delannoy, A. Louwagie, C. Mecucci, J. J. Cassiman, H. van den Berghe, and et al. 1995. 'Trisomy 3 is a consistent chromosome change in malignant lymphoproliferative disorders preceded by cold agglutinin disease', *Br J Haematol*, 91: 421-4.
- Michel, M., L. Terriou, F. Roudot-Thoraval, M. Hamidou, M. Ebbo, G. Le Guenno, L. Galicier, S. Audia, B. Royer, A. S. Morin, J. Marie Michot, A. Jaccard, L. Frenzel, M. Khellaf, and B. Godeau. 2017. 'A randomized and double-blind controlled trial evaluating the safety and efficacy of rituximab for warm auto-immune hemolytic anemia in adults (the RAIHA study)', *Am J Hematol*, 92: 23-27.
- MICHEL, Marc. 2017. "PNDS AHAI de l'adulte et de l'enfant." In, edited by B. Godeau.
- Miescher, S., M. O. Spycher, H. Amstutz, M. De Haas, M. Kleijer, U. J. Kalus, H. Radtke, A. Hubsch, I. Andresen, R. M. Martin, and J. Bichler. 2004. 'A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcgammaRIIA and FcgammaRIIIA genes', *Blood*, 103: 4028-35.
- Miller, J., C. Baker, K. Cook, B. Graf, M. Sanchez-Lockhart, K. Sharp, X. Wang, B. Yang, and T. Yoshida. 2009. 'Two pathways of costimulation through CD28', *Immunol Res*, 45: 159-72.
- Miller, J. F., and W. R. Heath. 1993. 'Self-ignorance in the peripheral T-cell pool', *Immunol Rev*, 133: 131-50.
- Miossec, P. 2007. 'Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified', *Arthritis Rheum*, 56: 2111-5.
- Miragaia, R. J., T. Gomes, A. Chomka, L. Jardine, A. Riedel, A. N. Hegazy, N. Whibley, A. Tucci, X. Chen, I. Lindeman, G. Emerton, T. Krausgruber, J. Shields, M. Haniffa, F. Powrie, and S. A. Teichmann. 2019. 'Single-Cell Transcriptomics of Regulatory T Cells Reveals Trajectories of Tissue Adaptation', *Immunity*, 50: 493-504.e7.
- Miyabe, C., Y. Miyabe, K. Strle, N. D. Kim, J. H. Stone, A. D. Luster, and S. Unizony. 2017. 'An expanded population of pathogenic regulatory T cells in giant cell arteritis is abrogated by IL-6 blockade therapy', *Ann Rheum Dis*, 76: 898-905.
- Miyao, T., S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H. J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn, and S. Hori. 2012. 'Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells', *Immunity*, 36: 262-75.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov, and S. Sakaguchi. 2009. 'Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor', *Immunity*, 30: 899-911.
- Mizui, M., and H. Kikutani. 2008. 'Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells?', *Immunity*, 28: 302-3.
- Modigliani, Y., V. Thomas-Vaslin, A. Bandeira, M. Coltey, N. M. Le Douarin, A. Coutinho, and J. Salaün. 1995. 'Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7555-9.

- Mombaerts, P., A. R. Clarke, M. A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itohara, J. J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, M. L. Hooper, and et al. 1992. 'Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages', *Nature*, 360: 225-31.
- Mora, Thierry, and Aleksandra M. Walczak. 2019. 'How many different clonotypes do immune repertoires contain?', *Current Opinion in Systems Biology*, 18: 104-10.
- Moran, A. E., K. L. Holzapfel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt, and K. A. Hogquist. 2011. 'T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse', *J Exp Med*, 208: 1279-89.
- Morawski, P. A., P. Mehra, C. Chen, T. Bhatti, and A. D. Wells. 2013. 'Foxp3 protein stability is regulated by cyclin-dependent kinase 2', *J Biol Chem*, 288: 24494-502.
- Moreno, C., K. Hodgson, G. Ferrer, M. Elena, X. Filella, A. Pereira, T. Baumann, and E. Montserrat. 2010. 'Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance', *Blood*, 116: 4771-6.
- Morgan, D. J., C. Kurts, H. T. Kreuzel, K. L. Holst, W. R. Heath, and L. A. Sherman. 1999. 'Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3854-8.
- Morrissey, P. J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J. D. Watson. 1993. 'CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells', *J Exp Med*, 178: 237-44.
- Moser, T., K. Akgün, U. Proschmann, J. Sellner, and T. Ziemssen. 2020. 'The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications', *Autoimmun Rev*, 19: 102647.
- Moyo, V. M., D. Smith, I. Brodsky, P. Crilley, R. J. Jones, and R. A. Brodsky. 2002. 'High-dose cyclophosphamide for refractory autoimmune hemolytic anemia', *Blood*, 100: 704-6.
- Mqadmi, A., X. Zheng, and K. Yazdanbakhsh. 2005. 'CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia', *Blood*, 105: 3746-8.
- Mueller, S. N., T. Gebhardt, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2013. 'Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence', *Annu Rev Immunol*, 31: 137-61.
- Mukai, Y., T. Nakamura, M. Yoshikawa, Y. Yoshioka, S. Tsunoda, S. Nakagawa, Y. Yamagata, and Y. Tsutsumi. 2010. 'Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex', *Sci Signal*, 3: ra83.
- Mullins, G. N., K. M. Valentine, M. Al-Kuhlani, D. Davini, K. D. C. Jensen, and K. K. Hoyer. 2020. 'T cell signaling and Treg dysfunction correlate to disease kinetics in IL-2R α -KO autoimmune mice', *Sci Rep*, 10: 21994.
- Murakami, M., K. Nakajima, K. Yamazaki, T. Muraguchi, T. Serikawa, and T. Honjo. 1997. 'Effects of breeding environments on generation and activation of autoreactive B-1 cells in anti-red blood cell autoantibody transgenic mice', *J Exp Med*, 185: 791-4.
- Murakami, M., T. Tsubata, R. Shinkura, S. Nisitani, M. Okamoto, H. Yoshioka, T. Usui, S. Miyawaki, and T. Honjo. 1994. 'Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse', *J Exp Med*, 180: 111-21.
- Murray, P. J. 2017. 'Macrophage Polarization', *Annu Rev Physiol*, 79: 541-66.
- Musaji, A., M. Meite, L. Detalle, S. Franquin, F. Cormont, V. Pr at, S. Izui, and J. P. Coutelier. 2005. 'Enhancement of autoantibody pathogenicity by viral infections in mouse models of anemia and thrombocytopenia', *Autoimmun Rev*, 4: 247-52.
- Nagelkerke, S. Q., C. W. Bruggeman, J. M. M. den Haan, E. P. J. Mul, T. K. van den Berg, R. van Bruggen, and T. W. Kuijpers. 2018. 'Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc- γ receptors', *Blood Adv*, 2: 941-53.
- Naiki, M., S. H. Yoshida, Y. Watanabe, S. Izui, A. A. Ansari, and M. E. Gershwin. 1993. 'The contribution of I-Abm12 to phenotypic and functional alterations among T-cell subsets in NZB mice', *J Autoimmun*, 6: 131-43.
- Nair, V. S., M. H. Song, M. Ko, and K. I. Oh. 2016. 'DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases', *Mol Cells*, 39: 888-97.

- Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. 'TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice', *J Immunol*, 172: 834-42.
- Nakayama, M., A. Hori, S. Toyoura, and S. I. Yamaguchi. 2021. 'Shaping of T Cell Functions by Trogocytosis', *Cells*, 10.
- Naradikian, M. S., A. R. Perate, and M. P. Cancro. 2015. 'BAFF receptors and ligands create independent homeostatic niches for B cell subsets', *Curr Opin Immunol*, 34: 126-9.
- Natarajan, P., D. Liu, S. R. Patel, M. Santhanakrishnan, D. Beitler, J. Liu, D. R. Gibb, J. S. Liepkalns, D. J. Madrid, S. C. Eisenbarth, S. R. Stowell, and J. E. Hendrickson. 2017. 'CD4 Depletion or CD40L Blockade Results in Antigen-Specific Tolerance in a Red Blood Cell Alloimmunization Model', *Front Immunol*, 8: 907.
- Nguyen, D. X., and M. R. Ehrenstein. 2016. 'Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis', *J Exp Med*, 213: 1241-53.
- Ni, X., W. Kou, J. Gu, P. Wei, X. Wu, H. Peng, J. Tao, W. Yan, X. Yang, A. Lebid, B. V. Park, Z. Chen, Y. Tian, J. Fu, S. Newman, X. Wang, H. Shen, B. Li, B. R. Blazar, X. Wang, J. Barbi, F. Pan, and L. Lu. 2019. 'TRAF6 directs FOXP3 localization and facilitates regulatory T-cell function through K63-linked ubiquitination', *Embo j*, 38.
- Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T. B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y. E. Chin, and J. Z. Zhang. 2013. 'Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis', *Nat Med*, 19: 322-8.
- Niedbala, W., X. Q. Wei, B. Cai, A. J. Hueber, B. P. Leung, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2007. 'IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells', *Eur J Immunol*, 37: 3021-9.
- Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. 'Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice', *Science*, 166: 753-5.
- Oberle, N., N. Eberhardt, C. S. Falk, P. H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2007. 'Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling', *J Immunol*, 179: 3578-87.
- Ogawara, H., H. Handa, K. Morita, M. Hayakawa, J. Kojima, H. Amagai, Y. Tsumita, Y. Kaneko, N. Tsukamoto, Y. Nojima, and H. Murakami. 2003. 'High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura', *Eur J Haematol*, 71: 283-8.
- Oh, H., Y. Grinberg-Bleyer, W. Liao, D. Maloney, P. Wang, Z. Wu, J. Wang, D. M. Bhatt, N. Heise, R. M. Schmid, M. S. Hayden, U. Klein, R. Rabadan, and S. Ghosh. 2017. 'An NF- κ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function', *Immunity*, 47: 450-65.e5.
- Ohkura, N., M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H. J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, and S. Sakaguchi. 2012. 'T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development', *Immunity*, 37: 785-99.
- Ohta, A., and M. Sitkovsky. 2001. 'Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage', *Nature*, 414: 916-20.
- Okamoto, M., M. Murakami, A. Shimizu, S. Ozaki, T. Tsubata, S. Kumagai, and T. Honjo. 1992. 'A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia', *J Exp Med*, 175: 71-9.
- Okoye, I. S., S. M. Coomes, V. S. Pelly, S. Czieso, V. Papayannopoulos, T. Tolmachova, M. C. Seabra, and M. S. Wilson. 2014. 'MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells', *Immunity*, 41: 89-103.
- Okubo, Y., T. Mera, L. Wang, and D. L. Faustman. 2013. 'Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2', *Sci Rep*, 3: 3153.
- Oldenborg, P. A., H. D. Gresham, Y. Chen, S. Izui, and F. P. Lindberg. 2002. 'Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice', *Blood*, 99: 3500-4.

- Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. 'Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10113-8.
- Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. 'Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1', *Nature*, 446: 685-9.
- Ortega, G., R. J. Robb, E. M. Shevach, and T. R. Malek. 1984. 'The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells', *J Immunol*, 133: 1970-5.
- Ostmann, A., H. J. Paust, U. Panzer, C. Wegscheid, S. Kapffer, S. Huber, R. A. Flavell, A. Erhardt, and G. Tiegs. 2013. 'Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN', *J Am Soc Nephrol*, 24: 930-42.
- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, J. H. Paik, R. A. DePinho, and M. O. Li. 2010. 'Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells', *Nat Immunol*, 11: 618-27.
- Oyler-Yaniv, A., J. Oyler-Yaniv, B. M. Whitlock, Z. Liu, R. N. Germain, M. Huse, G. Altan-Bonnet, and O. Krichevsky. 2017. 'A Tunable Diffusion-Consumption Mechanism of Cytokine Propagation Enables Plasticity in Cell-to-Cell Communication in the Immune System', *Immunity*, 46: 609-20.
- Pabbisetty, S. K., W. Rabacal, D. Maseda, D. Cendron, P. L. Collins, K. L. Hoek, V. V. Parekh, T. M. Aune, and E. Sebзда. 2014. 'KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 9579-84.
- Pacella, I., C. Procaccini, C. Focaccetti, S. Miacci, E. Timperi, D. Faicchia, M. Severa, F. Rizzo, E. M. Coccia, F. Bonacina, N. Mitro, G. D. Norata, G. Rossetti, V. Ranzani, M. Pagani, E. Giorda, Y. Wei, G. Matarese, V. Barnaba, and S. Piconese. 2018. 'Fatty acid metabolism complements glycolysis in the selective regulatory T cell expansion during tumor growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E6546-e55.
- Pakala, S. V., M. O. Kurrer, and J. D. Katz. 1997. 'T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice', *J Exp Med*, 186: 299-306.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells', *Nat Immunol*, 8: 1353-62.
- Panduro, M., C. Benoist, and D. Mathis. 2016. 'Tissue Tregs', *Annu Rev Immunol*, 34: 609-33.
- Papayannopoulos, V. 2018. 'Neutrophil extracellular traps in immunity and disease', *Nat Rev Immunol*, 18: 134-47.
- Park, H. J., J. S. Park, Y. H. Jeong, J. Son, Y. H. Ban, B. H. Lee, L. Chen, J. Chang, D. H. Chung, I. Choi, and S. J. Ha. 2015. 'PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells', *J Immunol*, 194: 5801-11.
- Passweg, J. R., M. Rabusin, M. Musso, Y. Beguin, S. Cesaro, G. Ehninger, I. Espigado, A. Iriondo, L. Jost, V. Koza, S. Lenhoff, I. Lisukov, F. Locatelli, A. Marmont, P. Philippe, C. Pilatrinio, P. Quartier, J. Stary, P. Veys, J. Vormoor, A. Wahlin, F. Zintl, C. Bocelli-Tyndall, A. Tyndall, and A. Gratwohl. 2004. 'Haematopoietic stem cell transplantation for refractory autoimmune cytopenia', *Br J Haematol*, 125: 749-55.
- Patel, S. R., A. Bennett, K. Girard-Pierce, C. L. Maier, S. Chonat, C. M. Arthur, P. E. Zerra, A. Mener, and S. R. Stowell. 2018. 'Recipient priming to one RBC alloantigen directly enhances subsequent alloimmunization in mice', *Blood Adv*, 2: 105-15.
- Peng, M., N. Yin, S. Chhangawala, K. Xu, C. S. Leslie, and M. O. Li. 2016. 'Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism', *Science*, 354: 481-84.
- Penhale, W. J., A. Farmer, R. P. McKenna, and W. J. Irvine. 1973. 'Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats', *Clin Exp Immunol*, 15: 225-36.
- Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis, and A. Farmer. 1976. 'Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells', *Clin Exp Immunol*, 25: 6-16.

- Piatek, C. I., H. Bocian, S. Algaze, I. C. Weitz, C. O'Connell, and H. A. Liebman. 2020. 'A Retrospective Study of the Combination of Rituximab, Cyclophosphamide and Dexamethasone for the Treatment of Relapsed/Refractory Warm Antibody Autoimmune Hemolytic Anemia', *Acta Haematol*, 143: 244-49.
- Placek, K., G. Hu, K. Cui, D. Zhang, Y. Ding, J. E. Lee, Y. Jang, C. Wang, J. E. Konkel, J. Song, C. Liu, K. Ge, W. Chen, and K. Zhao. 2017. 'MLL4 prepares the enhancer landscape for Foxp3 induction via chromatin looping', *Nat Immunol*, 18: 1035-45.
- Playfair, J. H., and S. Marshall-Clarke. 1973. 'Cross-reactions between erythrocytes at the T-cell level', *Immunology*, 24: 579-88.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle, and R. L. Coffman. 1993. 'Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice', *Int Immunol*, 5: 1461-71.
- Prestes, E. B., L. S. Alves, D. A. S. Rodrigues, F. F. Dutra, P. L. Fernandez, C. N. Paiva, J. C. Kagan, and M. T. Bozza. 2020. 'Mitochondrial Reactive Oxygen Species Participate in Signaling Triggered by Heme in Macrophages and upon Hemolysis', *J Immunol*, 205: 2795-805.
- Pritchard, N. R., A. J. Cutler, S. Uribe, S. J. Chadban, B. J. Morley, and K. G. Smith. 2000. 'Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcγRII', *Curr Biol*, 10: 227-30.
- Quintero, O. L., M. J. Amador-Patarroyo, G. Montoya-Ortiz, A. Rojas-Villarraga, and J. M. Anaya. 2012. 'Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity', *J Autoimmun*, 38: J109-19.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker, and D. M. Sansom. 2011. 'Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4', *Science*, 332: 600-3.
- Radbruch, A., G. Muehlinghaus, E. O. Luger, A. Inamine, K. G. Smith, T. Dörner, and F. Hiepe. 2006. 'Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell', *Nat Rev Immunol*, 6: 741-50.
- Raimondi, G., W. J. Shufesky, D. Tokita, A. E. Morelli, and A. W. Thomson. 2006. 'Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells', *J Immunol*, 176: 2808-16.
- Ramos-Casals, M., P. Brito-Zerón, S. Muñoz, N. Soria, D. Galiana, L. Bertolaccini, M. J. Cuadrado, and M. A. Khamashta. 2007. 'Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases', *Medicine (Baltimore)*, 86: 242-51.
- Ravetch, J. V. 1997. 'Fc receptors', *Curr Opin Immunol*, 9: 121-5.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong, and Y. Wang. 2007. 'Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells', *Cell Death Differ*, 14: 2076-84.
- Reynaud, Q., I. Durieu, M. Dutertre, S. Ledochowski, S. Durupt, A. S. Michallet, D. Vital-Durand, and J. C. Lega. 2015. 'Efficacy and safety of rituximab in auto-immune hemolytic anemia: A meta-analysis of 21 studies', *Autoimmun Rev*, 14: 304-13.
- Richards, A. L., H. L. Howie, L. M. Kapp, J. E. Hendrickson, J. C. Zimring, and K. E. Hudson. 2017. 'Innate B-1 B Cells Are Not Enriched in Red Blood Cell Autoimmune Mice: Importance of B Cell Receptor Transgenic Selection', *Front Immunol*, 8: 1366.
- Richards, A. L., A. Qiu, F. D. Zotti, K. Sheldon, C. Usaneerungrueng, D. R. Gruber, and K. E. Hudson. 2021. 'Autoantigen presentation by splenic dendritic cells is required for RBC-specific autoimmunity', *Transfusion*, 61: 225-35.
- Riet, T., and M. Chmielewski. 2022. 'Regulatory CAR-T cells in autoimmune diseases: Progress and current challenges', *Front Immunol*, 13: 934343.
- Riquelme, P., and J. A. Hutchinson. 2018. 'Novel molecules mediate specialized functions of human regulatory macrophages', *Curr Opin Organ Transplant*, 23: 533-37.

- Rocha, S., E. Costa, P. Rocha-Pereira, F. Ferreira, E. Cleto, J. Barbot, A. Quintanilha, L. Belo, and A. Santos-Silva. 2011. 'Erythropoiesis versus inflammation in Hereditary Spherocytosis clinical outcome', *Clin Biochem*, 44: 1137-43.
- Roders, N., F. Herr, G. Ambroise, O. Thauinat, A. Portier, A. Vazquez, and A. Durrbach. 2018. 'SYK Inhibition Induces Apoptosis in Germinal Center-Like B Cells by Modulating the Antiapoptotic Protein Myeloid Cell Leukemia-1, Affecting B-Cell Activation and Antibody Production', *Front Immunol*, 9: 787.
- Rodríguez-Perea, A. L., E. D. Arcia, C. M. Rueda, and P. A. Velilla. 2016. 'Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents', *Clin Exp Immunol*, 185: 281-91.
- Rogers, P. R., C. Dubey, and S. L. Swain. 2000. 'Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen', *J Immunol*, 164: 2338-46.
- Romagnani, S. 2000. 'The role of lymphocytes in allergic disease', *J Allergy Clin Immunol*, 105: 399-408.
- Rosenzweig, M., R. Lorenzon, P. Cacoub, H. P. Pham, F. Pitoiset, K. El Soufi, R. Ibet C, C. Bernard, S. Aractingi, B. Banneville, L. Beaugerie, F. Berenbaum, J. Champey, O. Chazouilleres, C. Corpechot, B. Fautrel, A. Mekinian, E. Regnier, D. Saadoun, J. E. Salem, J. Sellam, P. Seksik, A. Dagueneil-Nguyen, V. Doppler, J. Mariau, E. Vicaut, and D. Klatzmann. 2019. 'Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial', *Ann Rheum Dis*, 78: 209-17.
- Roumier, M., V. Loustau, C. Guillaud, L. Languille, M. Mahevas, M. Khellaf, N. Limal, F. Noizat-Pirenne, B. Godeau, and M. Michel. 2014. 'Characteristics and outcome of warm autoimmune hemolytic anemia in adults: New insights based on a single-center experience with 60 patients', *Am J Hematol*, 89: E150-5.
- Roychoudhuri, R., K. Hirahara, K. Mousavi, D. Clever, C. A. Klebanoff, M. Bonelli, G. Sciumè, H. Zare, G. Vahedi, B. Dema, Z. Yu, H. Liu, H. Takahashi, M. Rao, P. Muranski, J. G. Crompton, G. Punksody, D. Bedognetti, E. Wang, V. Hoffmann, J. Rivera, F. M. Marincola, A. Nakamura, V. Sartorelli, Y. Kanno, L. Gattinoni, A. Muto, K. Igarashi, J. J. O'Shea, and N. P. Restifo. 2013. 'BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis', *Nature*, 498: 506-10.
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen. 2009. 'Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome', *Immunity*, 31: 932-40.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller, and A. Y. Rudensky. 2008. 'Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces', *Immunity*, 28: 546-58.
- Rudra, D., T. Egawa, M. M. Chong, P. Treuting, D. R. Littman, and A. Y. Rudensky. 2009. 'Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells', *Nat Immunol*, 10: 1170-7.
- Russell, P. J., J. Cunningham, M. Dunkley, and N. M. Wilkinson. 1981. 'The role of suppressor T cells in the expression of autoimmune haemolytic anaemia in NZB mice', *Clin Exp Immunol*, 45: 496-503.
- Sadlack, B., J. Löhler, H. Schorle, G. Klebb, H. Haber, E. Sickel, R. J. Noelle, and I. Horak. 1995. 'Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells', *Eur J Immunol*, 25: 3053-9.
- Sahin, I., and R. Niroula. 2019. 'Erythrophagocytosis on bone marrow found in severe autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia', *Blood*, 134: 1877.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. 'Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease', *J Exp Med*, 161: 72-87.
- Sakaguchi, S., N. Mikami, J. B. Wing, A. Tanaka, K. Ichiyama, and N. Ohkura. 2020. 'Regulatory T Cells and Human Disease', *Annu Rev Immunol*, 38: 541-66.

- Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler. 2010. 'FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system', *Nat Rev Immunol*, 10: 490-500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. 'Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases', *J Immunol*, 155: 1151-64.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka. 1982. 'Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis', *J Exp Med*, 156: 1577-86.
- Salama, A., D. Hartnack, H. W. Lindemann, H. J. Lange, M. Rummel, and A. Loew. 2014. 'The effect of erythropoiesis-stimulating agents in patients with therapy-refractory autoimmune hemolytic anemia', *Transfus Med Hemother*, 41: 462-8.
- Salomon, B. L. 2021. 'Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells', *Nat Rev Rheumatol*, 17: 487-504.
- Samson, M., H. Greigert, M. Ciudad, C. Gerard, T. Ghesquière, M. Trad, M. Corbera-Bellalta, C. Genet, S. Ouandji, C. Cladière, M. Thebault, K. H. Ly, E. Liozon, F. Maurier, B. Bienvenu, B. Terrier, L. Guillevin, P. Charles, V. Quipourt, H. Devilliers, P. H. Gabrielle, C. Creuzot-Garcher, G. Tarris, L. Martin, P. Saas, S. Audia, M. C. Cid, and B. Bonnotte. 2021. 'Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis', *Clin Transl Immunology*, 10: e1332.
- Samson, M., D. Lakomy, S. Audia, and B. Bonnotte. 2011. '[T(H)17 lymphocytes: induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapy]', *Rev Med Interne*, 32: 292-301.
- Santarasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2009. 'TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells', *Eur J Immunol*, 39: 207-15.
- Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, and D. J. Campbell. 2007. 'Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease', *J Exp Med*, 204: 1335-47.
- Sato, Y., J. Liu, E. Lee, R. Perriman, M. G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2021. 'Co-Expression of FOXP3FL and FOXP3Δ2 Isoforms Is Required for Optimal Treg-Like Cell Phenotypes and Suppressive Function', *Front Immunol*, 12: 752394.
- Scatizzi, J. C., M. K. Haraldsson, K. M. Pollard, A. N. Theofilopoulos, and D. H. Kono. 2012. 'The Lbw2 locus promotes autoimmune hemolytic anemia', *J Immunol*, 188: 3307-14.
- Schlenner, S. M., B. Weigmann, Q. Ruan, Y. Chen, and H. von Boehmer. 2012. 'Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut', *J Exp Med*, 209: 1529-35.
- Schmitt, T. M., M. Ciofani, H. T. Petrie, and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2004. 'Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions', *J Exp Med*, 200: 469-79.
- Schubert, D., C. Bode, R. Kenefack, T. Z. Hou, J. B. Wing, A. Kennedy, A. Bulashevskaya, B. S. Petersen, A. Schäffer, B. A. Grüning, S. Unger, N. Frede, U. Baumann, T. Witte, R. E. Schmidt, G. Dueckers, T. Niehues, S. Seneviratne, M. Kanariou, C. Speckmann, S. Ehl, A. Rensing-Ehl, K. Warnatz, M. Rakhmanov, R. Thimme, P. Hasselblatt, F. Emmerich, T. Cathomen, R. Backofen, P. Fisch, M. Seidl, A. May, A. Schmitt-Graeff, S. Ikemizu, U. Salzer, A. Franke, S. Sakaguchi, L. S. K. Walker, D. M. Sansom, and B. Grimbacher. 2014. 'Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations', *Nat Med*, 20: 1410-16.
- Schuetz, C., M. Hoenig, D. Moshous, C. Weinstock, M. Castelle, M. Bendavid, K. Shimano, V. Tolbert, A. S. Schulz, and C. C. Dvorak. 2018. 'Daratumumab in life-threatening autoimmune hemolytic anemia following hematopoietic stem cell transplantation', *Blood Adv*, 2: 2550-53.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. 'Expression of

- interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells', *J Exp Med*, 203: 1693-700.
- Sefik, E., N. Geva-Zatorsky, S. Oh, L. Konnikova, D. Zemmour, A. M. McGuire, D. Burzyn, A. Ortiz-Lopez, M. Lobera, J. Yang, S. Ghosh, A. Earl, S. B. Snapper, R. Jupp, D. Kasper, D. Mathis, and C. Benoist. 2015. 'MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells', *Science*, 349: 993-7.
- Seidel, M. G. 2014. 'Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment', *Blood*, 124: 2337-44.
- Sekiguchi, N., S. Nishina, T. Kawakami, H. Sakai, N. Senoo, Y. Senoo, T. Ito, H. Saito, H. Nakazawa, T. Koizumi, and F. Ishida. 2017. 'Oral cyclophosphamide was effective for Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia in CD16+CD56- chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells', *Int J Hematol*, 105: 854-58.
- Seng, A., K. L. Krausz, D. Pei, D. C. Koestler, R. T. Fischer, T. M. Yankee, and M. A. Markiewicz. 2020. 'Coexpression of FOXP3 and a Helios isoform enhances the effectiveness of human engineered regulatory T cells', *Blood Adv*, 4: 1325-39.
- Serris, A., Z. Amoura, F. Canoui-Poitrine, B. Terrier, E. Hachulla, N. Costedoat-Chalumeau, T. Papo, O. Lambotte, D. Saadoun, M. Hié, P. Blanche, B. Lioger, J. E. Gottenberg, B. Godeau, and M. Michel. 2018. 'Efficacy and safety of rituximab for systemic lupus erythematosus-associated immune cytopenias: A multicenter retrospective cohort study of 71 adults', *Am J Hematol*, 93: 424-29.
- Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. '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*, 201: 723-35.
- Sfikakis, P. P. 2010. 'The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions', *Curr Dir Autoimmun*, 11: 180-210.
- Shen, C. R., G. Mazza, F. E. Perry, J. T. Beech, S. J. Thompson, A. Corato, S. Newton, R. N. Barker, and C. J. Elson. 1996. 'T-helper 1 dominated responses to erythrocyte Band 3 in NZB mice', *Immunology*, 89: 195-9.
- Shi, H., and H. Chi. 2019. 'Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity', *Front Immunol*, 10: 2716.
- Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. 'Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease', *Nature*, 359: 693-9.
- Shulman, Z., A. D. Gitlin, J. S. Weinstein, B. Lainez, E. Esplugues, R. A. Flavell, J. E. Craft, and M. C. Nussenzweig. 2014. 'Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection', *Science*, 345: 1058-62.
- Smirnova, S. J., J. V. Sidorova, N. V. Tsvetaeva, O. F. Nikulina, B. V. Biderman, E. E. Nikulina, S. M. Kulikov, and A. B. Sudarikov. 2016. 'Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia', *Autoimmunity*, 49: 147-54.
- Smyth, L. A., K. Ratnasothy, J. Y. Tsang, D. Boardman, A. Warley, R. Lechler, and G. Lombardi. 2013. 'CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function', *Eur J Immunol*, 43: 2430-40.
- Spolski, R., P. Li, and W. J. Leonard. 2018. 'Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy', *Nat Rev Immunol*, 18: 648-59.
- Stasi, R., G. Del Poeta, E. Stipa, M. L. Evangelista, M. M. Trawinska, N. Cooper, and S. Amadori. 2007. 'Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura', *Blood*, 110: 2924-30.
- Steiniger, B. S. 2015. 'Human spleen microanatomy: why mice do not suffice', *Immunology*, 145: 334-46.
- Steiniger, B. S., A. Seiler, K. Lampp, V. Wilhelmi, and V. Stachniss. 2014. 'B lymphocyte compartments in the human splenic red pulp: capillary sheaths and periarteriolar regions', *Histochem Cell Biol*, 141: 507-18.

- Steinman, L. 2007. '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*, 13: 139-45.
- Strauss, L., C. Bergmann, and T. L. Whiteside. 2009. 'Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis', *J Immunol*, 182: 1469-80.
- Strutt, T. M., K. K. McKinstry, Y. Kuang, L. M. Bradley, and S. L. Swain. 2012. 'Memory CD4+ T-cell-mediated protection depends on secondary effectors that are distinct from and superior to primary effectors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2551-60.
- Su, Q., J. Jing, W. Li, J. Ma, X. Zhang, Z. Wang, Z. Zhou, L. Dai, and L. Shao. 2019. 'Impaired Tip60-mediated Foxp3 acetylation attenuates regulatory T cell development in rheumatoid arthritis', *J Autoimmun*, 100: 27-39.
- Sugihara, S., Y. Izumi, T. Yoshioka, H. Yagi, T. Tsujimura, O. Tarutani, Y. Kohno, S. Murakami, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 1988. 'Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis', *J Immunol*, 141: 105-13.
- Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama, and S. Sakaguchi. 2006. 'Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis', *Int Immunol*, 18: 1197-209.
- Sun, L., H. Jin, and H. Li. 2016. 'GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- β releasing', *Oncotarget*, 7: 42826-36.
- Sunada, M., S. Suzuki, and Z. Ota. 1985. 'Reticuloendothelial cell function in autoimmune hemolytic anemia (AIHA): studies on the mechanism of peripheral monocyte activation', *Acta Med Okayama*, 39: 375-84.
- Suzuki, H., T. M. Kündig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J. J. Simard, P. S. Ohashi, H. Griesser, and et al. 1995. 'Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta', *Science*, 268: 1472-6.
- Szurek, E., A. Cebula, L. Wojciech, M. Pietrzak, G. Rempala, P. Kisielow, and L. Ignatowicz. 2015. 'Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells', *PLoS One*, 10: e0141161.
- Taguchi, O., and Y. Nishizuka. 1981. 'Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse', *Clin Exp Immunol*, 46: 425-34.
- Tai, X., B. Erman, A. Alag, J. Mu, M. Kimura, G. Katz, T. Guinter, T. McCaughtry, R. Etzensperger, L. Feigenbaum, D. S. Singer, and A. Singer. 2013. 'Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals', *Immunity*, 38: 1116-28.
- Takaba, H., Y. Morishita, Y. Tomofuji, L. Danks, T. Nitta, N. Komatsu, T. Kodama, and H. Takayanagi. 2015. 'Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance', *Cell*, 163: 975-87.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. 'Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state', *Int Immunol*, 10: 1969-80.
- Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L. C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. 2004. 'Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells', *J Immunol*, 172: 3580-9.
- Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Blüthmann, and H. von Boehmer. 1988. 'Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells', *Nature*, 335: 229-33.
- Tekguc, M., J. B. Wing, M. Osaki, J. Long, and S. Sakaguchi. 2021. 'Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.

- Thai, L. H., S. Le Gallou, A. Robbins, E. Crickx, T. Fadeev, Z. Zhou, N. Cagnard, J. Mégret, C. Bole, J. C. Weill, C. A. Reynaud, and M. Mahévas. 2018. 'BAFF and CD4(+) T cells are major survival factors for long-lived splenic plasma cells in a B-cell-depletion context', *Blood*, 131: 1545-55.
- Thangada, S., K. M. Khanna, V. A. Blaho, M. L. Oo, D. S. Im, C. Guo, L. Lefrancois, and T. Hla. 2010. 'Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics', *J Exp Med*, 207: 1475-83.
- Thomas-Vaslin, V., H. K. Altes, R. J. de Boer, and D. Klatzmann. 2008. 'Comprehensive assessment and mathematical modeling of T cell population dynamics and homeostasis', *J Immunol*, 180: 2240-50.
- Thornton, A. M., P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. 2010. 'Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells', *J Immunol*, 184: 3433-41.
- Thornton, A. M., J. Lu, P. E. Korty, Y. C. Kim, C. Martens, P. D. Sun, and E. M. Shevach. 2019. 'Helios(+) and Helios(-) Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires', *Eur J Immunol*, 49: 398-412.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. 'CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production', *J Exp Med*, 188: 287-96.
- Toh, M. L., M. Kawashima, A. Hot, P. Miossec, and P. Miossec. 2010. 'Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12Rbeta2 inhibition', *Ann Rheum Dis*, 69: 1562-7.
- Toker, A., D. Engelbert, G. Garg, J. K. Polansky, S. Floess, T. Miyao, U. Baron, S. Düber, R. Geffers, P. Giehr, S. Schallenberg, K. Kretschmer, S. Olek, J. Walter, S. Weiss, S. Hori, A. Hamann, and J. Huehn. 2013. 'Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus', *J Immunol*, 190: 3180-8.
- Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene, and M. Tone. 2008. 'Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer', *Nat Immunol*, 9: 194-202.
- Toomer, K. H., J. B. Lui, N. H. Altman, Y. Ban, X. Chen, and T. R. Malek. 2019. 'Essential and non-overlapping IL-2R α -dependent processes for thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells', *Nat Commun*, 10: 1037.
- Torri, A., D. Carpi, E. Bulgheroni, M. C. Crosti, M. Moro, P. Guarini, R. L. Rossi, G. Rossetti, D. Di Vizio, M. Hoxha, V. Bollati, C. Gagliani, C. Tacchetti, M. Paroni, J. Geginat, L. Corti, L. Venegoni, E. Berti, M. Pagani, G. Matarese, S. Abrignani, and P. de Candia. 2017. 'Extracellular MicroRNA Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity', *J Biol Chem*, 292: 2903-15.
- Toubi, E., A. Kessel, Z. Mahmudov, K. Hallas, M. Rozenbaum, and I. Rosner. 2005. 'Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab', *Ann N Y Acad Sci*, 1051: 506-14.
- Trop, S., M. Rhodes, D. L. Wiest, P. Hugo, and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2000. 'Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR', *J Immunol*, 165: 5566-72.
- Tung, S. L., D. A. Boardman, M. Sen, M. Letizia, Q. Peng, N. Cianci, L. Dioni, L. M. Carlin, R. Lechler, V. Bollati, G. Lombardi, and L. A. Smyth. 2018. 'Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function', *Sci Rep*, 8: 6065.
- Turner, J. A., E. Stephen-Victor, S. Wang, M. N. Rivas, A. Abdel-Gadir, H. Harb, Y. Cui, M. Fanny, L. M. Charbonnier, J. J. H. Fong, M. Benamar, L. Wang, O. T. Burton, K. Bansal, L. Bry, C. Zhu, Q. Z. Li, R. L. Clement, H. C. Oettgen, E. Crestani, R. Rachid, P. T. Sage, and T. A. Chatila. 2020. 'Regulatory T Cell-Derived TGF- β 1 Controls Multiple Checkpoints Governing Allergy and Autoimmunity', *Immunity*, 53: 1202-14.e6.
- Turner, V. M., and N. A. Mabbott. 2017. 'Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes', *Biogerontology*, 18: 723-38.
- Ueno, A., L. Jeffery, T. Kobayashi, T. Hibi, S. Ghosh, and H. Jijon. 2018. 'Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease', *J Autoimmun*, 87: 38-49.

- Vaeth, M., U. Schliesser, G. Müller, S. Reissig, K. Satoh, A. Tuettenberg, H. Jonuleit, A. Waisman, M. R. Müller, E. Serfling, B. S. Sawitzki, and F. Berberich-Siebelt. 2012. 'Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 16258-63.
- Vahl, J. C., C. Drees, K. Heger, S. Heink, J. C. Fischer, J. Nedjic, N. Ohkura, H. Morikawa, H. Poeck, S. Schallenberg, D. Rieß, M. Y. Hein, T. Buch, B. Polic, A. Schönle, R. Zeiser, A. Schmitt-Gräff, K. Kretschmer, L. Klein, T. Korn, S. Sakaguchi, and M. Schmidt-Supprian. 2014. 'Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool', *Immunity*, 41: 722-36.
- Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach, and P. E. Lipsky. 2006. 'TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells', *Blood*, 108: 253-61.
- Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. 'A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs', *J Clin Invest*, 115: 1953-62.
- Valzasina, B., C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A. D. Weinberg, and M. P. Colombo. 2005. 'Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR', *Blood*, 105: 2845-51.
- Van De Loosdrecht, A. A., D. W. Hendriks, N. R. Blom, J. W. Smit, J. T. De Wolf, and E. Vellenga. 2000. 'Excessive apoptosis of bone marrow erythroblasts in a patient with autoimmune haemolytic anaemia with reticulocytopenia', *Br J Haematol*, 108: 313-5.
- van der Laan, A. M., E. N. Ter Horst, R. Delewi, M. P. Begieneman, P. A. Krijnen, A. Hirsch, M. Lavaei, M. Nahrendorf, A. J. Horrevoets, H. W. Niessen, and J. J. Piek. 2014. 'Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir', *Eur Heart J*, 35: 376-85.
- van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, and S. J. Davis. 1997. 'CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics', *J Exp Med*, 185: 393-403.
- van Loosdregt, J., D. Brunen, V. Fleskens, C. E. Pals, E. W. Lam, and P. J. Coffe. 2011. 'Rapid temporal control of Foxp3 protein degradation by sirtuin-1', *PLoS One*, 6: e19047.
- van Loosdregt, J., V. Fleskens, J. Fu, A. B. Brenkman, C. P. Bekker, C. E. Pals, J. Meerding, C. R. Berkers, J. Barbi, A. Gröne, A. J. Sijts, M. M. Maurice, E. Kalkhoven, B. J. Prakken, H. Ovaa, F. Pan, D. M. Zaiss, and P. J. Coffe. 2013. 'Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity', *Immunity*, 39: 259-71.
- van Loosdregt, J., Y. Vercoulen, T. Guichelaar, Y. Y. Gent, J. M. Beekman, O. van Beekum, A. B. Brenkman, D. J. Hijnen, T. Mutis, E. Kalkhoven, B. J. Prakken, and P. J. Coffe. 2010. 'Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization', *Blood*, 115: 965-74.
- van Mierlo, G. J., H. U. Scherer, M. Hameetman, M. E. Morgan, R. Flierman, T. W. Huizinga, and R. E. Toes. 2008. 'Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators', *J Immunol*, 180: 2747-51.
- Vatanen, T., A. D. Kostic, E. d'Hennezel, H. Siljander, E. A. Franzosa, M. Yassour, R. Kolde, H. Vlamakis, T. D. Arthur, A. M. Hämäläinen, A. Peet, V. Tillmann, R. Uibo, S. Mokurov, N. Dorshakova, J. Ilonen, S. M. Virtanen, S. J. Szabo, J. A. Porter, H. Lähdesmäki, C. Huttenhower, D. Gevers, T. W. Cullen, M. Knip, and R. J. Xavier. 2016. 'Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans', *Cell*, 165: 842-53.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. 'TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells', *Immunity*, 24: 179-89.
- Verhagen, J., and D. C. Wraith. 2010. 'Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells"', *J Immunol*, 185: 7129; author reply 30.
- Vojdani, A., and E. Vojdani. 2021. 'The Role of Exosomes in the Pathophysiology of Autoimmune Diseases I: Toxic Chemicals and Food', *Pathophysiology*, 28: 513-43.
- Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman, and Y. J. Liu. 2009. 'Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 4793-8.

- Vu, M. D., X. Xiao, W. Gao, N. Degauque, M. Chen, A. Kroemer, N. Killeen, N. Ishii, and X. C. Li. 2007. 'OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs', *Blood*, 110: 2501-10.
- Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan, and A. N. Akbar. 2006. 'Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo', *J Clin Invest*, 116: 2423-33.
- Walker, L. S., and A. K. Abbas. 2002. 'The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery', *Nat Rev Immunol*, 2: 11-9.
- Walunas, T. L., and J. A. Bluestone. 1998. 'CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo', *J Immunol*, 160: 3855-60.
- Wan, Y. Y. 2010. 'Multi-tasking of helper T cells', *Immunology*, 130: 166-71.
- Wang, L., Y. Liu, R. Han, U. H. Beier, R. M. Thomas, A. D. Wells, and W. W. Hancock. 2013. 'Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function', *Mol Cell Biol*, 33: 4106-15.
- Wang, W. L., C. Ouyang, N. M. Graham, Y. Zhang, K. Cassidy, E. Y. Reyes, M. Xiong, A. M. Davis, K. Tang, D. Zeng, and M. P. Boldin. 2022. 'microRNA-142 guards against autoimmunity by controlling Treg cell homeostasis and function', *PLoS Biol*, 20: e3001552.
- Wang, W., S. Shao, Z. Jiao, M. Guo, H. Xu, and S. Wang. 2012. 'The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis', *Rheumatol Int*, 32: 887-93.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. 'Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis', *Nature*, 356: 314-7.
- Wehbi, V. L., and K. Taskén. 2016. 'Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells - Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units', *Front Immunol*, 7: 222.
- Weinstein, J. S., E. I. Herman, B. Lainez, P. Licona-Limón, E. Esplugues, R. Flavell, and J. Craft. 2016. 'TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response', *Nat Immunol*, 17: 1197-205.
- Weiss, J. M., A. M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M. A. Curotto de Lafaille, C. N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A. B. Frey, M. G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M. O. Li, R. E. Niec, A. Y. Rudensky, M. L. Dustin, D. R. Littman, and J. J. Lafaille. 2012. 'Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells', *J Exp Med*, 209: 1723-42, s1.
- Weiss, T., M. Grell, K. Siemienski, F. Mühlenbeck, H. Dürkop, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, and H. Wajant. 1998. 'TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60', *J Immunol*, 161: 3136-42.
- Westerman, M., and J. B. Porter. 2016. 'Red blood cell-derived microparticles: An overview', *Blood Cells Mol Dis*, 59: 134-9.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. 'X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy', *Nat Genet*, 27: 18-20.
- Wilson, A., W. Held, and H. R. MacDonald. 1994. 'Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes', *J Exp Med*, 179: 1355-60.
- Wing, J. B., A. Tanaka, and S. Sakaguchi. 2019. 'Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer', *Immunity*, 50: 302-16.
- Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. 'CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function', *Science*, 322: 271-5.
- Wohlfert, E. A., J. R. Grainger, N. Bouladoux, J. E. Konkel, G. Oldenhove, C. H. Ribeiro, J. A. Hall, R. Yagi, S. Naik, R. Bhairavabhotla, W. E. Paul, R. Bosselut, G. Wei, K. Zhao, M. Oukka, J. Zhu, and Y. Belkaid. 2011. 'GATA3 controls Foxp3+ regulatory T cell fate during inflammation in mice', *J Clin Invest*, 121: 4503-15.

- Wong, A. S. L., D. R. Gruber, A. L. Richards, K. Sheldon, A. Qiu, A. Hay, and K. E. Hudson. 2020. 'Tolerization of recent thymic emigrants is required to prevent RBC-specific autoimmunity', *J Autoimmun*, 114: 102489.
- Workman, C. J., and D. A. Vignali. 2005. 'Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223)', *J Immunol*, 174: 688-95.
- Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. 'FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT', *Cell*, 126: 375-87.
- Xiao, X., W. Gong, G. Demirci, W. Liu, S. Spoerl, X. Chu, D. K. Bishop, L. A. Turka, and X. C. Li. 2012. 'New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo', *J Immunol*, 188: 892-901.
- Xiao, Y., Y. Nagai, G. Deng, T. Ohtani, Z. Zhu, Z. Zhou, H. Zhang, M. Q. Ji, J. W. Lough, A. Samanta, W. W. Hancock, and M. I. Greene. 2014. 'Dynamic interactions between TIP60 and p300 regulate FOXP3 function through a structural switch defined by a single lysine on TIP60', *Cell Rep*, 7: 1471-80.
- Xiu, Y., K. Nakamura, M. Abe, N. Li, X. S. Wen, Y. Jiang, D. Zhang, H. Tsurui, S. Matsuoka, Y. Hamano, H. Fujii, M. Ono, T. Takai, T. Shimokawa, C. Ra, T. Shirai, and S. Hirose. 2002. 'Transcriptional regulation of Fcgr2b gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses', *J Immunol*, 169: 4340-6.
- Xu, L., T. Zhang, Z. Liu, Q. Li, Z. Xu, and T. Ren. 2012. 'Critical role of Th17 cells in development of autoimmune hemolytic anemia', *Exp Hematol*, 40: 994-1004.e4.
- Yan, J. B., M. M. Luo, Z. Y. Chen, and B. H. He. 2020. 'The Function and Role of the Th17/Treg Cell Balance in Inflammatory Bowel Disease', *J Immunol Res*, 2020: 8813558.
- Yan, Y., G. X. Zhang, B. Gran, F. Fallarino, S. Yu, H. Li, M. L. Cullimore, A. Rostami, and H. Xu. 2010. 'IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 185: 5953-61.
- Yang, F., C. Feng, X. Zhang, J. Lu, and Y. Zhao. 2017. 'The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections', *Inflammation*, 40: 311-23.
- Yang, S., C. Xie, Y. Chen, J. Wang, X. Chen, Z. Lu, R. R. June, and S. G. Zheng. 2019. 'Differential roles of TNF α -TNFR1 and TNF α -TNFR2 in the differentiation and function of CD4(+)Foxp3(+) induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases', *Cell Death Dis*, 10: 27.
- Yang, X., Y. Lun, H. Jiang, X. Liu, Z. Duan, S. Xin, and J. Zhang. 2018. 'SIRT1-Regulated Abnormal Acetylation of FOXP3 Induces Regulatory T-Cell Function Defect in Hashimoto's Thyroiditis', *Thyroid*, 28: 246-56.
- Yang, X. P., K. Jiang, K. Hirahara, G. Vahedi, B. Afzali, G. Sciume, M. Bonelli, H. W. Sun, D. Jankovic, Y. Kanno, V. Sartorelli, J. J. O'Shea, and A. Laurence. 2015. 'EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion', *Sci Rep*, 5: 10643.
- Yokosuka, T., W. Kobayashi, M. Takamatsu, K. Sakata-Sogawa, H. Zeng, A. Hashimoto-Tane, H. Yagita, M. Tokunaga, and T. Saito. 2010. 'Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation', *Immunity*, 33: 326-39.
- Young, D. A., L. D. Lowe, S. S. Booth, M. J. Whitters, L. Nicholson, V. K. Kuchroo, and M. Collins. 2000. 'IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 164: 3563-72.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H. U. Simon. 2009. 'Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps', *Cell Death Differ*, 16: 1438-44.
- Youssef, A. R., C. R. Shen, C. L. Lin, R. N. Barker, and C. J. Elson. 2005. 'IL-4 and IL-10 modulate autoimmune haemolytic anaemia in NZB mice', *Clin Exp Immunol*, 139: 84-9.
- Yuan, Y., A. G. A. Kolios, Y. Liu, B. Zhang, H. Li, G. C. Tsokos, and X. Zhang. 2022. 'Therapeutic potential of interleukin-2 in autoimmune diseases', *Trends Mol Med*, 28: 596-612.

- Zabransky, D. J., C. J. Nirschl, N. M. Durham, B. V. Park, C. M. Ceccato, T. C. Bruno, A. J. Tam, D. Getnet, and C. G. Drake. 2012. 'Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells', *PLoS One*, 7: e34547.
- Zakharova, M., and H. K. Ziegler. 2005. 'Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells', *J Immunol*, 175: 5024-33.
- Zemmour, D., R. Zilionis, E. Kiner, A. M. Klein, D. Mathis, and C. Benoist. 2018. 'Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR', *Nat Immunol*, 19: 291-301.
- Zerra, P. E., S. R. Patel, R. P. Jajosky, C. M. Arthur, J. W. McCoy, J. W. L. Allen, S. Chonat, R. M. Fasano, J. D. Roback, C. D. Josephson, J. E. Hendrickson, and S. R. Stowell. 2021. 'Marginal zone B cells mediate a CD4 T-cell-dependent extrafollicular antibody response following RBC transfusion in mice', *Blood*, 138: 706-21.
- Zhang, J., D. Ma, X. Zhu, X. Qu, C. Ji, and M. Hou. 2009. 'Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura', *Haematologica*, 94: 1326-9.
- Zhao, C., Y. Chu, Z. Liang, B. Zhang, X. Wang, X. Jing, M. Hao, Y. Wang, J. An, X. Zhang, L. Sun, and J. Chen. 2019. 'Low dose of IL-2 combined with rapamycin restores and maintains the long-term balance of Th17/Treg cells in refractory SLE patients', *BMC Immunol*, 20: 32.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach. 2006. 'Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes', *Blood*, 107: 3925-32.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. 'Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses', *Nature*, 458: 351-6.
- Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush, and A. Y. Rudensky. 2010. 'Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate', *Nature*, 463: 808-12.
- Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2007. 'Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells', *Nature*, 445: 936-40.
- Zhou, X., S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J. A. Bluestone. 2009. 'Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo', *Nat Immunol*, 10: 1000-7.
- Zhou, X., L. T. Jeker, B. T. Fife, S. Zhu, M. S. Anderson, M. T. McManus, and J. A. Bluestone. 2008. 'Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity', *J Exp Med*, 205: 1983-91.
- Zhou, X., J. Tang, H. Cao, H. Fan, and B. Li. 2015. 'Tissue resident regulatory T cells: novel therapeutic targets for human disease', *Cell Mol Immunol*, 12: 543-52.
- Zhu, H., W. Xu, H. Liu, H. Wang, R. Fu, Y. Wu, W. Qu, G. Wang, J. Guan, J. Song, L. Xing, and Z. Shao. 2016. 'Expression of activated molecules on CD5(+)B lymphocytes in autoimmune hemolytic anemia', *Int J Hematol*, 103: 545-53.
- Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W. E. Paul. 2006. 'GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors', *Cell Res*, 16: 3-10.
- Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. 'Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)', *Annu Rev Immunol*, 28: 445-89.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

European Journal of Internal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejim

Original article

T-cell immune response predicts the risk of critical SARS-Cov2 infection in hospitalized COVID-19 patients



Maxime Samson^{a,*}, Barbara Nicolas^a, Marion Ciudad^a, Hélène Greigert^a, Alexandre Guilhem^a, Claudie Cladiere^a, Cécile Straub^a, Mathieu Blot^b, Lionel Piroth^b, Thomas Rogier^c, Hervé Devilliers^c, Patrick Manckoundia^d, Thibault Ghesquiere^a, Stéphanie Francois^e, Daniela Lakomy^e, Sylvain Audia^a, Bernard Bonnotte^{a,1}

^a Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital of Dijon, INSERM U1098, University of Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

^b Department of Infectious diseases, University Hospital of DijonDijon, France

^c Department of internal medicine and systemic diseases, University Hospital of DijonDijon, France

^d Department of geriatric internal medicine, University Hospital of DijonDijon, France

^e Laboratory of immunology, University Hospital of DijonDijon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
SARS Cov2
Covid-19
Th17 cells
IL-6

ABSTRACT

Introduction: This study aimed to identify markers of disease worsening in patients hospitalized for SARS-Cov2 infection.

Patients and methods: Patients hospitalized for severe recent-onset (<1 week) SARS-Cov2 infection were prospectively included. The percentage of T-cell subsets and plasma IL-6 at admission (before any steroid therapy) were compared between patients who progressed to a critical infection and those who did not.

Results: Thirty-seven patients (18 men, 19 women) were included; 11 (30%) progressed to critical infection. At admission, the critical infection patients were older ($P = 0.021$), had higher creatinine levels ($P = 0.003$), and decreased percentages of circulating B cells ($P = 0.04$), T cells ($P = 0.009$), and CD4+ T cells ($P = 0.004$) than those with a favorable course. Among T cell subsets, there was no significant difference between the two groups except for the percentage of Th17 cells, which was two-fold higher in patients who progressed to critical infection ($P = 0.028$). Plasma IL-6 at admission was also higher in this group ($P = 0.018$). In multivariate analysis, the percentage of circulating Th17 cells at admission was the only variable associated with higher risk of progression to critical SARS-Cov2 infection ($P = 0.021$).

Conclusion: This study suggests that an elevated percentage of Th17 cells in patients hospitalized for SARS-Cov2 infection is associated with an increased risk of progression to critical disease. If these data are confirmed in a larger study, this marker could be used to better target the population of patients in whom tocilizumab could decrease the risk of progression to critical COVID-19.

1. Introduction

The SARS-Cov2 infection pandemic that began in December 2019 has so far infected 525 million people and caused at least 6.285 million deaths around the world. In France, 28.5 million people were infected and 144,809 died between the start of the pandemic and May 2022 [1]. Since its emergence, the management of SARS-Cov2 infection has improved, first with the use of dexamethasone and more recently with the use of biologics that block IL-6 or IL-1beta signaling pathways.

Although the precise pathophysiology of this infection is not fully understood, studies have shown that SARS-Cov-2 infection causes a cytokine storm with significant IL-6 release [2]. Based on these data, tocilizumab, a monoclonal antibody directed against soluble and membranous receptors of IL-6, has emerged as a potential therapy to improve the prognosis of patients with severe SARS-Cov-2 infection. Since then, numerous clinical studies have been conducted to evaluate the efficacy of this drug, and there is a growing body of evidence on the efficacy of this treatment [3]. When infected patients are hospitalized,

* Corresponding author at: Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, 14 Bd Gaffarel, 21000 Dijon, France.

E-mail address: maxime.samson@chu-dijon.fr (M. Samson).

¹ Bernard BONNOTTE: Roche-Chugai, Boehringer Ingelheim and Novartis (remuneration for symposiums and consulting payments).

<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.06.001>

Received 3 May 2022; Received in revised form 30 May 2022; Accepted 1 June 2022

Available online 3 June 2022

0953-6205/© 2022 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Federation of Internal Medicine.



OPEN ACCESS

Edited by:

Xue-Zhong Yu,
Medical University of South Carolina,
United States

Reviewed by:

Ping Zhang,
Fred Hutchinson Cancer Research
Center, United States
Xiangyu Zhao,
Peking University People's
Hospital, China
Lei Tian,
Shanghai Jiao Tong University, China

***Correspondence:**

Bernard Bonnotte
Bernard.Bonnotte@u-bourgogne.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 03 December 2021

Accepted: 11 February 2022

Published: 08 March 2022

Citation:

Gérard C, Thébault M,
Lamarthée B, Genet C,
Cattin F, Brazdova A, Janikashvili N,
Cladière C, Ciudad M, Ouandji S,
Ghesquière T, Greigert H, Tinel C,
Adotevi O, Saas P, Samson M,
Audia S and Bonnotte B (2022)
Human Monocyte-Derived
Suppressor Cell Supernatant
Induces Immunoregulatory
Effects and Mitigates xenoGvHD.
Front. Immunol. 13:827712.
doi: 10.3389/fimmu.2022.827712

Human Monocyte-Derived Suppressor Cell Supernatant Induces Immunoregulatory Effects and Mitigates xenoGvHD

Claire Gérard^{1,2†}, Marine Thébault^{1†}, Baptiste Lamarthée^{1†}, Coraline Genet^{1†},
Florine Cattin¹, Andréa Brazdova^{1,3}, Nona Janikashvili^{1,4}, Claudie Cladière¹,
Marion Ciudad¹, Séthi Ouandji¹, Thibault Ghesquière^{1,2}, Hélène Greigert¹, Claire Tinel¹,
Olivier Adotevi⁵, Philippe Saas⁵, Maxime Samson^{1,2}, Sylvain Audia^{1,2}
and Bernard Bonnotte^{1,2*}


¹ Université Bourgogne Franche-Comté (UBFC), Inserm, EFS BFC, UMR1098, Team « immunoregulation, immunopathology », RIGT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Dijon, France, ² Department of Internal Medicine, Dijon University Hospital, Dijon, France, ³ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czechia, ⁴ Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tbilisi State Medical University (TSMU), Tbilisi, Georgia, ⁵ UBFC, Inserm, EFS BFC, UMR1098, RIGT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, France

Recently developed cell-based therapies have shown potential for graft-versus-host disease (GvHD) mitigation. Our team previously developed a protocol to generate human monocyte-derived suppressor Cells (HuMoSC), a subpopulation of CD33+ suppressor cells of monocytic origin. CD33+HuMoSC successfully reduced xenoGvHD severity in NOD/SCID/IL-2R γ ^{-/-} (NSG) mice. While CD33+ HuMoSC culture supernatant inhibits T cell activation and proliferation, the recovery of CD33+ HuMoSC immunosuppressive cells and the subsequent production of their supernatant is limited. An attractive solution would be to use both the CD33+ and the large number of CD14+ cells derived from our protocol. Here, we assessed the immunoregulatory properties of the CD14+HuMoSC supernatant and demonstrated that it inhibited both CD4 and CD8 T cell proliferation and decreased CD8 cytotoxicity. *In vivo*, injection of CD14+HuMoSC supernatant reduced xenoGvHD in NSG mice. Furthermore, CD14+HuMoSC supernatant maintained its immunoregulatory properties in an inflammatory environment. Proteomic and multiplex analyses revealed the presence of immunosuppressive proteins such as GPNMB, galectin-3 and IL-1R(A). Finally, CD14+HuMoSC supernatant can be produced using good manufacturing practices and be used as complement to current immunosuppressive drugs. CD14+HuMoSC supernatant is thus a promising therapy for preventing GvHD.

Keywords: myeloid-derived suppressor cell, xeno GVHD, supernatant characteristics, GMP-good manufacturing practice, immunoregulation

ORIGINAL ARTICLE

Improvement of Treg immune response after treatment with tocilizumab in giant cell arteritis

Maxime Samson^{1,2†} , Hélène Greigert^{1,2†}, Marion Ciudad², Claire Gerard², Thibault Ghesquiere^{1,2}, Malika Trad², Marc Corbera-Bellalta³, Coraline Genet², Sethi Ouanji², Claudie Cladi ere², Marine Thebault², Kim Heang Ly⁴, Eric Liozon⁴, François Maurier⁵, Boris Bienvenu⁶, Benjamin Terrier⁷, Loïc Guillevin⁷, Pierre Charles⁸, Valérie Quipourt⁹, Hervé Devilliers^{10,11}, Pierre-Henry Gabrielle¹², Catherine Kreuzot-Garcher¹², Georges Tarris¹³, Laurent Martin¹³, Philippe Saas^{2,14}, Sylvain Audia^{1,2}, Maria Cinta Cid³ & Bernard Bonnotte^{1,2}

¹Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, Dijon, France

²Universit e Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-H ote-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Dijon, France

³Vasculitis Research Unit, Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clinic, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biom ediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CRB-CELLEX, Barcelona, Spain

⁴Department of Internal Medicine, CHU de Limoges, Limoges, France

⁵Department of Internal Medicine, HP-Metz Site Belle Isle, Metz, France

⁶Department of Internal Medicine, Hôpital Saint-Joseph, Marseille, France

⁷Department of Internal Medicine, National Referral Center for Systemic and Rare Autoimmune Diseases, Hôpital Cochin, APHP, Paris, France

⁸Department of Internal Medicine, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France

⁹Department of Geriatric Internal Medicine, Dijon University Hospital, Dijon, France

¹⁰Department of Internal Medicine and Systemic Diseases, Dijon University Hospital, Dijon, France

¹¹INSERM, CIC 1432, Clinical Epidemiology Unit, Dijon, France

¹²Department of Ophthalmology, Dijon University Hospital, Dijon, France

¹³Department of Pathology, Dijon University Hospital, Dijon, France

¹⁴CIC-1431, INSERM, Besançon University Hospital, EFS, Besançon, France

Correspondence

M Samson, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Hôpital François Mitterrand, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, 14 boulevard Gaffarel, 21000 Dijon, France.

E-mails: maxime.samson@u-bourgogne.fr; maxime.samson@chu-dijon.fr

[†]Co-first authors.

Received 25 January 2021;

Revised 20 June 2021;

Accepted 3 August 2021

doi: 10.1002/cti2.1332

Clinical & Translational Immunology
2021; 10: e1332

Abstract

Objectives. To study the percentage, suppressive function and plasticity of Treg in giant cell arteritis (GCA), and the effects of glucocorticoids and tocilizumab. **Methods.** Blood samples were obtained from 40 controls and 43 GCA patients at baseline and after treatment with glucocorticoids + IV tocilizumab ($n = 20$) or glucocorticoids ($n = 23$). Treg percentage and phenotype were assessed by flow cytometry. Suppressive function of Treg was assessed by measuring their ability to inhibit effector T-cell (Teff) proliferation and polarisation into Th1 and Th17 cells. **Results.** Treg (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) frequency in total CD4⁺ T cells was decreased in active GCA patients when compared to controls (2.5% vs. 4.7%, $P < 0.001$) and increased after treatment with tocilizumab but worsened after treatment with glucocorticoids alone. Treg lacking exon 2 of FoxP3 were increased in GCA patients when compared to controls (23% vs. 10% of total Treg, $P = 0.0096$) and normalised after treatment with tocilizumab + glucocorticoids but not glucocorticoids alone. In GCA patients, Treg were unable to control Teff proliferation and induced ~50% increase in the amount of IL-17⁺ Teff, which was

Immune Thrombocytopenia: Recent Advances in Pathogenesis and Treatments

Sylvain Audia^{1,2}, Matthieu Mahévas^{3,4}, Martin Nivet^{1,2}, Sethi Ouanji^{1,2}, Marion Ciudad^{1,2}, Bernard Bonnotte^{1,2}

Correspondence: Sylvain Audia (sylvain.audia@u-bourgogne.fr).

Abstract

Immune thrombocytopenia (ITP) is a rare autoimmune disease due to both a peripheral destruction of platelets and an inappropriate bone marrow production. Although the primary triggering factors of ITP remain unknown, a loss of immune tolerance—mostly represented by a regulatory T-cell defect—allows T follicular helper cells to stimulate autoreactive splenic B cells that differentiate into antiplatelet antibody-producing plasma cells. Glycoprotein IIb/IIIa is the main target of antiplatelet antibodies leading to platelet phagocytosis by splenic macrophages, through interactions with Fc gamma receptors (FcγRs) and complement receptors. This allows macrophages to activate autoreactive T cells by their antigen-presenting functions. Moreover, the activation of the classical complement pathway participates to platelet opsonization and also to their destruction by complement-dependent cytotoxicity. Platelet destruction is also mediated by a FcγR-independent pathway, involving platelet desialylation that favors their binding to the Ashwell-Morell receptor and their clearance in the liver. Cytotoxic T cells also contribute to ITP pathogenesis by mediating cytotoxicity against megakaryocytes and peripheral platelets. The deficient megakaryopoiesis resulting from both the humoral and the cytotoxic immune responses is sustained by inappropriate levels of thrombopoietin, the major growth factor of megakaryocytes. The better understanding of ITP pathogenesis has provided important therapeutic advances. B cell-targeting therapies and thrombopoietin-receptor agonists (TPO-RAs) have been used for years. New emerging therapeutic strategies that inhibit FcγR signaling, the neonatal Fc receptor or the classical complement pathway, will deeply modify the management of ITP in the near future.

Generality and triggering factors of immune thrombocytopenia

Immune thrombocytopenia (ITP) is a rare autoimmune disease with an incidence around 3/100,000 person-years, with a peak among males older than 75 years (9/100,000 person-years). Factors initiating ITP are unknown, but seasonal fluctuations have been observed with an increased incidence during winter, suggesting a role for viral infections.¹ However, both persistent and chronic ITP (>3 mo, and >12 mo after diagnosis, respectively) affect 70% of adult patients and are less prone to such fluctuations, suggesting the involvement of other factors.

Although genetic predispositions such as major histocompatibility complex (MHC) subtypes, cytokine or cytokine receptor polymorphisms, have been reported as favoring factors of ITP or involved in its maintenance, none appears relevant in clinical practice.² Innate lymphoid cells (ILC) could participate in the initiation of the autoimmune process as supported by the expansion of splenic ILC1 that produce the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-2 and interferon (IFN)-γ.³

ITP is referred to as secondary—that is, associated to another disease—in 20% of cases, mostly hematological malignancies, followed by systemic autoimmune diseases such as lupus, infections, and primary immune deficiencies.⁴ Among infections, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, hepatitis C virus (HCV), and HIV are the most documented,² with recent reports of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-associated ITP.⁵ These associations are partly due to a molecular mimicry between platelet glycoprotein (GP) IIIa and HIV GP120 or HCV core envelope 1 protein.

Overall, 80% of ITP are considered as primary, favored by a rupture of the immune tolerance leading to an autoimmune process involving both innate and adaptive immune responses.

Peripheral destruction of platelets

An integrative view of ITP pathogenesis is summarized in Figure 1 and Table 1.

Humoral response and antiplatelet antibodies

The involvement of the humoral response against platelets is known since the 1950s when Harrington et al⁶ observed that sera of ITP patients induced thrombocytopenia when infused to healthy volunteers. It was further shown that IgG

¹Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence Constitutif des Cytopenies Auto-immunes de l'adulte, Centre Hospitalo-Universitaire Dijon Bourgogne, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, LabEx LipSTIC, Dijon, France

³Service de Médecine Interne, Centre de Référence des Cytopenies Auto-immunes de l'adulte, Centre Hospitalier Universitaire Henri-Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France

⁴Institut Necker Enfants Malades (INEM), INSERM U1151/CNRS UMS 8253, Université de Paris, France

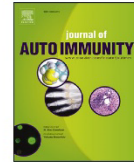
Copyright © 2021 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the European Hematology Association. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal. HemaSphere (2021) 5:6(e574). <http://dx.doi.org/10.1097/HSS.0000000000000574>.

Received: 11 March 2021 / Accepted: 8 April 2021



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

Mucosal-associated invariant T cells in Giant Cell Arteritis

Thibault Ghesquière^{a,b}, Marion Ciudad^{a,b}, André Ramon^{b,c}, Hélène Greigert^{a,b}, Claire Gerard^b, Claudie Cladière^{a,b}, Marine Thébaud^{a,b}, Coraline Genet^b, Hervé Devilliers^d, François Maurier^e, Paul Ornetti^{c,f}, Valérie Quipourt^g, Pierre-Henry Gabrielle^h, Catherine Creuzot-Garcher^h, Georges Tarrisⁱ, Laurent Martinⁱ, Agnès Soudry-Faure^j, Philippe Saas^{b,k}, Sylvain Audia^{a,b}, Bernard Bonnotte^{a,b,1}, Maxime Samson^{a,b,*,1}

^a Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Dijon University Hospital, Dijon, France

^b Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-21000, Dijon, France

^c Department of Rheumatology, Dijon University Hospital, Dijon, France

^d Department of Internal Medicine and Systemic Diseases, Dijon University Hospital, Dijon, France

^e Department of Internal Medicine, Hospital Belle Isle, Metz, France

^f CIC-1432 Plateforme d'investigation Technologique Dijon University Hospital, INSERM UMR1093-CAPS, Université Bourgogne, Dijon, France

^g Department of Internal Medicine and Geriatrics, Dijon University Hospital, Dijon, France

^h Department of Ophthalmology, Dijon University Hospital, Dijon, France

ⁱ Department of Pathology, CHU François Mitterrand, Dijon, France

^j Unité de Soutien Méthodologique, DRCI, Dijon Bourgogne University Hospital, 21000, Dijon, France

^k CIC-1431, INSERM, Besançon University Hospital, EFS Bourgogne Franche-Comté, LabEx LipSTIC, F-25000, Besançon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Giant cell arteritis
Mucosal associated invariant T
Invariant T-cells

ABSTRACT

This study aimed to assess the implication of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in GCA. Blood samples were obtained from 34 GCA patients (before and after 3 months of treatment with glucocorticoids (GC) alone) and compared with 20 controls aged >50 years. MAIT cells, defined by a CD3⁺CD4⁺TCRγδ⁺TCRVα7.2⁺CD161⁻ phenotype, were analyzed by flow cytometry. After sorting, we assessed the ability of MAIT cells to proliferate and produce cytokines after stimulation with anti CD3/CD28 microbeads or IL-12 and IL-18. MAIT were stained in temporal artery biopsies (TAB) by confocal microscopy.

MAIT cells were found in the arterial wall of positive TABs but was absent in negative TAB. MAIT frequency among total αβ-T cells was similar in the blood of patients and controls (0.52 vs. 0.57%; P = 0.43) and not modified after GC treatment (P = 0.82). Expression of IFN-γ was increased in MAIT cells from GCA patients compared to controls (44.49 vs. 32.9%; P = 0.029), and not modified after 3 months of GC therapy (P = 0.82). When they were stimulated with IL-12 and IL-18, MAIT from GCA patients produced very high levels of IFN-γ and displayed a stronger proliferation compared with MAIT from controls (proliferation index 3.39 vs. 1.4; P = 0.032).

In GCA, the functional characteristics of MAIT cells are modified toward a pro-inflammatory phenotype and a stronger proliferation capability in response to IL-12 and IL-18, suggesting that MAIT might play a role in GCA pathogenesis. Our results support the use of treatments targeting IL-12/IL-18 to inhibit the IFN-γ pathway in GCA.

1. Introduction

Giant cell arteritis (GCA) is a large vessel vasculitis that occurs in

people older than 50 years and mainly affects the aorta and cranial arteries. The pathogenesis of GCA is not fully understood but major progress has been made over the last several years, leading to the

* Corresponding author. Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, 14 boulevard Gaffarel, 21000, Dijon, France.

E-mail addresses: maxime.samson@u-bourgogne.fr, maxime.samson@chu-dijon.fr (M. Samson).

¹ both authors share senior authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102652>

Received 18 March 2021; Received in revised form 30 April 2021; Accepted 2 May 2021

Available online 14 May 2021

0896-8411/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect

Nona Janikashvili, Claire Gérard, Marine Thébault, Andrea Brazdova, Clovis Boibessot, Claudie Cladière, Marion Ciudad, Hélène Greigert, Séthi Ouandji, Thibault Ghesquière, Maxime Samson, Sylvain Audia, Philippe Saas & Bernard Bonnotte

To cite this article: Nona Janikashvili, Claire Gérard, Marine Thébault, Andrea Brazdova, Clovis Boibessot, Claudie Cladière, Marion Ciudad, Hélène Greigert, Séthi Ouandji, Thibault Ghesquière, Maxime Samson, Sylvain Audia, Philippe Saas & Bernard Bonnotte (2021) Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect, *OncoImmunology*, 10:1, 1880046, DOI: 10.1080/2162402X.2021.1880046

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1880046>



© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 19 Feb 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1826



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)



Altered distribution and function of splenic innate lymphoid cells in adult chronic immune thrombocytopenia



Sylvain Audia^{a,b,*}, Thomas Moulinet^{a,1}, Marion Ciudad-Bonté^a, Maxime Samson^{a,b}, Olivier Facy^c, Pablo Ortega-Deballon^c, Philippe Saas^a, Bernard Bonnotte^{a,b}

^a Université de Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génétique, F-21000 Dijon, France

^b CHU Dijon Bourgogne, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence Constitutif des Cytopenies Auto-immunes de l'adulte, F-21000 Dijon, France

^c CHU Dijon Bourgogne, Service de Chirurgie Digestive, Cancérologique, Générale et d'Urgence, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Innate lymphoid cells
Immune thrombocytopenia
Spleen

ABSTRACT

Innate lymphoid cells (ILCs) have been characterized as innate immune cells capable to modulate the immune response in the mucosae. Human ILCs have been rarely described in secondary lymphoid organs except in tonsils. Moreover, their function and phenotype in human secondary lymphoid organs during autoimmune diseases have never been studied. We took advantage of splenectomy as a treatment of immune thrombocytopenia (ITP) to describe and compare splenic ILC from 18 ITP patients to 11 controls. We first confirmed that ILC3 represented the most abundant ILC subset in human non-inflamed spleens, accounting for 90% of total ILC, and that they were mostly constituted of NKp44⁺ cells. On the contrary, proportions of ILC1 and ILC2 in spleens were lower than in blood. Splenic IL-2- and IFN- γ -producing ILC1 were increased in ITP. While the frequencies of total splenic ILC3 were similar in the two groups, splenic GM-CSF-producing ILC3 were increased in ITP.

This is the first description of human ILC in a major secondary lymphoid organ during an autoimmune disease, ITP. We observed an expansion of splenic ILC1 that could participate to the Th1 skewing, while the increased production of GM-CSF by splenic ILC3 could stimulate splenic macrophages which play a key role in ITP pathophysiology.

1. Introduction

Innate lymphoid cells (ILC), defined as lymphoid cells that lack the expression of rearranged antigen-specific receptors, are categorized in 3 groups, according to their phenotype, transcription factors and functions. Group 1 ILC includes *Natural Killer* (NK) cells that depend on the transcription factor *Eomes*, and ILC1 that express T-bet and produce IFN- γ in response to IL-12. ILC2 depend on GATA-3 and produce IL-5 and IL-13, while ILC3 are characterized by the expression of ROR γ T and produce IL-17, IL-22 and GM-CSF [1,2]. ILC are mostly localized in the mucosal tissue (gut, lungs, skin), whereas they represent only a minor part of the immune cells in blood and in secondary lymphoid organs (SLO). They participate to the initiation of the immune response and modulate the adaptive immune response by promoting B cell activation and antibody production, and by activating or inhibiting T cell functions [3–6]. Thus, ILC are innate cells that physiologically participate to tissue homeostasis and orchestrate the first steps of the adaptive

immune response. There is also growing evidence for their role in human pathology [7], notably in autoimmune diseases (AID) such as systemic sclerosis [8], psoriasis [9], during the early stages of rheumatoid arthritis [10] and also in graft versus host disease [11].

Immune thrombocytopenia (ITP) is an AID with a complex pathogenesis that is better understood [12]. Briefly, B-cells produce anti-platelet antibodies that facilitate the phagocytosis of platelets by splenic macrophages. The stimulation of B cells and the production of auto-antibodies occur in the spleen and are orchestrated by T follicular helper cells [13]. Splenic T lymphocyte polarization is skewed to Th1 and cytotoxic T cells also participate to platelet destruction [12].

Here, we aimed to determine whether splenic ILC frequencies and functions were altered during ITP. We also compared the proportion and phenotype of ILC subsets between spleen and blood of healthy controls.

* Corresponding author. Batiment B3, INSERM 1098, 15 rue Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon, France.

E-mail address: sylvain.audia@u-bourgogne.fr (S. Audia).

¹ Both authors contribute equally.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.07.015>

Received 2 May 2018; Received in revised form 16 July 2018; Accepted 18 July 2018

Available online 23 July 2018

0896-8411/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Etude des populations lymphocytaires T au cours de l'anémie hémolytique auto-immune

L'anémie hémolytique auto-immune à auto-anticorps chaud (AIHA) est une maladie auto-immune rare, acquise et à l'origine d'une destruction des GR par des auto-Ac ciblant certains Ag érythrocytaires membranaires (protéines Rhésus, protéine bande 3, glycophorine A). Le rôle des populations lymphocytaires T helper (Th) CD4+ dans la physiopathologie a été peu étudié et la plupart des résultats sont extrapolés de modèles murins. Bien que cela soit encore débattu, l'AIHA pourrait être associée à une polarisation pro-inflammatoire de type Th17 et à un déficit quantitatif en lymphocytes T régulateurs (Treg).

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la première étude concomitante des LT effecteurs et des Treg circulants, ainsi qu'une étude fonctionnelle et transcriptomique des Treg de patients atteints d'AHAI au diagnostic. Nous avons observé une orientation des LT effecteurs vers une polarisation Th17 accompagnée d'une diminution des Treg circulants, principalement des Treg effecteurs. Ce déficit quantitatif est associé à une diminution de la capacité des Treg à inhiber la

prolifération des LT effecteurs, ce qui semble favoriser d'avantage la polarisation Th17.

Le déficit en Treg est associé à une diminution du niveau d'expression de la protéine Foxp3, le facteur de transcription dominant des Treg, qui assure la stabilité de leur phénotype et le maintien de leurs fonctions suppressives. Le profil transcriptomique des Treg des patients a révélé : |1. Un fort engagement des voies de signalisation du TNF dans les Treg, en accord avec une augmentation significative du TNF- α sérique chez les patients. |2. Un rôle possible de mécanismes post-traductionnels conduisant à la dégradation de Foxp3 à l'origine des dysfonctionnements des Treg.

A travers ce travail nous rapportons deux observations majeures pour la compréhension de la physiopathologie de l'AHAI, l'augmentation du TNF- α sérique chez les patients AHAI au diagnostic ainsi que le déficit quantitatif et fonctionnel des Treg circulants. Bien que les aspects mécanistiques ou les liens entre ces deux observations restent à préciser, elles nous permettent d'ores et déjà d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques pour les patients tels que le renforcement des populations Treg et/ou la neutralisation de la production du TNF- α .

AHAI, Treg, Th17, TNF- α

T cell lymphocytes in warm autoimmune hemolytic anemia

Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) is a rare acquired autoimmune disease mediated by antibodies targeting red blood cells. The involvement of CD4 T helper (Th) cells has been scarcely explored, with most findings extrapolated from animal models. Although it is still debated, wAIHA is thought to be associated with a pro-inflammatory Th17 polarization and a quantitative deficit of regulatory T cells (Treg).

In this work, we performed the first concomitant quantification of circulating effector T lymphocytes (Teff) and Treg, associated with functional and transcriptomic analyses of Treg in human wAIHA at diagnosis. We observed a shift towards a Th17 polarization of Teff and a decrease in circulating Treg, notably effector Treg. This quantitative deficit was associated with an impairment of Treg capability to inhibit Teff proliferation and promoted the Th17

skewing. Treg deficiency was related to the diminished Foxp3 protein level, the master transcription factor maintaining phenotype stability and suppressive functions of Treg.

The transcriptomic profile of patients' Treg revealed: |1. A strong engagement of TNF signaling pathways in Treg, consistent with serum TNF- α increase in patients. |2. A possible role of post-translational mechanisms leading to Foxp3 downregulation accounting for Treg dysfunctions.

Through this work, we report two novel and major observations for the understanding of wAIHA pathophysiology: the increase of serum TNF- α in patients at diagnosis, and both a quantitative and functional deficit of circulating Treg. Although the mechanistic aspects and the links between these two observations remain to be clarified, they allow us to consider new therapeutic axes for patients such as Treg strengthening and/or the neutralization of TNF- α production.

wAIHA, Treg, Th17, TNF- α