



HAL
open science

ÉTUDE DES CELLULES LYMPHOÏDES INNÉES SPLÉNIQUES HUMAINES ET DE LEURS IMPLICATIONS AU COURS DE LA THROMBOPÉNIE IMMUNOLOGIQUE

Marion Ciudad

► **To cite this version:**

Marion Ciudad. ÉTUDE DES CELLULES LYMPHOÏDES INNÉES SPLÉNIQUES HUMAINES ET DE LEURS IMPLICATIONS AU COURS DE LA THROMBOPÉNIE IMMUNOLOGIQUE . Immunologie. 2018. hal-01824009

HAL Id: hal-01824009

<https://ephe.hal.science/hal-01824009>

Submitted on 28 Jun 2018

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.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par
Marion CIUDAD

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**ÉTUDE DES CELLULES LYMPHOÏDES INNEES SPLENIQUES
HUMAINES ET DE LEURS IMPLICATIONS AU COURS DE LA
THROMBOPENIE IMMUNOLOGIQUE**

Soutenu le 11 juin 2018 devant le jury suivant :

Pr Bruno CANQUE - Président
Dr Frédérique VEGAN - Rapporteur
Dr Yann GODET - Examineur
Pr Bernard BONNOTTE - Tuteur scientifique
Dr Sylvain AUDIA - Tuteur scientifique
Dr Catherine PAUL - Tuteur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr Bernard BONNOTTE et Dr Sylvain AUDIA
Equipe Immunorégulation, Immunopathologie
Directeur : Pr Philippe SAAS
Université de Bourgogne Franche-Comté - UMR INSERM 1098

Dr Catherine PAUL
Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers
Directeur : Pr Ali BETTAIEB
EA7269 - UBFC - EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier les membres de mon jury, **Dr Frédérique VEGRAN**, rapporteur, **Dr Yann GODET**, examinateur, **Pr Bruno CANQUE**, président de jury, merci à vous qui me faites l'honneur de juger ce travail.

Pr BONNOTTE, Tuteur scientifique et grand maitre s'il en est... Bernard, cela fait déjà 8 années que j'ai l'honneur de travailler à vos côtés. Vous avez su préserver, non sans adversité, cette très belle équipe de recherche, brillante, soudée, intègre, mais toujours empreinte d'un petit brin de folie ! Cette équipe est à votre image et il faut bien l'avouer, je suis incapable d'envisager mon avenir professionnel loin de la BB team...

Je vous remercie de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans la réalisation de ce projet, merci de votre disponibilité et de votre honnêteté, j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Je voulais également vous remercier de m'accorder au quotidien tant de liberté et de confiance, essentiel à mon épanouissement professionnel... Merci pour ces petits moments, toujours très professionnels, partagés en toute simplicité autour d'un café (on contribue largement à l'enrichissement de la société des machines à café...)

Soyez assuré, Professeur, de ma profonde admiration, et de ma sincère amitié.

Dr AUDIA, Tuteur scientifique. Cher Sylvain, voilà maintenant trois ans que nous avons initié ce projet avec Thomas et malgré des résultats parfois déconcertants, voir décevants, je me suis éclatée ! Un immense merci pour le soutien, la confiance et la liberté que tu m'as accordé pour conduire ce travail, et pour la réelle attention que tu as porté à la correction de mon manuscrit.

L'étendue de tes connaissances souvent m'intimide et il te suffit généralement d'une phrase pour contrecarrer mes théories les plus réfléchies... (fort heureusement pour les finances de l'équipe !) C'est un honneur et un grand plaisir pour moi de travailler sur tes projets, merci de ta disponibilité et de ta patience, j'espère pouvoir continuer à apprendre à tes côtés dans les années à venir.

Ils ont raison, tu es un tueur... J'adore !

Dr PAUL, Tuteur pédagogique. Catherine, un grand merci pour tes précieux conseils, tes corrections pertinentes, la confiance que tu m'as témoignée et ton réel soutien face à mes... comment dire... incertitudes !

Je ne sais pas combien de fois je suis passée te voir, mais pour moi les choses sont toujours plus claires après un petit passage par ton fauteuil d'invité... Merci de ton amitié et de ton immense disponibilité ! Pour toujours tu resteras ma tut et sois assurée de ma créativité pour trouver d'autres prétextes à mes petites visites impromptues... Merci.

Un immense merci à vous, très chers membres de la **BB team**. Je vous ai tous énormément sollicité durant cette très très longue période de rédaction... Merci de votre disponibilité et de votre très précieux soutien, c'est une chance pour moi d'être chaque jour à vos côtés ! **Maxime**, il est bon de te revoir parmi nous ! C'est un grand plaisir de travailler avec toi, merci de ta

disponibilité, de ta confiance et de ton amitié. **Thomas**, on a initié ce projet ensemble puis tu as rejoint d'autres horizons... Ce fut un plaisir de découvrir avec toi les joies et les aléas des ILC !

Marine, un grand merci pour ta précieuse aide, passée et à venir... Tu es une très belle rencontre pour moi, et la perspective d'un petit we au temple ou de séjour en Inde me réjouit! Claudie, on ne se connaît pas encore très bien je pense que tu te plairas dans cette équipe... Bienvenue !

Claire, Thibault, Hélène, je suis désolée mais vous allez en baver, c'est certain... Soyez assurés cependant de mon soutien technique, psychologique ou philosophique selon les besoins... vous savez où est mon bureau ! **Jonathan**... On ne s'est jamais rencontré certes, mais tu m'as déjà sauvée de nombreuses galères !! Un grand merci pour Endnote et Adobe... Sûr que tu ne peux rien faire pour VR ??

Cindy, Leslie, Malika, Nona, Alexandrine. Vous étiez toutes là (ou presque) lorsque cette histoire a commencé. A peine mon premier contrat de travail signé à l'U517, je me demandais déjà : Bon, quand est ce que je reprends mes études... Après avoir modestement accompagné nombre d'entre vous dans vos brillantes études, j'ai enfin fait un petit bout de chemin...

Depuis, nos orientations professionnelles nous ont quelque peu séparés, Vincent nous a quitté et vous n'étiez pas là lorsque mon tour était venu de pleurer dans les toilettes... Pour autant vous avez été très présentes pour moi pendant ces trois années. J'ai très souvent pensé à vous, à vos conseils, merci de votre indéfectible soutien, merci d'être mes amies, vous me manquez. Soyez assurées mesdames de ma sincère admiration.

Cindy, tiens bon !!

Je tiens également à remercier le **Professeur Philippe Saas**, qui dirige l'UMR Inserm 1098, merci à toute l'**unité INSERM 1098**, et merci à l'**équipe du plateau technique de cytométrie** de l'UB pour leur soutien technique et la mise à disposition d'outils toujours plus performants. Merci au **CHU F. Mitterrand**, mon employeur, de m'avoir soutenu dans la réalisation de mon projet et d'avoir assuré la prise en charge financière de ces 3 années de formation.

Un grand merci à tous **les patients** pour leur altruisme, leur générosité et merci à la **direction de la recherche clinique et de l'innovation** du CHU de Dijon pour leur aide dans la mise en place et la conduite des protocoles.

Merci à vous **mes amis, ma famille**, pour votre soutien, votre compassion et les très belles et très nombreuses attentions que j'ai reçu pendant la rédaction...

C'est enfin à ma petite famille, que j'adresserai mes plus chers remerciements. **Mathieu, Zoé, Salomé**, tout au long de ce projet, vous m'avez incroyablement soutenu, encouragé et... supporté ;-). Merci pour les plateaux goûter, les relectures, les pâtisseries réconfortantes, les bonbons, les gren, les tableaux d'encouragement... Vivre à vos côtés me comble de bonheur. Tu as raison Salom, je fais beaucoup trop d'écran !! Je vous aime.

SUPPORT MUSICAL : Ibrahim maalouf, live tracks - Stanley et Dom La Nena - Yann tiersen, Eusa – Sissoko & segal, chamber music - Rokai traoré, Tchamantché - Nirvana, Nevermind (après minuit...)

TABLE DES MATIERES

Remerciements	1
Table des matières	2
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	5
Liste des annexes.....	5
Abréviations	6
Introduction.....	8
1 La rate	10
1.1 Anatomie de la rate.....	10
1.2 Fonctions immunologiques spléniques.....	12
2 Les cellules lymphoïdes innées	22
2.1 Découverte, définition et nomenclature	22
2.2 Classification des ILC	24
2.3 Ontogénie	28
2.4 Plasticité.....	32
2.5 Fonctions des ILC auxiliaires	33
3 La thrombopénie immunologique (PTI).....	41
3.1 Définition	41
3.2 Manifestations cliniques du PTI.....	41
3.3 Etiologies.....	42
3.4 Physiopathologie du PTI.....	43
3.5 Prise en charge thérapeutique et mécanismes d'échappement.....	51
4 Problématique	56
Matériel et méthode	57
1 Cohorte de patients	57
2 Méthodologie	58
2.1 Séparation des cellules mononucléées sanguines	58
2.2 Dissociation et conservation des prélèvements spléniques	58
2.3 Immunophénotypage.....	59
2.4 Tri des ILC spléniques.....	62
2.5 Expansion des ILC spléniques	63
2.6 Analyses statistiques	63
Résultats.....	64
1 Identification des ILC auxiliaires spléniques	64
2 Etude phénotypique des ILC auxiliaires spléniques au cours du PTI.....	66
2.1 Elaboration du phénotype d'intérêt.....	66
2.2 Quantification des ILC	68
2.3 Caractérisation phénotypique des ILC spléniques au cours du PTI	68
3 Expérience d'expansion des ILC.....	79
Discussion	85
Bibliographie	94
Annexes	114

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure macroscopique de la rate

Figure 2 : Microanatomie de la pulpe blanche splénique humaine

Figure 3 : Synapse immunologique

Figure 4 : Polarisation lymphocytaire T CD4⁺

Figure 5 : Dynamique de la maturation des LB dans le centre germinatif

Figure 6 : Les cellules lymphoïdes innées auxiliaires

Figure 7 : Ontogénie des ILC murines

Figure 8 : ILC-poïèse

Figure 9 : Plasticité des ILC auxiliaires chez l'Homme

Figure 10 : Analyse transcriptomique des populations lymphocytaires innées et adaptatives

Figure 11 : Physiopathologie du PTI

Figure 12 : Stades et thérapeutiques de la thrombopénie immunologique

Figure 13 : Banc optique du cytomètre BD Canto 10 et fluorochromes utilisés pour l'immunophénotypage

Figure 14 : Représentation de la fuite spectrale des fluorochromes – Matrice de compensation

Figure 15 : Stratégie d'identification des ILC sanguines et spléniques en cytométrie en flux

Figure 16 : Quantification des ILC auxiliaires et de leurs sous-populations dans les compartiments sanguins et spléniques

Figure 17 : Expression des molécules d'adressage et du CMH-II des ILC spléniques et sanguines

Figure 18 : Quantification des ILC auxiliaires spléniques

Figure 19 : Expression des facteurs de transcription et de Ki67 par les ILC spléniques

Figure 20 : Expression des molécules d'adressage par les ILC spléniques totales

Figure 21 : Expression de HLA-DR et des molécules de costimulation par les ILC spléniques totales

Figure 22 : Sécrétion de cytokines par les ILC totales

Figure 23 : Phénotype des ILC1 spléniques au cours du PTI (molécules d'adressage, d'activation et cytokines)

Figure 24 : Corrélation entre l'expression de CXCR3 et la sécrétion d'IFN- γ par les ILC1 au cours du PTI

Figure 25 : Les ILC3 spléniques au cours du PTI

Figure 26 : Sécrétion cytokinique des ILC3 spléniques

Figure 27 : Fréquence et intensité d'expression de HLA-DR et des molécules de costimulation par les ILC3 spléniques

Figure 28 : Identification des 3 sous-populations d'ILC3 dans la rate d'un patient atteint de PTI

Figure 29 : Répartition des populations d'ILC3 spléniques

Figure 30 : Corrélation entre la fréquence des ILC1 CD62L⁺ et des ILC3 NCR⁻CD62L⁺

Figure 31 : Fréquence des ILC3 et ILC1 spléniques au cours du PTI en fonction de la réponse à la splénectomie

Figure 32 : Représentation des sous-populations d'ILC3 en fonction de la réponse à la splénectomie
Figure 33 : Sécrétion cytokinique par les ILC totales en fonction de la réponse à la splénectomie
Figure 34 : Identification et répartition des sous-populations des ILC triées par cytométrie en flux
Figure 35 : Phénotype des sous-populations d'ILC spléniques après 7 jours de stimulation - Exemples des cellules en conditions « non stimulées » et en présence d'IL-2, IL-7 et IL-23.
Figure 36 : Prolifération et répartition des sous-populations d'ILC au cours de l'expansion induite par différentes cytokines
Figure 37 : Evolution phénotypique des ILC au cours de leur prolifération induite par différents cocktails de cytokines
Figure 38 : Implication des ILC dans la physiopathologie du PTI

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des patients splénectomisés
Tableau 2 : Composition du cocktail d'exclusion (Lin)
Tableau 3 : Liste et provenance des anticorps utilisés pour l'immunophénotypage
Tableau 4 : Score d'expression des antigènes étudiés

LISTE DES ANNEXES

Article en révision : Altered distribution and function of splenic innate lymphoid cells in adult chronic immune thrombocytopenia.

Autres publications

ABRÉVIATIONS

- A** Ac : Anticorps
ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*
Ag : Antigène
AHR : *Aryl Hydrocarbon Receptor*
AICD : *Activation-Induced Cell Death*
APC : Allophycocyanin
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
- B** BAFF : *B-cell Activating Factor of the TNF Family*
Bax : *Bcl-2-Associated X protein*
Bcl : *B-cell lymphoma*
BCR : *B-cell receptor*
BPCO: broncho-pneumopathie chronique obstructive
BSA : *Bovine Serum Albumin*
BV: *Brillant Violet*
- C** CD : *Cluster de Différenciation*
CCL/CXCL/ XCL : chémokines de motif CC, CXC et XC
CCR/CXCR : Récepteur de chémokine de motif CC et CXC
CDC : *Complement Dependent Cytotoxicity*
CG : Centre germinatif
CHILP : Commun Helper Innate Lymphoid Progenitor
CILP : *Common Innate Lymphoid Precursors*
CLP : *Common Lymphoid Precursors*
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
c-Mpl1 : récepteur de la thrombopoïétine
CMV : *Cytomégalovirus*
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
Cre : *Causes recombination* - recombinaise
CRTh2 : *Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on T-Helper type 2 cells*
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*
- D** DC : *Dendritic cells*
DICV : Déficit immunitaire commun variable
DMSO : Diméthylsulfoxyde
- E** EBV : *Epstein-Barr Virus*
Eomes: Eomesodermin
ETS1 : *Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1*
- F** Fas-L: *Apoptosis Stimulating Fragment Ligand*
FcγR : Récepteur du fragment Fc γ des immunoglobulines
FITC: *Fluorescein Isothiocyanate-5*
FSC : *Forward Scatter*
FDC : *Follicular Dendritic cells*
Foxp3 : Forkhead/winged-helix box protein 3
- G** GATA-3: GATA binding protein 3
G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*
Gfi1: *growth factor independent 1*
GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GP : Glycoprotéine
GvHD : *Graft versus host disease*
- H** HLA-DR : *Human Leukocyte Antigen – antigen D Related*
HMS: Hypermutations somatiques
- I** IAP : *Integrin Associated Protein*
ICOS : *Inductible T cell COSTimulator*
ID2 : *DNA-binding protein inhibitor 2*
IDO : *Indoleamine 2,3-dioxygenase*
IELC1 : *intra-épithelial ILC1*
IFN-γ : Interferon-γ
Ig : Immunoglobuline

- IgIV : Immunoglobulines polyvalentes
IntraVeineuses
iILC2 : *Inflammatory ILC2*
IL : Interleukine
ILC : *Innate Lymphoid Cell*
ILCP : *Innate Lymphoid Cell Precursor*
Iono : Ionomycine
ISC : *Intestinal Stem Cell*
- K** KO : *knock-out*
- L** LB : Lymphocyte B
LS : Lupus Systémique
LT : Lymphocyte T
LTc : *Lymphocyte T cytotoxic*
LTh : *Lymphocyte T helper*
LTi : *Lymphoid Tissues inducer cell*
- M** MAI : Maladies Auto-Immunes
MFI : *Median Fluorescence Intensity*
moDC : *monocyte derived DC*
mTor : *mammalian Target of rapamycin*
- N** NK : *Natural Killers*
nILC2 : *natural ILC2*
NFIL3 : *Nuclear Factor IL-3 regulated*
- P** PALS : *PeriArteriolar Lymphoid Sheaths*
PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*
PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS : *Phosphate buffered saline*
PE : *Phycoerythrin*
PerCP ef710 : *Peridinin Chlorophyll Protein Complex eFluor®710*
PeCy7 : *Phycoerythrin Cyanin7*
PLZF : *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*
PMA : *Phorbol 12-Myristate 23-Acetate*
PMT : *Photomultiplicateur*
- PRR : *Pattern-Recognition Receptors*
PTI : *Thrombopénie immunologique / Purpura Thrombopénique Immunologique*
- R** Rag : *Recombination activating gene*
ROR γ t : *Retinoic acid-related Orphan Receptor- γ t*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
RTX : *Rituximab*
RUNX3 : *Runt-related transcription factor 3*
- S** SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*
SVF : *Serum de Veau Foetal*
SSC : *Side Scatter*
- T** T-bet : *T-box transcription factor*
TCF-1 : *T Cell Factor 1*
TCR : *T Cell Receptor*
Tfh: *T Follicular helper lymphocyte*
TGF β : *Transforming Growth Factor- β*
TIM-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
TIMP-3 : *Metalloproteinase inhibitor 3*
TLR : *Toll Like Receptor*
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α*
Tox : *Thymocyte selection-associated high mobility group box protein*
TPO : *Thrombopoïétine*
TPO-RA: *Thrombopoietin Receptor Agonist*
Treg : *regulatory T lymphocyte*
TSPL : *Thymic Stromal Lymphopoietin*
- V** VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
VIH : *Virus de l'Immunodéficience Humaine*
VHC : *Virus de l'Hépatite C*
VLA-4 : *Very Late Activation antigen-4*

INTRODUCTION

Préambule

Le système immunitaire exerce des fonctions de surveillance, de défense contre les agents infectieux ou le soi altéré, d'auto-régulation et de préservation de l'homéostasie.

Les différentes cellules du système immunitaire prennent naissance dans les organes lymphoïdes primaires (la moelle osseuse et le thymus) et sillonnent l'ensemble de l'organisme à travers le réseau sanguin et le système lymphatique. La coordination de la réponse immunitaire a lieu en périphérie, au sein des organes lymphoïdes secondaires que constituent la rate et les ganglions lymphatiques, mais également au niveau des tissus inflammés par le développement de petites structures lymphoïdes ectopiques, les organes lymphoïdes tertiaires.

Pour être en mesure de répondre à toutes sortes d'aléas, la réponse immunitaire comprend une grande diversité de dispositifs et il est d'usage de distinguer, de manière un peu dogmatique, l'immunité « innée » de l'immunité « adaptative ».

Dès la fin du 19^{ème} siècle, au terme de la « révolution pastoriennne », deux visions de l'immunité s'affrontent : celle de l'école allemande avec Paul Ehrlich, qui s'appuie sur le rôle prépondérant des anticorps (Ac) circulants et celle de l'école franco-russe, avec Elie Metchnikoff, qui place la phagocytose au centre des mécanismes antibactériens. D'un point de vue phylogénétique, le système immunitaire inné est conservé dans l'ensemble des espèces alors que le système adaptatif est retrouvé exclusivement chez les espèces vertébrées à mâchoire (Bleyzac, Exbrayat, & Fellah, 2005).

L'immunité innée constitue le système de défense de première ligne : elle est immédiate et peu spécifique. Elle est activée en présence d'altération du soi, notamment par le défaut d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), ou par la liaison de motifs associés aux microorganismes (*Pathogen-associated molecular pattern* – PAMPs) aux récepteurs PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) (Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997). Les DC (*Dendritic cells* - DC), les monocytes-macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes, les cellules NK (*Natural Killers*) et les cellules lymphoïdes innées (*Innate Lymphoid cell* - ILC), en sont les principaux protagonistes.

La réponse immunitaire adaptative fait suite à la réponse innée : elle est spécifique et à l'origine de la mémoire immunitaire. Les lymphocytes expriment des récepteurs spécifiques d'antigènes (*T Cell Receptor* – TCR ; *B Cell Receptor* - BCR) dont la diversité de reconnaissance est liée aux recombinaisons V(D)J sous l'action des recombinaisons RAG (*Recombination*

Activating Gene). La réponse immunitaire adaptative est orchestrée par les LT auxiliaires (*helper T Lymphocyte* – LTh ou LTCD4⁺), et la réponse immunitaire cellulaire, médiée par les LT cytotoxiques (*cytotoxic T Lymphocyte* - LTc ou LTCD8⁺). Les LB (Lymphocyte B), différenciés en plasmocytes, produisent les anticorps et sont responsables de la réponse à médiation humorale.

Tel que l'énonce Philippe Kourilsky dans son livre intitulé « Le Jeu du hasard et de la complexité : La nouvelle science de l'immunologie », cette opposition entre immunité innée et adaptative a certes l'avantage de la simplicité, mais il n'y a plus lieu de faire une distinction aussi tranchée chez l'homme, compte tenu des interactions permanentes entre ces 2 systèmes. Bien sûr, cette distinction trouve toute sa justification dans la perspective de l'évolution, pour autant, on peut relativiser le sens fonctionnel de cette dichotomie. D'une part, l'immunité adaptative ne s'est pas seulement superposée à l'immunité innée préexistante, elle en est probablement issue (Bleyzac et al., 2005). D'autre part, les différents types de mécanismes développés ont eu le temps évolutif nécessaire pour s'entremêler, s'accorder et se perfectionner.

En effet, Les cellules présentatrices d'antigènes (Ag - CPA), notamment les DC et les macrophages constituent le carrefour entre l'immunité innée et adaptative, en présentant les Ag aux lymphocytes. De surcroît, la nature des signaux « dangers » à l'origine de la stimulation de leurs PRR va moduler leur sécrétion de cytokines et ainsi orienter la polarisation de la réponse lymphocytaire auxiliaire ainsi que la réponse humorale.

A son tour, l'immunité adaptative peut influencer les cellules de la réponse innée par des contacts cellulaires ou la sécrétion de cytokines, chémokines et immunoglobulines (Ig).

Le concept même de mémoire immunologique ne semble plus être l'exclusivité du système adaptatif puisqu'il existe des formes de mémoire chez les cellules innées telles que les cellules NK au cours d'infections virales (O'Sullivan, Johnson, Kang, & Sun, 2015).

La coopération entre ces deux systèmes est primordiale pour une réponse immunitaire optimale anti-infectieuse et antitumorale. Une meilleure compréhension des acteurs de l'immunité innée et de ces interactions avec les cellules adaptatives permettra sans doute de mieux comprendre les mécanismes impliqués au cours des maladies auto-immunes (MAI), inflammatoires et allergiques.

1 La rate

Au cours du développement embryonnaire, tout comme le foie, la rate a des fonctions hématopoïétiques. Après la naissance, elle assure avec les ganglions lymphatiques la fonction d'organe lymphoïde secondaire.

1.1 Anatomie de la rate

Alors que les ganglions constituent un ensemble de plus de 500 petites structures disséminées en amas ou chaîne dans les sites de convergence des vaisseaux lymphatiques, la rate est l'organe lymphoïde secondaire le plus volumineux et elle est directement connectée au réseau sanguin.

Chez l'homme la rate mesure en moyenne 12 cm de long, 8 cm de large et 4 cm d'épaisseur. De forme ovoïde, encapsulé, et situé dans l'hypocondre gauche, cet organe hautement vascularisé a un débit sanguin de 300 ml/min, lui permettant 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 incomplètement la rate, et permet 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 1**).

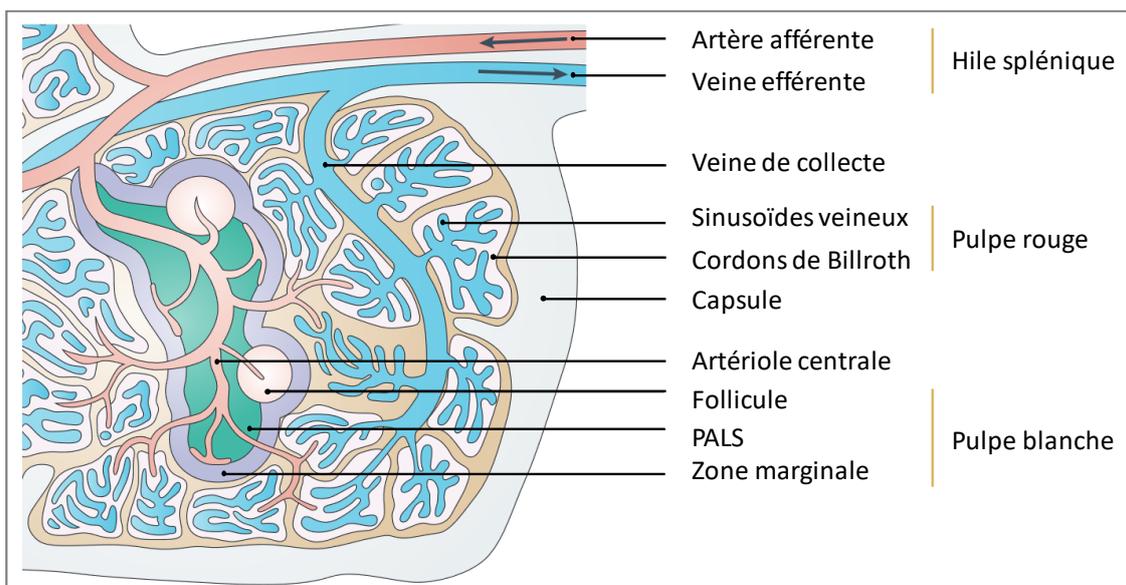


Figure 1 : Structure macroscopique de la rate – Adapté de Mebius, Nature 2005

Deux types de compartiments spléniques sont distingués macroscopiquement :

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 sont constitués de fibroblastes et de macrophages (Steiniger, 2015). La pulpe rouge fait le lien entre le réseau artériel et veineux splénique et doit sa pigmentation aux érythrocytes qui la constituent (Mebius & Kraal, 2005; Turner & Mabbott, 2017).

Disséminée dans tout le tissu splénique, la pulpe blanche est constituée de lymphocytes T, organisés autour des petites branches artérielles, nommés manchons lymphoïdes périartériolaires (*PeriArteriolar Lymphoid Sheaths* ; PALS) et de LB organisés en follicules et attenants aux PALS. La pulpe blanche est cernée par la zone marginale diffuse. 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, B 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, granulocytes, monocytes et macrophages (Mebius & Kraal, 2005; Steiniger, 2015; Turner & Mabbott, 2017) (Figure 2).

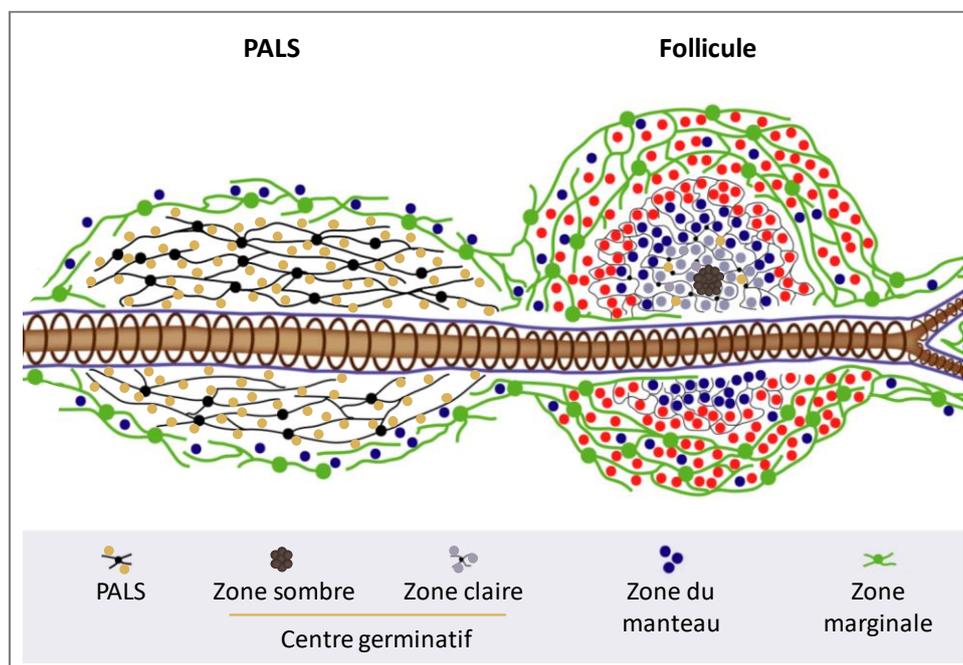


Figure 2 : Microanatomie de la pulpe blanche splénique humaine - Adapté de Steiniger, Immunology 2015

La rate exerce les fonctions propres aux organes lymphoïdes secondaires telles que l'initiation des réponses adaptatives cellulaire et humorale. Cependant, sa localisation sur le réseau artériel et la spécificité de son architecture lui confèrent des propriétés particulières telles que l'immuno-surveillance et la filtration du compartiment sanguin, permettant la

phagocytose et l'élimination des érythrocytes sénescents, des particules opsonisées et des microorganismes circulants (Chadburn, 2000; Mebius & Kraal, 2005).

Elle constitue également un réservoir cellulaire puisque près d'un tiers des plaquettes sont séquestrées dans les cordons de Billroth et qu'elle contient un contingent important de monocytes rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire ou d'inflammation (Kotze et al., 1986; van der Laan et al., 2014).

1.2 Fonctions immunologiques spléniques

1.2.1 La pulpe rouge

Bien qu'elle contienne toutes les lignées hématopoïétiques, les fonctions de la pulpe rouge en conditions physiologiques sont essentiellement le fait des macrophages résidents.

La sénescence des hématies entraîne de très nombreuses perturbations métaboliques, la structure de la membrane plasmique des hématies est désorganisée en raison de l'oxydation des glycoprotéines et des phospholipides qui la constituent (Bratosin et al., 1998). Elles perdent notamment l'expression de CD47, molécule ubiquitaire protectrice, dont la liaison au récepteur inhibiteur SIRP- α (*signal inhibitory regulatory protein α*) exprimé par les macrophages et les polynucléaires, les protègent de la phagocytose (Oldenburg et al., 2000). La fragilisation et la rigidification de la membrane des hématies sénescents entravent leur passage à travers le réseau réticulo-endothélial de la pulpe rouge : elles y sont ainsi piégées puis reconnues et phagocytées par les macrophages (Mebius & Kraal, 2005). C'est ainsi que 5 millions de globules rouges sont éliminés chaque seconde chez l'homme (Bratosin et al., 1998).

En raison de leur petite taille, le passage trans-splénique des débris cellulaires et des microorganismes est ralenti, et ils sont exposés aux macrophages spléniques. Les pathogènes circulants et toutes les particules opsonisées, en se liant aux PRR ou aux récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, activent les macrophages spléniques et sont ainsi phagocytés (Medzhitov & Janeway, 1997; Ravetch, 1997).

Les PRR constituent une grande famille de récepteur principalement représentée par les récepteurs « Toll-like » (*Toll Like Receptor – TLR*) spécifiques de nombreux constituants microbiens, mais également par les récepteurs *Scavenger*, les récepteurs de type lectine ou certaines intégrines.

Les récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines (FcγR) lient les Immunoglobulines G (IgG). Il existe 3 types de récepteurs activateurs, FcγRI (CD64), FcγRIIa/c (CD32a/c), FcγRIII (CD16), et un récepteur inhibiteur, FcγRIIb (CD32b). Les cellules immunitaires peuvent exprimer ces quatre récepteurs de façon simultanée mais leur niveau d'activation dépend de leur expression relative (Wijngaarden et al., 2004).

La phagocytose de microorganismes ou particules opsonisées, en présence de signaux dangers va entraîner la présentation d'Ag sur les molécules de CMH de classe II et l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, indispensables à l'activation des lymphocytes. Suite à leur activation, les CPA diminuent l'expression des récepteurs de chémokines CCR5 (Récepteur 5 de chémokine au motif CC) et CCR6 au profit de CCR7, et se dirigent vers la zone périfolliculaire où les cellules stromales produisent CCL19 (Ligand 19 de chémokines de motif CC) et CCL21, chémokines se liant à CCR7 (Sallusto et al., 1998).

La pulpe rouge est également une niche pour les plasmocytes de longue durée de vie et contient des LTCD8⁺ qui exercent leur action cytotoxique sur les cellules dont ils reconnaissent les Ag présentés sur les molécules de CMH-I.

Dans un contexte infectieux, les DC contenues dans la pulpe rouge sont capables de phagocyter les agents infectieux (Wluka & Olszewski, 2006), d'en présenter certains Ag et d'être activées par les motifs PAMPs *via* les PRR. Les LB naïfs et mémoires, également présents dans la pulpe rouge (Harms Pritchard & Pepper, 2018; Steiniger, Seiler, Lampp, Wilhelmi, & Stachniss, 2014), peuvent reconnaître par l'intermédiaire de leurs BCR les Ag circulants sous leur forme native, les capturer et les présenter à la surface de leurs molécules de CMH-II.

1.2.2 Pulpe blanche

1.2.2.1 Les manchons lymphoïdes péri-artériolaires

De part et d'autre des artéioles spléniques, les cellules stromales expriment les chémokines CXCL21 (Ligand 21 de chémokines de motif CXC) et CXCL19, à l'origine du recrutement des cellules exprimant CCR7, notamment les CPA, les LT naïfs, ou des LB ayant reconnu des Ag natifs. Les manchons lymphoïdes péri-artériolaires (*PeriArteriolar lymphoid Sheaths* – PALS) constituent une structure anatomique centrale pour l'activation et la polarisation des LT.

1.2.2.1.1 Activation des LT

Dans les PALS comme dans les zones corticales des ganglions lymphatiques, les lymphocytes naïfs criblent la surface des CPA matures, à la recherche d'un complexe CMH-peptide de même spécificité que leur TCR. S'en suivent 3 étapes indispensables à leur activation complète (**Figure 3**).

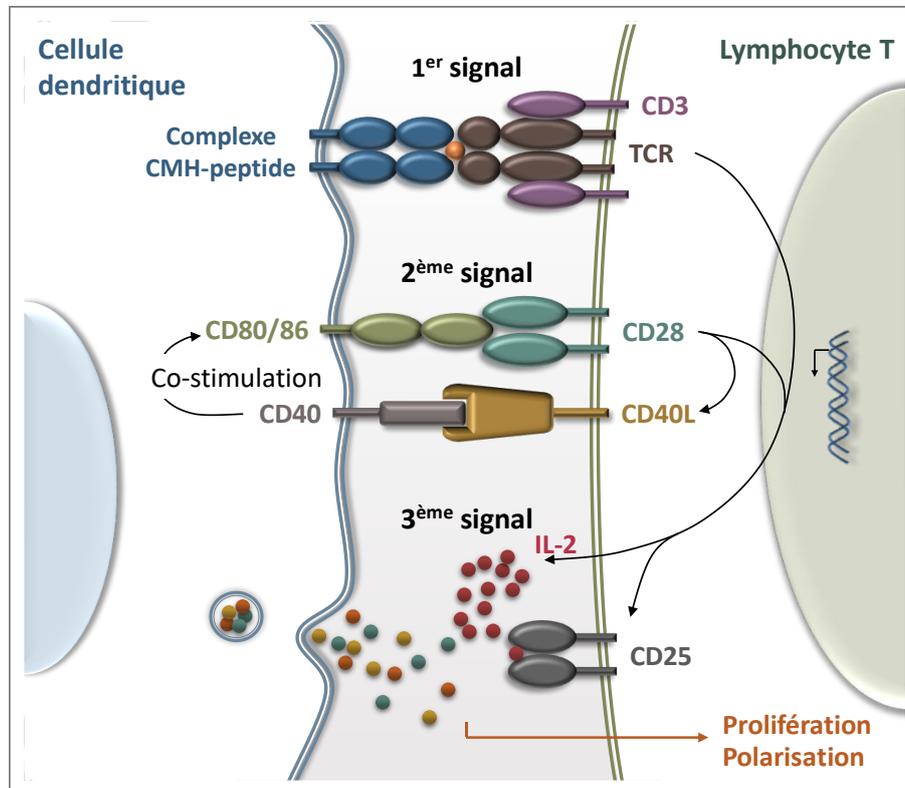


Figure 3 : Synapse immunologique

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 de 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 transcription anti-apoptotiques et la production de l'IL-2 (Interleukine-2), facteur de croissance majeur pour les LT.

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 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 de CTLA-4 (*cytotoxic T Lymphocyte antigen*), corécepteur de plus haute affinité que CD28, qui va entrer en compétition pour lier CD80 et CD86, et transmettre un signal inhibiteur.

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 marqueurs de costimulation conduit à l'activation de la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), à la sécrétion d'IL-2, et à l'expression de la chaîne α de son récepteur (chaîne de haute affinité - CD25). Ainsi les cellules entrent en cycle cellulaire pour une prolifération clonale.

Le troisième signal est lié à la signalisation du récepteur de l'IL-2 et la sécrétion de cytokines par les CPA qui orientent la polarisation des lymphocytes.

Les LT auxiliaires, par l'expression du CD4 reconnaissent les molécules du CMH-II tandis que les LT cytotoxiques, CD8⁺ reconnaissent les molécules de classe I. Alors que l'activation du LTCD4⁺ est indépendante, celle des LTCD8⁺ requiert l'activation des LTCD4⁺ qui supportent leur prolifération par la production d'IL-2.

1.2.2.1.2 Polarisation lymphocytaire

Dans la rate comme dans les ganglions lymphatiques, la sécrétion de cytokines par les CPA va être modulée en fonction de l'environnement, « signaux dangers » notamment, ce qui va entraîner une modulation de la polarisation des lymphocytes.

Les LT CD4⁺ activés présentent une diversité phénotypique et fonctionnelle très importante. On distingue dans la fonction effectrice trois voies majeures de polarisation (Th1, Th2 et Th17) que nous détaillerons par la suite (**Figure 4**), et deux voies aux propriétés inflammatoires dont la découverte est plus récente (Th22 et Th9). Indépendamment de la nature et de la provenance de l'Ag, les CPA induisent également l'engagement des LTCD4⁺ vers deux voies particulières et essentielles à toute réponse immunitaire : les Tfh (*T Follicular helper*), indispensables à l'induction d'une réponse humorale mémoire et les LT régulateurs induits (iTreg), essentiels à la régulation des réponses cellulaires et humorales.

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 (**Figure 4**). Sous la dépendance du facteur de transcription T-bet (*T-box transcription factor*), les Th1 expriment les récepteurs de chémokines CXCR3 et CCR5. Les LTh1 vont produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ (interféron- 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 NK (Del Prete, 1992; Mosmann & Coffman, 1989).

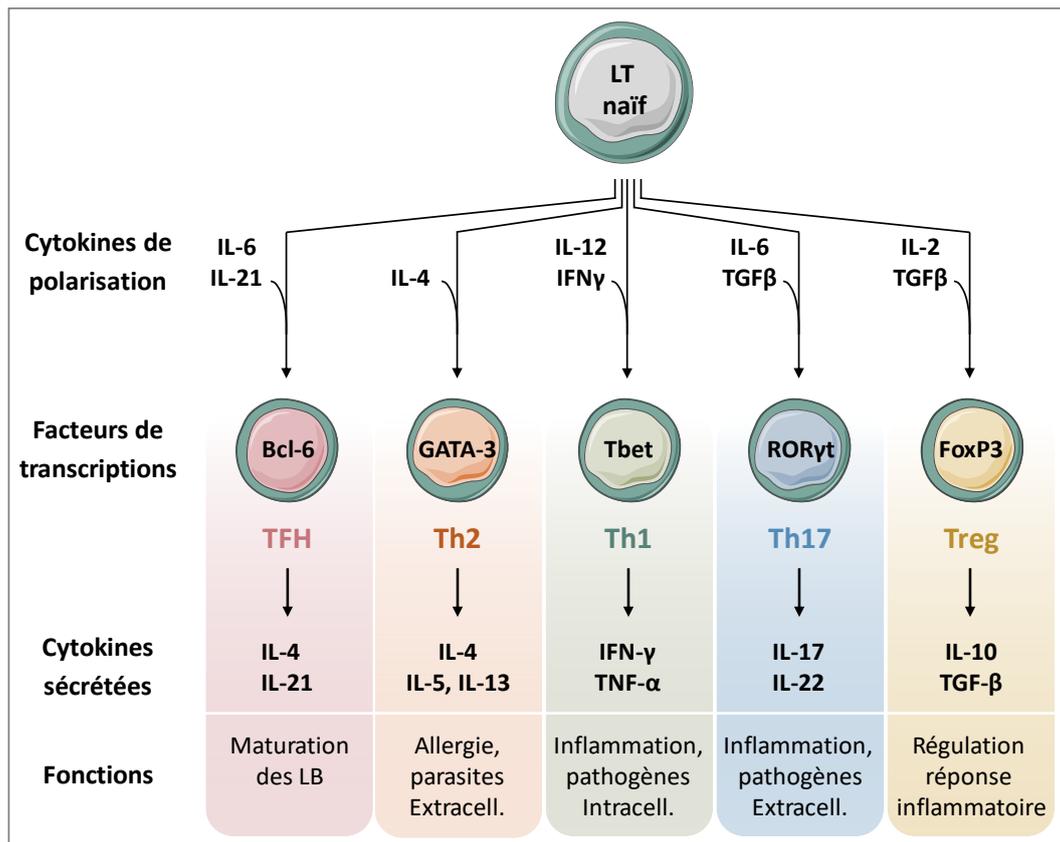


Figure 4 : Polarisation lymphocytaire TCD4⁺

La sécrétion de l'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 2006). Les LTh2 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 tel 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 entrainer le recrutement de polynucléaires éosinophiles et des mastocytes (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012; Mosmann & Coffman, 1989).

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 (*Transforming Growth Factor- β*) (Puel et al., 2011; Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006). Les Th17 sont caractérisés par l'expression de ROR γ t (*Retinoic acid-related Orphan Receptor- γ t*), CCR6 et sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-17 A et F et IL-21 (Ivanov et al., 2006).

L'engagement des lymphocytes dans l'une de ces 3 voies réprime la polarisation vers les autres axes. Ainsi, la sécrétion d'IFN- γ ou d'IL-4 inhibe la polarisation Th17, alors que 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, Kawashima, Hot, Miossec, & Miossec, 2010). T-bet réprime les

gènes associés à la polarisation Th2 tel que GATA3 et IL-4 alors que GATA3 inhibe indirectement la transcription de l'IFN- γ (Djuretic et al., 2007; Hwang, Szabo, Schwartzberg, & Glimcher, 2005). Néanmoins, il ne s'agit pas d'une différenciation définitive et en fonction de l'environnement, un lymphocyte T peut évoluer d'une polarisation à l'autre, ce qui traduit sa plasticité.

Les lymphocytes CD8⁺ ont une activité cytotoxique, mais ils participent également à la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, modulant ainsi l'environnement cytokinique. Par analogie aux LT auxiliaires, on distingue les LTc1 sous la dépendance de T-bet et producteurs d'IFN- γ ; les LTc2, exprimant GATA3 et l'IL-4 ; les LTc17, sous la dépendance de ROR γ t et sécrétant de l'IL-17.

Les LT régulateurs induits (iTreg) sont des cellules immunosuppressives générées en périphérie à partir de LT naïfs, distinctes des Treg naturels (nTreg) dont la différenciation est achevée dès leur sortie du thymus. En réponse au TGF- β et l'IL-2, les LT expriment Foxp3 (*Forkhead/winged-helix box protein 3*), augmentent leur expression du récepteur de l'IL-2 et produisent les cytokines régulatrices IL-10 (Tr1) et TGF- β (Th3) (Chen et al., 2003).

Enfin, les LTfh sont définis comme la population lymphocytaire T spécialisée dans la maturation des LB (Crotty, 2011). Dans la zone T, 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; Nurieva et al., 2009). 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; Nurieva et al., 2008).

Les Tfh nouvellement différenciés expriment fortement CXCR5 et diminuent leur expression de CCR7, ce qui conduit à leur attraction vers les zones B et leur colocalisation avec les DC folliculaires (FDC) qui expriment CXCL-13.

1.2.2.1.3 Interactions lymphocyte B / Lymphocyte Tfh

Dans les PALS, les LB activés par la reconnaissance d'Ag natifs expriment les marqueurs de costimulation CD40, CD80 ou OX40, le récepteur de chémokine CXCR5 et sont attirés vers les centres germinatifs. A l'interface des zones T et B, leur rencontre avec les Tfh conditionne la voie de maturation dans laquelle ils vont s'engager (Qi, Cannons, Klauschen, Schwartzberg, & Germain, 2008) :

- Si l'interaction entre le CHM-II des LB et le TCR des lymphocytes T folliculaires de même spécificité est de courte durée, les LB s'orientent vers une réponse extra-folliculaire qui se traduit *in fine* par la génération, dans la zone marginale, de plasmocytes de courte durée de vie et la sécrétion d'Ig de faible affinité.
- A contrario, un contact prolongé, va engager les LB vers une maturation T dépendante dans le centre germinatif.

1.2.2.2 Le centre germinatif

Dans les organes lymphoïdes secondaires, le centre germinatif (CG) est une structure transitoire et adjacente aux PALS, constituée de Tfh, LB, FDC, et de macrophages. Contrairement à la réponse extra-folliculaire, la réponse du centre germinatif est à l'origine de la maturation d'affinité des Ig, de 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 (Mesin, Ersching, & Victora, 2016).

Dans le centre germinatif, les interactions très nombreuses entre les Tfh et les LB sont furtives mais au centre d'une coopération très étroite. La signalisation répétée *via* le TCR des Tfh est à l'origine d'une modulation de l'expression des récepteurs ICOS, CD40L, et de la sécrétion d'IL-21 et d'IL-4. Ceci leur permet d'accompagner la progression des LB à travers le CG et d'orchestrer leur processus de maturation (Shulman et al., 2014; Weinstein et al., 2016) (**Figure 5**).

La formation de la zone sombre du CG résulte de l'interaction LB/Tfh, notamment de la signalisation *via* la molécule de costimulation CD40, qui induit une prolifération clonale des LB alors appelés centroblastes en raison de l'élargissement de leur cytoplasme. En périphérie de la zone sombre, les Tfh sécrètent de l'IL-4, IL-21 et BAFF (*B-cell Activating Factor of the TNF Family*), stimulant ainsi les mécanismes d'hypermutation somatique (HMS) des centroblastes, c'est-à-dire la génération de mutations ponctuelles dans la zone CDR3 des gènes codant pour les Ig, à l'origine de la maturation d'affinité des récepteurs à l'Ag, la perte de l'expression des Ig membranaire et la commutation de classe isotypique (sous la dépendance de CD40/CD40L) (Weinstein et al., 2016). Progressivement, les centroblastes sont repoussés vers la zone claire du follicule, moins dense en cellules, où ils sont nommés centrocytes.

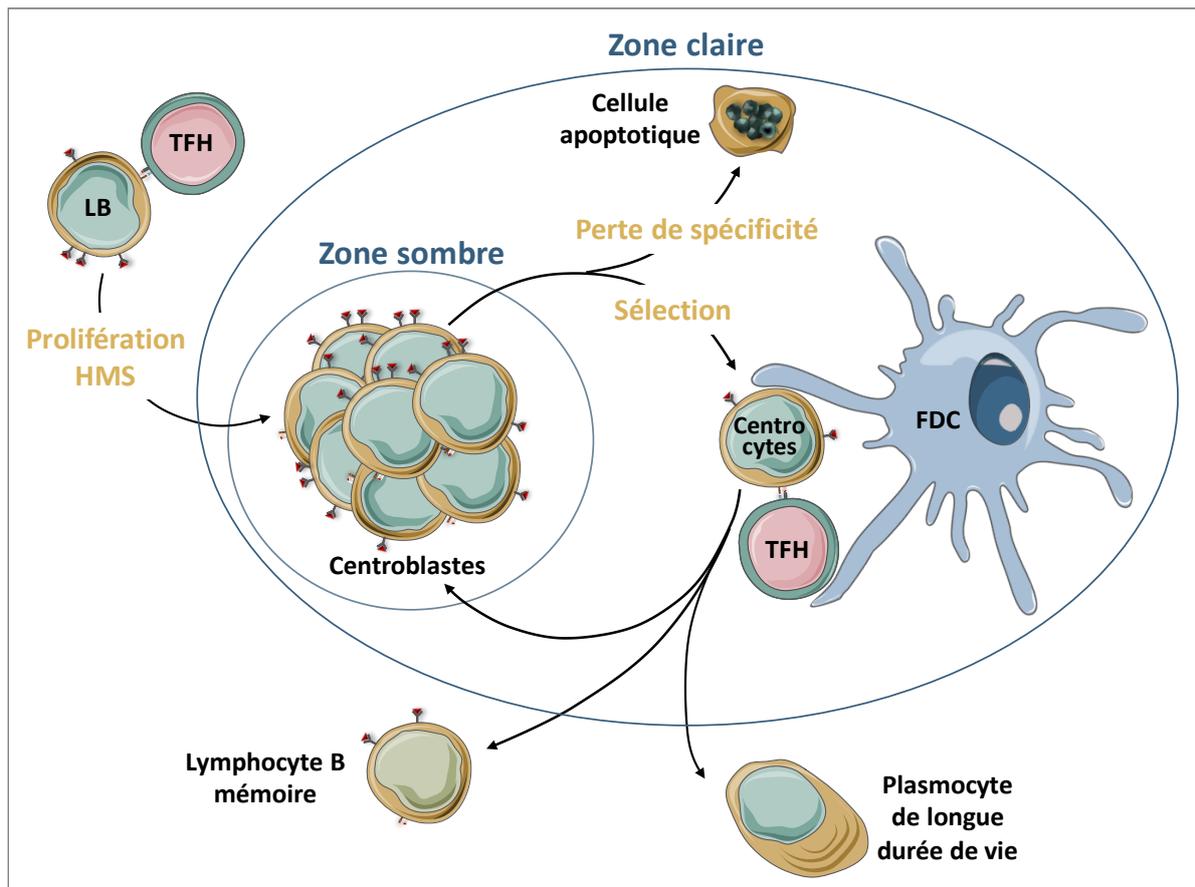


Figure 5 : Dynamique de la maturation des LB dans le centre germinatif (CG)– Adapté de Kurosaki, Nature revue immunology 2015

A l'interface des zones T/B, la rencontre entre un LB et un TFH de même spécificité et plus particulièrement une forte signalisation CD40/CD40L, est à l'origine de la zone sombre du CG par une expansion clonale des cellules B spécifiques, alors appelées centroblastes. Cette prolifération clonale s'accompagne de la diversification des BCR par hypermutation somatique (HMS), puis les cellules B qui quittent le cycle cellulaire sont repoussées vers la zone claire et nommées centrocytes. La sélection d'affinité se fait alors par interaction avec des FDC et les Tfh spécifiques de l'antigène et la puissance des signaux qu'ils reçoivent conditionne le devenir des centrocytes. Ceux de faible affinité meurent par apoptose tandis que les centrocytes de haute affinité regagnent la zone sombre pour un nouveau cycle d'expansion et diversification. Le processus de maturation des Ig se déroule en plusieurs cycles pour aboutir à un phénotype terminal de plasmocyte ou de lymphocyte B mémoire, ils quittent alors le centre germinatif puis recirculent.

Les centrocytes sont alors sélectionnés selon l'affinité de leur BCR par un processus de compétition (Gitlin et al., 2015; Shulman et al., 2014). Ceux dont le BCR a une très haute affinité pour les Ag natifs présentés par les FDC reçoivent, de la part des Tfh de même spécificité, des signaux de survie *via* les interactions ICOS/ICOSL, CD40/CD40L et BAFF-R/BAFF. L'intensité de ces signaux est proportionnelle à la force de l'association du TCR avec le CMH-II présenté par les LB (Gitlin et al., 2015). Les centrocytes de faible affinité meurent par apoptose et sont phagocytés par les macrophages (Allen, Okada, & Cyster, 2007).

Le processus de maturation des Ig se déroule en plusieurs cycles, au cours desquels le LB recircule de la zone claire à la zone sombre, jusqu'à l'obtention d'un BCR suffisamment affin. Cette boucle de maturation aboutit à un phénotype terminal de plasmocyte pour la majorité ou de lymphocyte B mémoire (Allen et al., 2007; Shulman et al., 2014). Les mécanismes qui conditionnent la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte ou en B mémoire ne sont pas clairement décrits mais sont influencés par la sécrétion d'IL-21 par les TFH, le nombre de cycles de maturation réalisés et l'affinité du BCR pour l'Ag. En effet, les LB mémoires sont générés plus précocement et expriment un BCR dont l'affinité est moindre que celle des plasmocytes de longue durée de vie (Mesin et al., 2016; Shinnakasu et al., 2016).

Les LB mémoires perdent l'expression de CXCR5, quittent le CG puis recirculent pour regagner la moelle, les organes lymphoïdes secondaires et tertiaires où ils résideront dans l'attente d'une future rencontre avec l'Ag dont ils sont spécifiques (Kurosaki, Kometani, & Ise, 2015). De façon similaire, les plasmocytes n'expriment plus CXCR5, au profit de CXCR4, quittent le CG, recirculent et migrent principalement vers la moelle osseuse attirés par la sécrétion de CXCL12 par les cellules souches mésenchymateuses médullaires.

1.2.3 La tolérance périphérique

Dans les organes lymphoïdes, comme dans les tissus inflammés, les cellules immunosuppressives sont présentes et participent au maintien de l'homéostasie.

En première ligne, les LT régulateurs (Treg), caractérisés par une expression constitutive et intense de CD25 et du facteur de transcription Foxp3, sont localisés préférentiellement dans les zones T mais également au sein des centres germinatifs (Audia, Samson, et al., 2011; Velasquez-Lopera et al., 2008).

Alors que leur activation nécessite l'engagement de leur TCR, les Treg exercent une action immunosuppressive globale et sans spécificité vis-à-vis de l'Ag (Thornton & Shevach, 2000) : ainsi, ils sont capables d'inhiber la prolifération des LT, la production d'Ig par les LB, la cytotoxicité des NK, et la maturation des DC. Les mécanismes mis en jeu sont nombreux et impliquent notamment des interactions cellulaires dépendantes du contact par l'expression de CTLA-4 et TGF- β , mais également par la production de cytokines régulatrices, telles que l'IL-10, l'IL-35, l'IL-9 et le TGF- β (Collison et al., 2007; Ralainirina et al., 2007).

D'autre part, les Treg via l'expression du récepteur à l'IL-2 entraînent une déprivation de l'environnement de cette cytokine indispensable à la survie des LT effecteurs, ce qui conduit à leur apoptose (Pandiyana, Zheng, Ishihara, Reed, & Lenardo, 2007).

L'expression constitutive du marqueur de costimulation CTLA-4 permet aux Treg d'inhiber directement la prolifération des LT en interrompant la transmission du 2^{ème} signal d'activation par sa liaison avec CD80 (Paust, Lu, McCarty, & Cantor, 2004). Elle est également à l'origine de l'induction de DC tolérogènes (Manzotti et al., 2002), sa liaison aux molécules CD80 et CD86 induisant l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DC. Cette enzyme confère aux DC des propriétés tolérogènes par la catalyse du tryptophane, acide aminé essentiel à la survie et la prolifération des LT et favorise également la conversion des LT naïfs en Treg engendrant une boucle d'auto-amplification (Fallarino et al., 2003).

Récemment, une population de LB aux propriétés anti-inflammatoires a été décrite comme participant au maintien de la tolérance périphérique (Rosser & Mauri, 2015). Alors que chez la souris, on distingue une multitude de populations Breg matures et immatures, chez l'homme deux populations de Breg ont été identifiées dans le sang (Blair et al., 2010; Iwata et al., 2011). A ce jour, aucun marqueur membranaire ou facteur de transcription spécifique n'a pu être caractérisé, les Breg étant essentiellement identifiés par la sécrétion d'IL-10 (van de Veen et al., 2013).

Ils semblent être issus de la conversion de LB immatures, matures ou de plasmablastes, sous l'influence du microenvironnement, l'implication des TLR et la signalisation du récepteur CD40 étant les mécanismes les mieux caractérisés jusqu'à présent (Matsumoto et al., 2014; Mauri & Bosma, 2012). Ils exercent leurs fonctions anti-inflammatoires par la sécrétion d'IL-10, d'IL-35, et de TGF- β . Ainsi, ils régulent l'activité des LTCD4⁺, LTCD8⁺, des DC, des monocytes, et ils participent la différenciation des iTreg (Carter, Rosser, & Mauri, 2012; Matsumoto et al., 2014; Mauri & Bosma, 2012; Rosser & Mauri, 2015).

2 Les cellules lymphoïdes innées

2.1 Découverte, définition et nomenclature

Tout comme J.A. Walker, qui titrait sa revue consacrée aux ILC, « *Innate Lymphoid Cells – How did we miss them ?* », on s'étonne que cette population lymphoïde ait été révélée près de 35 ans après la découverte des NK alors que la littérature scientifique en immunologie s'enrichit chaque année de plusieurs dizaines de milliers d'articles (Herberman, 1975; R. Kiessling, Klein, Pross, & Wigzell, 1975; Walker, Barlow, & McKenzie, 2013).

Dans les années 2008 à 2010, une dizaine d'équipes rapportait simultanément l'existence de cellules lymphoïdes jusqu'alors inconnues, diversement nommées NK22, ROR γ t⁺ NKp46⁺, NK⁺LTi, nuocytes ou *Natural Helper cells* (Cella et al., 2009; Moro et al., 2010; Narni-Mancinelli et al., 2011; Price et al., 2010; Satoh-Takayama et al., 2010; Vonarbourg et al., 2010). Le terme de cellules lymphoïdes innées, basé sur l'aspect cytologique et phénotypique des cellules, sera utilisé pour la 1^{ère} fois par Buonocore en 2010 (Buonocore et al., 2010). Par le recoupement de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles, Spitz a proposé en 2013, une uniformisation de leur nomenclature qui fait consensus à ce jour (Spits et al., 2013).

Les ILC répondent à trois caractéristiques fondamentales : l'absence d'expression des marqueurs membranaires des lignées myéloïdes et dendritiques, une morphologie lymphoïde, et un défaut de réarrangement génique dépendant des recombinaisons RAG, conduisant à l'absence d'expression des récepteurs d'antigène, TCR ou BCR (Spits et al., 2013). Les ILC ne sont donc pas activées par la reconnaissance spécifique d'un Ag, bien qu'elles présentent une diversité fonctionnelle proche de celle des LT auxiliaires. Ainsi, par analogie à la nomenclature des LTh, les ILC sont classées selon les facteurs de transcription qu'elles expriment et les cytokines qu'elles secrètent (**Figure 6**) :

- Les ILC de type 1 regroupent les NK et les ILC1. Elles sont sous la dépendance du facteur de transcription Tbet (et EOMES pour les NK) et sécrètent de l'IFN- γ , comme les LTh1.
- Les ILC de type 2 expriment GATA-3 et sécrètent les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13, comme les LTh2.
- Les ILC de type 3, constituées des « *lymphoid Tissues inducers* » (LTi) et des ILC3, expriment ROR γ t ainsi que le récepteur de l'IL-23, et sécrètent l'IL-17 et IL-22 (Spits et al., 2013).

On distingue également, à l'image des LT, les ILC cytotoxiques (les NK) des ILC auxiliaires (ILC1 ILC2 et ILC3). Les LTi, présentes dès le stade fœtal, ont une fonction particulière, puisqu'elles sont indispensables au développement des structures lymphoïdes secondaires et des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (Honda et al., 2001).

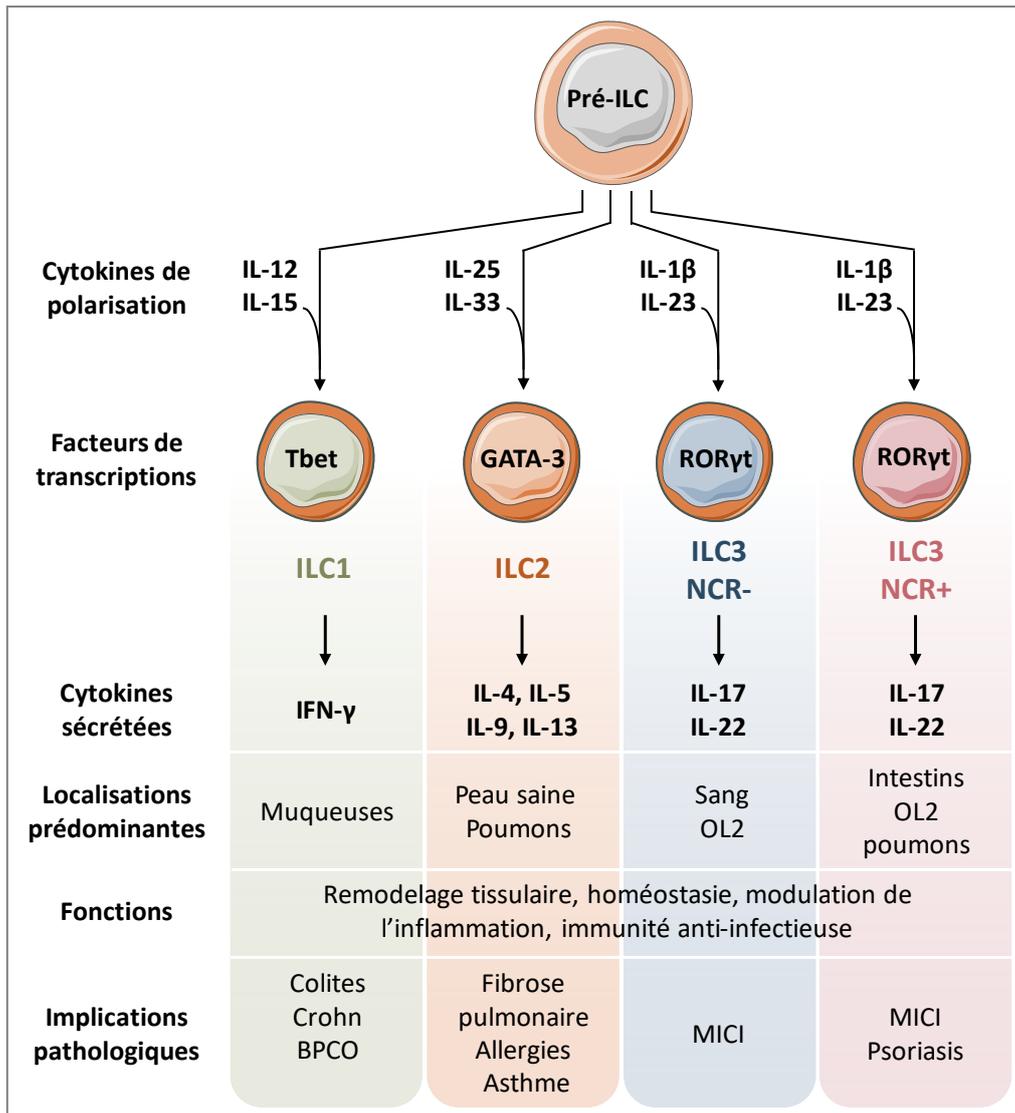


Figure 6 : Les cellules lymphoïdes innées (Spencer, Gilchrist, & Mallory) auxiliaires - OL2 : Organes lymphoïdes secondaires ; MICI : Maladies Inflammatoires

La découverte récente des ILC a ouvert tout un pan de l'immunologie, permettant un nouveau regard sur les interactions possibles entre système inné et adaptatif et leurs implications potentielles en pathologies humaines. Ceci a provoqué ces dernières années un grand engouement, se traduisant par une littérature dense, empreinte de concepts originaux et de multiples controverses portant sur la classification des ILC ainsi que sur leurs fonctions.

Dans le cadre de ce projet de recherche, notre étude s'est focalisée sur les ILC auxiliaires au sein des rates humaines non pathologiques et au cours d'une maladie auto-immune, la thrombopénie immunologique (ou purpura thrombopénique immunologique - PTI).

2.2 Classification des ILC

Selon la nomenclature élaborée par Spitz, les ILC se distinguent par l'absence d'expression des marqueurs des lignées lymphoïde (récepteurs spécifiques aux Ag (TCR, BCR) et leurs corécepteurs (CD3, CD4, CD8, CD19...)), myéloïde et plasmacytoïde (CD14, CD16, CD123, CD303) et érythrocytaire (glycophorine A). La plupart des ILC humaines expriment la lectine de type C (*C-type lectin*, CD161) et le récepteur de l'IL-7 (CD127), à l'exception des cellules NK, des LTi et de certaines sous-populations d'ILC1 telles que les ILC1 intraépithéliales (*intra-epithelial ILC1* – ielLC1) (Crinier, Viant, Girard-Madoux, & Vivier, 2017; Spits et al., 2013).

Compte tenu de la diversité des sous-populations, de la variabilité de leurs phénotypes et fonctions, la classification des ILC est sujette à de nombreuses controverses. L'appartenance même des NK aux ILC de type I peut être discutée tant leurs origines et fonctions diffèrent de celles des ILC1.

Bien que toutes les sous-populations d'ILC auxiliaires soient présentes dans les épithéliums, une vision synthétique de leur répartition et fonction n'est pas aisée compte tenu des multiples stratégies d'identification utilisées au fil des années. Alors que les proportions d'ILC totales semblent stables pour un tissu donné dans des conditions physiologiques, la proportion des sous-populations est très variable selon les individus (Kramer et al., 2017; Simoni & Newell, 2018).

2.2.1 ILC de type 1

2.2.1.1 Les cellules NK

Les NK constituent une population hétérogène caractérisée par l'expression des marqueurs CD56, CD94, CD16 (FcγRIII) et l'absence de TCR et de CD3. Les cellules NK sont localisées dans les tissus (foie, poumons, placenta...), les organes lymphoïdes (ganglions, rate...) et le sang. Elles ont été identifiées par leurs fonctions cytotoxiques et elles sont capables d'induire la mort de cellules infectées ou de cellules tumorales suite à la détection de défaut d'expression des molécules du CMH-I (R. Kiessling et al., 1975) ou par un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* - ADCC). En fonction du microenvironnement dans lequel elles évoluent et de leur stade de développement, les NK peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, TNF-α), anti-inflammatoires (IL-10), des facteurs de croissance (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor* - G-CSF, IL-3), et de nombreuses chémokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 et CXCL8) leur permettant de moduler les réponses innée et adaptative (Bjorklund et al., 2016; Vivier et al., 2011; Walzer, Dalod, Vivier, & Zitvogel, 2005).

Chez l'homme, deux sous-populations de NK aux fonctions différentes sont identifiées selon le niveau d'expression de CD56 : les NK CD56^{low} sont cytotoxiques et capables d'ADCC, alors que les NK CD56^{high} sont peu cytotoxiques mais produisent des cytokines (Jacobs et al., 2001; Poli et al., 2009).

2.2.1.2 Les ILC1

A ce jour, aucun marqueur spécifique et commun aux ILC1 n'a été identifié. Au sein des cellules exprimant CD161 et CD127, leur caractérisation repose sur l'absence d'expression de marqueurs spécifiques de lignées et des marqueurs des ILC2 (CRTh2) et ILC3 (cKit). En réponse à l'IL-15 et l'IL-12, les ILC1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α et sont présentes dans les muqueuses (**Figure 6**).

Par ailleurs, on distingue une population intra-épithéliale (*intra-epithelial ILC1* – ieILC1) exprimant Eomes (*eomesodermin*), T-bet, CD103, mais dont l'expression de CD127 est négative. Le développement de ces cellules est indépendant de l'IL-15 et leur précurseur n'a pas été identifié (Fuchs et al., 2013). En réponse à l'IL-12 et l'IL-15, les ieILC1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et développent une activité cytotoxique par la production de granzyme et perforine, leur conférant des fonctions similaires aux NK (Fuchs et al., 2013).

L'absence de marqueurs permettant la caractérisation formelle de la population d'ILC1 est problématique car elle rend leur identification ambiguë et certains auteurs doutent même de leur existence (Simoni & Newell, 2018).

En effet, une étude des ILC dans différents compartiments humains par cytométrie de masse, permettant une modélisation stochastique des populations qui la constituent selon leurs similarités phénotypiques, n'a pas permis d'identifier la population d'ILC1. En suivant la stratégie d'identification classiquement utilisée dans la littérature, les auteurs ont montré qu'une proportion importante des cellules considérées comme les LC1 n'exprime pas Tbet et est largement contaminée par des LT, des DC et des cellules souches. Par ailleurs, la population d'ILC intra-épithéliales correspondrait selon ces mêmes auteurs à une sous-population de cellules NK.

Néanmoins, l'approche méthodologique de ce travail a été largement critiquée, notamment quant à l'utilisation d'une déplétion magnétique pour isoler les ILC, sur l'absence d'Ac dirigés contre le TCR et le CD34 dans le cocktail d'exclusion des lignées et sur l'absence de considération de marqueurs phénotypiques exprimés par les ILC1 tel que le CD5 (Bernink,

Mjosberg, & Spits, 2017). De plus, une modification du plan d'analyse des données brutes a permis d'individualiser les ILC1, et d'exclure les cellules contaminantes (Bernink et al., 2017).

2.2.2 ILC de type 2

Les ILC2 se distinguent par l'expression du marqueur CRTh2, et sont principalement localisées dans les poumons, la peau, le tissu adipeux et le foie (Halim, Krauss, Sun, & Takei, 2012; McHedlidze et al., 2013; Molofsky et al., 2013; Roediger et al., 2013). En réponse à l'IL-25 et l'IL-33, elles peuvent sécréter de l'IL-4, IL-5, IL-13, IL-19 et l'amphiréguline (Sonnenberg & Artis, 2015)(**Figure 6**).

Bien que les ILC2 semblent constituer un groupe homogène, la multitude de cytokines qu'elles peuvent sécréter laisse supposer l'existence de sous-populations spécifiques (Koyasu, 2015). D'autre part, il a été montré qu'au cours d'infections chez la souris on pouvait distinguer les ILC2 naturelles (*natural ILC2* - nILC2) des ILC2 inflammatoires (*Inflammatory ILC2* - iILC2) qui expriment ROR γ t et peuvent sécréter de l'IL-17 (Huang et al., 2015).

2.2.3 ILC de type 3

2.2.3.1 Les LTi

Au cours de l'embryogenèse murine et humaine, les LTi migrent du foie (organe hématopoïétique) vers les ébauches des tissus lymphoïdes (Mebius, Rennert, & Weissman, 1997). De par leur coopération avec les cellules stromales, elles sont à l'origine du recrutement des DC, des LB et LT, et vont ainsi participer à l'organisation anatomique des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer, tissus lymphoïdes associés à l'intestin (Cupedo et al., 2009; Honda et al., 2001).

Chez la souris adulte, les LTi sont situés à proximité des cryptes intestinales (Kanamori, 1996), mais à ce jour, aucun marqueur phénotypique ne permet de les distinguer des ILC3.

Comme toutes les ILC, les LTi sont dépourvus des principaux marqueurs de lignées hématopoïétiques mais leur expression de CD4 et de CD161 est variable. Elles expriment CD127, c-kit et CCR6, et n'expriment pas le récepteur NKp44. Enfin, ROR γ t est indispensable à leur développement, au maintien de leur phénotype et de leurs fonctions (Crinier et al., 2017; Eberl et al., 2004). En réponse à une activation par l'IL-23, l'IL-1 β , ou l'IL-6, elles sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Sawa et al., 2010).

Il a été proposé de distinguer, chez la souris, les ILC3 des LTi selon l'intensité d'expression de CD127 et de c-kit, élevée dans la population de LTi (CD127^{high}CD117^{high}) et plus modérée pour les populations d'ILC3 (CD127^{low} CD117^{low}) mais cette distinction ne fait pas consensus et n'a pas été reprise dans les définitions phénotypiques des ILC (Sawa et al., 2010).

2.2.3.2 Les ILC3

Les ILC3 humaines et murines sont principalement localisées dans la lamina propria des différentes portions de l'intestin et sont identifiées par l'expression du récepteur du facteur de croissance des cellules souches (*stem cell factor* – SCF) appelé c-kit (CD117). Sous l'effet de l'IL-23 et de l'IL-1 β , les ILC3 sécrètent principalement de l'IL-22 et du GM-CSF, et dans une moindre mesure de l'IL-17 (Mortha et al., 2014; Rankin et al., 2016) (**Figure 6**).

Elles forment un groupe hétérogène dont les sous-populations se distinguent par l'expression des récepteurs naturels de cytotoxicité (*Natural Cytotoxicity Receptors* - NCR). Les ILC3 NCR⁺ expriment à leur surface NKp46 chez la souris et NKp44 chez l'Homme. Les ILC3 NCR⁺ sécrètent leurs cytokines après activation *via* le récepteur NCR ou en réponse aux ligands de TLR et à l'environnement cytokinique. Les ILC3 NCR⁻ sécrètent essentiellement de l'IL-22, expriment CD45RA et les molécules CMH-II (Glatzer et al., 2013; Magri et al., 2014).

Plus récemment, sur les bases d'une analyse transcriptomique de 3000 gènes sur cellule unique (*Single cell RNA sequencing*), Bjorklund a proposé de distinguer 3 sous-populations d'ILC3 aux fonctions différentes.

Les ILC3 NCR⁺ constituent une sous-population de cellules activées tandis que la population NCR⁻CD62L⁺, minoritaire dans le ganglion lymphatique, est constituée de cellules naïves. Enfin, les ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ (*Human Leukocyte Antigen – antigen D Related*) auraient une activité tolérogène car capables de présenter des Ag sur leurs molécules de CMH II en l'absence d'expression des récepteurs de costimulation (Bjorklund et al., 2016).

2.2.4 Les ILC reg

Dernièrement, un groupe d'ILC régulatrices, appelé ILCreg ou ILC10, dont la fréquence est augmentée dans un contexte inflammatoire, a été mis en évidence dans les tissus lymphoïdes et dans les épithéliums intestinaux murins (Kim et al., 2016). L'analyse du transcriptome de ces cellules productrices d'IL-10 et de TGF- β confirme qu'il s'agit bien d'une population d'ILC, distincte des Treg, notamment par l'absence d'expression du facteur de transcription Foxp3 (S. Wang et al., 2017).

Chez l'Homme, une population d'ILC productrice de cytokines régulatrices (Lin⁻CD127⁺IL-10⁺) a également été identifiée dans l'intestin et serait impliquée dans la résolution de l'inflammation (S. Wang et al., 2017).

2.3 Ontogénie

Depuis l'identification des ILC, de nombreuses équipes se sont intéressées aux processus impliqués dans leur développement, que ce soit dans des modèles murins ou par l'étude *ex-vivo* de cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines.

Chez la souris, l'ontogénie des lymphocytes innés est initiée à partir des précurseurs lymphoïdes communs (*Common Lymphoid Precursors* – CLP) dans le foie fœtal puis se poursuit à l'âge adulte dans la moelle osseuse. Un progéniteur commun de la lignée ILC a été identifié par l'expression du facteur de transcription ID2 (*DNA-binding protein inhibitor 2*), requis pour l'engagement précoce dans cette voie de différenciation (Cherrier, 2014; Moro et al., 2010; Satoh-Takayama et al., 2010; Yokota et al., 1999).

2.3.1 Développement des ILC murines

Au cours du développement lymphocytaire murin, les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes perdent leur potentiel de différenciation en précurseurs érythroïdes et myéloïdes, donnant lieu aux précurseurs lymphoïdes communs. L'engagement des précurseurs lymphoïdes communs dans une voie de différenciation se restreint progressivement par l'expression séquentielle de facteurs de transcription, en partie déterminée par le microenvironnement (Doulatov, Notta, Laurenti, & Dick, 2012).

Ainsi sous la dépendance des facteurs de transcription NFIL3 (*Nuclear Factor IL-3 regulated*), ID2, TOX (*Thymocyte selection-associated high mobility group box protein*), TCF-1 (T Cell Factor 1) et ETS1 (Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1), les précurseurs lymphoïdes communs se différencient en précurseurs communs des lymphocytes innés (*Common Innate Lymphoid Precursors* – CILP), qui sont à l'origine d'un premier embranchement dans la lignée des ILC (Koues et al., 2016; Seillet et al., 2014) (**Figure 7**).

L'inhibition de TCF-1 engage les précurseurs communs des lymphocytes innés dans la voie de différenciation des ILC cytotoxiques, en générant les précurseurs des NK (*NK precursors* – NKP), qui vont donner lieu aux NK sous la dépendance de T-bet et Eomes (Carotta, Pang, Nutt, & Belz, 2011; Fathman et al., 2011).

Inversement, la différenciation vers la voie des progéniteurs communs de lymphocytes innés helper (*Commun Helper Innate Lymphoid Progenitor* – CHILP) requiert le maintien de l'expression de TCF-1 et l'acquisition de GATA-3 (Constantinides, McDonald, Verhoef, & Bendelac, 2014; C. S. N. Klose et al., 2014; Yagi et al., 2014).

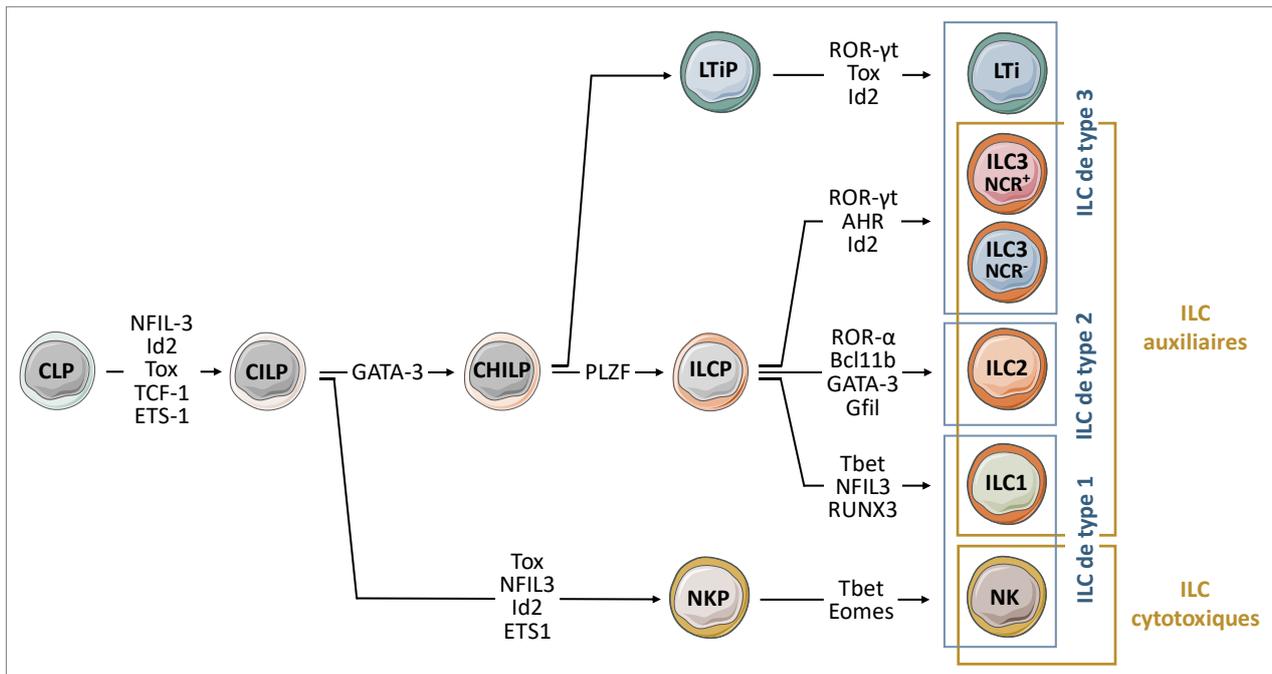


Figure 7 : Ontogénie des ILC murines – Adapté de Crinier, Médecine sciences 2017

Un second embranchement se dessine alors, conditionné par l'expression de PLZF (*Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*) qui engage irréversiblement les CHILP dans la différenciation en ILC auxiliaires, en passant par le stade précurseur d'ILC (*Innate Lymphoid Cell Precursor* – ILCP) (Constantinides et al., 2014; C. S. N. Klose et al., 2014). L'absence d'expression de PLZF permet la différenciation des CHILP en précurseurs des LTi (*Lymphoid Tissue inducer Progenitor* – LTiP) qui, sous la dépendance de ROR γ t, TOX et ID2, engendrent les LTi (Eberl et al., 2004).

Enfin, l'engagement des précurseur d'ILC vers les trois populations d'ILC auxiliaires requiert l'expression de T-bet, NFIL3, RUNX3 (*Runt-related transcription factor 3*) pour les ILC1, GATA-3, ROR α , Bcl11b, Gfi1 pour les ILC2 et ROR γ t, AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*), ID2 pour les ILC3 (Gronke, Kofoed-Nielsen, & Diefenbach, 2016).

2.3.2 Ontogénie des ILC humaines et ILC-poïèse

De façon générale chez l'homme, l'hématopoïèse humaine est moins bien caractérisée, l'existence du progéniteur lymphoïde commun restant incertaine (Doulatov et al., 2012). L'ontogénie des ILC est assez peu décrite mais, il semblerait que le modèle de développement de ces cellules chez l'Homme diverge des paradigmes habituels et que la différenciation des précurseurs des ILC survienne au niveau tissulaire (Di Santo, Lim, & Yssel, 2017).

L'existence de progéniteurs homologues aux précurseurs communs des lymphocytes innés (CILP) ou aux progéniteurs communs de lymphocytes innés helper (CHILP) n'a pas été démontrée jusqu'à présent, bien que plusieurs études rapportent la présence de progéniteurs, localisés dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions ou les amygdales, à faible potentiel de différenciation en LT ou DC mais capables de générer des cellules au phénotype proche des ILC : $\text{Lin}^- \text{CD161}^+$ (Freud et al., 2005; Montaldo et al., 2014; Tang et al., 2012). *In vitro*, les cellules NK, les ILC3 et les ILC2 ont pu être générées à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34^+ originaires du sang, de sang de cordon ombilical, de thymus, de moelle osseuse ou d'amygdales, mais également à partir de précurseurs hématopoïétiques à haut potentiel lymphoïde (CLP-like) (Canque et al., 2000; Montaldo et al., 2014; Renoux et al., 2015; Tang et al., 2012).

Plus récemment, l'équipe de Lim et Di Santo a identifié les précurseurs des ILC (ILCP) humaines dans le sang chez l'adulte (Lim et al., 2017). Les auteurs décrivent une population circulante d'ILC3 très différente des ILC3 humaines intestinales, n'exprimant pas Nkp44, ni ROR γ t et incapable de sécréter les cytokines IL-17 et IL-22 après stimulation pharmacologique par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et la ionomycine (iono). Par ailleurs, ces cellules expriment l'IL-1R, CD45-RA et CD7.

Ces cellules se révèlent être essentiellement constituées d'ILCP multipotents ou unipotents, capables de se différencier en ILC auxiliaires ou cytotoxiques. Elles se développent à partir des cellules souches hématopoïétique CD34^+ , sont abondantes dans le foie fœtal, le sang de cordon et les organes lymphoïdes, mais sont également présentes dans les tissus.

Ce travail permet d'appréhender différemment les publications antérieures rapportant la présence dans les organes lymphoïdes de précurseurs capables de se différencier en ILC (Freud et al., 2005; Freud et al., 2006; Montaldo et al., 2014; Scoville et al., 2016; Yagi et al., 2014), ou traitant de l'adaptabilité du contingent de chaque population d'ILC selon l'organe et le contexte inflammatoire (Robinette et al., 2015), ou encore de la plasticité des ILC3 (Chea et al., 2015; C. S. Klose et al., 2013; Vonarbourg et al., 2010).

La synthèse de ces travaux a abouti à la proposition d'un modèle de développement unique nommé ILC-poïèse, au cours duquel les ILCP CD117⁺ pluripotents et unipotents se développeraient dans le foie fœtal à partir des cellules souches hématopoïétiques, et probablement dans les organes lymphoïdes à partir d'un précurseur ILCP CD34⁺. Ils rejoindraient les tissus par la circulation sanguine puis, en réponse au microenvironnement tissulaire, les ILCP se différencieraient en ILC auxiliaires et cytotoxiques matures en présence d'IL-1 β (Figure 8).

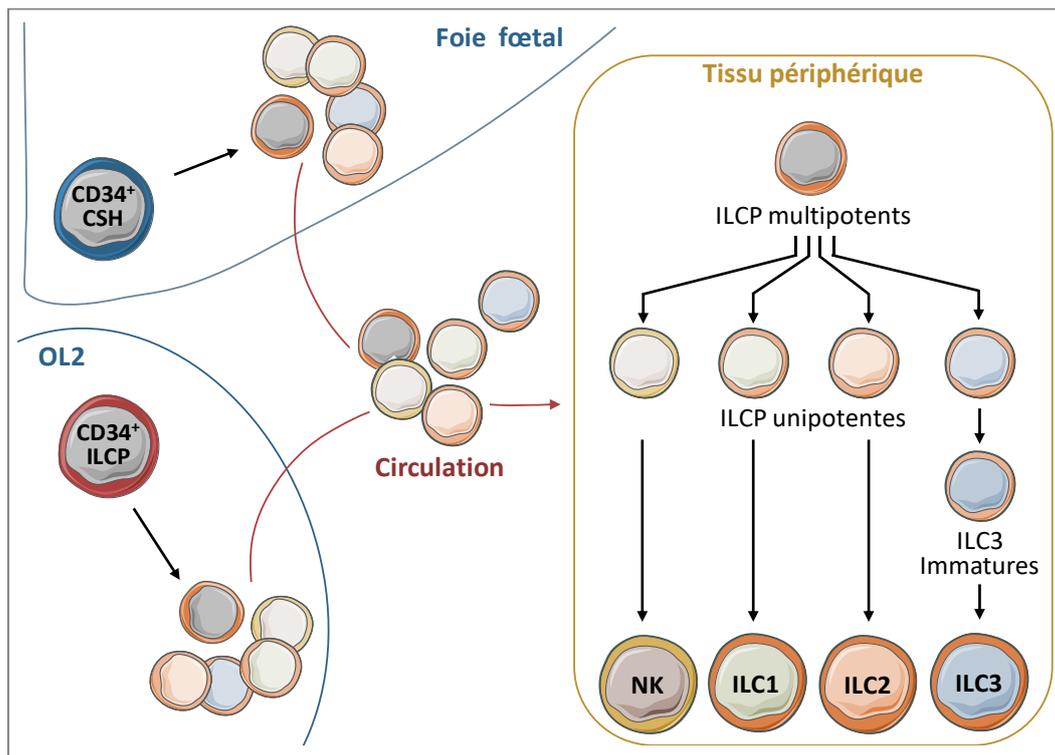


Figure 8 : ILC-poïèse – Adapté de Mjösberg, Immunity 2017 - OL2 : Organe Lymphoïde secondaire

Loin d'être caractérisé en tout point, ce modèle met en exergue les similarités entre la réponse lymphoïde adaptative et la réponse lymphoïde innée. Alors que les organes lymphoïdes sont au cœur de la polarisation des LT, dans le modèle proposé par Di Santo, tout tissu inflammé peut être le lieu de différenciation des ILC. L'IL-1 β est le signal indispensable à l'initiation de la différenciation, tandis que l'environnement cytokinique oriente la différenciation vers les différents types d'ILC. Ainsi, en réponse à une inflammation d'origine infectieuse ou autre, les tissus développent une réponse lymphoïde innée rapide, qui contribuera à la stimulation de l'immunité adaptative spécifique (Di Santo et al., 2017).

Les dernières étapes de différenciation de chaque population d'ILC sont mal définies, ce qui rend difficile la distinction entre cellules aux stades tardifs de différenciation et ILC naïves non activées (Serafini, Vosshenrich, & Di Santo, 2015).

2.4 Plasticité

Il est à présent établi qu'il existe une plasticité fonctionnelle entre les différentes populations d'ILC, à la fois chez l'Homme et chez la souris. Sous l'influence des facteurs environnementaux, ces cellules différenciées peuvent ainsi adapter la réponse lymphoïde innée en fonction du contexte tissulaire (**Figure 9**). Néanmoins, certaines observations portant sur la plasticité des ILC3 doivent être relativisées en prenant en compte les récents travaux sur l'ILC-poïèse et la présence potentielle de précurseurs d'ILC dans cette population (Lim et al., 2017).

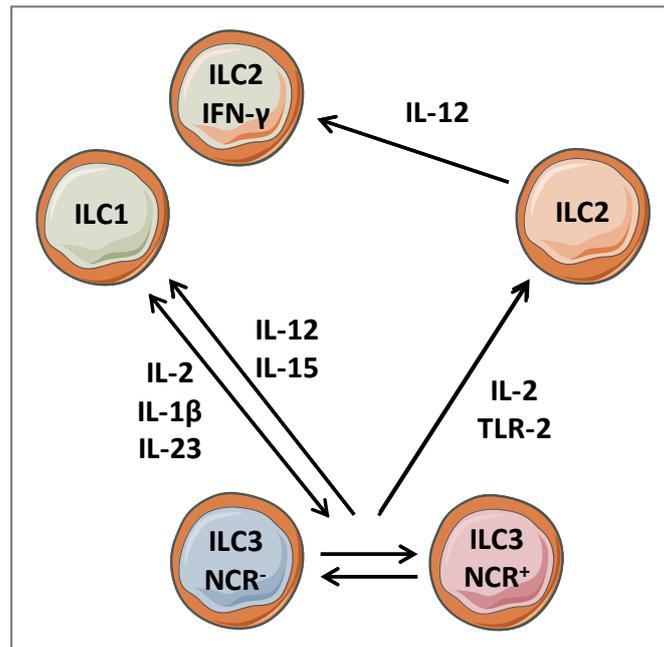


Figure 9 : Plasticité des ILC auxiliaires chez l'Homme -
Adapté de Crinier, Médecine sciences 2017

Ainsi, les ILC2 humaines sont en mesure d'acquérir, *in vitro*, l'expression de T-bet et de sécréter de l'IFN- γ sous l'influence de l'IL-12 (Lim et al., 2016). Au cours de pathologies respiratoires par exemple, l'émergence d'une population d'ILC1 pulmonaire résulte de la conversion des ILC2 résidentes (Bal et al., 2016; Silver et al., 2016).

Au cours d'infections parasitaires et fongiques chez la souris, les ILC2 sont en mesure de s'adapter à l'environnement cytokinique pour s'orienter vers un phénotype « nILC2 like » ou « ILC3 like » productrice d'IL-17 (Huang et al., 2015). Inversement, en présence d'IL-2, la stimulation des ILC3 *via* un activateur de TLR-2 entraîne la production de cytokines habituellement produites par les ILC2 comme l'IL-13 et l'IL-5 (Crellin et al., 2010).

Une plasticité entre les ILC1 et les ILC3 a également été établie. *In vitro*, une conversion des ILC3 en ILC1 est observée en présence d'IL-12 et d'IL-15 par inhibition de ROR γ t (Crinier et al., 2017; Vonarbourg et al., 2010). A l'inverse, les ILC1 acquièrent un phénotype d'ILC3 en réponse

à l'IL-2, l'IL-23 et l'IL-1 β (Gronke et al., 2016; C. S. Klose et al., 2013). Des travaux *in vivo* dans un modèle murin de maladie de Crohn suggèrent que l'accumulation d'ILC1 dans les muqueuses intestinales serait la conséquence d'une conversion des ILC3 résidentes (Bernink et al., 2013).

Chez la souris, il a été montré que les ILC3 NCR⁻ peuvent réguler l'expression de ROR γ t pour acquérir un phénotype se rapprochant des ILC1. Ces cellules, nommées « ex-ILC3 », expriment NKp46 et produisent de l'IFN- γ et du TNF- α (Vonarbourg et al., 2010). Enfin, sous l'influence de Notch et transitoirement de T-bet, les ILC3 NCR⁻ acquièrent l'expression de NKp46 (Chea et al., 2016; C. S. Klose et al., 2013; Viant et al., 2016; Vonarbourg et al., 2010).

2.5 Fonctions des ILC auxiliaires

De par leur localisation principalement muqueuse, les ILC ont des fonctions essentielles dans la lutte contre les pathogènes, le remodelage et l'homéostasie tissulaire. Plus récemment, elles ont été impliquées dans le développement de nombreuses pathologies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, le psoriasis et les maladies allergiques (Fuchs et al., 2013; Hams et al., 2014; Villanova et al., 2014).

Les ILC, dépourvues de récepteur spécifique d'Ag, sont activées par l'environnement cytokinique et des « signaux dangers », dépendants des cellules épithéliales et myéloïdes environnantes. Elles font partie des premiers effecteurs de l'immunité innée et répondent au microenvironnement par la modulation de leur sécrétion cytokinique, tantôt protectrice, tantôt inflammatoire.

Compte tenu des mécanismes d'activation impliqués, une réponse mémoire des ILC effectrices n'est pas envisageable. Néanmoins, plusieurs études épigénétiques identifient au sein des ILC humaines tissulaires des populations dotées de supers amplificateurs de gènes, notamment au niveau du locus de l'IL-22 (Koues et al., 2016; Shih et al., 2016). En réponse à une stimulation récurrente, les promoteurs de ces facteurs de transcription seraient en quelque sorte « pré-amorcés », conférant ainsi aux ILC3 une capacité transcriptionnelle très rapide et soutenue. L'exposition répétée des ILC à un environnement cytokinique constant semble amplifier et maintenir l'intensité de leur réponse jusqu'à la génération d'ILC « priming ».

2.5.1 ILC et homéostasie

Physiologiquement ou cours de situations pathologiques, les ILC tissulaires participent au maintien de l'homéostasie et au remodelage des tissus.

Au cours des infections virales pulmonaires, la présence d'ILC2 activées et productrices d'amphiréguline contribue à la réparation de l'épithélium des voies aériennes et à la préservation des fonctions pulmonaires (Monticelli et al., 2011). Dans l'intestin, la production d'IFN- γ par les ILC1 au cours d'infections participe au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, notamment par la stimulation de la sécrétion de mucus (C. S. Klose et al., 2013).

Dans des conditions physiologiques, les ILC3 sont la principale source de GM-CSF intestinal. Elles interagissent avec les macrophages, producteurs d'IL-1 β et participent par des mécanismes non encore élucidés au maintien du pool de LTreg intestinal qui est impliqué dans la tolérance vis-à-vis des Ag oraux (Mortha et al., 2014). D'autre part, les ILC3 aux fonctions tolérogènes limitent l'inflammation intestinale et participent au maintien du biotope intestinal en entraînant l'anergie des LT reconnaissant les peptides de la flore commensale intestinal (Hepworth et al., 2015).

La production d'IL-22 par les ILC3 limiterait également les dommages tissulaires dus à l'inflammation en favorisant notamment l'expansion des cellules souches intestinales (*Intestinal stem cell* – ISC) (Lindemans et al., 2015; Y. Zheng et al., 2008). Par ailleurs, les ILCreg contribuent à la résolution de l'inflammation intestinale par la production d'IL-10 et de TGF- β (S. Wang et al., 2017).

De par leur production d'IL-5 et d'IL-13, les ILC2 résidentes du tissu adipeux blanc sont essentielles au maintien du contingent éosinophile infiltrant le tissu adipeux, garant du maintien de l'homéostasie (Molofsky et al., 2013). Elles ont également un rôle dans le maintien de l'homéostasie métabolique en produisant des peptides méthionines-enképhalines qui agissent directement sur les adipocytes dont ils favorisent le brunissement, améliorant ainsi les capacités de thermogenèse adaptative (Brestoff et al., 2015). De façon similaire, la production d'IL-22 par les ILC3 pourrait être impliquée dans l'homéostasie métabolique puisque l'inactivation de son récepteur chez des souris atteintes d'obésité est à l'origine de désordres métaboliques (X. Wang et al., 2014).

2.5.2 ILC et infections

Dans un contexte d'infection virale ou bactérienne intracellulaire, les ILC1, sous l'influence de l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 produites par les cellules infectées vont sécréter de l'IFN- γ et du TNF- α . Elles initient alors la stimulation des macrophages tissulaires et la production de radicaux libres (Crinier et al., 2017). Lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*, les ILC1 intestinales murines sont une source précoce et prédominante d'IFN- γ , qui vont contribuer avec les LT au contrôle de la réplication du parasite et au recrutement des macrophages inflammatoires (Schulthess et al., 2012).

Au cours des infections parasitaires intestinales, les cellules épithéliales et plus particulièrement les cellules tuft produisent de l'IL-25, de l'IL-33 et de la lymphopoïétine stromale thymique (*Thymic Stromal Lymphopoietin* – TSLP), à l'origine de l'expansion des ILC2 et de leur activation. En réponse à l'IL-25 et l'IL-33, les ILC2 sont une source précoce d'IL-13 et d'IL-5 qui provoquent une contraction des cellules musculaires lisses et une hyperplasie des cellules à gobelet conduisant à la sécrétion de mucus et à l'élimination des parasites intestinaux (C. S. Klose & Artis, 2016; Moro et al., 2010). De par leur production d'IL-13, elles entretiennent l'hyperplasie des cellules tuft intestinales (von Moltke, Ji, Liang, & Locksley, 2016). Dans des modèles murins, il a été montré que les ILC2 participaient, de par la sécrétion d'IL-5, à l'inflammation éosinophilique pulmonaire au cours des parasitoses (Yasuda et al., 2012).

Suite à une infection bactérienne ou fongique extracellulaire, les ILC3 activées par la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 β par les DC produisent de l'IL-17 et de l'IL-22, favorisant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et la libération de peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales (Gladiator, Wangler, Trautwein-Weidner, & LeibundGut-Landmann, 2013; S. P. Spencer et al., 2014).

La sécrétion d'IL-22 leur confère de nombreuses propriétés protectrices. Les ILC3 NCR⁺ sont indispensables au confinement anatomique de certaines bactéries symbiotiques du tube digestif, empêchant l'émergence d'une inflammation systémique (Sonnenberg et al., 2012). Elles sont également à l'origine de la fucosylation des cellules épithéliales intestinales, les protégeant de l'infection à *Salmonella typhimurium* (Goto et al., 2014) et sont initiatrices de la résistance à *Citrobacter rodentium* médiée par l'IL-22 (C. S. Klose & Artis, 2016; Sonnenberg, Monticelli, Elloso, Fouser, & Artis, 2011). Les ILC3 favorisent également la sécrétion d'immunoglobulines A par la production de lymphotoxine (Hanash et al., 2012).

De nouveaux travaux suggèrent que les ILC3 puissent directement influencer la réponse adaptative lymphocytaire B et T. En effet, Magri décrit une population d'ILC3 spléniques principalement localisée dans la zone marginale où elles soutiennent l'activation des LB et des

plasmocytes de la zone marginale par la sécrétion de BAFF et l'expression de CD40. Ces ILC3 sécrétrices de GM-CSF et d'IL-8 participent également au recrutement et à l'activation d'une population de polynucléaires neutrophiles capables de stimuler les LB (Magri et al., 2014).

Par ailleurs, les travaux de Von Burg suggèrent que les ILC3 auraient, comme les DC, les macrophages ou les LB, la capacité de présenter des Ag aux LT. En effet, malgré une cinétique lente, les ILC3 NCR⁺ spléniques murines sont capables de phagocyter des billes de latex. En réponse à l'IL-1 β , elles surexpriment des molécules de CMH-II et les molécules de costimulation (CD80, CD86 et CD40) et sont ainsi capables d'induire l'activation et la prolifération *in vitro* de LT. Dans le but d'évaluer l'importance de ces fonctions *in vivo*, les auteurs ont développé un modèle murin « *Floxed H2-Ab1 allele* » (I-ab ^{Δ ILC3}) qui consiste à intégrer un système Cre (*Causes recombination*) sous le contrôle du promoteur de RORc qui délète l'allèle H2-Ab1. Dans ce système ou toutes les populations ROR⁺ sont dépourvues de molécules de CMH-II, ils décrivent une altération majeure de la production d'Ig, de la prolifération des LT et LB, malgré la préservation des fonctions CPA des DC, LB et macrophages (von Burg et al., 2014).

Plus récemment, il a été montré qu'au cours de la maladie de Crohn, certaines ILC3 exprimaient HLA-DR et étaient capables de présentation antigénique, mais avaient des propriétés tolérogènes compte tenu de l'absence d'expression de molécules de costimulation (Bjorklund et al., 2016; Hepworth et al., 2015).

2.5.3 ILC et cancer

Très peu de données concernant les ILC auxiliaires au cours du cancer sont disponibles dans la littérature et toutes concernent l'impact des ILC sur l'environnement tumorale par leurs propriétés sécrétrices. Aucun article publié ne rapporte un potentiel rôle pro tumorigène ou antitumorale relatif aux propriétés tantôt tolérogènes et tantôt activatrices de ces cellules présentatrices.

Un premier article de Eisenring en 2010 révèle l'importance d'une population, dont le phénotype se rapproche de celui des ILC3 NCR⁺, dans la régression du mélanome sous-cutané murin. De par leur sécrétion d'IL-12, elles favorisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules vasculaires tumorales, permettant l'infiltration des tumeurs par des LT cytotoxiques et des NK (Eisenring, vom Berg, Kristiansen, Saller, & Becher, 2010). Dans l'infiltrat lymphoïde tumoral de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, les ILC3 NCR⁺ sont largement représentées et favoriseraient l'émergence de structures lymphoïdes tertiaires (Carrega et al., 2015).

En revanche, les ILC3 ont également un rôle néfaste puisqu'il a été montré dans un modèle de colite associée à un cancer que la sécrétion d'IL-22 participait à la croissance tumorale (Huber et al., 2012; Kirchberger et al., 2013).

Enfin, une population d'ILC1 non conventionnelles est impliquée dans les mécanismes d'immuno-surveillance tumorale dans des modèles murins de cancers du sein et de la prostate. Cette population résidente proliférerait au sein des lésions précancéreuses et participerait au contrôle de la croissance tumorale par une activité cytotoxique (Dadi et al., 2016).

2.5.4 ILC et maladies inflammatoires

2.5.4.1 Les ILC1

De par leur production d'IFN- γ , les ILC1 sont impliquées dans le développement de colites (Buonocore et al., 2010). Dans un modèle murin rag^{-/-} de **colite** induite par l'injection d'anti-CD40, la déplétion des ielLC1 provoque une diminution des infiltrats de cellules inflammatoires et une résorption des dommages de l'épithélium intestinal (Fuchs et al., 2013).

Les patients atteints de la **maladie de Crohn** présentent une fréquence d'ILC1 intestinale majorée, tout comme celle des patients atteints de **broncho-pneumopathie chronique obstructive** (BPCO) (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013).

2.5.4.2 Les ILC2

Au cours des **maladies allergiques**, pathologies au cours desquelles une polarisation Th2 est habituellement observée, il existe également une augmentation de la réponse ILC2 dans la peau, les bronches et le sang (Bartemes, Kephart, Fox, & Kita, 2014; Hams et al., 2014; Mjosberg et al., 2011; Salimi et al., 2013).

Après exposition à un allergène, les cellules épithéliales, les cellules myéloïdes ou les basophiles activent les ILC2 par la sécrétion d'IL-25, IL-33 et TSPL (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) (Imai et al., 2013; B. S. Kim et al., 2014; Sonnenberg & Artis, 2015) et leur production d'IL-5 participe au recrutement des polynucléaires éosinophiles dans la peau et les poumons. Chez la souris, dans un modèle d'allergie alimentaire, il a également été montré que la sécrétion d'IL-4 par les ILC2 altérait l'activation des LTreg et initiait celle des mastocytes (Noval Rivas, Burton, Oettgen, & Chatila, 2016). De par leur sécrétion d'IL-13, les ILC2 sont impliquées dans l'exacerbation des réactions inflammatoires et allergiques des voies respiratoires en agissant sur la polarisation des macrophages et la production de mucus (Barlow et al., 2012).

Une fois activées, les ILC2 expriment CD40L et participent à la commutation de classe isotypique des immunoglobulines en favorisant la production d'IgE, impliquées dans l'**atopie** (**rhinite allergique**, l'**asthme** ou la **dermatite atopique**) (Maggi et al., 2017).

La proportion d'ILC2 est également augmentée au niveau hépatique dans un modèle murin de **fibrose hépatique** induite par l'IL-33 et dans les poumons dans un modèle de **fibrose pulmonaire** (D. Li et al., 2014).

Enfin, la diminution de la proportion d'ILC2 au sein du tissu adipeux des souris obèses est associée à une inflammation chronique modérée et des désordres métaboliques (Hams, Locksley, McKenzie, & Fallon, 2013; Molofsky et al., 2013). L'administration d'IL-25 et d'IL-33 à ces animaux restaure le taux d'ILC2 et diminue la fréquence des maladies métaboliques (Brestoff et al., 2015).

2.5.4.3 Les ILC3

Comme les Th17, les ILC3 sont impliquées dans la survenue de **maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)**, une sous-unité du récepteur de l'IL-23 ayant été identifiée comme étant un gène associé aux MICI (Duerr et al., 2006). Une majoration de la sécrétion d'IL-17 par les ILC3 a été observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn, alors qu'une autre étude rapporte une augmentation des ILC1 dans la *lamina propria* intestinale, ce qui pourrait en partie témoigner de la plasticité entre ILC3 et ILC1 (Fuchs et al., 2013; Geremia et al., 2011).

D'autre part, dans une cohorte pédiatrique atteinte de la maladie de Crohn, il a été observé que la diminution de l'expression du CMH-II par les ILC3 était corrélée à l'augmentation des Th17 (Hepworth et al., 2015).

Dans divers modèles murins, les ILC3 participent au développement de **colites infectieuses ou induites** par un agoniste de CD40 en raison de leur production d'IL-17, de GM-CSF ou d'IFN- γ (C. S. Klose & Artis, 2016; C. S. Klose et al., 2013; Vonarbourg et al., 2010).

Au cours de l'**asthme associé à l'obésité**, les ILC3 entretiennent l'hyperréactivité bronchique par la sécrétion d'IL-17 (H. Y. Kim et al., 2014). Les ILC3 NCR⁺ pourraient également être impliquées dans la physiopathologie du **psoriasis** puisque leur fréquence est augmentée dans le sang et les lésions cutanées des patients et que l'accumulation d'IL-22 dans la peau est à l'origine de la prolifération accrue des kératinocytes (Villanova et al., 2014).

En revanche, dans le contexte de la **réaction du greffon contre l'hôte** (*Graft versus host disease* – GvHD), les ILC3 pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis des cellules souches intestinales (*intestinal stem cells* – ISC), l'IL-22 étant *in vivo* à l'origine du rétablissement du pool d'ISC, de la régénération épithéliale et de la baisse de la mortalité des souris (Lindemans et al., 2015).

2.5.5 Cellules lymphoïdes Innées et LT : Similarités, différences, complémentarités et redondances

Les ILC et les LT partagent de nombreuses similarités morphologiques, transcriptomiques et fonctionnelles sur lesquelles repose la classification des ILC. Cependant, sur le plan développemental, la dichotomie de ces deux lignées est précoce et l'absence d'expression du TCR par les ILC témoigne de leur évolution dans des systèmes distincts.

L'étude transcriptomique des populations lymphocytaires murines révèle pleinement les limites de leur association, à l'image de l'opposition des clusters ILC2/Th2 ou ILC3/LTh17 malgré leur commune expression respective de GATA-3 et ROR- γ t. Mais elle illustre également leurs similitudes tant leur répartition semble se refléter dans un miroir (Huntington, Carpentier, Vivier, & Belz, 2016; Robinette et al., 2015) (**Figure 10**).

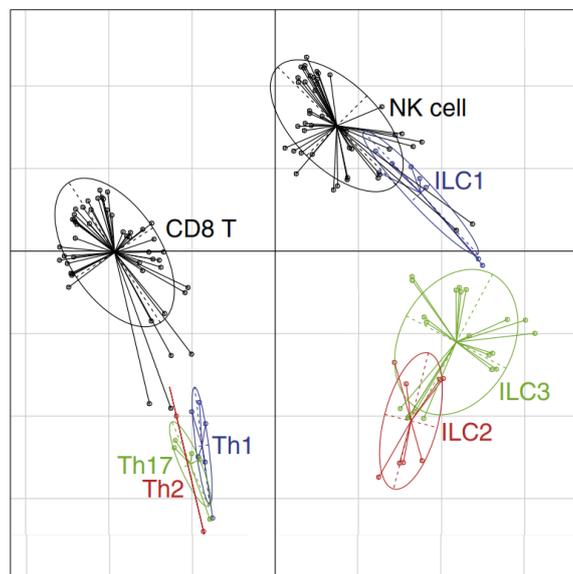


Figure 10 : Analyse transcriptomique en composante principale des populations lymphocytaires innées et adaptatives - Huntington, Current opinion in Immunology 2015

Du fait de la présence simultanée des ILC et des lymphocytes auxiliaires au sein des tissus, des similarités de leurs réponses au microenvironnement et des interactions entre elles, il existe vraisemblablement une redondance fonctionnelle entre lymphocytes et ILC.

Il est par exemple difficile d'établir avec certitude que la protection de l'intestin vis-à-vis des pathologies inflammatoires chroniques ou que la fucosylation des cellules épithéliales repose exclusivement sur la production en IL-22 par les ILC3 NCR⁺, les LTh17 et Th22 pouvant également en être à l'origine (C. S. Klose & Artis, 2016; Sonnenberg et al., 2012).

Dans de nombreux cas de déficits immunitaires monogéniques impliquant le système immunitaire inné, les patients présentent une susceptibilité restreinte à certains types d'infections qui s'atténue avec l'âge en raison du développement de l'immunité adaptative (Picard, Casanova, & Puel, 2011). C'est par exemple le cas des patients atteints de déficit en MyD88 qui présentent une susceptibilité aux infections à bactéries pyrogènes dans l'enfance.

En 2016, deux articles font le constat de la redondance fonctionnelle entre ILC et LT. Rankin démontre que la protection des cellules intestinales, *via* la sécrétion d'IL-22 contre *Citrobacter rodentium* peut être assurée par les LT en cas de défaut des ILC3 alors qu'elles sont indispensables dans un contexte d'immunodéficiência (Rankin et al., 2016). De même, après greffe de cellules souches hématopoïétiques avec conditionnement non myéloablatif, les patients dont la reconstitution des populations d'ILC est incomplète ne développent aucune pathologie particulière (Vely et al., 2016).

Bien que potentiellement redondante avec celles des LT, les fonctions des ILC s'avèrent décisives au cours de la vie foetale, de la petite enfance, et des pathologies dérégulant l'immunité adaptative. Il s'agit à la fois d'une redondance mais également d'une complémentarité, compte tenu de la coopération qui existe entre les ILC et les cellules de l'immunité adaptative. Ainsi, dans un modèle murin d'ankylostomiase, la coopération entre les ILC2 et les LT est indispensable au maintien des macrophages de type M2 dans l'immunité pulmonaire (Paclik, Stehle, Lahmann, Hutloff, & Romagnani, 2015).

3 La thrombopénie immunologique (PTI)

3.1 Définition

La thrombopénie immunologique (ou Purpura Thrombopénique Immunologique - PTI) est une cytopénie auto-immune rare définie par un taux de plaquettes dans le sang inférieur à 100 G/L du fait d'une destruction périphérique des plaquettes et d'une production médullaire inadaptée (Audia, Mahevas, Samson, Godeau, & Bonnotte, 2017).

La prévalence du PTI est d'environ 10/100 000 habitants et l'incidence varie de 1,6 à 3,9/100000 patients/an. Elle survient à tout âge avec un pic de fréquence chez l'enfant, la personne âgée et une prédominance féminine modérée (sexe ratio d'environ 1,3) (Abrahamson, Hall, Feudjo-Tepie, Mitrani-Gold, & Logie, 2009). Alors que la majorité des enfants (80%) présentent une forme aiguë et guérissent en quelques semaines, le PTI de l'adulte évolue vers la chronicité dans 70% des cas.

Un consensus international a établi une nomenclature qui répertorie les différentes phases de la maladie en fonction de la durée d'évolution : on parle de PTI nouvellement diagnostiqué au cours des 3 mois suivant le diagnostic, de PTI persistant entre 3 et 12 mois et de PTI réfractaire au-delà de 1 an d'évolution (Rodeghiero & Ruggeri, 2009).

3.2 Manifestations cliniques du PTI

Les troubles hémorragiques sont habituellement révélateurs et surviennent pour un taux de plaquettes inférieur à 20-30 G/L. Le plus souvent, il s'agit de manifestations hémorragiques cutanées tels qu'un purpura hémorragique pétéchial ou ecchymotique. Une atteinte muqueuse comme des épistaxis, des bulles hémorragiques intra-buccales, une hématurie peut également être observée et précéder les manifestations hémorragiques graves engageant le pronostic vital telles que les hémorragies cérébrales ou digestives (Rodeghiero & Ruggeri, 2009).

Dans un tiers des cas cependant, le PTI est asymptomatique et le diagnostic est fortuit lors d'un bilan biologique systématique ou pré-opératoire par exemple (Frederiksen & Schmidt, 1999).

3.3 Etiologies

Le PTI est primaire dans 80% des cas, c'est-à-dire qu'il n'est pas associé à une autre maladie. Au cours du PTI secondaire, la thrombopénie est liée ou associée à une autre pathologie qui peut être :

- Une maladie auto-immune : lupus systémique (LS) ou anémie hémolytique auto-immune, constituant alors le syndrome d'Evans
- Une infection virale : VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), EBV (*Epstein-Barr Virus*), CMV (*Cytomégalovirus*), VHC (Virus de l'Hépatite C)
- Une infection bactérienne : *Helicobacter Pylori*
- Un déficit immunitaire primaire : essentiellement le déficit immunitaire commun variable (DICV)

Parfois la thrombopénie est liée à une prise médicamenteuse (anti-inflammatoires stéroïdiens (AINS), antibiotiques par exemple), on parle alors de thrombopénie immuno-allergique.

Plusieurs polymorphismes génétiques ont été associés à la survenue du PTI ou à sa chronicisation : polymorphisme des FcγR, des molécules de CMH, des cytokines et de leurs récepteurs ou encore de certains facteurs de transcription (Foster et al., 2001; Maia et al., 2009; Pavkovic, Petlichkovski, Karanfiski, Cevreska, & Stojanovic, 2018).

Plusieurs mécanismes d'origine infectieuse ont été impliqués dans l'initiation de la réponse auto-immune, suggérant que la thrombopénie immunologique puisse être déclenchée par des facteurs exogènes chez un patient prédisposé. Cependant, ces facteurs exogènes ne sont que rarement identifiés.

Un mimétisme moléculaire entre la glycoprotéine (GP) IIIa plaquettaire et des Ag viraux peut survenir au cours d'une infection comme l'a décrit Bettaieb en 1996 avec la GP120 du virus de l'immunodéficience humaine ou Zhang en 2008 avec le virus de l'Hépatite C (Bettaieb, Oksenhendler, Duedari, & Bierling, 1996; W. Zhang, Nardi, Borkowsky, Li, & Karpatkin, 2009). Des homologies de séquences entre la GPIIb/IIIa et les peptides viraux des herpes virus humains ont été identifiés par des programmes de prédiction et certains d'entre eux sont reconnus *in vivo* par les Ac antiplaquettes (Boughton, Simpson, Bolt, Buchan, & McLeish, 1995).

D'autres mécanismes sont impliqués, telles que la diminution de l'expression monocytaire du récepteur inhibiteur FcγRIIb au cours de l'infection à *H. Pylori* ou l'induction de clones lymphocytaires B polyclonaux lors de l'infection à EBV (Cines, Bussel, Liebman, & Luning Prak, 2009; Liebman, 2008). Par ailleurs, l'infection chronique par le VHC peut entraîner la production de complexes immuns circulants qui se lient de façon non spécifique aux plaquettes et accélèrent leur clairance.

3.4 Physiopathologie du PTI

La thrombopénie immunologique résulte de la mise en place d'un processus auto-immun complexe et probablement hétérogène d'un patient à l'autre, expliquant les présentations cliniques et des réponses thérapeutiques différentes (Figure 11).

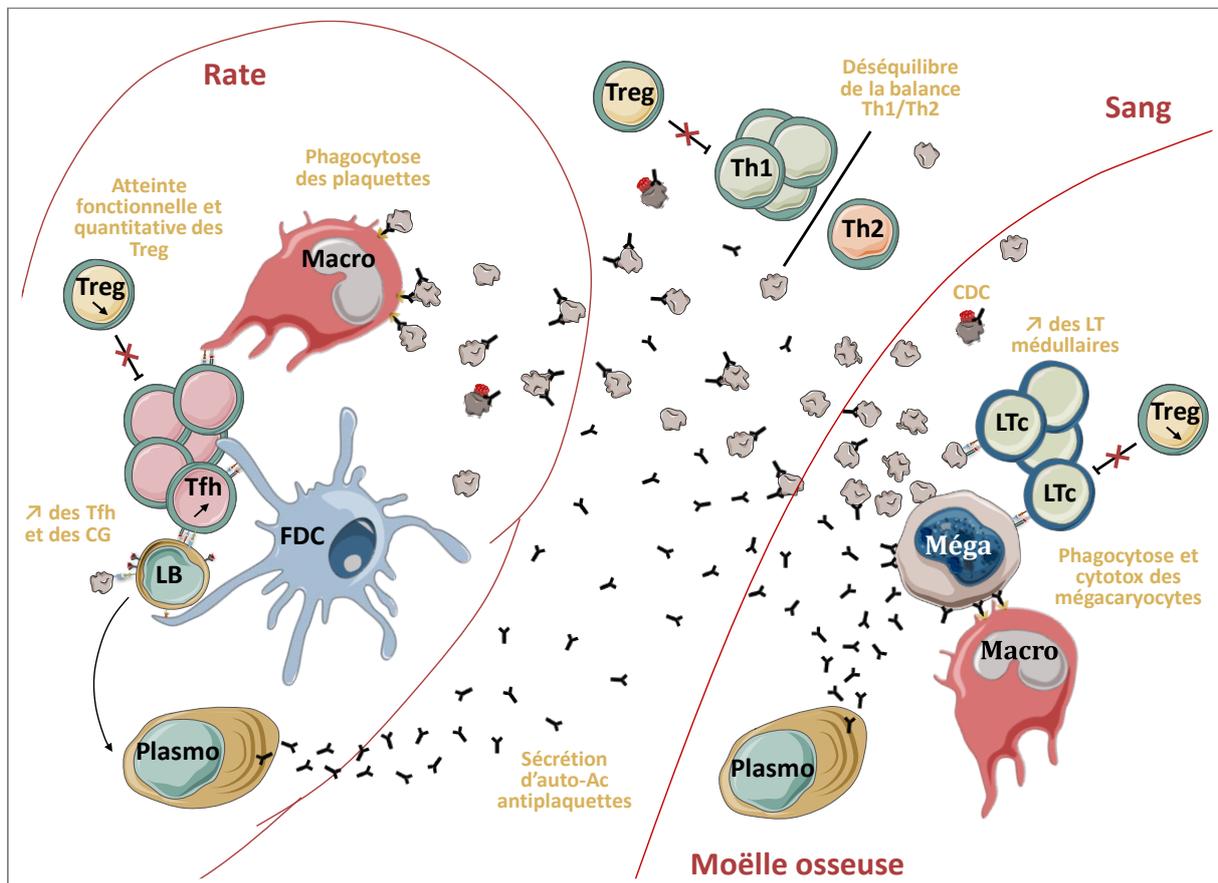


Figure 11 : Physiopathologie du PTI – Adapté de Audia, Autoimmunity Reviews 2017

Les macrophages spléniques phagocytent les plaquettes opsonisées puis présentent des Ag dérivés des plaquettes à l'origine de l'activation des LT CD4⁺ autoréactifs. Ces LT CD4⁺ et plus particulièrement les Tfh, participent à la stimulation et maturation des LB autoréactifs, qui reconnaissent les antigènes plaquettaires natifs présentés à la surface des FDC. Les LB autoréactifs différenciés en plasmocytes migrent vers la moelle osseuse, ou nichent dans la rate, et produisent les anticorps antiplaquettaires ciblant notamment les glycoprotéines GPIIb/IIIa et GPIb/IX.

La polarisation des LT circulants est déséquilibrée avec une augmentation des ratios Th1/Th2 et Tc1/Tc2, ce qui favorise l'activation des lymphocytes T cytotoxiques dont le recrutement médullaire est augmenté. Dans la moelle les mégacaryocytes sont opsonisés par les auto-anticorps et par conséquent sont la cible de cytotoxicité dépendante des Ac par les macrophages spléniques.

Enfin un déficit périphérique et médullaire, fonctionnel et/ou quantitatif des Treg se traduit par un défaut de régulation de la réponse auto-immune.

3.4.1 Les plaquettes, cible de la réponse immunitaire au cours du PTI

L'hypothèse d'une destruction plaquettaire par un composant du plasma a été démontrée dès 1951 avec la publication de Harrington et Hollingsworth, qui rapportait l'induction d'une thrombopénie sévère transitoire chez des sujets sains après transfusion de plasma de patients atteints de PTI (Harrington, Minnich, Hollingsworth, & Moore, 1951). Depuis de nombreux travaux ont confirmé qu'il s'agissait d'auto-anticorps, principalement de classe IgG1. Ces anticorps antiplaquettes sont dirigés contre un ou plusieurs épitopes des GP plaquettaires, la GPIIb/IIIa principalement, la GPIb/IX et la GPIa/IIa, qui correspondent respectivement aux récepteurs du fibrinogène, du facteur Von Willebrand et du collagène (McMillan, 2007). Les auto-anticorps sont à l'origine de la destruction des plaquettes par phagocytose médiée par les fragments Fc et par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Ils sont également responsables de la liaison du complément entraînant un phénomène de cytotoxicité dépendante du complément (Complement-Dependent Cytotoxicity - CDC) ou de façon plus anecdotique de l'induction de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS - *reactive Oxygen species*) (Nardi, Tomlinson, Greco, & Karpatkin, 2001).

Le risque hémorragique au cours du PTI ne survient habituellement que pour des taux très bas de plaquettes (<20-30 G/L). En effet, les fonctions d'hémostase primaire sont préservées malgré la liaison des auto-Ac aux plaquettes (Rand & Dean, 1998). D'autre part, le pool plaquettaire au cours du PTI est constitué essentiellement de plaquettes jeunes, hyperactivées.

Alors que la détection d'auto-anticorps est possible en routine, elle est peu utile car l'absence d'anticorps antiplaquettes n'élimine pas le diagnostic de PTI : celle-ci peut être le fait de techniques de détection insuffisamment sensibles mais également du fait de mécanismes autres que la médiation humorale impliqués dans la destruction des plaquettes.

3.4.1.1 Dysfonctionnement de la réponse innée

3.4.1.1.1 Les macrophages

De par leurs fonctions effectrices et présentatrices d'antigène, les macrophages jouent un rôle central dans la physiopathologie du PTI.

Suite à l'opsonisation des plaquettes par les auto-anticorps, celles-ci sont phagocytées par les macrophages spléniques et dans une moindre mesure au niveau du foie (Heyns Adu et al., 1986). Cette liaison se fait *via* les récepteurs FcγRI, FcγRIIA et FcγRIIIa dont l'affinité est augmentée par un polymorphisme prédominant chez certains patients (Audia, Mahevas, et al., 2017; Kuwana, Okazaki, & Ikeda, 2009).

En 2009, Kuwana a montré *ex vivo* que les macrophages spléniques de patients atteints de PTI pouvaient stimuler spontanément les clones lymphocytaires T autoréactifs reconnaissant des peptides de GPIIb/IIIa sans chargement préalable de l'antigène, ce qui n'était pas le cas des DC et des LB. De surcroît, l'augmentation de l'expression de HLA-DR et du récepteur de costimulation CD86 à la surface des macrophages témoigne de leur activation (Audia, Mahevas, et al., 2017).

Ces propriétés et aberrations fonctionnelles confèrent aux macrophages spléniques un rôle primordial dans l'activation des LT et la diversification antigénique.

Par ailleurs, au cours du PTI, le taux sérique de GM-CSF est augmenté, tout comme la fréquence des monocytes surexprimant le récepteur FcγRI, avec un ratio FcγRIIa/FcγRIIb augmenté et une capacité de phagocytose amplifiée (Abboud, Laver, Xu, Weksler, & Bussel, 1996; X. G. Liu et al., 2011).

3.4.1.1.2 Les cellules dendritiques

Les DC au cours du PTI, participent à l'activation des LT par la présentation des Ag plaquettaires phagocytées mais également des Ag dérivés de corps apoptotiques plaquettaires (Catani et al., 2006).

Au cours du PTI, les DC dérivées des monocytes présentent une surexpression de HLA-DR et de CD86 et sécrètent de plus grandes quantités d'IL-12 (Chu et al., 2006). Néanmoins, contrairement aux macrophages spléniques, les DC n'induisent pas la prolifération des clones T autoréactifs *ex vivo* sans un chargement préalable avec les Ag plaquettaires GPIIb/IIIa (Kuwana et al., 2009).

3.4.1.1.3 Les cellules lymphoïdes innées et les NK

Les données de la littérature sur l'implication des ILC au cours du PTI concernent exclusivement les cellules NK et les résultats sont divergents.

En 2015, il a été rapporté au cours du PTI un nombre des NK circulants identique à ceux des témoins mais avec un déficit fonctionnel portant sur la production d'IFN-γ et leur fonction cytotoxique. En revanche, la cytotoxicité dépendante des anticorps des NK spléniques est augmentée (Ebbo et al., 2015).

Une autre équipe a étudié le compartiment de NK sanguin selon la sévérité des manifestations hémorragiques des patients. Le taux de NK CD56^{high} circulants était plus élevé chez les patients présentant un syndrome sévère alors que le taux des NK totaux restait

identique. L'expression de TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), important régulateur négatif de la transcription d'IFN- γ , était diminuée dans la population de cellules NK CD64^{high} des patients atteints de PTI, en particulier lorsque les manifestations hémorragiques étaient sévères (Zahran, Youssef, Elsayh, Embaby, & Ibrahim, 2017). Enfin, la population de NK totale circulante est également moindre au cours de la phase aiguë du PTI de l'enfant (El-Rashedi, El-Hawy, Helwa, & Abd-Allah, 2017).

3.4.1.2 Altération de la réponse humorale

Il s'agit du premier mécanisme mis en évidence, par la découverte des Ac antiplaquettes, plaçant les LB autoréactifs au cœur de la physiopathologie du PTI.

Les centres germinatifs (CG), site de maturation du LB, sont observés en plus grand nombre au cours du PTI comparativement à des rates saines. Cette dysrégulation est en partie liée à l'augmentation des Tfh et se traduit par une corrélation positive entre la fréquence des Tfh, celle des LB du centre germinatif et celle des plasmocytes (Audia et al., 2014).

Les plasmocytes autoréactifs de longue durée de vie sont impliqués dans l'échec du rituximab (RTX). N'exprimant pas le CD20, cible du RTX, ils peuvent nicher dans la rate ou la moelle osseuse, expliquant la persistance de la maladie (Kuwana, Iki, & Urabe, 2007; Mahevas et al., 2013).

L'activation des LB par l'axe CD40/CD40L n'est pas exclusivement médié par les Tfh. Les plaquettes sont probablement elles même activatrices des LB, car elles expriment CD40L, expression qui est par ailleurs augmentée au cours du PTI. *In vitro*, elles sont en mesure d'induire la prolifération de LB ainsi que la production d'auto-anticorps (Solanilla et al., 2005).

L'altération du contrôle lymphocytaire B est également médiée par une production accrue de la cytokine BAFF dans le sérum des patients, probablement par les monocytes sanguins (Vincent, Saulep-Easton, Figgett, Fairfax, & Mackay, 2013; Zhu et al., 2009). Physiologiquement, cette cytokine est impliquée dans la différenciation, la prolifération et la survie des LB. L'expression de l'ARNm du récepteur de BAFF des cellules mononucléées spléniques est 15 fois supérieure à celle des cellules mononucléées sanguines (*Peripheral blood mononuclear cell* - PBMC) des patients et BAFF contribue à la survie des plasmocytes spléniques (Thai et al., 2018; Zhou et al., 2009).

Les interactions entre Tfh et LB sont réciproques puisque la présence de LB est requise pour la survie des Tfh (Audia, Mahevas, et al., 2017) et que les LB activés peuvent également activer les clones T autoréactifs par présentation d'Ag et contribuer à la polarisation de la réponse cellulaire par la production de cytokines pro-inflammatoires.

3.4.1.3 Dysfonctionnement de la réponse cellulaire

3.4.1.3.1 Polarisation lymphocytaire

Comme c'est le cas dans de nombreuses maladies auto-immunes, il existe un déséquilibre entre la réponse pro et anti-inflammatoire au cours du PTI.

Dès 1996, l'équipe de Semple a rapporté une augmentation des taux sériques d'IL-2 et d'IFN- γ , reflet de la polarisation Th1 prédominante. Ceci a été confirmé avec la mise en évidence du déséquilibre des balances Th1/Th2 et Tc1/Tc2 dans le sang en lien avec une diminution des réponses Th2 et Tc2 (Panitsas et al., 2004; Stasi et al., 2007; T. Wang et al., 2005). Ainsi, l'expression de GATA-3 au sein des splénocytes et des cellules sanguines est diminuée alors que celle de T-bet est stable chez les patients en phase active. D'autre part, les taux de sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et IL-10 par les LT CD4⁺ sont moindres au cours du PTI (Panitsas et al., 2004; T. Wang et al., 2005).

Au niveau splénique, nous avons rapporté un déséquilibre de la balance Th1/Treg, qui contribue à l'activation des cellules cytotoxiques, notamment chez les patients en échec du traitement par RTX (Audia et al., 2013).

Les résultats des travaux portant sur le rôle des LT Th17 au cours du PTI sont discordants et leur implication dans la physiopathologie du PTI n'est donc pas clairement établie. Certains auteurs décrivent une augmentation du compartiment Th17 (Hu et al., 2011; Ji et al., 2012; Rocha et al., 2011; J. Zhang, D. Ma, et al., 2009) alors que pour d'autres, la polarisation sanguine TH17 est similaire à celle des sujets témoins (Sollazzo et al., 2011). La proportion de LTh17 spléniques au cours du PTI est quant à elle identique à celle observée au sein de rates de sujets témoins (Audia et al., 2013).

3.4.1.3.2 Cytotoxicité des LTCD8⁺

Plusieurs indices laissent supposer l'implication d'autres mécanismes qu'une réponse humorale dans la destruction plaquettaire périphérique au cours du PTI, tels que l'absence d'induction systématique de thrombopénie par la transfusion de plasma de patients à des

témoins sains (Harrington et al., 1951), l'absence de détection d'auto-anticorps sériques chez 40% des patients ou la polarisation lymphocytaire en faveur d'un profil Th1.

En 2003, l'équipe de B. Olsson montre une augmentation de la transcription des protéines impliquées dans les mécanismes de cytotoxicité, granzyme A, granzyme B et perforine, et rapporte pour la première fois la lyse *in vitro* des plaquettes par les LT cytotoxiques autologues de patients. Par ailleurs, ils observent une augmentation de l'expression des récepteurs KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*), capables de contrôler l'activité cytotoxique des NK, chez les patients en rémission (Olsson et al., 2003).

Cette cytotoxicité médiée par les LTCD8⁺ a été confirmée à plusieurs reprises (F. Zhang et al., 2006; C. Zhao et al., 2008) et nous avons montré que les LT cytotoxiques spléniques pouvaient être impliqués dans les mécanismes d'échappement au RTX.

3.4.1.3.3 Les LTCD4⁺, clé de voute des réponses humorales et cytotoxiques

De par le rôle majeur des Tfh dans la maturation des LB et la polarisation pro-Th1 qui soutient l'activation des cellules cytotoxiques, les LTCD4⁺ ont un rôle primordial dans l'orchestration et le maintien des deux voies de destruction plaquettaire.

Le travail de Chow publié en 2010 illustre cette position centrale dans un modèle murin de PTI basé sur le transfert de splénocytes de souris KO-CD61 (*knock-out*) et immunisées contre le CD61, à des souris immunodéficientes (*Severe Combined ImmunoDeficiency* - SCID), dont les plaquettes expriment l'antigène plaquettaire CD61 (GPIIIa) (Chow et al., 2010). Les auteurs ont montré l'implication à la fois de la réponse humorale et cytotoxique dans la survenue de la pathologie : lorsque la fraction splénique transférée est préalablement déplétée en LB, la thrombopénie est induite malgré une absence totale de sécrétion d'Ac antiplaquettes et dépend des LT CD8⁺. A l'inverse, dans le cas d'une déplétion en LTCD8⁺ préalable, la thrombopénie est sévère et des anticorps antiplaquettes sont détectés.

Mais ce travail révèle avant tout le caractère indispensable des LT CD4⁺, dans le développement de la réponse antiplaquettaire humorale et dans la réponse cytotoxique, puisque lors du transfert de la fraction splénique déplétée en LTCD4⁺, il n'y a pas d'induction de thrombopénie.

D'autre part, l'analyse du répertoire de la région hypervariable de la chaîne β du TCR des LT auxiliaires révèle un profil oligoclonal des cellules auto-réactives, dirigés contre un épitope N-terminal du déterminant antigénique GPIIb/IIIa (Stasi et al., 2007). De plus, les populations lymphocytaires T auto-réactives, plus particulièrement les LTCD4⁺, voient leur processus de

mort cellulaire induite par l'activation (*Activation-Induced Cell Death* - AICD) perturbé, favorisant la survie des clones autoréactifs lymphocytaires. Les LTh présentent une augmentation de la transcription du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et une diminution de celle du facteur pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-Associated X protein*), associée à une altération de l'expression de Fas-L (*Apoptosis Stimulating Fragment Ligand*), et des caspases 8 et 1 (Stasi et al., 2007).

3.4.2 Atteinte de la mégacaryopoïèse

Simultanément à la destruction périphérique des plaquettes, les mécanismes compensatoires de régulation de la mégacaryopoïèse sont insuffisants au cours du PTI, et les mégacaryocytes sont eux même la cible du système immunitaire.

De façon surprenante, au cours du PTI, la thrombopénie ne s'accompagne pas d'une élévation du taux de thrombopoïétine (TPO), le principal facteur de croissance régulateur de la prolifération des précurseurs mégacaryocytaires et de l'endomytose des mégacaryocytes (Vainchenker, Besancenot, & Favale, 2013).

Physiologiquement, la production hépatique de la thrombopoïétine est relativement stable et régulée par la sénescence des plaquettes (Grozovsky et al., 2015). La régulation de l'activité de la TPO est intimement liée à sa liaison à son récepteur c-Mpl qui est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, les mégacaryocytes à tous les stades de différenciation et par les plaquettes. Ainsi, lorsque le contingent plaquettaire sanguin est normal, une grande partie de la TPO va se lier aux plaquettes *via* c-Mpl, empêchant ainsi sa biodisponibilité au niveau médullaire et créant un équilibre entre le taux de plaquettes circulantes et la production mégacaryocytaire (Kuter & Rosenberg, 1995).

Au cours du PTI, le pool de mégacaryocytes médullaires est proche de la normale, et malgré une durée de vie limitée, le taux de plaquettes gagnant la circulation est important et non sénéscent. De ce fait, le taux de TPO produite par le foie est insuffisamment élevé pour stimuler la thrombopoïèse, contrairement à ce qui est observé lors des thrombopénies centrales, comme au cours de l'aplasie médullaire par exemple (Kosugi et al., 1996).

Les cellules de la lignée mégacaryocytaire exprimant la GPIIb/IIIa et GPIb/IX, sont également la cible des auto-anticorps du fait de la diffusion passive des Ac sériques dans la moelle osseuse et de leur sécrétion par les plasmocytes matures et les plasmocytes de longue durée de vie résidants dans la moelle osseuse (Kuwana et al., 2007; Kuwana, Okazaki, Kaburaki, & Ikeda, 2003).

Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'ajout d'Ac antiplaquettes aux cultures de différenciation mégacaryocytaire de cellules CD34⁺ dérivées de sang de cordon entraîne un déficit quantitatif et qualitatif de la maturation des mégacaryocytes, se traduisant par une altération de la production plaquettaire (Ji et al., 2012; Lev et al., 2014; McMillan, Wang, Tomer, Nichol, & Pistillo, 2004).

Au cours du PTI, l'expression de la chémokine membranaire CX3CL1 et de la molécule d'adhésion VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) est normale dans la moelle. Cependant, les lymphocytes T sont en plus grand nombre dans la moelle osseuse des patients en raison de la surexpression de leurs récepteurs CX3CR1 (récepteur de CX3CL1) et de VLA-4 (*Very Late Activation antigen-1* - récepteur de VCAM-1), molécules de recrutement tissulaire des lymphocytes cytotoxiques activés (Olsson, Ridell, Carlsson, Jacobsson, & Wadenvik, 2008).

L'apoptose des mégacaryocytes étant un processus endogène normal dans la genèse des plaquettes, sa description au cours du PTI est d'interprétation difficile. Elle serait cependant plus importante chez les patients atteints de PTI en raison d'une cytotoxicité dépendante du complément et de cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac suite à l'opsonisation des mégacaryocytes (McMillan et al., 2004). Ces observations sont corroborées par l'étude en microscopie électronique des mégacaryocytes médullaires des patients qui révèle des anomalies morphologiques. Les modifications structurelles, témoignant du processus apoptotique tels qu'une condensation de la chromatine, un gonflement mitochondrial, une vacuolisation cytoplasmique sont présentes chez plus de ¾ des patients atteints de PTI (Houwerzijl et al., 2004).

3.4.3 Rupture de tolérance périphérique

La genèse et la perpétuation des mécanismes auto-immuns impliqués au cours du PTI sont possibles du fait d'une rupture des mécanismes de tolérance périphérique.

L'existence d'un déficit quantitatif des Treg sanguins au cours du PTI est débattue et dépend du phénotype utilisé pour l'identification de cette population : CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺Foxp3⁺ ou CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺. Certains auteurs rapportent une diminution de leur fréquence (Ling, Cao, Yu, & Ruan, 2007; B. Liu et al., 2007; Stasi et al., 2008) alors que d'autres, dont notre équipe, décrivent un maintien du taux de LTreg circulants au cours du PTI (Audia, Lorcerie, Godeau, & Bonnotte, 2011; Bao et al., 2010; Yu et al., 2008). En revanche, dans les compartiments

spléniques et médullaires, site de la réponse inflammatoire, la fréquence des LTreg est diminuée (Audia, Samson, et al., 2011; Olsson et al., 2008).

In vitro, la capacité des Treg sanguins et spléniques à réprimer la prolifération de LT effecteurs est altérée, tout comme leur propension à produire les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-35, essentielles à la régulation de réponse Th1 et Th17 (B. Liu et al., 2007; Stasi et al., 2008; Yu et al., 2008).

Concernant la population lymphocytaire B, les travaux de Li en 2012 puis Gudbrandsdottir en 2017 rapportent une diminution de la population régulatrice CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} sanguine au cours du PTI chronique ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-10 par la population lymphocytaire B totale, ce qui altère leur capacité à inhiber l'activation des monocytes *in vivo* (Gudbrandsdottir, Brimnes, Kollgaard, Hasselbalch, & Nielsen, 2018; X. Li et al., 2012).

Les propriétés tolérogènes des DC au cours du PTI sont également déficientes, ainsi l'expression de IDO par les moDC (*monocyte derived DC*) matures est diminuée et corrélée à une moindre conversion des LTCD4⁺ naïfs en Treg (Catani et al., 2013). D'autre part le taux de TIMP-3 (*Metalloproteinase inhibitor 3*) sérique est significativement plus bas chez les patients (Catani et al., 2006). Cette protéine inhibitrice de métalloprotéase, produite par les macrophages et les DC tolérogènes, entraîne une réduction de l'expression de CD86, et de la production d'IL-12 et TNF- α , favorisant de ce fait la polarisation Th2 des lymphocytes (Shao et al., 2012).

3.5 Prise en charge thérapeutique et mécanismes d'échappement

Le traitement du PTI a pour objectif d'augmenter le taux de plaquettes au-dessus de 30 G/L, taux généralement suffisant pour empêcher tout saignement (**Figure 12**). De ce fait, l'instauration d'un traitement n'est pas systématique. En raison d'étiologies diverses et de l'implication variable des différents mécanismes physiopathologiques, la réponse aux traitements est variable et imprévisible d'un patient à l'autre.

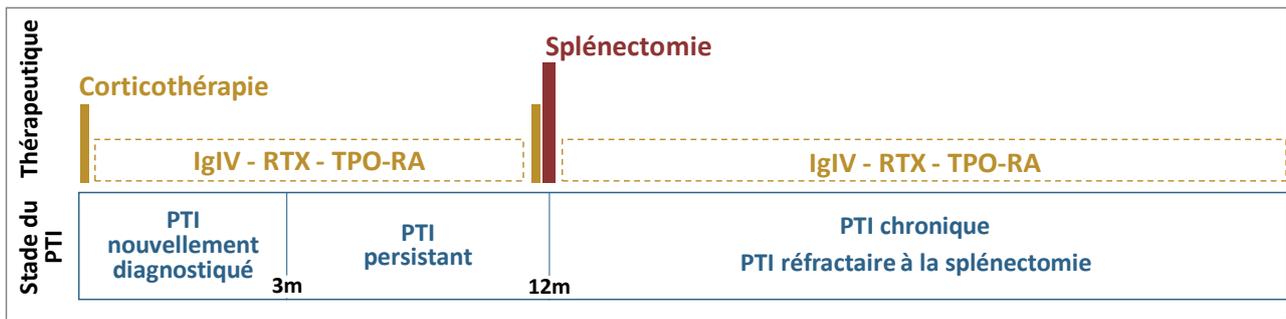


Figure 12 : Stades et thérapies de la thrombopénie immunologique – IgIV : Immunoglobulines polyvalentes IntraVeineuses, RTX : Rituximab, TPO-RA: *Thrombopoietin Receptor Agonist*

3.5.1 1^{ère} ligne

Lorsque le syndrome hémorragique est marqué ou que le taux de plaquettes est inférieur à 20-30 G/L, les **corticoïdes** sont généralement proposés en première ligne de traitement, et permettent une réponse transitoire dans près de 80% mais sans incidence sur l'évolution de la pathologie.

Les glucocorticoïdes répriment de nombreux gènes inflammatoires dans toutes les cellules immunitaires. Au cours du PTI, ceci conduit au rétablissement du ratio Th1/Treg, à une augmentation du taux de Treg circulants et un rétablissement du taux sérique de BAFF (Barnes, 2006; Cao et al., 2012; Kamhieh-Milz, Ghosoun, Sterzer, & Salama, 2018).

A forte dose, les corticoïdes permettent également de rétablir la balance entre l'expression des FcγR inhibiteurs et activateurs à la surface des monocytes circulants, participant ainsi à la modulation de leur fonction phagocytaire (X. G. Liu et al., 2011). La corticothérapie permet également de corriger les anomalies morphologiques mégacaryocytaires.

L'administration **d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (IgIV)** est réservée aux patients réfractaires à la corticothérapie ou en cas de syndrome hémorragique important. Les IgIV sont efficaces dans près de 80% des cas avec une augmentation du taux de plaquettes en 1 à 3 jours seulement. Cependant, en raison de la durée de vie des IgG, la réponse est transitoire, de 1 à 3 semaines et n'apporte pas de bénéfices sur l'évolution de la pathologie sur le long terme.

L'efficacité thérapeutique des IgIV repose sur divers mécanismes immunorégulateurs (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Elles bloquent les FcγR activateurs impliqués dans la phagocytose des plaquettes opsonisées, saturant les FcR néonataux exprimés par les cellules endothéliales, accélérant ainsi la clairance des auto-anticorps, et inhibent la maturation des DC en les orientant vers un profil tolérogène

Chez la souris, l'administration d'IgIV peut être à l'origine d'une activation et d'une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs FcγRIIb d'une part et diminution de l'expression des FcγR activateurs d'autre part. Au cours du PTI, l'expression du FcγRIIb par les macrophages spléniques et les monocytes circulants des patients n'est pas augmentée. En revanche, leur capacité de phagocytose est altérée et la clairance des plaquettes est diminuée par les IgIV (Audia, Santegoets, et al., 2017; Newland & Macey, 1994; Shimomura et al., 2012).

3.5.2 2^{ème} ligne

La stratégie à adopter vis-à-vis des PTI persistants ou chroniques n'est pas parfaitement codifiée ni consensuelle. Avec une normalisation du taux de plaquettes chez 60 à 70% des patients, la **splénectomie** est la seule thérapeutique curative du PTI et reste de ce fait le traitement de référence des formes chroniques (Kojouri, Vesely, Terrell, & George, 2004). Néanmoins, l'apparition de nouvelles thérapeutiques, en particulier le RTX et les agonistes de récepteur de la TPO (TOP-RA), a profondément modifié la stratégie thérapeutique.

La splénectomie permet de prolonger la survie des plaquettes par l'élimination de leur principal site de destruction d'une part et du lieu de maturation des LB autoréactifs d'autre part. Ainsi les patients répondeurs voient leurs taux de LT et LB mémoires circulants diminuer (Kuwana, Okazaki, Kaburaki, Kawakami, & Ikeda, 2002), accompagné d'une diminution de l'expansion clonale des LT autoréactifs (Fogarty et al., 2003), d'une élévation du taux de Treg (Sakakura et al., 2007) et de la suppression d'une niche des plasmocytes de longue vie (Mahevas et al., 2013).

Cette approche thérapeutique radicale n'est pas anodine mais le taux de mortalité est faible (<1%). Puisqu'une rémission spontanée peut survenir dans l'année qui suit le diagnostic chez près de 30% des patients adultes, la splénectomie n'est habituellement pas proposée avant un an d'évolution, c'est-à-dire au stade de PTI chronique (Rodeghiero & Ruggeri, 2009). L'asplénie expose au risque infectieux, notamment envers les germes encapsulés (Bisharat, Omari, Lavi, & Raz, 2001). Une complication infectieuse peut survenir chez 2 à 5% des patients splénectomisés, majoritairement au cours des deux premières années, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenza* et *Nisseria meningitidis* étant les trois germes les plus incriminés. Ces infections peuvent être d'une extrême gravité, il est donc indispensable de vacciner les patients au moins deux semaines avant la splénectomie contre ces germes.

Par ailleurs, dans les semaines succédant l'intervention, plus de 70% des patients présentent une thrombocytose, définie par un taux de plaquettes supérieur à 400 G/L, ce qui peut majorer

le risque d'accident thromboembolique, notamment au niveau des veines porte et splénique (Bouvier et al., 2017; Boxer, Braun, & Ellman, 1978).

Pour 1/3 des patients « non répondeurs » à la splénectomie (PTI réfractaire), le pool de lymphocytes mémoires autoréactifs sanguin et la clonalité des LT subsistent. L'origine de cette non réponse n'est pas clairement établie : elle est probablement le fait de la localisation médullaire des plasmocytes autoréactifs et / ou d'une destruction hépatique des plaquettes.

Depuis plusieurs années, le **rituximab** est envisagé en 2nde ligne thérapeutique et permet ainsi d'éviter ou de retarder le recours à la splénectomie (Godeau et al., 2008). La réponse est relativement rapide (2 à 8 semaines) et persiste dans 40% des cas à 2 ans, mais est seulement de 20% à 5 ans (Khellaf et al., 2014; V. L. Patel et al., 2012). Le RTX est un anticorps chimérique anti-CD20, qui cible les cellules lymphocytaire B, du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature, conduisant à leur destruction par des phénomènes d'ADCC, de CDC et d'apoptose.

De façon surprenante le RTX entraîne, chez les patients répondeurs, la correction des anomalies des populations lymphocytaires T, en restaurant le profil polyclonal du TCR, et en rééquilibrant les réponses Th1/Th2 et Tc1/Tc2 (Stasi et al., 2007). Une augmentation de la population Treg circulante et un rétablissement de leur fonctionnalité ont également été décrits (Stasi et al., 2008).

Le RTX est inefficace dans 40% des cas et les causes de cet échec sont multiples et partiellement connues. D'une part, le RTX ne cible pas les plasmocytes qui n'expriment pas le CD20, notamment les plasmocytes de longue durée de vie qui peuvent donc maintenir la production des anticorps antiplaquettes (Mahevas et al., 2013). La prédominance d'une destruction plaquettaire par les LT CD8 cytotoxiques est également impliquée dans l'échec du rituximab. Ainsi, nous avons observé dans les rates des patients réfractaires au RTX une restriction oligoclonale de la population LT CD8, une augmentation des LT CD8 mémoires ainsi qu'une polarisation Tc1 et Th1 prépondérante (Audia et al., 2013).

Afin de palier à la production médullaire inadaptée, les **agonistes du récepteur de la TPO** (TPO-RA) sont également utilisés en 2nde ligne thérapeutique et permettent une correction de la thrombopénie dans 70 à 85% des cas, sans pour autant inhiber la réponse auto-immune (Kuter, 2008). Ce traitement suspensif permet tout de même d'obtenir une réponse prolongée après utilisation transitoire chez environ 15% des patients. Cette immunomodulation pourrait être le fait de la restauration de la fonctionnalité des LTreg (Bao et al., 2010) et le

rétablissement de l'équilibre entre les FcγR activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface des monocytes (X. G. Liu et al., 2016).

Dans des rares cas, le PTI est multi-réfractaire, c'est-à-dire que les patients ne répondent pas aux traitements de 2nde ligne, incluant la splénectomie, le RTX et les TPO-RA. Le pronostic vital peut être mis en jeu et la prise en charge repose alors sur des associations thérapeutiques, notamment avec des **immunosuppresseurs**.

Actuellement, de nouvelles molécules sont à l'étude ayant pour cible les FcγR (clinicaltrials.gov NCT00244257), l'interaction CD40/CD154 (clinicaltrials.gov NCT02009761) ou la molécule BAFF ((clinicaltrials.gov NCT01440361 et NCT01609452). A plus long terme, des thérapeutiques régulant l'apoptose plaquettaire (L. Zhao et al., 2017) et des stratégies de thérapie cellulaire comme la transfusion de cellules souches mésenchymateuses (Ma et al., 2012) ou de Treg (X. L. Zhang et al., 2009) pourrait être envisagées.

4 Problématique

De par leur sécrétion de cytokines ou par des mécanismes plus spécifiques comme la présentation antigénique, les ILC sont en mesure de moduler la réponse lymphocytaire T et B au sein des muqueuses afin de préserver l'homéostasie, ou de participer à une réponse anti-infectieuse. Pour autant, les ILC spléniques humaines n'ont pas été décrites dans des conditions physiologiques et leur implication dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, au sein des organes lymphoïdes secondaires est peu documentée.

Le premier objectif de ce travail était donc d'identifier et de caractériser les ILC auxiliaires spléniques humaines dans des conditions physiologiques et de les comparer aux ILC circulantes. Nous avons également recherché les sous-populations d'ILC3 décrites par Bjorklund en 2016 (ILC3 NCR⁺, NCR⁻CD62L⁺ et NCR⁻HLA-DR⁺), les ILC reg (ou ILC-10) et tenté de caractériser la population d'ILC3 afin d'évaluer les propriétés tolérogène ou activatrices de ces cellules.

Par la suite nous avons caractérisé les ILC issues de la rate de patients atteints de PTI afin de déterminer leur implication dans la genèse ou l'évolution de la physiopathologie. Les questions étaient multiples :

- La fréquence des ILC spléniques et de leurs sous-populations est-elle modifiée au cours du PTI ?
- Les ILC présentent-elles un profil cytokinique pro-inflammatoire ?
- Le profil d'expression des chémokines permet-il d'envisager une localisation des ILC dans les PALS ou dans les centres germinatifs au cours du PTI ?
- Les ILC3 ont-elles des propriétés activatrices ou tolérogènes au cours du PTI ?

Dans le but d'apporter des éléments de réponse à ces nombreuses questions, nous avons réalisé une étude phénotypique des ILC dans la rate de patients atteints de PTI et étudié l'expression des molécules d'adressage, leur profil d'activation et leurs capacités de sécrétion cytokinique en réponse à une stimulation pharmacologique.

Enfin, nous avons mené une expérience d'expansion des ILC spléniques dans le but d'entreprendre une étude fonctionnelle des mécanismes mis en jeu.

MATERIEL ET METHODE

1 Cohorte de patients

L'ensemble des patients atteints de PTI et des donneurs sains ont donné leur consentement éclairé en conformité avec les principes éthiques de la déclaration d'Helsinki, et ont été inclus dans le cadre de protocoles d'études cliniques du centre hospitalier de Dijon, approuvés par le comité d'éthique de Bourgogne.

Cette étude a nécessité le recueil de prélèvements sanguins de 9 donneurs sains, indemnes de pathologies inflammatoires, cancéreuses, auto-immunes ou infectieuses récentes et n'ayant pas reçu de traitement par corticoïdes ou immunosuppresseurs le mois précédant le prélèvement.

Dix-huit patients atteints de PTI primaire ont été inclus, selon les critères suivants : taux de plaquettes inférieur à 100 G/L, et exclusion des thrombopénies d'origine virale, familiale ou induite par une prise médicamenteuse ainsi que de toutes maladies auto-immunes pouvant être associées à une thrombopénie. Les splénectomies ont été réalisées dans le cadre de la prise en charge thérapeutique habituelle des patients. En première ligne thérapeutique, 16 des 18 patients avaient reçu des corticoïdes et 14 des IgIV. Préalablement à la splénectomie, 8 patients ont reçu en 2nde ligne de traitement du RTX, des TPO-RA, de la dapsone ou d'autres molécules.

	Contrôles (n=11)	PTI (n=18)	p
Informations générales			
Age [interquartile range - IQR]	47 [28,5 - 66,5]	48,4 [29,2 - 54,8]	0,7
Sex ratio (femme / homme)	6/5	9/9	1
Taux de plaquettes (G/L)	221,3 ± 59,8	21,5 ± 8,3	<0,001
Durée de la maladie (mois) [IQR]	-	24 [16,5 - 61,8]	
Traitements antérieurs, n (%)			
Corticoïde	-	16 (88,8)	
IgIV	-	14 (77,7)	
Rituximab	-	8 (44,4)	
Dapsone	-	8 (44,4)	
TPO-RA	-	7 (38,8)	
Autre	-	4 (22,2)	
Traitements précédents la splénectomie (2 semaines), n (%)			
IgIV	-	7 (3,38)	
TPO-RA	-	6 (33,3)	
Stéroïdes	-	4 (22,2)	
Aucun	-	1 (5,5)	
Réponse à la splénectomie, n (%)			
	-	14 (77,7)	

Tableau 1 : Caractéristiques des patients splénectomisés

Enfin, 11 prélèvements spléniques issus de splénectomies d'hémostase post-traumatiques ont été utilisés comme contrôles.

La moyenne d'âge et le sexe ratio des patients et des témoins splénectomisés sont identiques. Les caractéristiques de l'ensemble des patients splénectomisés sont présentées dans le **tableau 1**.

2 Méthodologie

2.1 Séparation des cellules mononucléées sanguines

Le prélèvement sanguin des donneurs sains a été recueilli dans des tubes héparinés puis le sang a été déposé sur une solution de polyfluorocarbone liquide de densité 1,077 (Ficoll®), à un ratio de 2/1 (sang/ficoll).

Après centrifugation 30 min à 800g, sans frein ni accélération, les cellules mononucléées sanguines (PBMC) peuvent être isolées grâce à la création d'un gradient de densité. Le sérum de densité 1,006 constitue la fraction supérieure, les PBMC ont été recueillies à l'interface des phases de sérum et de ficoll, tandis que les hématies et cellules polynucléées plus denses ont sédimentés au fond du tube. Les PBMC recueillies ont été lavées trois fois avec du tampon phosphate saline (*phosphate buffered saline* – PBS) puis phénotypées.

2.2 Dissociation et conservation des prélèvements spléniques

Dans l'heure suivant la splénectomie, des fragments spléniques 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 (chlorure d'ammonium 150mM, bicarbonate de potassium 10mM, EDTA 0,1 mM). Les splénocytes sont ensuite lavés dans du milieu de culture (*Roswell Park Memorial Institute medium* - RPMI) à 4°C, supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal (SVF), puis de nouveau filtrés. La viabilité des cellules est mesurée par un comptage cellulaire en présence de bleu trypan, colorant vital d'exclusion. Enfin, les cellules sont congelées à -196°C dans une solution cryoprotectrice de SVF et diméthylsulfoxyde à 10% (DMSO) jusqu'à utilisation.

2.3 Immunophénotypage

2.3.1 Appareil et configuration

2.3.1.1 BD Canto II

L'analyse phénotypique des cellules a été réalisée sur un cytomètre en flux Becton Dickinson (BD) Canto 10. Cet analyseur est doté de 3 lasers de 405nm, 488nm et 633nm, et peut mesurer jusqu'à 10 paramètres de fluorescence et 2 paramètres optiques (taille des cellules, *Forward scatter*, FSC - Granularité des cellules, *Side Scatter*, SSC)(Figure 13).

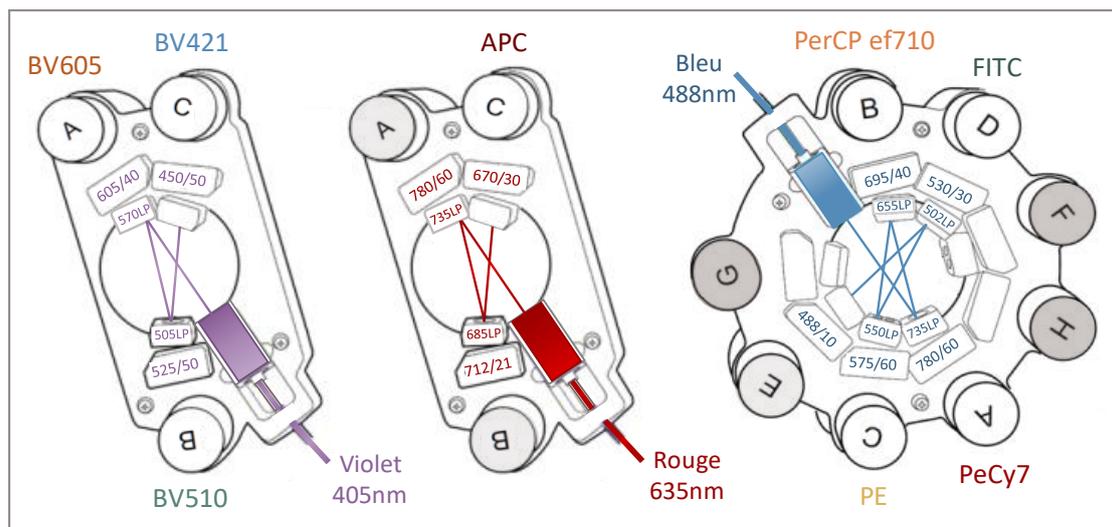


Figure 13 : Banc optique du cytomètre BD Canto 10 et fluorochromes utilisés pour l'immunophénotypage

En raison de la configuration de l'appareil, de la très faible représentation de notre population d'intérêt, de la complexité de son identification, et de la co-expression de la plupart des Ag recherchés, nous avons fait le choix de restreindre l'analyse à 8 paramètres de fluorescence afin de limiter la complexité analytique inhérente à la compensation, le risque d'artefacts et la distorsion du signal qu'elle provoque. Les fluorochromes utilisés sont le Brilliant Violet (Zheng, Lefebvre, & Laurent) 421, BV510, BV605, FITC (*Fluorescein Isothiocyanate-5*), PE (*Phycoerythrin*), PerCP ef710 (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex eFluor®710*), PeCy7 (*Phycoerythrin Cyanin7*), APC (Allophycocyanin). L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel BD FACSDiva™.

2.3.1.2 Matrice de compensation

Les billes de capture d'Ac « UltraComp eBeads™ » ont été utilisées pour générer la matrice de compensation des fluorochromes (Figure 14).

Conformément aux recommandations du fournisseur, les billes ont été marquées individuellement avec chacun des 8 fluorochromes choisis pour ce phénotype.

L'analyse de la fluorescence des mono-marquages sur l'ensemble des PMT (Photomultiplicateur) du cytomètre révèle le chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes et permet au logiciel d'acquisition DIVA de calculer la matrice de compensation à appliquer pour soustraire la contamination spectrale.

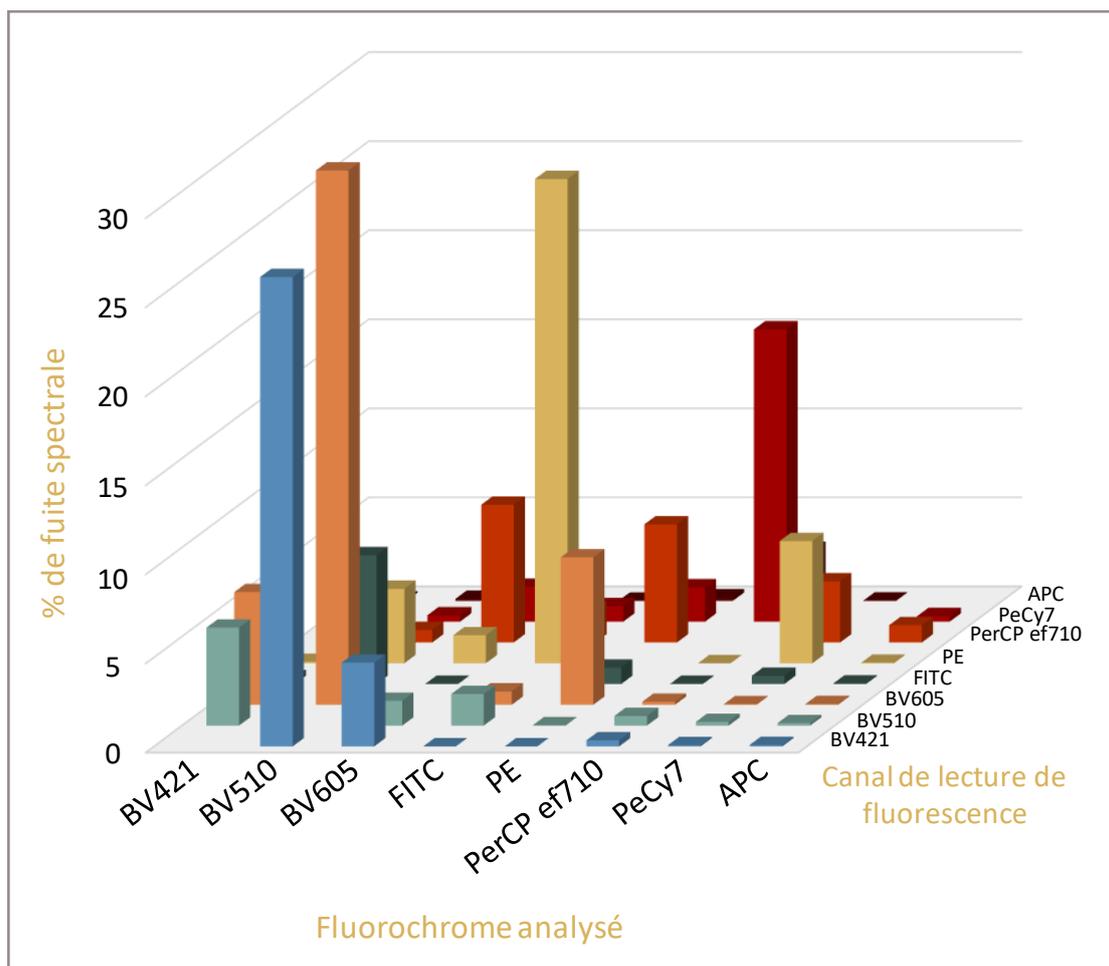


Figure 14 : Représentation de la fuite spectrale des fluorochromes – Matrice de compensation

2.3.2 Phénotypage membranaire

Le phénotypage membranaire des splénocytes décongelés et des PBMC a été réalisé dans du PBS supplémenté avec 1% d'albumine de sérum bovin (*bovin serum albumin* – BSA), pendant 30 min à 4°C.

En conformité avec la nomenclature proposée par Spitz en 2013, nous avons identifié les ILC en excluant d'abord les cellules des lignées lymphoïdes, myéloïdes, plasmacytoïdes, et les cellules souches par l'utilisation d'un cocktail d'Ac FITC appelé « *lineage* » (Lin) (**tableau 2**) (Spits et al., 2013).

Ly T	Ly B	NK	Mono Macro	DC	Masto	Cellules souches
CD3	CD19	CD16	CD14	CD123	FcεR1	CD34
TCRαβ	CD20	CD94	CD16	CD303		
TCRγδ						

Tableau 2 : Composition du cocktail d'exclusion (Lin)

Les ILC ont ensuite été identifiées par un anti-CD161 BV605 et un anti-CD127 BV510, et les sous-populations d'ILC distinguées par l'utilisation des anticorps anti-CRTh2 PeCy7, anti-CD117 BV421, et anti-NKp44 Per-eFluor710.

L'ensemble des Ac ayant permis la caractérisation de ces populations sont répertoriés dans le **tableau 3**.

Ag	Fluorochrome	Fournisseur	Ag	Fluorochrome	Fournisseur
Lineage cocktail 3 (CD3, CD14, CD19, CD20)	FITC	BD Pharmingen	HLA-DR	APC	Miltenyi
			CD40L	PE	eBiosciences
			ICOS	APC	eBiosciences
CD123	FITC	BD Pharmingen	BAFF	APC	eBiosciences
CD34	FITC	BD Pharmingen	Ki67	PE	Miltenyi
TCRαβ	FITC	eBiosciences	INF-γ	APC	eBiosciences
TCRγδ	FITC	eBiosciences	IL-17	PE	eBiosciences
FcεR1	FITC	eBiosciences	GM-CSF	APC	Miltenyi
CD303	FITC	Biologend	IL-10	PE	eBiosciences
CD16	FITC	eBiosciences	IL-22	PE	eBiosciences
CD94	FITC	Biologend	IL-5	APC	Miltenyi
CD127	BV510	Biologend	TNF-α	PE	eBiosciences
CD161	BV605	Biologend	IL-2	APC	eBiosciences
CRTH2	PeCy7	Biologend	CCR6	AlexaFluor647	Biologend
CD117	BV421	Biologend	CCR7	PE	eBiosciences
NKp44	PerCP-eFluor710	eBiosciences	CXCR5	PE	eBiosciences
CD80	PE	eBiosciences	CD62L	PE	eBiosciences
CD83	APC	Biologend	CXCR3	PE	BD Pharmingen

Tableau 3 : Liste et provenance des anticorps utilisés pour l'immunophénotypage

2.3.3 Sécrétion de cytokines

Afin de stimuler la production de cytokines des populations d'intérêt, les splénocytes ont été incubés 4h à la concentration de 10^6 cellules/ml de milieu RPMI et 10% SVF, à 37°C, en présence de PMA 0,1 µg/ml et de ionocycine 1µg/ml. L'activité de leur l'appareil de golgi a été inhibée par l'ajout de Brefeldine A (BD Golgi Pulg) à 1µl/ml, empêchant ainsi la sécrétion des cytokines produites et permettant leur détection au sein du cytoplasme.

La quantification des cytokines intracellulaires a été réalisée après fixation et perméabilisation des membranes cytoplasmiques en utilisant le kit « *Intracellular fixation and permeabilization buffer* » eBioscience™.

2.3.4 Expression des facteurs de transcription

Le marquage des facteurs de transcription et du marqueur de prolifération Ki67 a été réalisé après la fixation et perméabilisation des membranes cytoplasmiques et nucléaires par l'utilisation du kit « *True Nuclear™ transcription factor buffer set* » BioLegend.

2.4 Tri des ILC spléniques

Les ILC spléniques totales issues de la rate d'un patient atteint de PTI ont également été triées. Après dissociation de la rate, une première étape d'enrichissement par un tri magnétique a été réalisée en conditions stériles. Les cellules ont été marquées avec l'Ac lin3 FITC (BD - CD3 CD14 CD19 CD20) pendant 30 minutes à 4°C en présence d'un tampon de BSA et EDTA (*Running Buffer* - Miltenyi). L'utilisation de billes magnétiques dirigées contre la FITC a permis d'exclure les cellules exprimant ces marqueurs, permettant d'obtenir une fraction splénique enrichie en ILC. Le tri magnétique a été effectué avec l'*AutoMACS® pro separator* (Miltenyi) selon les recommandations du fournisseur.

Le tri par cytométrie en flux (BD FACSAria II) des ILC totales a été réalisé selon la stratégie de phénotypage habituelle, à partir des splénocytes déplétés en LT, LB et monocytes.

Le tri magnétique de 150 millions de splénocytes nous a permis d'obtenir 9,03 millions de cellules dans la fraction splénique enrichie à partir de laquelle nous avons trié 61 731 ILC.

2.5 Expansion des ILC spléniques

Dans le but de suivre leur prolifération, les ILC triées ont été marquées par un colorant cytoplasmique fluorescent permanent, le *CellTrace FarRed* (Invitrogen), qui est excité par le laser rouge et émet un maximum de fluorescence à 661nm.

Afin d'induire une prolifération des ILC spléniques triées, celles-ci ont été cultivées pendant 7 jours à 37°C dans du RPMI 10% SVF, en présence d'un cocktail de cytokines associant l'IL-2 (10UI/ml – Miltenyi) +/- IL-1 β (50ng/ml - Miltenyi) +/- IL-7 (50ng/ml - Miltenyi) +/- IL-23 (50ng/ml – Miltenyi).

Les proportions et la prolifération des ILC ont été mesurées par cytométrie en flux. A chaque division cellulaire, le cytoplasme des cellules est réparti entre les deux cellules filles, divisant ainsi la quantité de colorant cytoplasmique par 2. L'indice de prolifération cellulaire est ainsi proportionnel à la perte de la fluorescence à 660nm.

2.6 Analyses statistiques

L'analyse des données brutes de cytométrie a été réalisée avec le logiciel FlowJo 10.2, les résultats sont exprimés soit en % de cellules positives, soit en intensité médiane de fluorescence (*Median Fluorescence Intensity* – MFI), dans ce cas la MFI des contrôles isotypiques a été retranchée aux valeurs de MFI des Ag recherchés. Les expériences de prolifération ont été analysées avec le logiciel ModFit LT5 et l'analyse statistique avec le logiciel GraphPad Prism5.

En raison de la distribution non normale des données, celles-ci ont été comparées par le test non paramétrique de Mann-Whitney et les corrélations effectuées avec le test de Spearman. Les résultats sont exprimés par leur médiane [interquartiles]. Les valeurs $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

RESULTATS

1 Identification des ILC auxiliaires spléniques

La 1^{ère} étape de notre étude a consisté à valider la stratégie d'identification phénotypique des ILC afin de comparer leurs distributions dans les compartiments sanguins et spléniques, dans des conditions physiologiques.

Après élimination des doublets par la discordance de leur taille avec leur aire, nous avons sélectionné des cellules à la morphologie lymphoïde sur les critères de taille et de granularité. Cette sélection, très majoritairement constituée de lymphocytes nous a permis d'exprimer la fréquence des ILC spléniques en nombre d'ILC par million de lymphocytes.

Les ILC n'exprimant aucun des marqueurs des lignées lymphoïdes, myéloïdes, plasmacytoïdes et des cellules souches, elles sont sélectionnées par la négativité du marquage d'exclusion Lin, puis la population d'ILC totale est identifiée par la co-expression de CD161 et CD127 (Figure 15).

Les sous-populations d'ILC sont identifiées selon les phénotypes suivants :

- ILC1: Lin⁻ CD161⁺ CD127⁺ CRTh2⁻ CD117⁻
- ILC2: Lin⁻ CD161⁺ CD127⁺ CRTh2⁺
- ILC3: Lin⁻ CD161⁺ CD127⁺ CRTh2⁻ CD117⁺
 - ILC3 NCR⁻ : NKp44⁻
 - ILC3 NCR⁺ : NKp44⁺

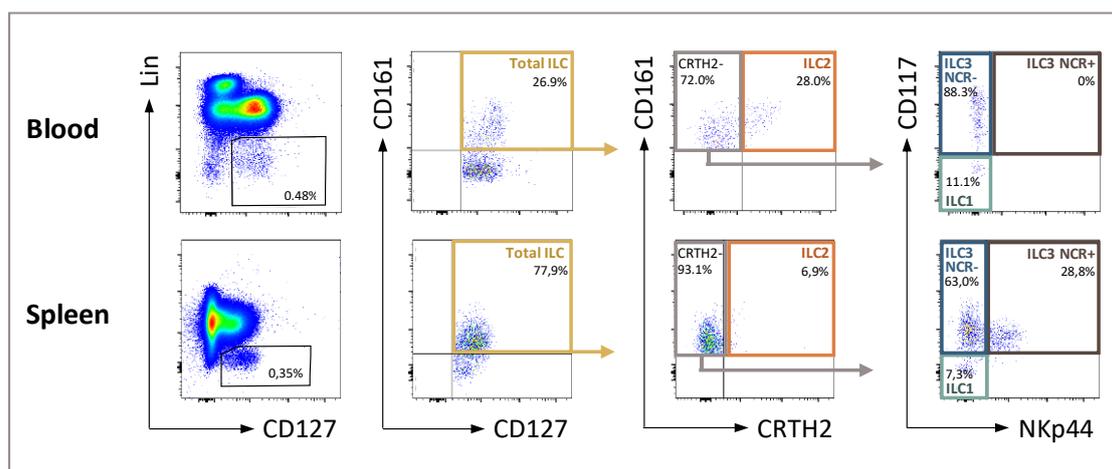


Figure 15 : Stratégie d'identification des ILC sanguines et spléniques en cytométrie en flux

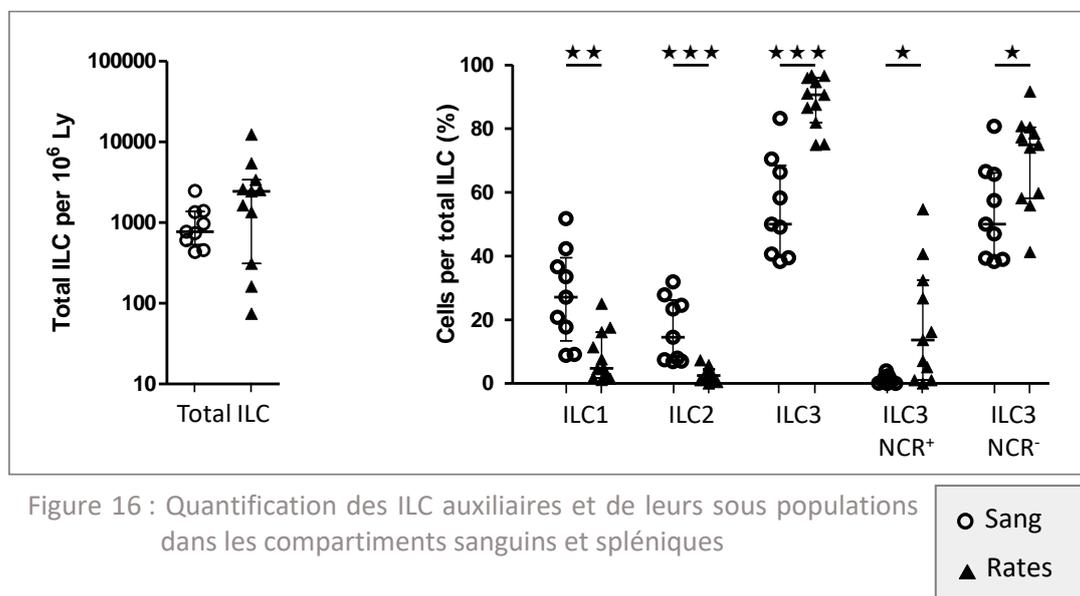
Cette stratégie phénotypique nous a permis d'identifier les ILC sanguines et leurs sous-populations. Les ILC sanguines représentent environ 0,1% des cellules de morphologie lymphoïde (Figure 15). Les ILC3 NCR⁻ constituent la population majoritaire alors que les ILC3

NCR⁺ sont quasiment inexistantes, ce qui est en accord avec la description du compartiment sanguin proposée par Lim (Lim et al., 2017).

Dans la rate, les ILC totales représentent près de 0,3% des cellules lymphoïdes, l'ensemble des sous-populations est présent et les ILC3 NCR⁻ sont prédominantes (**Figure 15**).

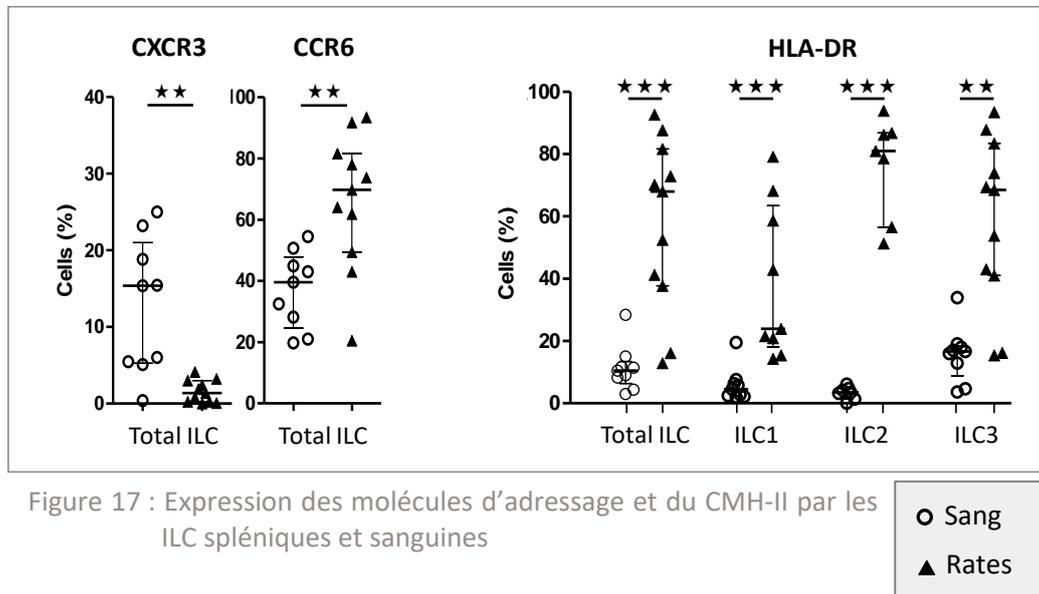
Lorsque l'on compare la quantité d'ILC totales issues de prélèvements sanguins de 9 témoins sains et de 11 rates contrôles, il n'y a pas de différence significative entre leurs taux (872 ILC/10⁶ lymphocytes sanguins [664-1664]) et 2443 ILC /10⁶ lymphocytes spléniques [311-3392]), malgré une médiane d'ILC spléniques 3 fois supérieure (**Figure 16**).

Bien que le pool d'ILC totales soit identique, la distribution des sous-populations est très différente entre le compartiment sanguin et splénique. Les ILC1 et les ILC2 sont très peu présentes dans les rates des sujets contrôles en comparaison avec leur fréquence dans le sang (respectivement 4.8% vs. 27% des ILC totales, $p=0,008$ et 2.5% vs. 14,5% des ILC totales, $p=0,001$). Inversement, la proportion d'ILC3 totale, est beaucoup plus abondante dans les rates que dans le sang (90% vs. 49.5% des ILC totales, $p=0,001$). Les ILC3 représentent 90% des ILC totales dans une rate saine, soit près de 2200 ILC3/million de lymphocytes, faisant d'elles la population d'ILC spléniques prédominante.



L'étude des molécules d'adressage CXCR3 et CCR6 par les ILC totales sanguines et spléniques révèle un profil d'expression « opposé » selon les compartiments (**Figure 17**). De façon cohérente avec la faible représentation des ILC1 dans la rate, CXCR3, récepteur des chémokines CXCL9 CXCL10 CXCL11 et marqueur de polarisation de « type Th1 » est moins exprimé par les

ILC totales spléniques que par les ILC totales sanguines (10.4% vs. 1.4%, $p=0,01$). Inversement, en cohérence avec la prédominance des ILC3 dans la rate, la proportion d'ILC exprimant CCR6, récepteur de CCL20 et marqueur de la polarisation de « type Th17 » est plus élevée dans la rate (69.8% vs. 42.2%, $p=0,03$).



Dans le sang, la proportion d'ILC exprimant HLA-DR est relativement faible (respectivement pour les ILC1, 2 et 3 : 4,5%, 3,5% et 16,6%), en revanche beaucoup plus d'ILC spléniques expriment cette molécule, notamment au sein des sous-populations d'ILC2 et d'ILC3 (respectivement 81% et 68,5%).

Cette étude du compartiment splénique humain dans des conditions physiologiques, nous a permis d'identifier et de quantifier l'ensemble des sous-populations d'ILC pour la première fois. La forte expression de CCR6 est le reflet d'une proportion prédominante d'ILC3 dans la rate et l'expression de HLA-DR laisse supposer que ces ILC puissent avoir des fonctions de cellules présentatrices d'antigènes.

2 Etude phénotypique des ILC auxiliaires spléniques au cours du PTI

2.1 Elaboration du phénotype d'intérêt

Dans le but de sélectionner les Ag les plus appropriés à la caractérisation des ILC auxiliaires spléniques au cours du PTI, nous avons évalué l'expression d'un large panel de marqueurs d'intérêt par les 4 sous-populations issues de 3 rates de patients et témoins.

Dans ces expériences de mise au point, l'expression de 14 marqueurs de costimulation, d'activation, de prolifération ou molécules d'adressages a été mesurée ainsi que l'expression de 3 facteurs de transcription et la production de 10 cytokines. L'établissement d'un score d'expression nous a permis d'identifier les Ag non pertinents afin de les exclure du phénotype final. Ainsi, en fonction de l'expression et de l'intensité du marquage, nous avons attribué pour chacun des Ag recherchés, une valeur d'expression de 0 à 2. La somme des valeurs établies au cours du phénotypage des 3 rates nous a permis d'établir un score d'expression, de 0 à 6 dont les valeurs sont reportées dans le **tableau 4** (en gris, les Ag non retenus pour l'analyse des ILC).

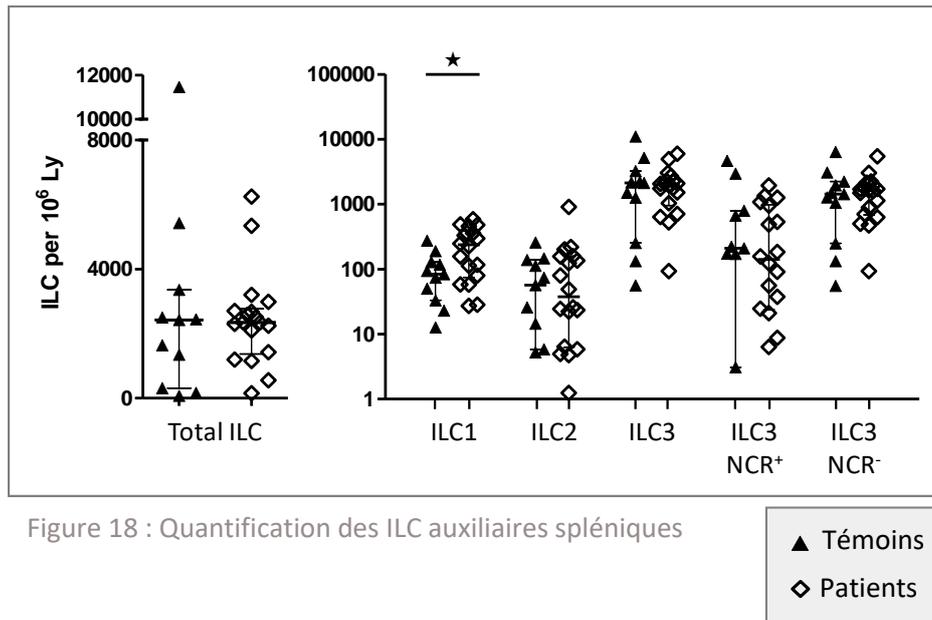
		ILC1	ILC2	ILC3	
				NCR-	NCR+
Costimulation	CD83	3	5	4	4
	CD80	1	0	1	1
	CD86	3	1	1	2
	CD40L	0	1	0	0
	ICOS	0	0	0	0
Activation	HLA-DR	4	5	6	6
	CD69	1	0	0	1
	CD25	0	0	0	0
Adressage	CD62L	3	2	3	2
	CXCR5	3	0	0	1
	CCR6	3	3	6	6
	CXCR3	3	0	0	0
	CCR7	1	0	0	0
Prolifération	Ki67	0	0	1	1
Cytokines	IL-2	4	4	3	4
	TNF α	6	6	6	6
	GM-CSF	2	3	3	3
	IFN γ	5	2	2	2
	IL-17	0	0	0	0
	IL-22	0	1	2	2
	BAFF(m)	1	2	2	2
	BAFF	4	4	4	4
	IL-5	2	2	2	3
IL-10	3	2	3	3	
Facteurs de transcription	Tbet	3	1	0	
	GATA3	2	3	2	
	ROR γ	1	1	3	

Tableau 4 : Score d'expression des antigènes étudiés

En raison de l'absence de détection de l'expression des marqueurs de costimulation CD40L et ICOS, des marqueurs d'activation CD69 et CD25 et de la chémokine CCR7, ces Ag ont été exclus de l'analyse phénotypique. De façon similaire, la sécrétion d'IL-17 n'ayant pas été détectée dans nos conditions de stimulation sa recherche n'a pas été maintenue et nous avons préféré une analyse de la production intracellulaire de BAFF à son expression membranaire (BAFFm). Les autres marqueurs ont été conservés.

2.2 Quantification des ILC

L'analyse quantitative de la population globale d'ILC auxiliaires révèle une fréquence médiane similaire dans les rates des patients de PTI et dans les rates contrôles (2443 vs. 2349 ILC par million de lymphocytes) (**Figure 18**). La quantification des sous-populations montre également une relative stabilité de la fréquence des ILC2, ILC3 NCR⁺ et ILC3 NCR⁻; en revanche la proportion d'ILC1 spléniques est augmentée chez les patients atteint de PTI (84 vs. 236.8 ILC1 par million de lymphocytes, $p=0,03$).



Du fait de l'augmentation de la fréquence des ILC1 spléniques au cours du PTI d'une part, et de la prédominance de la population d'ILC3 d'autre part, nous avons focalisé la caractérisation phénotypique sur ces deux populations. De surcroit, la très faible proportion d'ILC2 dans les rates ne permettait pas une analyse approfondie de leur phénotype.

2.3 Caractérisation phénotypique des ILC spléniques au cours du PTI

2.3.1 ILC auxiliaires totales

Bien que la fréquence d'ILC totales soit similaire dans les rates des patients et des témoins, nous avons dans un premier temps analysé le pool d'ILC dans sa globalité. L'expression des facteurs de transcription T-bet et ROR- γ t a été mesurée sur 4 échantillons. Comme attendu, l'expression de T-bet est plus intense dans la population d'ILC1 alors que ROR γ t est principalement exprimé par les ILC3 et le pool d'ILC totales, puisque majoritairement constitué d'ILC3 (**Figure 19**).

De façon similaire, l'expression du marqueur de prolifération Ki67 a été mesurée à partir de 4 échantillons. Le niveau d'expression de Ki67 par les ILC spléniques est très bas, ce qui traduit l'absence de prolifération de ces cellules (Figure 19).

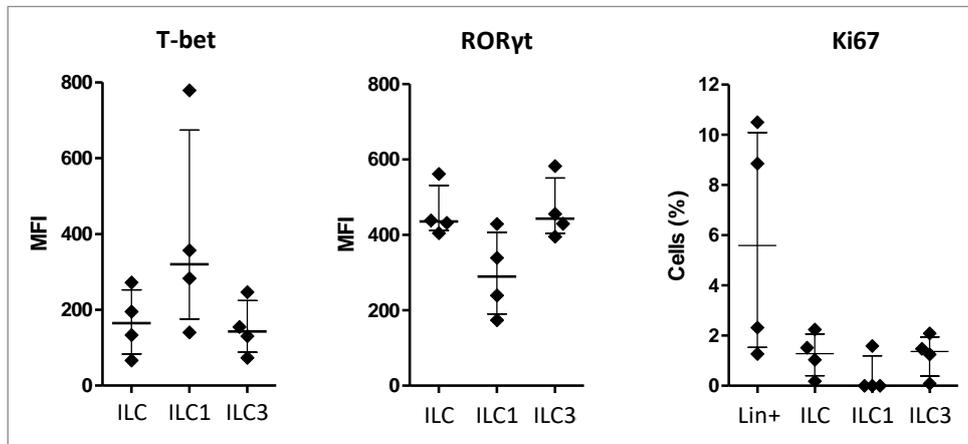


Figure 19 : Expression des facteurs de transcription et de Ki67 par les ILC spléniques

◆ Rates

L'analyse des molécules d'adressage montre une expression faible et similaire de CXCR5 et CXCR3 par les ILC spléniques des patients et des témoins (respectivement 1,29% vs. 1,70% et 1,36% vs. 1,61%) (Figure 20). CCR6 est le récepteur de chémokine majoritairement exprimé par les ILC spléniques et ce de façon similaire entre patients et témoins. L'expression de son ligand, CXCL20 dans la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires laisse supposer une localisation préférentielle des ILC au sein des zones marginales spléniques (Magri et al., 2014). Enfin, le taux d'ILC exprimant la L-sélectine (CD62L) dans la rate des patients atteint de PTI est plus important (0,27% vs. 5,45%, $p=0,0005$).

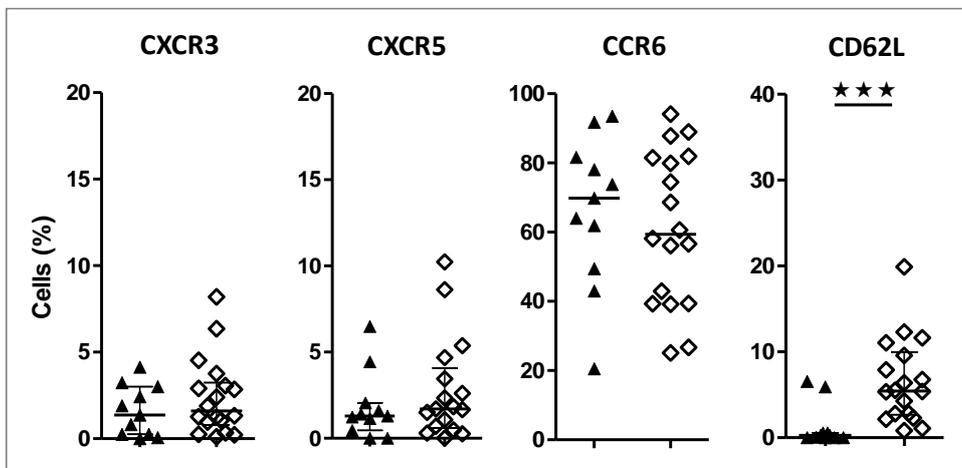
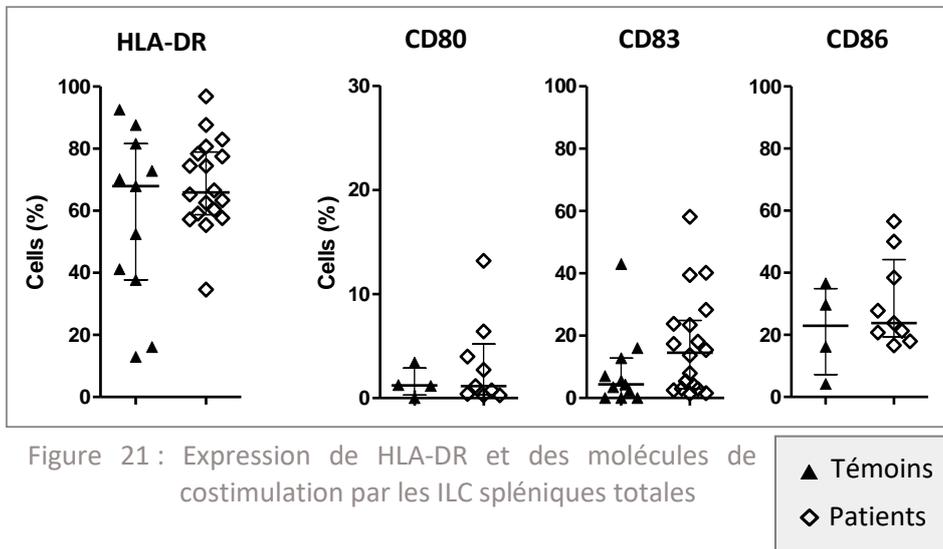


Figure 20 : Expression des molécules d'adressage par les ILC spléniques totales

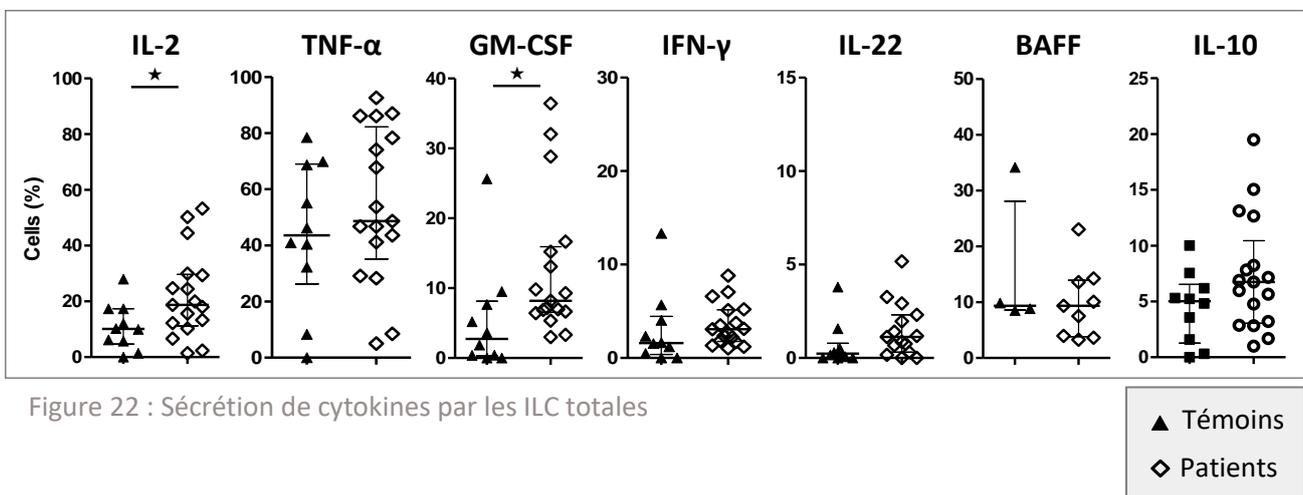
▲ Témoins
◆ Patients

Tel que nous l'avons observé lors de la comparaison des compartiments sanguins et spléniques, l'expression d'HLA-DR par les ILC spléniques est élevée (**Figure 21**). Bien que la proportion d'ILC exprimant HLA-DR chez les témoins soit très variable d'un individu à l'autre, les proportions d'ILC exprimant HLA-DR dans les rates des témoins et des patients atteints de PTI sont similaires (67,92% vs. 65,89%).



En revanche, les taux d'ILC exprimant les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD83 sont très bas et identiques entre les témoins et les patients (**Figure 21**). Une telle différence entre les proportions d'ILC exprimant le CMH-II et les molécules de costimulation est en faveur d'une population prédominante exprimant le CMH-II sans les molécules de costimulation qui pourrait donc avoir des fonctions de CPA tolérogènes.

L'étude des cytokines sécrétées par les ILC spléniques après une stimulation de 4 heures par PMA/iono révèle un profil pro-inflammatoire au cours du PTI (**Figure 22**). La fréquence des ILC sécrétant les cytokines pro-inflammatoires IL-2 et GM-CSF est plus importante au cours du PTI (respectivement, 10% vs. 18% des ILC totales $p=0,03$ et 2,7% vs. 8,2%, $p=0,015$). Le TNF- α est



la cytokine la plus sécrétée par les ILC spléniques, sans différence chez les patients et témoins, alors que l'IL-22, l'IFN- γ et BAFF sont faiblement sécrétés dans ces conditions de stimulation (<10%), avec des fréquences similaires entre patients et témoins.

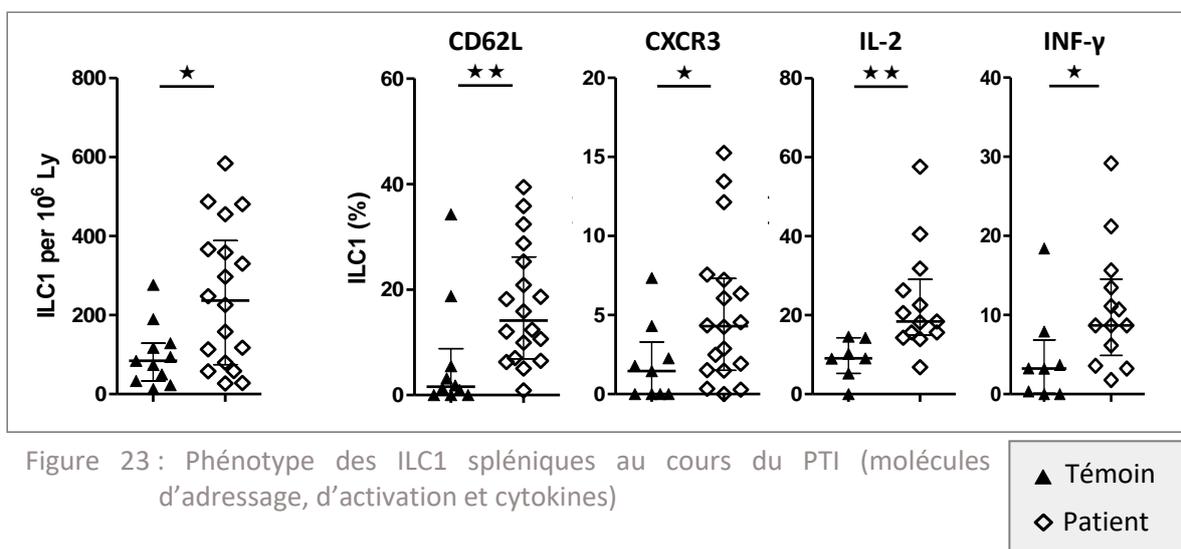
Malgré l'absence de différence significative entre les patients et les témoins, environ 6 % des ILC spléniques sécrètent de l'IL-10 dans ces conditions de stimulation, traduisant vraisemblablement des propriétés régulatrices des ILC spléniques (Figure 22).

L'analyse des ILC spléniques par groupes de patients, selon les traitements administrés préalablement à la splénectomie, n'a révélé aucune incidence sur la fréquence des ILC spléniques, la distribution des sous-populations, l'expression des marqueurs membranaires ou la sécrétion des cytokines (données non représentées).

2.3.2 Les ILC1

La proportion d'ILC1 est augmentée dans les rates des patients atteints de PTI et elles présentent un état d'hyperactivation (Figure 23)

La proportion d'ILC1 spléniques exprimant la molécule d'adressage aux organes lymphoïdes secondaires CD62L est augmentée dans les rates des patients (1,58% vs. 14,12% des ILC1, $p=0,008$) tout comme le taux d'ILC1 exprimant le récepteur de chémokine CXCR3 (1,5% vs. 4,3% des ILC1, $p=0,03$). Par ailleurs, au sein des rates des patients atteints de PTI, on observe une augmentation de la proportion d'ILC1 sécrétant de l'IL-2, cytokine importante pour la



prolifération lymphocytaire, et de l'IFN- γ , cytokine de polarisation pro-inflammatoire (respectivement 9,09% vs. 18,42% d'ILC1, $p=0,0038$ puis 3,24% vs. 8,70% d'ILC1, $p=0,03$).

Le récepteur CXCR3 est le récepteur des chémokines induites par l'IFN- γ (CXCL9, CXCL10 et CXCL11). Il existe une corrélation positive entre la fréquence d'ILC1 spléniques exprimant CXCR3 et la sécrétion d'IFN- γ après 4 heures de stimulation (**Figure 24**).

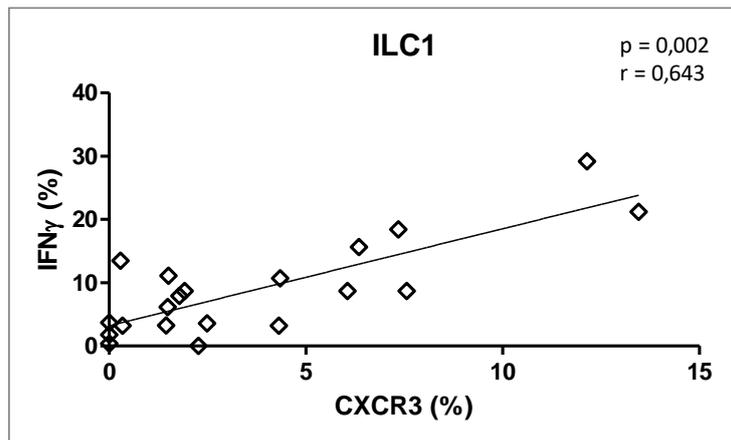


Figure 24 : Corrélation entre l'expression de CXCR3 et la sécrétion d'IFN- γ par les ILC1 au cours du PTI

2.3.3 Les ILC3 totales

Les ILC3 spléniques représentent la population majoritaire des ILC et leur fréquence est similaire dans les rates des patients et des témoins, (**Figures 18 et 25**).

L'analyse de cette population dans sa globalité révèle une augmentation de la proportion exprimant CD62L au cours du PTI (0,15% vs. 3,54% des ILC3, $p=0,0017$). Le taux d'ILC3

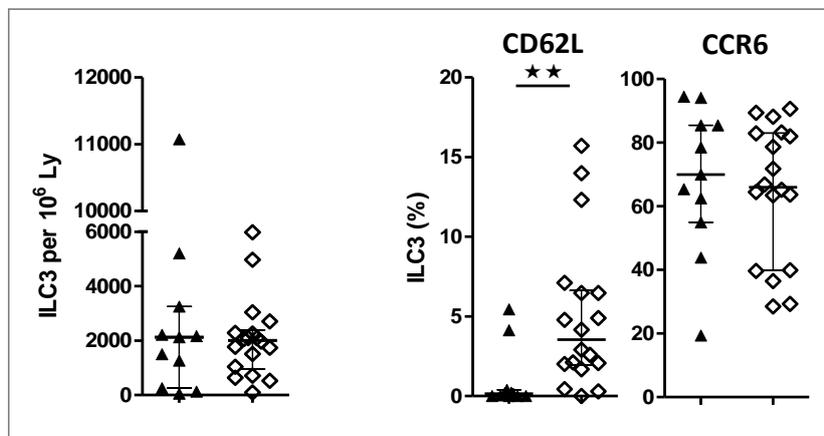


Figure 25 : Les ILC3 spléniques au cours du PTI

▲ Témoins
◇ Patients

exprimant CCR6 est élevé, mais équivalent dans les rates des témoins et patients (66,01% vs. 69,94% d'ILC3) (**Figure 25**).

Après 4h de stimulation par la PMA et la ionomycine, on observe une tendance à l'augmentation de la proportion d'ILC3 sécrétant de l'IL-2 mais de façon non significative (7,46% vs. 11,28%) (**Figure 26**). Nous n'avons pas été en mesure de détecter une production d'IL-17 dans les conditions de stimulation appliquées (résultats de mise au point, **tableau 04**), comme cela a déjà été rapporté (Magri et al., 2014). Par ailleurs, la proportion d'ILC3 totales exprimant l'IL-22 est très faible et ne diffère pas entre patients et témoins. La proportion d'ILC3 exprimant BAFF est également similaire entre les témoins et les patients.

En revanche, la fréquence d'ILC3 totales sécrétant du GM-CSF, cytokine pro-inflammatoire activatrice des macrophages et des polynucléaires, est augmentée dans les rates des patients atteints de PTI (1,58% vs. 6,45% des ILC3, $p=0,0083$).

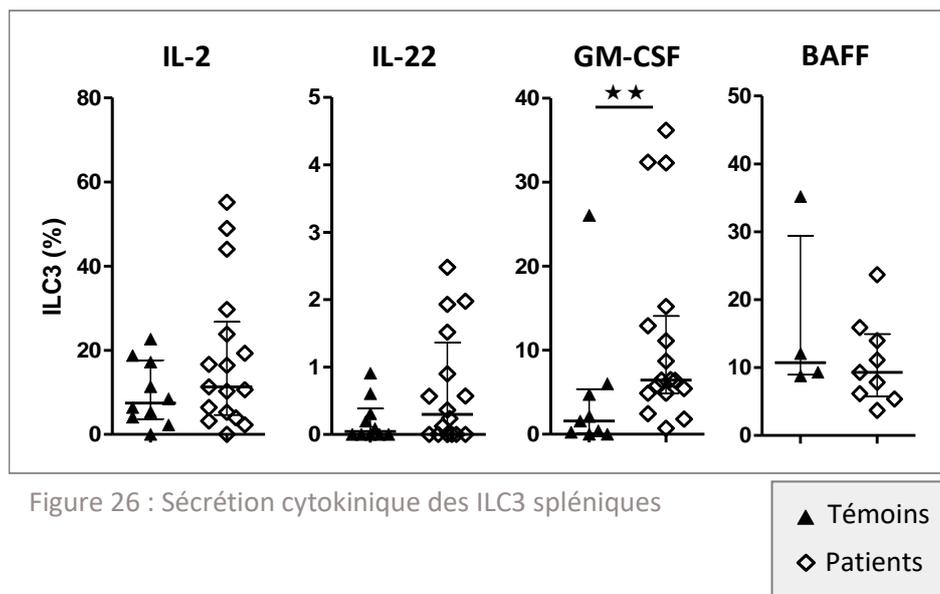
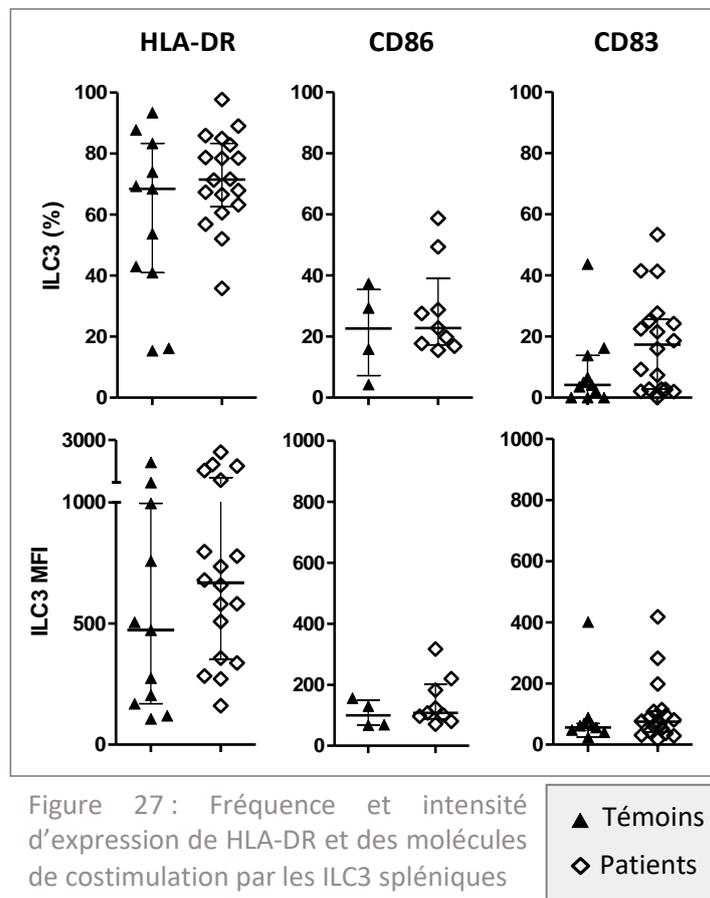


Figure 26 : Sécrétion cytokinique des ILC3 spléniques

Bien qu'elle soit similaire chez les patients et les témoins, la fréquence d'ILC3 spléniques exprimant de HLA-DR est importante (>65%) et l'intensité d'expression de ces molécules est élevée (**Figure 27**). Plusieurs articles ont attribué des propriétés de présentation antigénique aux ILC3, tantôt activatrices, tantôt tolérogènes (Bjorklund et al., 2016; Magri et al., 2014).

Au niveau splénique, nous observons une faible proportion d'ILC3 exprimant les molécules de costimulation CD83 et CD86 tant chez les patients que chez les témoins, avec une intensité d'expression très faible comparativement au HLA-DR. De ce fait, les ILC3 spléniques ne sont

probablement pas en mesure d'induire une activation efficace des lymphocytes. Le défaut de signalisation *via* CD28 conduisant à l'anergie ou la mort des lymphocytes, cette divergence d'expression confère probablement aux ILC des propriétés tolérogènes.



2.3.4 Les sous-population d'ILC3

Classiquement, on distingue chez l'homme deux sous-populations d'ILC3 selon l'expression du récepteur de mort, NKp44. Dans le cadre de notre étude de la physiopathologie du PTI, nous n'avons pas identifié de différence entre ces deux populations chez les patients et les témoins. Leur fréquence, leur profil phénotypique et leur production de cytokines sont identiques (données non représentées).

Récemment, sur les bases d'une étude transcriptomique, la classification des ILC3 a été révisée et 3 sous-populations se distinguent (Bjorklund et al., 2016) :

- ILC3 NCR⁺ : population activée, la plus à même de sécréter des cytokines.
- ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ : Sous-population majoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires dépourvue de molécules de costimulation et ayant des fonctions tolérogènes
- ILC3 NCR⁻CD62L⁺ : Sous-population minoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires, considérée comme des cellules naïves.

Nous avons identifié et quantifié ces 3 sous-populations au sein des splénocytes des patients atteints de PTI et des témoins (Figure 28). Tel que décrit dans les ganglions, les ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ constituent la sous-population d'ILC3 majoritaire et les ILC3 NCR⁻CD62L⁺ sont presque inexistantes dans les rates des témoins (Figure 29).

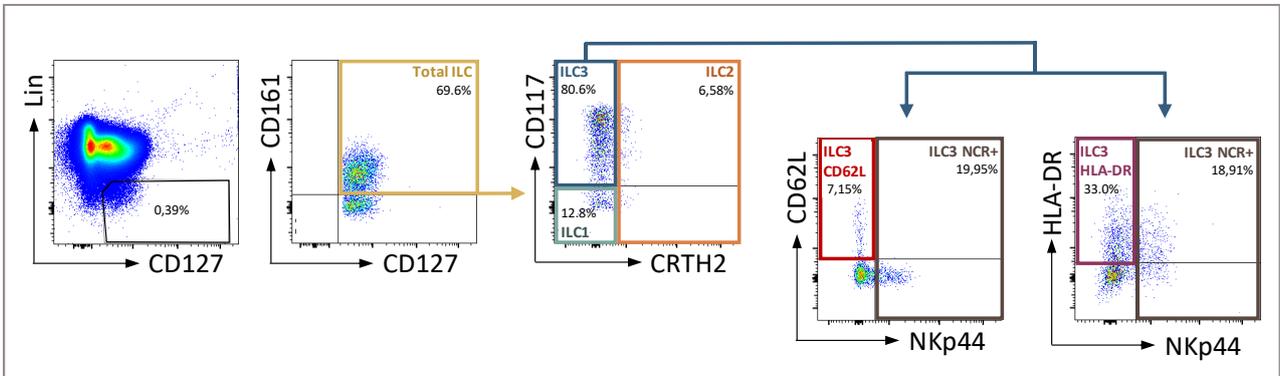


Figure 28 : Identification des 3 sous-populations d'ILC3 dans la rate d'un patient atteint de PTI

Rapporté par million de lymphocytes, le nombre d'ILC3 NCR⁺ et d'ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ est similaire entre patients et témoins (respectivement 14,44 vs. 7,78 et 40,68 vs. 44,82 par million de lymphocytes), en revanche la fréquence des ILC3 NCR⁻CD62L est augmentée chez les patients (0,11 vs. 3,0 par million de lymphocytes, $p=0,0008$) (Figure 29).

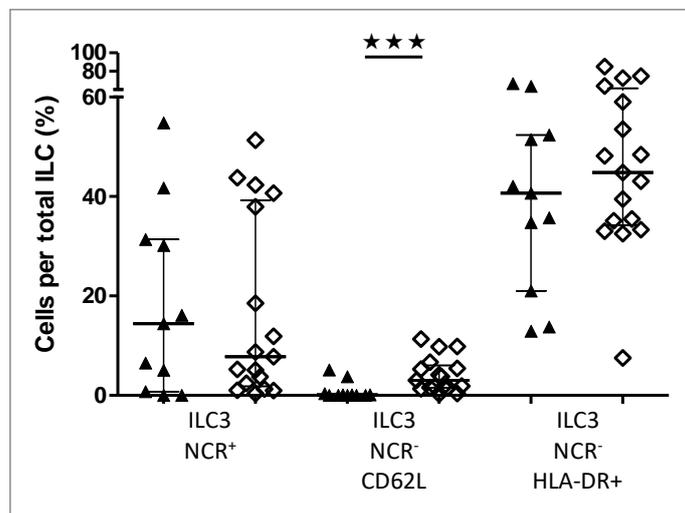


Figure 29 : Répartition des populations d'ILC3 spléniques

▲ Témoins
◆ Patients

Le CD62L et le HLA-DR n'étant pas inclus dans notre phénotype d'identification des ILC, ces marqueurs n'ont pas été mesurés dans l'ensemble des tubes. De ce fait, nous ne pouvons pas analyser plus précisément le phénotype et la production cytokinique de ces sous-populations,

ce qui aurait pu être informatif pour déterminer leurs fonctions et propriétés.

La démonstration d'une corrélation positive entre les fréquences des ILC1 CD62L⁺ et des ILC3 NCR CD62L⁺ est le reflet de l'augmentation simultanée de ces deux populations au cours du PTI (Figure 30). Associé à leur commune expression de CD62L, ces éléments laissent supposer une possible colocalisation dans les zones marginales de la rate et un potentiel lien entre ces 2 populations cellulaires.

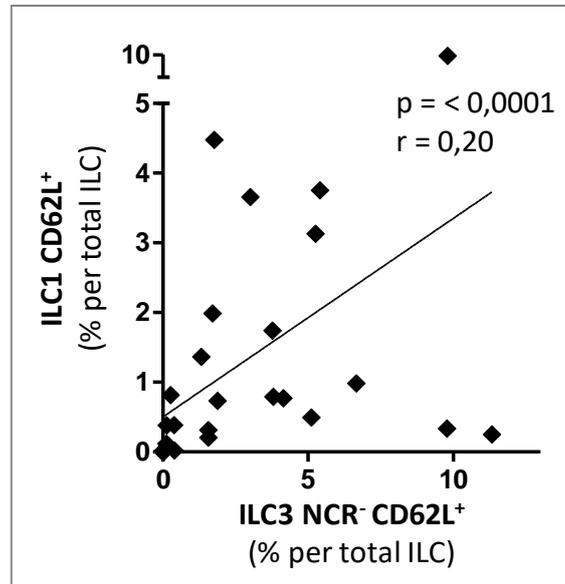


Figure 30 : Corrélation entre la fréquence des ILC1 CD62L⁺ et des ILC3 NCR CD62L⁺

▲ Rates

Bien que la fréquence des ILC3 NCR CD62L⁺ soit augmentée au cours du PTI, cette population reste rare puisque qu'elle ne représente que 3% des ILC totales en moyenne dans le PTI, soit environ 70 cellules par million de lymphocytes. Ces cellules ne semblent pour autant pas

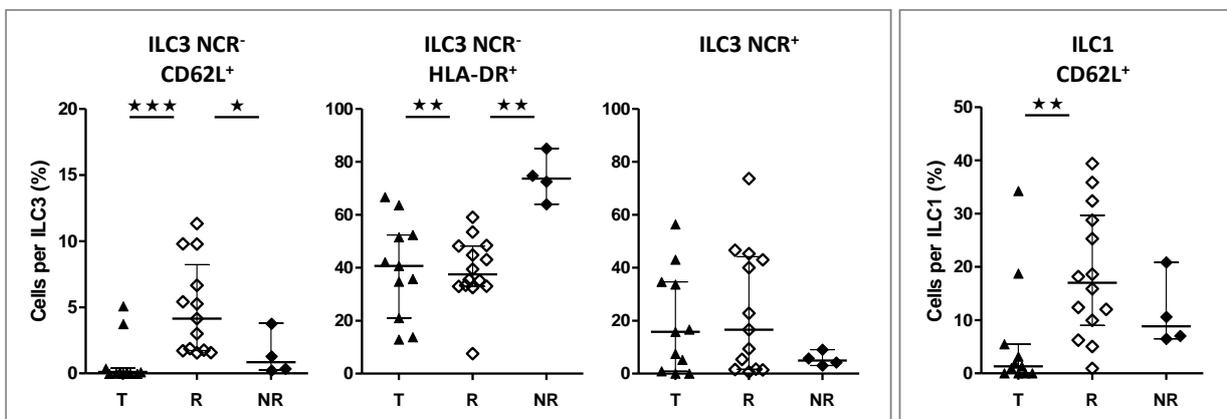


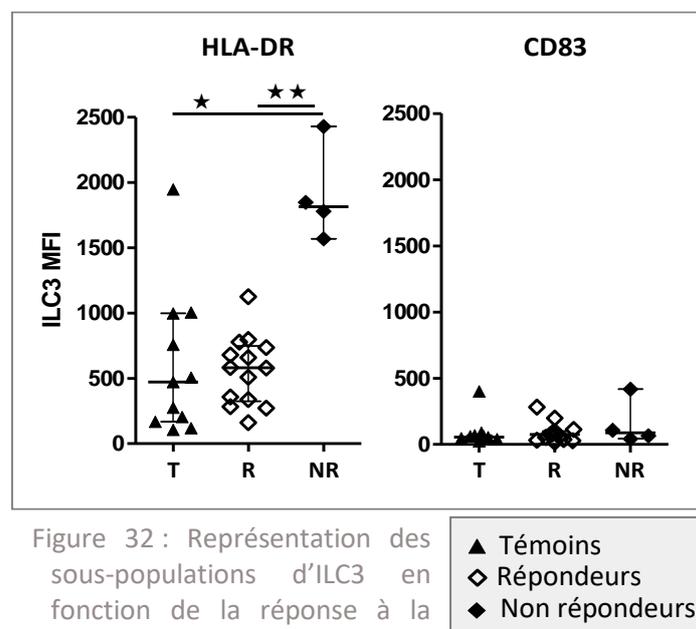
Figure 31 : Fréquence des ILC3 et ILC1 spléniques au cours du PTI en fonction de la réponse à la splénectomie

▲ Témoins
◇ Répondeurs
◆ Non répondeurs

anodines dans la physiopathologie du PTI car dans la rate des patients réfractaires à la splénectomie, on note une diminution de la population d'ILC3 NCR⁻CD62L⁺ alors que les ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ sont augmentées (**Figure 31**).

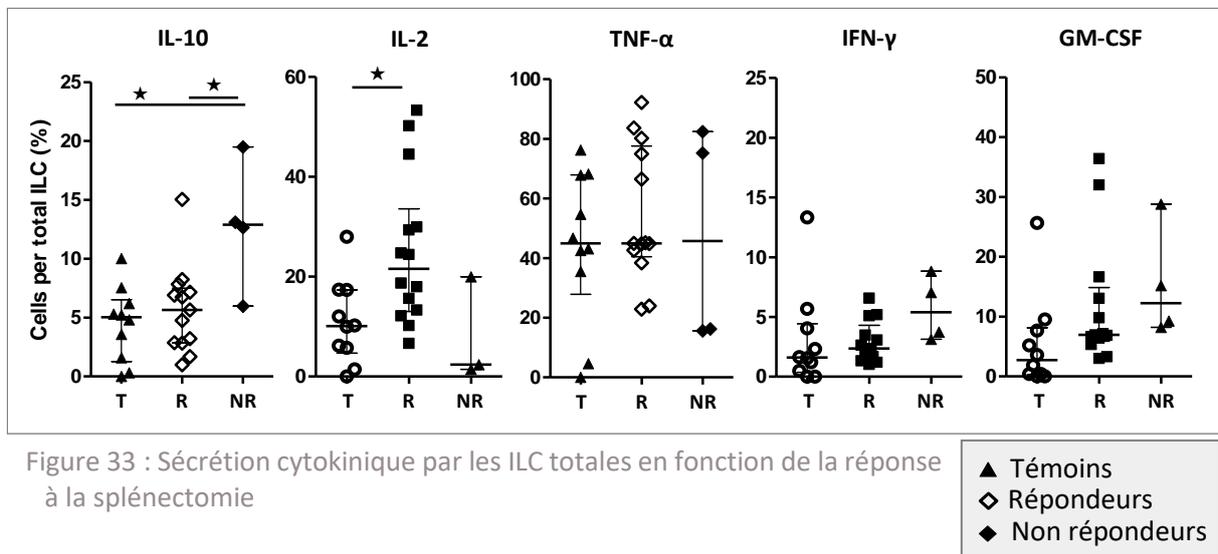
On observe également une baisse de la fréquence des ILC3 NCR⁺ et des ILC1 CD62L⁺ mais non significative, possiblement en raison du nombre trop faible de patients réfractaires inclus dans notre étude (**Figure 31**).

L'analyse de l'expression de CD80 et CD86 n'a pas été réalisée dans les rates des patients non répondeurs. En revanche, la comparaison de l'intensité d'expression de CD83 et CMH-II confirme un profond déséquilibre d'expression entre les molécules de présentation antigénique et les molécules de costimulation chez les patients non répondeurs.



Ceci pourrait traduire la mise en œuvre de mécanismes d'immunorégulation dans les rates des patients non répondeurs, impliquant notamment l'expansion d'une population d'ILC tolérogènes, ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ (**Figure 32**).

L'analyse de la sécrétion des cytokines par les ILC totales, en fonction de la réponse à la splénectomie semble corroborer l'hypothèse d'une activité régulatrice des ILC spléniques dans la rate des patients réfractaires. On visualise, malgré la faiblesse de l'échantillon, une augmentation significative du taux d'ILC spléniques sécrétant de l'IL-10 et une tendance à la baisse du taux d'expression de l'IL-2 (Figure 33).



Ainsi, cette étude du compartiment splénique humain permet une première description phénotypique des ILC relativement complète.

Dans des conditions physiologiques, l'ensemble des sous-populations d'ILC a été identifié et la fréquence moyenne des ILC totales est de 2443 ILC par million de lymphocytes. Les ILC2 sont très peu représentées dans la rate, les ILC3 sont prédominantes et les ILC3 NCR⁻ constituent la sous-population majoritaire. Les ILC spléniques totales expriment majoritairement le récepteur de chémokine CCR6 et sécrètent d'importantes quantités de TNF- α . Les ILC3 expriment fortement HLA-DR mais elles n'expriment pas ou peu les molécules de costimulation. Par ailleurs, dans nos conditions de stimulation, la proportion d'ILC3 qui sécrètent des cytokines « Th17 » telles que l'IL-17 et l'IL-22 sont très faibles.

Au cours du PTI, la fréquence des ILC totales est similaire dans la rate des patients et des témoins, en revanche elles sont plus nombreuses à exprimer CD62L et à sécréter de l'IL-2 et du GM-CSF. Les ILC1 spléniques sont en plus grand nombre au cours du PTI, avec une augmentation de la proportion de cellules exprimant CXCR3 et CD62L, et sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- γ . Les ILC3 constituent la population d'ILC prédominante dans la rate mais leur

proportion est similaire chez les patients et les témoins. La proportion d'ILC3 spléniques sécrétant du GM-CSF est plus importante au cours du PTI et on observe une augmentation de la sous-population d'ILC3 NCR⁻CD62L⁺, corrélée avec la fréquence des ILC1 CD62L⁺.

Enfin, la répartition des sous-populations d'ILC spléniques des patients non répondeurs diffère par des proportions moindres d'ILC3 NCR⁻CD62L⁺, d'ILC3 NCR⁺ et d'ILC1 CD62L⁺ au profit des ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺. L'augmentation cette population d'ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺, n'exprimant pas ou peu les molécules de costimulation et l'augmentation de la proportion d'ILC3 sécrétant de l'IL-10 et peu d'IL-2 sont autant de signes en faveur d'un rôle principalement régulateur des ILC spléniques dans la rate des patients non répondeurs à la splénectomie.

3 Expérience d'expansion des ILC

L'analyse fonctionnelle des sous-populations d'ILC spléniques et sanguines est limitée par la très faible fréquence de ces cellules. De ce fait, nous avons cherché à expandre les ILC spléniques pour en faciliter l'étude.

Le pool d'ILC totales a été trié par cytométrie en flux selon la stratégie usuelle d'identification (**Figure 34**) à partir de splénocytes frais dissociés de la rate d'un patient atteint de PTI et enrichi par tri magnétique (cf. matériels et méthodes). La répartition des sous-populations était la suivante : ILC1 2,69%, ILC2 15,7%, ILC3 NCR⁻ 45,5% et ILC3 NCR⁺ 35,7%.

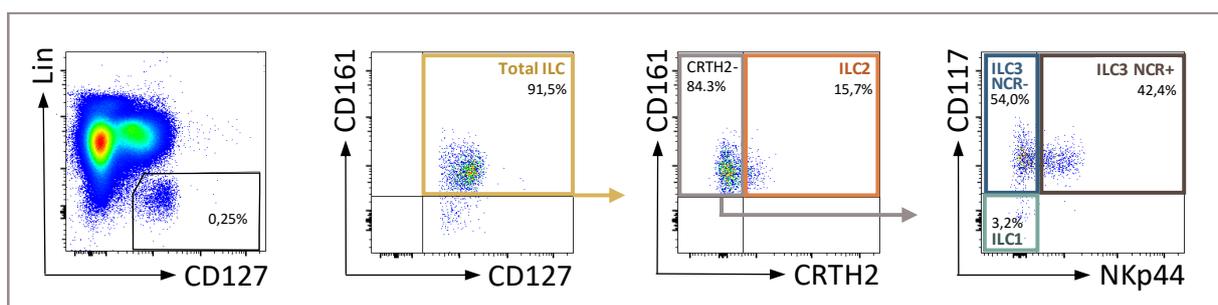


Figure 34 : Identification et répartition des sous-populations des ILC triées par cytométrie en flux

Après 7 jours de culture avec un cocktail cytokinique associant l'IL-1 β +/- l'IL-2 +/- l'IL-7 +/- l'IL-23, la prolifération des cellules et la répartition des sous-populations ont été analysées.

Notre choix s'est porté sur ces cytokines car l'IL-7, dont l'ensemble des ILC expriment son récepteur, le CD127 et l'IL-1 β sont des cytokines nécessaires à la différenciation et la prolifération des ILC et de leurs précurseurs. L'IL-2 est indispensable à la prolifération des

cellules lymphoïdes et par ailleurs, l'association de l'IL-1 β et de l'IL-23 est nécessaire à la différenciation des ILC3 (Crinier et al., 2017).

Les ILC non stimulées, cultivées 7 jours sans ajout de cytokines, présentent une bonne survie, et même une légère prolifération (indice de prolifération - IP=2,0) (Figure 36).

De façon surprenante, leur phénotype évolue après plusieurs jours de stimulation : les ILC non stimulées sont toujours dépourvues des marqueurs des lignées hématopoïétiques mais perdent également l'expression du récepteur CD127. De plus, 88% des cellules expriment CRTh2, indiquant un phénotype « ILC2-like » (Figure 35).

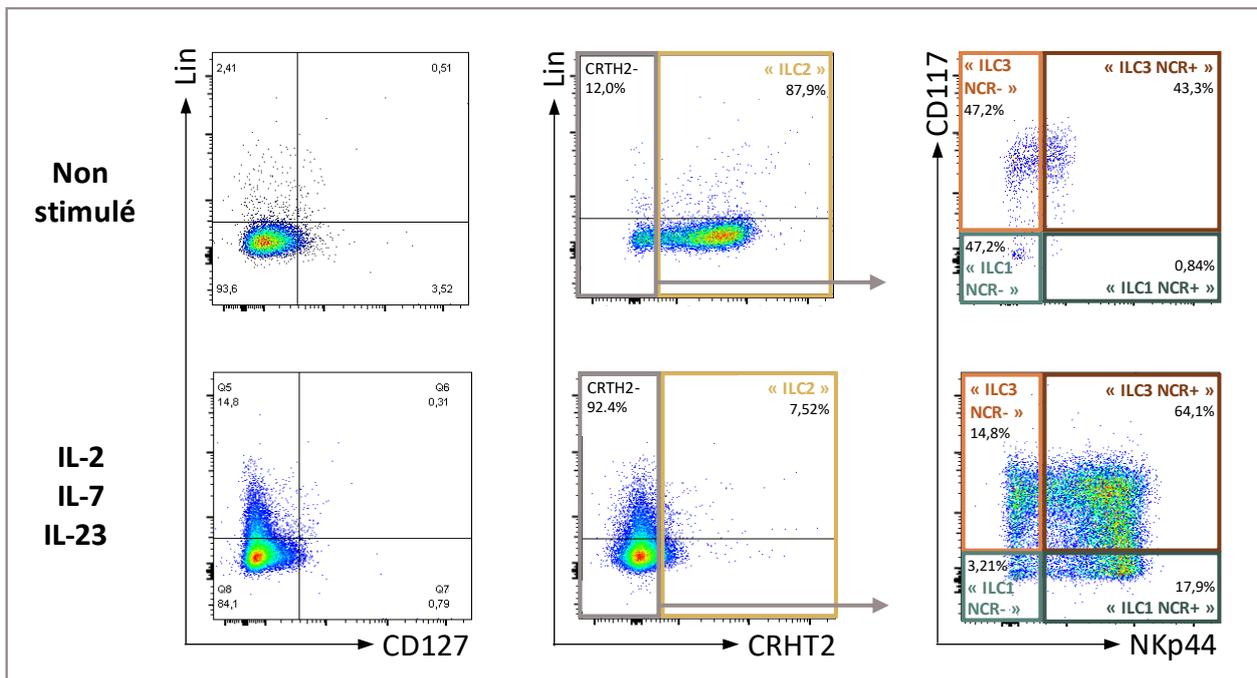


Figure 35 : Phénotype des sous-populations d'ILC spléniques après 7 jours de stimulation - Exemples des cellules en conditions « non stimulées » et en présence d'IL-2, IL-7 et IL-23.

En présence de cytokines et ce, quel que soit le cocktail utilisé, les ILC ne retrouvent pas l'expression de CD127 et environ 15% d'entre elles acquièrent l'expression de marqueurs présents dans le « lineage » (exemple de la condition IL-2/IL-7/IL-23, Figure 35).

La répartition des sous-populations est plus classique en revanche, on dénombre des taux de cellules CRTh2⁺ avoisinant les 6% et qui restent relativement constants selon les conditions de stimulations. Parmi les cellules CRTh2⁻, on retrouve les cellules CD117⁺ Nkp44^{+/-} correspondant aux populations d'« ILC3 NCR⁺ » et « ILC3 NCR⁻ », ainsi que les cellules CD117⁻ correspondant aux « ILC1 ». Après expansion des ILC, on dénombre une quantité importante de cellules CD117⁻Nkp44⁺ que l'on nommera « ILC1 NCR⁺ ». L'influence des cocktails sur la

répartition des sous-populations et la prolifération de l'ensemble des cellules est rapporté dans la **figure 36**.

L'action conjointe de l'IL-1 β et de l'IL-2 entraîne une prolifération importante des ILC, induisant 6 générations de cellules (IP=8,61) alors que l'ajout d'IL-23 puis d'IL-7 semble diminuer la prolifération des ILC. C'est en l'absence d'IL-1 β que l'indice de prolifération est le plus faible, confirmant l'importance de cette cytokine dans l'induction de la prolifération des ILC.

Sur la représentation de la répartition des sous-populations d'ILC en fonction de la stimulation appliquée, on visualise clairement la surprenante proportion d'« ILC2 » lorsque les cellules sont cultivées 7 jours sans cytokines (non stimulées). Ces cellules, qui n'ont pas proliféré, semblent s'être polarisées vers un phénotype ILC2 par l'acquisition du récepteur CRTh2.

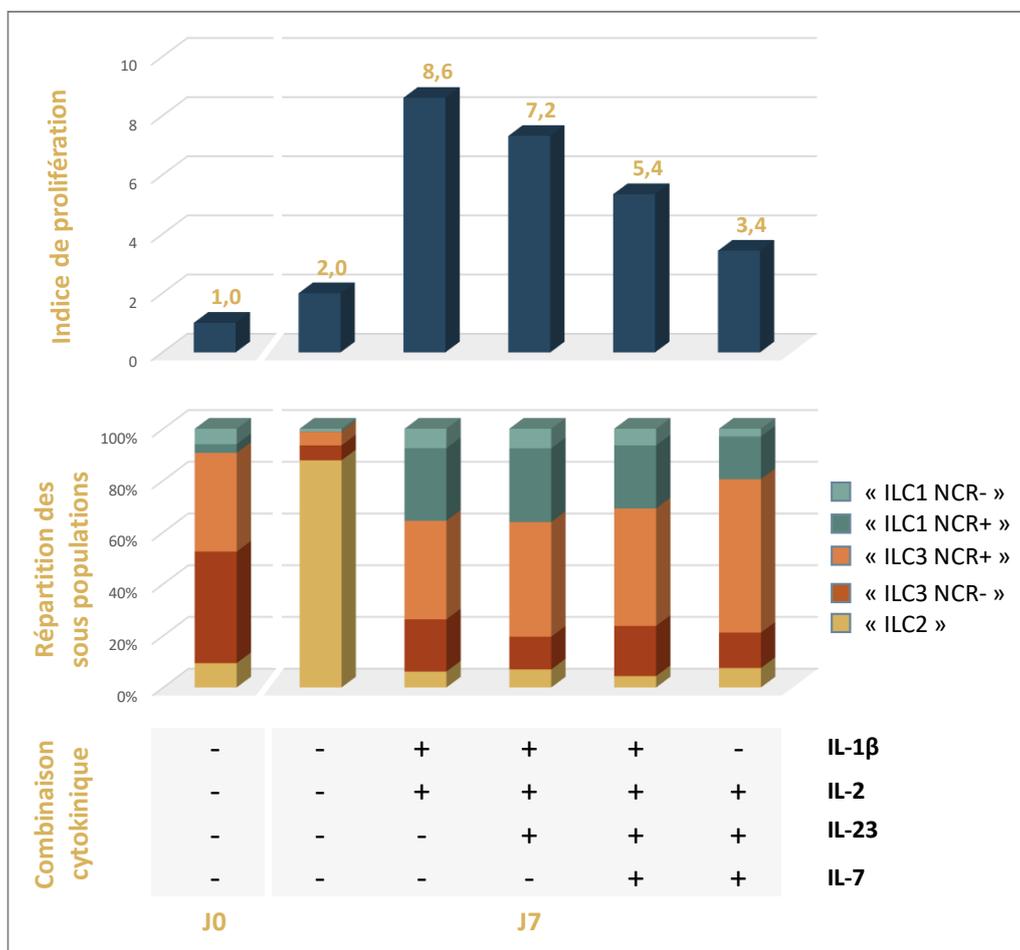


Figure 36 : Prolifération et répartition des sous-populations d'ILC au cours de l'expansion induite par différentes cytokines

En comparaison avec la répartition des sous-populations d'ILC spléniques du patient à l'état basal (J0), après 7 jours de culture avec l'IL-1 β et l'IL-2, on observe une relative stabilité de la proportion des populations d'ILC1 NCR⁻ et d'ILC3 NCR⁺. En revanche, dans cette condition, le

taux d'ILC1 NCR⁺ est fortement augmenté alors que celui des ILC3 NCR⁻ est plus faible. L'ajout d'IL-23 dans le cocktail cytokinique favorise l'expansion ou la différenciation en ILC3 NCR⁺ au détriment des ILC3 NCR⁻. Enfin, lorsque le cocktail cytokinique est dépourvu d'IL-1 β , la proportion d'ILC1 diminue de façon importante, cette condition de stimulation favorisant l'expansion des ILC3 NCR⁺.

Ces résultats issus d'une unique expérience doivent être interprétés avec prudence. A ce stade, nous ne pouvons pas déterminer si les modifications des proportions des sous-populations d'ILC sont le fait de capacités prolifératives différentes ou de phénomènes de plasticité ou de différenciation terminale.

Néanmoins, si on se focalise sur les populations d'ILC1 NCR⁻ et d'ILC3 NCR⁺, on peut entrevoir certains éléments de réponse. Alors que la proportion d'ILC3 NCR⁺ semble diminuer avec la prolifération des ILC totales, la proportion d'ILC1 NCR⁺ augmente au fur et à mesure des générations. Sur la base de cette observation, nous avons représenté l'évolution de l'expression des marqueurs Nkp44, CD117 et « *Lineage* » au cours des générations cellulaires (**Figure 37**).

Cette représentation permet de visualiser 2 phases distinctes lors de l'expansion des ILC spléniques dans ces conditions de stimulation : une première phase de prolifération au cours de laquelle le phénotype des cellules semble stable (générations 1, 2 et 3) puis une seconde phase au cours de laquelle les cellules continuent de proliférer mais changent de phénotype (générations 4, 5 et 6).

En présence d'IL-1 β , l'expression de Nkp44 est stable au cours des 3 premières générations puis on observe un continuum entre la population NCR⁺ et NCR⁻ à partir de la 4^{ème} génération. Dans le cas des stimulations par IL-1 β et IL-2 +/- IL-23, on visualise une perte d'expression de Nkp44 alimentant les cellules NCR⁻, principalement au cours de la 5^{ème} génération. Ce phénomène requiert la présence d'IL-1 β , tandis que l'ajout d'IL-7 dans le cocktail cytokinique le bloque partiellement.

Lorsque l'on observe l'évolution de l'expression de CD117 au cours des générations, la démonstration est encore plus nette. A partir de la 4^{ème} génération, un continuum phénotypique s'établit entre les cellules CD117⁺ et CD117⁻, allant jusqu'à une perte d'expression presque complète de CD117 par les cellules de 6^{ème} génération en présence d'IL-

1β. De plus, l'inhibition de la prolifération induite par l'IL-7 ou l'absence d'IL-1β n'altère pas cette évolution de phénotype.

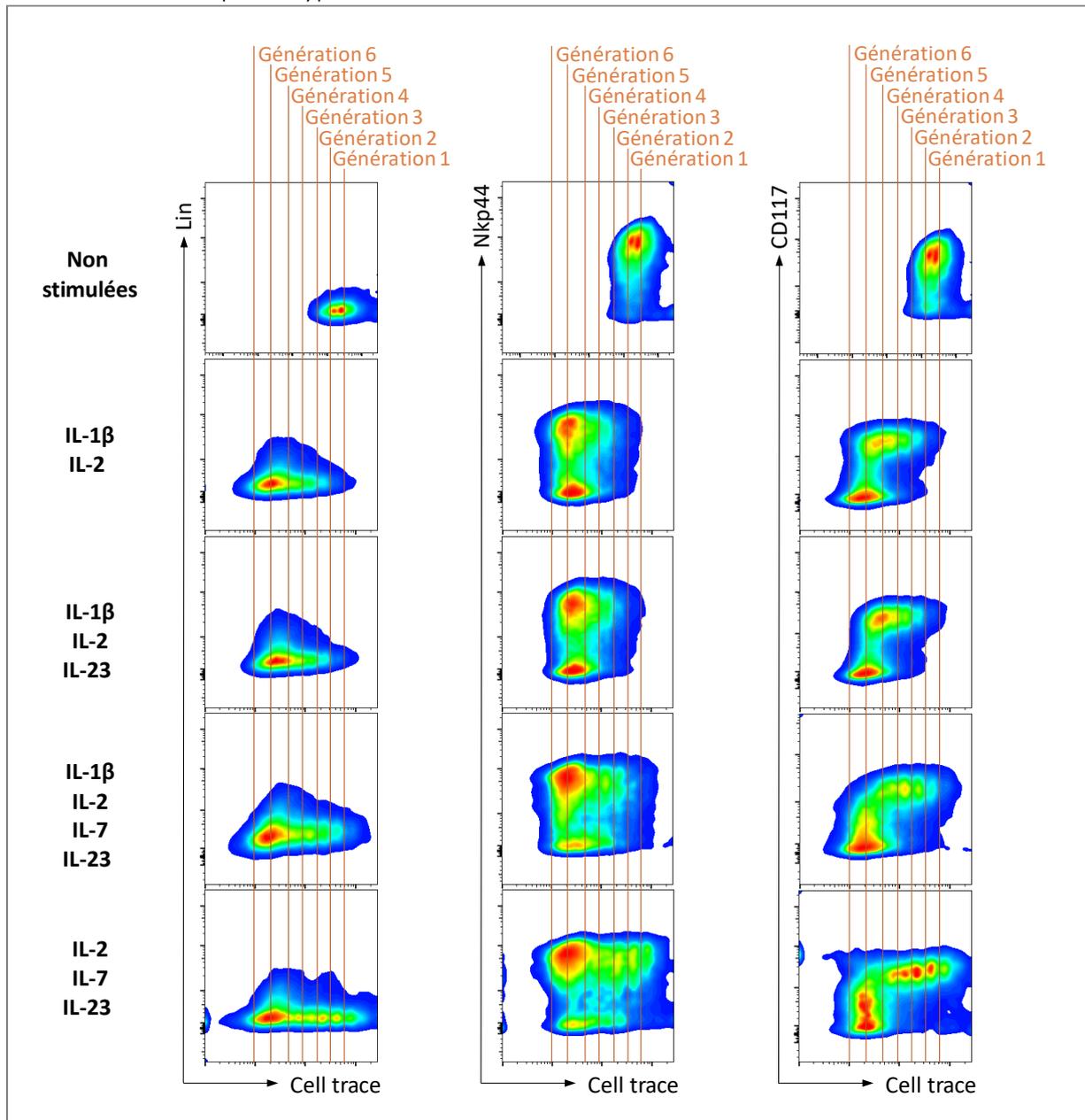


Figure 37 : Evolution phénotypique des ILC au cours de leur prolifération induite par différents cocktails de cytokines

Dans la littérature, il a été décrit une plasticité entre les ILC1 et les ILC3 en présence d'IL-1β, IL-2 et IL-23 (Gronke et al., 2016). Dans le cas de notre patient atteint de PTI, cette condition de stimulation n'est pas favorable aux ILC3 et elle entraîne un léger retard de prolifération qui diffère la perte d'expression de CD117.

De façon générale, l'acquisition de l'expression de marqueurs de lignées hématopoïétiques « Lin » évolue peu mais de façon relativement constante au cours des générations jusqu'à une

expression plus importante par les cellules de 5^{ème} génération. De façon surprenante, les cellules ayant dépassé la 6^{ème} génération n'expriment pas de marqueurs de lignée.

Une dernière remarque peut être tirée de cette représentation de la prolifération. En présence d'IL-7 et plus encore en absence d'IL-1 β , les indices de prolifération sont nettement plus faibles (respectivement 5,4 et 3,4). Cette diminution n'est pas due à un retard général de la prolifération car une part notable d'ILC sont en 5^{ème} et 6^{ème} génération. Ceci traduit plus vraisemblablement une inhibition partielle et/ou totale de la prolifération d'une petite proportion d'ILC, puisque certaines d'entre elles sont toujours dans la population 0 et ne sont donc pas entrées en division.

L'ensemble de ces données préliminaires sur l'expansion et la plasticité des ILC spléniques est à confirmer et les conditions d'expansion sont à affiner pour permettre de comparer les capacité prolifératives et plastiques des ILC spléniques dans des conditions physiologiques et au cours du PTI.

DISCUSSION

Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé la première description phénotypique des ILC spléniques humaines dans des conditions physiologiques et dans la rate de patients atteints de thrombopénie immunologique. Ces travaux permettent une caractérisation de cette lignée lymphoïde rare et ouvrent de nombreuses pistes concernant leur localisation prédominante dans la microarchitecture splénique, leurs propriétés plastiques, leur provenance et leurs propriétés fonctionnelles dans des conditions normales et pathologiques (Figure 38)

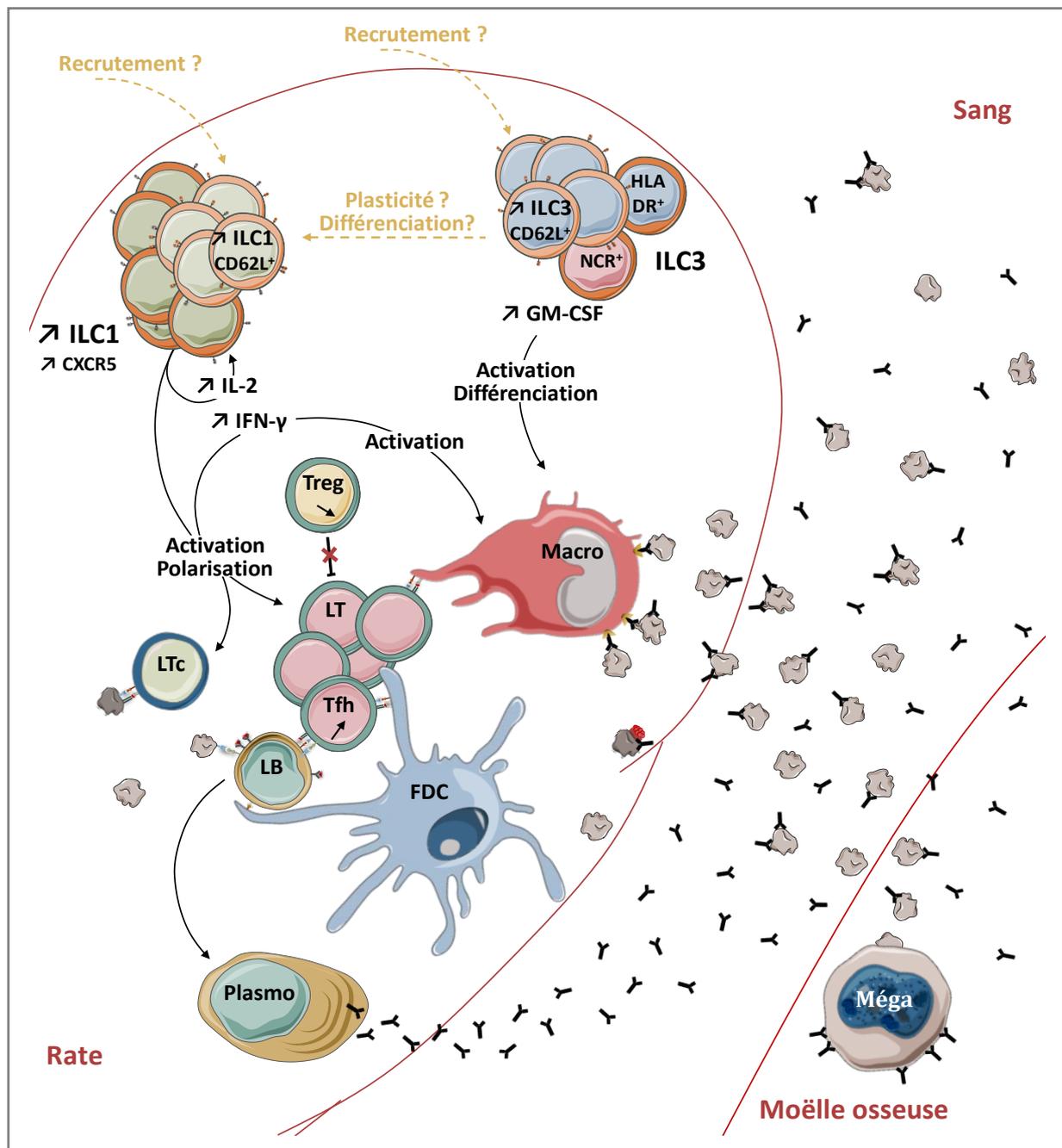


Figure 38 : Implication des ILC dans la physiopathologie du PTI

Nous avons identifié l'ensemble des populations et sous-populations d'ILC spléniques dans des conditions physiologiques et la fréquence moyenne des ILC totales est d'environ 2400 ILC par million de lymphocytes (0,24%).

La répartition des sous-populations d'ILC dans la rate est très différente de celle du compartiment sanguin. Les ILC3 NCR⁺ constituent la population d'ILC la plus importante alors que les ILC1 et 2 sont très peu représentées. En accord avec cette répartition, la fréquence d'ILC spléniques totales exprimant CCR6 est très majoritaire et l'expression de CXCR3 par les ILC totales est diminuée dans la rate en comparaison avec le compartiment sanguin.

Les ILC spléniques totales

Dans des conditions physiologiques, la cytokine majoritairement exprimée par les ILC spléniques est le TNF- α . Cette cytokine leur confère d'une part des propriétés générales pro-inflammatoires, par la stimulation probable de la phagocytose des macrophages spléniques, le recrutement de monocytes/macrophages et de polynucléaires neutrophiles ou encore en contribuant à la sécrétion de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6, l'IL-1 β ...) ou facteur de croissance (GM-CSF, M-CSF...). Par ailleurs, les ILC spléniques pourraient également contribuer au maintien des centres germinatifs spléniques, le TNF- α étant indispensable à la production de CXCL13 par les cellules stromales et les FDC (Tumanov et al., 2010), ou entretenir l'axe TNF- α /CCL20/CCR6 qui permet le recrutement et la rétention des LB dans la zone marginale (Paradis et al., 2014).

La fréquence médiane d'ILC spléniques totales produisant de l'IL-10 est d'environ 5%. Ces cellules récemment décrites dans l'intestin chez l'homme dans un contexte inflammatoire sont nommées ILC10 ou ILCreg, et présenteraient des propriétés régulatrices par la répression de la production des médiateurs inflammatoires et seraient ainsi impliquées dans la résolution de l'inflammation (S. Wang et al., 2017).

Etant donné la faible proportion de cellules exprimant les récepteurs de chémokines étudiés, il n'est pas évident de déterminer la localisation préférentielle des ILC dans la rate dans un contexte non pathologique. Il est peu probable que les ILC soit résidentes dans les manchons lymphoïdes périartériolaires car nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression de CCR7. L'expression de CD62L est presque inexistante par les ILC des rates témoins et les ILC exprimant CXCR5 représentent environ 2%, et sont réparties dans les trois groupes. Cela n'exclut pas la possible présence d'ILC au sein des centres germinatifs mais leur influence est probablement minime du fait de leur fréquence très faible (0,004% des cellules lymphoïdes)

comparativement aux populations lymphocytaires T CD4⁺ spléniques constituées en moyenne de 20% de cellules exprimant CXCR5 et 0,5% de Tfh (Audia et al., 2014).

In fine, le récepteur de chémokine majoritairement exprimé par les ILC spléniques est CCR6, récepteur de CCL20 (également appelé *Macrophage Inflammatory Protein-3* - MIP3 α). CCR6 est considéré comme le récepteur de la chémokine indispensable au recrutement des LTh17 sur les sites inflammatoires, mais il permet également le recrutement des LTreg et son expression par les LB et les Tfh influence le développement des CG et favorise la génération d'Ig de forte affinité (Lee & Korner, 2017; Reimer et al., 2017). La localisation des cellules sécrétant CCL20 dans la rate est peu documentée mais elles seraient principalement présentes dans les zones périfolliculaires et les zones marginales mais peuvent également être localisées dans les PALS lors d'infections (Lalic et al., 2018; Paradis et al., 2014).

Cette première description des ILC spléniques ne nous permet pas de déterminer leurs localisations, et leur influence potentielle sur les autres cellules immunitaires ou sur l'architecture des follicules spléniques dans des conditions physiologiques. Localiser les ILC dans le tissu splénique est une étape nécessaire à la compréhension de leur action. La localisation de CCL20 par immunohistochimie sur des coupes de rates donnerait une première indication. Il est également possible de directement identifier des cellules « ILC like » en microscopie à fluorescence par la réalisation d'un marquage ciblant CD3 (ou Lin), CD127 et selon la population recherchée Tbet, ROR γ t ou GATA3 (Mackley et al., 2015; S. Wang et al., 2017; Withers et al., 2012).

Au cours du PTI, la fréquence des ILC totales spléniques est similaire à celle des témoins, tout comme le taux de cellules sécrétrices de TNF- α ou d'IL-10. En revanche elles sont plus nombreuses à exprimer le CD62L et à sécréter de l'IL-2 et du GM-CSF principalement du fait des ILC1 et ILC3.

Les ILC1 spléniques

Comparativement aux sujets témoins, les ILC1 sont en plus grand nombre dans les rates des patients atteints de PTI et sont plus nombreuses à exprimer CD62L et CXCR3 et à sécréter de l'IL-2 et de l'IFN- γ .

L'expression moyenne de CD62L (L-sélectine) par les ILC1 des patients atteints de PTI est de 14% mais elle peut s'élever jusqu'à 40%. A ce jour, 4 ligands de la L-sélectine ont été identifiés : GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1 et PSGL-1. Une des fonctions majeures de CD62L est d'initier le « *rolling* » des lymphocytes à la surface des veinules post-capillaires à endothélium épais des ganglions (*high endothelial venule* – HEV) qui expriment les ligands CD34 et GlyCAM-1,

aboutissant à la transmigration des lymphocytes naïfs à travers les cellules endothéliales pour entrer dans les ganglions.

Bien que cela soit toujours discutée, on considère que la circulation intrasplénique est un système ouvert. Les artères centrales, entourées des PALS se ramifient et quittent la pulpe blanche pour donner naissance à de courts capillaires qui s'ouvrent directement dans les cordons de Billroth. Les cellules sanguines quittent la rate par les sinusoides veineux qui s'unissent pour former les veines septales puis spléniques. La rate est ainsi dépourvue de HEV et le recrutement des lymphocytes est indépendant de CD62L.

Cependant, les cellules stromales de la zone marginale splénique expriment MadCAM-1, ce qui suggère que les ILC1 exprimant CD62L soient localisées dans la zone marginale au cours du PTI (Steiniger, 2015). Une étude des rates par microscopie à fluorescence permettrait de confirmer cette hypothèse.

L'hypothèse d'une fonction « helper » des ILC vis-à-vis des LB de la zone marginale est peu probable car nous n'avons pas détecté d'expression d'ICOS ni de CD40L à la surface des ILC1 dans les expériences de mise au point. Par ailleurs, l'expression membranaire de BAFF par les ILC1 n'est pas augmentée au cours du PTI (~10%). On peut tout de même s'interroger sur une expression préférentielle de BAFF par les ILC1 CD62L⁺. Les modalités de phénotypage et le logiciel d'analyse utilisé ne nous permettent pas de répondre à cette question, les deux Ag ayant été recherchés dans des tubes différents. En revanche, une réanalyse de nos données en utilisant un logiciel d'intégration et d'analyse multidimensionnelle des données de cytométrie en flux (type Infinicyt™) permettrait de statuer sur la co-expression de ces marqueurs. Ce type de logiciel permet de fusionner les analyses de plusieurs tubes grâce à la reconnaissance des cellules analysées sur la base de leur profil de fluorescence de 4 marqueurs identiques.

Plus probablement, les ILC1 contribuent à la polarisation Th1/Tc1 et à la survie des LT spléniques au cours du PTI.

L'augmentation de l'expression de CXCR3, récepteur des chémokines induites par l'IFN- γ , témoigne de leur état d'activation et est corrélée à la sécrétion d'IFN- γ . De par leur importante production d'IFN- γ , les ILC1 pourraient moduler l'activité des CPA et favoriser la polarisation des LTh1 et LTc1 de façon directe par l'induction des facteurs de transcription STAT1 puis Tbet, ou indirecte par l'inhibition des Th2 et Th17 (Szabo, Sullivan, Peng, & Glimcher, 2003).

La sécrétion d'IL-2 par les ILC1 est majorée au cours du PTI. Elle favorise leur propre survie par une boucle de rétrocontrôle positive autocrine d'une part et d'autre part, si la promiscuité des cellules est suffisante, pourrait participer à la survie et la prolifération des LT, plus particulièrement des LT CD8⁺ (Boyman & Sprent, 2012).

Les ILC3 spléniques

Bien que leur fréquence soit stable au cours du PTI, les ILC3 sont prédominantes dans la rate et les ILC3 NCR⁻ constituent la sous-population majoritaire.

Que ce soit dans des conditions physiologique, ou dans les rates de patients atteints de PTI, les ILC3 spléniques expriment majoritairement le récepteur de chémokine CCR6, leur permettant probablement de résider dans la zone marginale tel que décrit par Magri (Magri et al., 2014). Cet article montre le rôle primordial des ILC3 dans la survie des LB de la zone marginale ainsi que leur importance dans la production d'IgM indépendante des LT et passant par une expression importante de BAFF, CD40 et DLL-1. Dans notre étude, nous avons observé une faible expression de BAFF et CD40 par les ILC3, ce qui va plutôt à l'encontre cette hypothèse. Par ailleurs, au cours du PTI, les anticorps antiplaquettes sont essentiellement constitués d'isotype IgG.

En revanche, l'augmentation des ILC3 produisant du GM-CSF pourrait participer à la stimulation des LB indépendamment des LT par l'activation des neutrophiles « helpers ». Chez la souris, les ILC3 spléniques, par leur forte production de GM-CSF et CXCL9, recrutent et activent les neutrophiles de la zone marginale leur permettant *in vivo* d'influer sur la sécrétion d'Ig A, M et G de façon T indépendante.

Très peu de données sont disponibles sur le rôle des neutrophiles dans la physiopathologie du PTI. Une étude *in vitro* de leur activation par les ILC des patients permettrait dans un premier temps de conforter cette hypothèse.

Par ailleurs, la production de GM-CSF par les ILC3 leur permet probablement de contribuer à la maturation des DC mais également d'entretenir l'activation des macrophages spléniques, acteurs essentiels dans la physiopathologie du PTI.

Lors de l'analyse des cytokines secrétées par les ILC spléniques, les taux d'IL-22 mesurés sont peu élevés et nous n'avons pas été en mesure de détecter la sécrétion d'IL-17 par les ILC3 et ce même au sein de la population d'ILC3 NCR⁺, les plus aptes à sécréter ces cytokines, ce qui a déjà été rapporté par d'autres auteurs avec une stimulation identique (Magri et al., 2014).

De façon générale, l'ensemble des cytokines que nous avons mesuré dans les populations d'ILC spléniques est relativement faible, et les proportions d'ILC sécrétant des cytokines n'excèdent que rarement 10%, à l'exception du TNF- α et l'IL-2. Cela est probablement dû à des conditions de stimulation non optimales. Sur la base de nombreux travaux publiés, nous avons fait le choix de stimuler les ILC par de la PMA, activateur spécifique de la protéine kinase C (PKC) et de NF- κ B, associée à la ionomycine, ionophore calcique. Utilisées pour stimuler des LT, ces molécules miment une activation *via* le TCR aboutissant à la sécrétion d'IL-2 en quelques heures.

Dans des conditions physiologiques, les ILC sont principalement activées par des cytokines dont les voies de signalisation n'engagent généralement pas PKC mais la voie des MAP Kinases (*mitogen-activated protein kinase*). A l'inverse, le choix d'une stimulation cytokinique n'est pas aisé car il risque d'influencer la polarisation des ILC. Néanmoins, il est probable qu'une utilisation de l'IL-1 β et de l'IL-23 permettrait de mesurer la production des cytokines « Th17 » tel que l'IL-22 et l'IL-17.

De ce fait, il serait inapproprié d'exclure la présence d'ILC3 « memory-like » dont l'exposition répétée à un environnement inflammatoire leur confèrerait des capacités de sécrétion d'IL-22 importantes et rapides (Koues et al., 2016; Shih et al., 2016). Etant donné l'environnement dans lequel évoluent les ILC spléniques des patients atteints de PTI, la recherche de ces cellules mériterait d'être de nouveau explorée en utilisant une stimulation cytokinique plutôt que PMA/iono.

Nos travaux confirment l'expression des molécules de CMH-II par les ILC3 spléniques dans des conditions physiologiques et sans stimulation.

Depuis les travaux de Von Burg en 2014 sur des souris, on attribue aux ILC3 des fonctions phagocytaires et on la présume capable d'influencer les réponses T et B par présentation antigénique. Des ILC3 aux propriétés activatrices avec une surexpression de HLA-DR et des molécules de costimulation en réponse à l'IL-1 β ont été décrites, leur permettant d'activer les LT et de stimuler la sécrétion d'Ig par les LB.

D'autres travaux plus récents, également réalisés chez la souris, indiquent que les ILC3 intestinales et ganglionnaires exprimant HLA-DR possèdent une activité tolérogène (Hepworth et al., 2015). Par ailleurs, les travaux menés par Bjorklund identifient les ILC3 NCR⁺HLA-DR⁺ comme une sous-population à part entière dont la signature transcriptomique confirme la capacité de présentation antigénique mais leur confère des propriétés tolérogènes en raison de l'absence d'expression des molécules de costimulation (Bjorklund et al., 2016). Enfin, dans une cohorte pédiatrique atteinte de maladie de Crohn, il a été observé que la diminution d'expression du CMH-II par les ILC3 était corrélée à l'augmentation des Th17 (Hepworth et al., 2015).

Dans le cadre de notre étude, nous avons recherché un lien entre ces populations mais ces résultats préliminaires ne nous ont pas permis d'établir de corrélation entre le taux d'ILC3 exprimant HLA-DR et le taux de Th17 spléniques (donnée non représentée). Cependant la fréquence d'ILC3 exprimant les récepteurs de costimulation CD80, CD83 et CD86 est basse et l'intensité de leur expression est très faible. Ce déséquilibre est donc plutôt en faveur d'un

profil tolérogène de ces ILC3 HLA-DR⁺, ce qui est corroboré par l'augmentation de la proportion d'ILC3 sécrétant de l'IL-10 et peu d'IL-2.

La fréquence des ILC3 exprimant HLA-DR est similaire au cours du PTI mais, dans la rate des patients non répondeurs à la splénectomie, la population d'ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ est largement prédominante.

Ceci suggère que chez certains patients, des mécanismes tolérogènes mettant notamment en jeu les ILC soient mis en place afin de réguler la destruction plaquettaire splénique et de maintenir une certaine tolérance. Chez les patients non répondeurs à la splénectomie, la destruction plaquettaire a probablement lieu dans d'autres organes que la rate expliquant l'absence de réponse à la splénectomie.

Afin d'affirmer les propriétés tolérogènes de cette sous-population d'ILC, il faudrait en premier lieu consolider ces observations dans un groupe plus important de patients non-répondeurs. Par ailleurs, les capacités de phagocytose des ILC3 pourrait être confirmée sur la population d'ILC totales (majoritairement constituée d'ILC3) avec des billes de latex fluorescentes puis avec des plaquettes opsonisées. Par la suite, des expériences de coculture avec des lymphocytes permettraient de déterminer les fonctions activatrices ou tolérogènes des ILC3 spléniques humaines.

Dans les rates contrôles comme dans celles des patients atteints de PTI, nous avons identifié les 3 sous-populations d'ILC3 décrites par Bjorklund dans les ganglions humains sur la base de leur profil transcriptomique. Alors que les taux d'ILC3 NCR⁺ et ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ sont similaires chez les patients et les témoins, la fréquence d'ILC3 NCR⁻CD62L⁺ est augmentée dans les rates des patients atteint de PTI.

Cette population dont l'analyse transcriptomique est en faveur de cellules naïves n'est pas en mesure de sécréter de l'IL-17 ou de l'IL-22 en réponse à une stimulation par PMA/iono ou IL-23 et IL-1 β et ce malgré l'expression des récepteurs de ces cytokines. Ces cellules non activées présentent certaines similitudes avec les précurseurs d'ILC décrites par Lim en 2017 dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes chez l'homme (Di Santo et al., 2017; Lim et al., 2017). Dans notre travail, le phénotype utilisé ne nous permet pas d'affirmer que ces cellules correspondent aux précurseurs des ILC, définis par le phénotype Lin⁻CD7⁺ CD127⁺ CD45RA⁺ CRTh2⁺ CD117⁺ Nkp44⁻ IL-1R⁺ (Lim et al., 2017).

Les sous-populations d'ILC spléniques au cours du PTI :

Prolifération, recrutement, plasticité, différenciation

Nous avons mis en évidence dans la rate des patients atteint de PTI une augmentation globale de la fréquence des ILC1, des ILC1 sécrétant de l'IFN- γ et de l'IL-2, des ILC1 CD62L⁺ et des ILC3 NCR⁺CD62L⁺. Bien que nos résultats ne nous permettent pas de déterminer l'origine de ces cellules, plusieurs hypothèses peuvent être proposées.

L'expression du marqueur de prolifération Ki67 dans la population d'ILC spléniques globale est faible, ce qui va contre l'hypothèse d'une prolifération de ces cellules. Pour autant, les résultats obtenus lors de l'expérience d'expansion des ILC spléniques montre que ces cellules n'ont pas perdu leurs capacités prolifératives et sont en mesure de proliférer en réponse à un environnement cytokinique approprié. Au cours du PTI, l'environnement cytokinique intrasplénique est considéré comme pro-inflammatoire en raison de l'état général d'activation et de polarisation des cellules immunitaires, pour autant l'analyse du secrétôme splénique n'a jamais été réalisée. Une analyse en multiplex des cytokines issues d'un lysat de splénocytes frais permettrait d'évaluer et de comparer le pool cytokinique dans sa globalité. En revanche, ce type d'analyse ne prend pas en compte les mécanismes subtils de régulation cytokinique, notamment l'agencement des cellules entre elles, au sein de la microarchitecture des organes lymphoïdes.

Qu'il s'agisse d'une population naïve ou de précurseurs des ILC, nous avons observé une corrélation entre la sous-population d'ILC3 NCR⁺CD62L⁺ et les ILC1 CD62L⁺, toutes deux plus fréquentes dans les rates des patients. Compte tenu de l'expression de la L-sélectine, et de la localisation de son ligand MadCAM, ces cellules sont probablement colocalisées dans la zone marginale splénique.

La possibilité d'un recrutement des populations naïves CD62L⁺ est à considérer, et plus particulièrement dans l'hypothèse d'une population d'ILC3 CD62L⁺ répondant aux caractéristiques des précurseurs des ILC. Les travaux de Lim sur l'ILC-poïèse des précurseurs d'ILC, issus de la moelle, circulants pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires ou les muqueuses inflammées où ils se différencient en ILC matures en réponse au microenvironnement. Nos résultats suggèrent qu'une population circulante d'ILC exprimant CD62L, constituée soit de cellules naïves, soit de précurseurs, est attirée lors de son passage à travers la pulpe rouge splénique, puis retenue dans la zone marginale en raison de l'expression de MADCAM par les cellules stromales. Pour tester cette hypothèse, l'analyse des ILC sanguines au cours du PTI serait informative ainsi que l'étude de la zone marginale splénique qui pourrait révéler une infiltration par des ILC CD62L⁺.

Une des questions sous-jacentes à l'augmentation des populations d'ILC1 et d'ILC3 exprimant CD62L est l'existence d'une plasticité entre ces populations. De façon générale, les ILC3 ont été décrites comme ayant des capacités plastiques importantes. De plus, dans un environnement favorable, notamment en présence d'IL-1 β , d'IL-2 et d'IL-23, les ILC1 peuvent se différencier en ILC3 (Gronke et al., 2016; C. S. Klose et al., 2013; Vonarbourg et al., 2010). Si on considère les résultats de notre expérience d'expansion des ILC, nous n'avons pas observé chez ce patient atteint de PTI de différenciation des ILC1 en ILC3, à en juger par l'absence d'acquisition de CD117 dans ces conditions de stimulation. Au contraire, quelles que soient les conditions de stimulation cytokinique, la perte d'expression de CD117 *in vitro* est inévitable au cours des 5 et 6^{èmes} générations.

Ces observations nécessitent d'être enrichies par le suivi de l'évolution des facteurs de transcription et des capacité sécrétrices des cellules mais elles suggèrent qu'une plasticité ou une différenciation de la population ILC3 NCR⁻CD62L⁺ en ILC1 CD62L⁺ soit possible en réponse au microenvironnement à la suite de leur recrutement dans les zones marginales.

On peut également s'interroger sur les fonctions de cette population d'ILC1 non activées exprimant CD62L. S'agit-il d'une population spécifique aux fonction biologiques particulières dont la fréquence est augmentée chez les patients, ou d'un état transitoire avant différenciation en ILC1 activées ? Une étude *in vitro* de la plasticité des ILC3 NCR⁻CD62L⁺ triées, permettrait de confirmer ou d'infirmer leur capacité à générer des ILC1 et de déterminer si le phénotype ILC1 CD62L⁺ constitue une étape dans le continuum de différenciation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abboud, M. R., Laver, J., Xu, F., Weksler, B., & Bussel, J. (1996). Serum levels of GM-CSF are elevated in patients with thrombocytopenia. *Br J Haematol*, *92*(2), 486-488.
- Abrahamson, P. E., Hall, S. A., Feudjo-Tepie, M., Mitrani-Gold, F. S., & Logie, J. (2009). The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. *Eur J Haematol*, *83*(2), 83-89. doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01247.x
- Allen, C. D., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*, *27*(2), 190-202. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.009
- Audia, S., Lorcerie, B., Godeau, B., & Bonnotte, B. (2011). [Pathophysiology of immune thrombocytopenia]. *Rev Med Interne*, *32*(6), 350-357. doi:10.1016/j.revmed.2009.05.017
- Audia, S., Mahevas, M., Samson, M., Godeau, B., & Bonnotte, B. (2017). Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev*, *16*(6), 620-632. doi:10.1016/j.autrev.2017.04.012
- Audia, S., Rossato, M., Santegoets, K., Spijkers, S., Wichers, C., Bekker, C., . . . Radstake, T. R. (2014). Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood*, *124*(18), 2858-2866. doi:10.1182/blood-2014-03-563445
- Audia, S., Samson, M., Guy, J., Janikashvili, N., Fraszczak, J., Trad, M., . . . Bonnotte, B. (2011). Immunologic effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. *Blood*, *118*(16), 4394-4400. doi:10.1182/blood-2011-03-344051
- Audia, S., Samson, M., Mahevas, M., Ferrand, C., Trad, M., Ciudad, M., . . . Bonnotte, B. (2013). Preferential splenic CD8(+) T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, *122*(14), 2477-2486. doi:10.1182/blood-2013-03-491415
- Audia, S., Santegoets, K., Laarhoven, A. G., Vidarsson, G., Facy, O., Ortega-Deballon, P., . . . Radstake, T. R. (2017). Fcγ receptor expression on splenic macrophages in adult immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol*, *188*(2), 275-282. doi:10.1111/cei.12935
- Bal, S. M., Bernink, J. H., Nagasawa, M., Groot, J., Shikhagaie, M. M., Golebski, K., . . . Ros, X. R. (2016). IL-1β, IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol*, *17*(6), 636-645. doi:10.1038/ni.3444
- Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Graf, B. A., Moquin, A., Adams, P. S., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2012). Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity*, *36*(5), 847-856. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.012
- Bao, W., Bussel, J. B., Heck, S., He, W., Karpoff, M., Boulad, N., & Yazdanbakhsh, K. (2010). Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood*, *116*(22), 4639-4645. doi:10.1182/blood-2010-04-281717
- Barlow, J. L., Bellosi, A., Hardman, C. S., Drynan, L. F., Wong, S. H., Cruickshank, J. P., & McKenzie, A. N. (2012). Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*, *129*(1), 191-198 e191-194. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.041
- Barnes, P. J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*, *148*(3), 245-254. doi:10.1038/sj.bjp.0706736

- Bartemes, K. R., Kephart, G. M., Fox, S. J., & Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *134*(3), 671-678 e674. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.024
- Bernink, J. H., Mjosberg, J., & Spits, H. (2017). Human ILC1: To Be or Not to Be. *Immunity*, *46*(5), 756-757. doi:10.1016/j.immuni.2017.05.001
- Bernink, J. H., Peters, C. P., Munneke, M., te Velde, A. A., Meijer, S. L., Weijer, K., . . . Spits, H. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*, *14*(3), 221-229. doi:10.1038/ni.2534
- Bettaieb, A., Oksenhendler, E., Duedari, N., & Bierling, P. (1996). Cross-reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol*, *103*(1), 19-23.
- Bisharat, N., Omari, H., Lavi, I., & Raz, R. (2001). Risk of infection and death among post-splenectomy patients. *J Infect*, *43*(3), 182-186. doi:10.1053/jinf.2001.0904
- Bjorklund, A. K., Forkel, M., Picelli, S., Konya, V., Theorell, J., Friberg, D., . . . Mjosberg, J. (2016). The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol*, *17*(4), 451-460. doi:10.1038/ni.3368
- Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, *32*(1), 129-140. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009
- Bleyzac, P., Exbrayat, J. M., & Fellah, J. S. (2005). [On the origin of the adaptive immune system (AIS): the hypothesis]. *Med Sci (Paris)*, *21*(2), 210-215. doi:10.1051/medsci/2005212210
- Boughton, B. J., Simpson, A. W., Bolt, C., Buchan, A., & McLeish, P. (1995). Platelet Membrane Glycoprotein IIb/IIIa has Sequence Homologies with Human Virus Proteins and Synthetic Viral Peptides Inhibit Anti-GPIIb/IIIa Antibodies in Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Platelets*, *6*(2), 75-82. doi:10.3109/09537109509078447
- Bouvier, A., Gout, M., Audia, S., Chalumeau, C., Rat, P., & Deballon, O. (2017). [Routine screening of splenic or portal vein thrombosis after splenectomy]. *Rev Med Interne*, *38*(1), 3-7. doi:10.1016/j.revmed.2016.08.003
- Boxer, M. A., Braun, J., & Ellman, L. (1978). Thromboembolic risk of postsplenectomy thrombocytosis. *Arch Surg*, *113*(7), 808-809.
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 180-190. doi:10.1038/nri3156
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., . . . Montreuil, J. (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*, *80*(2), 173-195.
- Brestoff, J. R., Kim, B. S., Saenz, S. A., Stine, R. R., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., . . . Artis, D. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, *519*(7542), 242-246. doi:10.1038/nature14115
- Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I., Littman, D. R., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, *464*(7293), 1371-1375. doi:10.1038/nature08949
- Canque, B., Camus, S., Dalloul, A., Kahn, E., Yagello, M., Dezutter-Dambuyant, C., . . . Gluckman, J. C. (2000). Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+)CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood*, *96*(12), 3748-3756.

- Cao, J., Chen, C., Li, L., Ling-yu, Z., Zhen-yu, L., Zhi-ling, Y., . . . Kai-lin, X. (2012). Effects of high-dose dexamethasone on regulating interleukin-22 production and correcting Th1 and Th22 polarization in immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol*, *32*(3), 523-529. doi:10.1007/s10875-012-9649-4
- Carotta, S., Pang, S. H., Nutt, S. L., & Belz, G. T. (2011). Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood*, *117*(20), 5449-5452. doi:10.1182/blood-2010-11-318956
- Carrega, P., Loiacono, F., Di Carlo, E., Scaramuccia, A., Mora, M., Conte, R., . . . Ferlazzo, G. (2015). NCR(+)ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat Commun*, *6*, 8280. doi:10.1038/ncomms9280
- Carter, N. A., Rosser, E. C., & Mauri, C. (2012). Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, *14*(1), R32. doi:10.1186/ar3736
- Catani, L., Fagioli, M. E., Tazzari, P. L., Ricci, F., Curti, A., Rovito, M., . . . Vianelli, N. (2006). Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol*, *34*(7), 879-887. doi:10.1016/j.exphem.2006.03.009
- Catani, L., Sollazzo, D., TrabANELLI, S., Curti, A., Evangelisti, C., Polverelli, N., . . . Lemoli, R. M. (2013). Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia. *Ann Hematol*, *92*(1), 67-78. doi:10.1007/s00277-012-1556-5
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J. K., . . . Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, *457*(7230), 722-725. doi:10.1038/nature07537
- Chadburn, A. (2000). The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol*, *37*(1 Suppl 1), 13-21.
- Chea, S., Perchet, T., Petit, M., Verrier, T., Guy-Grand, D., Banchi, E. G., . . . Golub, R. (2016). Notch signaling in group 3 innate lymphoid cells modulates their plasticity. *Sci Signal*, *9*(426), ra45. doi:10.1126/scisignal.aaf2223
- Chea, S., Possot, C., Perchet, T., Petit, M., Cumano, A., & Golub, R. (2015). CXCR6 Expression Is Important for Retention and Circulation of ILC Precursors. *Mediators Inflamm*, *2015*, 368427. doi:10.1155/2015/368427
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (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*(12), 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Cherrier, M. (2014). [Innate lymphoid cells: new players of the mucosal immune response]. *Med Sci (Paris)*, *30*(3), 280-288. doi:10.1051/medsci/20143003016
- Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Johnston, R. J., Monticelli, L., . . . Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*, *34*(6), 932-946. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.023
- Chow, L., Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Cridland, N., Webster, M. L., . . . Semple, J. W. (2010). A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8⁺ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. *Blood*, *115*(6), 1247-1253. doi:10.1182/blood-2009-09-244772

- Chu, X. X., Hou, M., Peng, J., Zhu, Y. Y., Ji, X. B., Wang, L., . . . Ma, D. X. (2006). Effects of IgG and its F(ab')₂ fragments of some patients with idiopathic thrombocytopenic purpura on platelet aggregation. *Eur J Haematol*, *76*(2), 153-159. doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00557.x
- Cines, D. B., Bussel, J. B., Liebman, H. A., & Luning Prak, E. T. (2009). The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, *113*(26), 6511-6521. doi:10.1182/blood-2009-01-129155
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., . . . Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, *450*(7169), 566-569. doi:10.1038/nature06306
- Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Verhoef, P. A., & Bendelac, A. (2014). A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature*, *508*(7496), 397-401. doi:10.1038/nature13047
- Crellin, N. K., Trifari, S., Kaplan, C. D., Satoh-Takayama, N., Di Santo, J. P., & Spits, H. (2010). Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTI-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity*, *33*(5), 752-764. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.012
- Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., & Vivier, E. (2017). [Innate lymphoid cells]. *Med Sci (Paris)*, *33*(5), 534-542. doi:10.1051/medsci/20173305018
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, *29*, 621-663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
- Cupedo, T., Crellin, N. K., Papazian, N., Rombouts, E. J., Weijer, K., Grogan, J. L., . . . Spits, H. (2009). Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol*, *10*(1), 66-74. doi:10.1038/ni.1668
- Dadi, S., Chhangawala, S., Whitlock, B. M., Franklin, R. A., Luo, C. T., Oh, S. A., . . . Li, M. O. (2016). Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell*, *164*(3), 365-377. doi:10.1016/j.cell.2016.01.002
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, *47*(5), 450-455.
- Di Santo, J. P., Lim, A. I., & Yssel, H. (2017). 'ILC-poiesis': generating tissue ILCs from naive precursors. *Oncotarget*, *8*(47), 81729-81730. doi:10.18632/oncotarget.21046
- Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., & Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, *8*(2), 145-153. doi:10.1038/ni1424
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 120-136. doi:10.1016/j.stem.2012.01.006
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., . . . Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, *314*(5804), 1461-1463. doi:10.1126/science.1135245
- Ebbo, M., Audonnet, S., Grados, A., Benarous, L., Mahevas, M., Godeau, B., . . . Vely, F. (2015). NK cell compartment in the peripheral blood and spleen in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Clin Immunol*, *177*, 18-28. doi:10.1016/j.clim.2015.11.005
- Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M. J., Rennert, P. D., Choi, Y., & Littman, D. R. (2004). An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*, *5*(1), 64-73. doi:10.1038/ni1022

- Eisenring, M., vom Berg, J., Kristiansen, G., Saller, E., & Becher, B. (2010). IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nat Immunol*, *11*(11), 1030-1038. doi:10.1038/ni.1947
- El-Rashedi, F. H., El-Hawy, M. A., Helwa, M. A., & Abd-Allah, S. S. (2017). Study of CD4(+), CD8(+), and natural killer cells (CD16(+), CD56(+)) in children with immune thrombocytopenic purpura. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, *10*(1), 8-14. doi:10.1016/j.hemonc.2017.01.001
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., . . . Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, *4*(12), 1206-1212. doi:10.1038/ni1003
- Fathman, J. W., Bhattacharya, D., Inlay, M. A., Seita, J., Karsunky, H., & Weissman, I. L. (2011). Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood*, *118*(20), 5439-5447. doi:10.1182/blood-2011-04-348912
- Fogarty, P. F., Rick, M. E., Zeng, W., Risitano, A. M., Dunbar, C. E., & Bussell, J. B. (2003). T cell receptor VB repertoire diversity in patients with immune thrombocytopenia following splenectomy. *Clin Exp Immunol*, *133*(3), 461-466.
- Foster, C. B., Zhu, S., Erichsen, H. C., Lehrnbecher, T., Hart, E. S., Choi, E., . . . Early Chronic, I. T. P. S. G. (2001). Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcγ receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol*, *113*(3), 596-599.
- Frederiksen, H., & Schmidt, K. (1999). The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood*, *94*(3), 909-913.
- Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., . . . Caligiuri, M. A. (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*, *22*(3), 295-304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013
- Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K., & Caligiuri, M. A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, *203*(4), 1033-1043. doi:10.1084/jem.20052507
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J. S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R. D., . . . Colonna, M. (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-γ-producing cells. *Immunity*, *38*(4), 769-781. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.010
- Geremia, A., Arancibia-Carcamo, C. V., Fleming, M. P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N. J., . . . Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med*, *208*(6), 1127-1133. doi:10.1084/jem.20101712
- Gitlin, A. D., Mayer, C. T., Oliveira, T. Y., Shulman, Z., Jones, M. J., Koren, A., & Nussenzweig, M. C. (2015). HUMORAL IMMUNITY. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science*, *349*(6248), 643-646. doi:10.1126/science.aac4919
- Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., & LeibundGut-Landmann, S. (2013). Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol*, *190*(2), 521-525. doi:10.4049/jimmunol.1202924
- Glatzer, T., Killig, M., Meisig, J., Ommert, I., Luetke-Eversloh, M., Babic, M., . . . Romagnani, C. (2013). RORγmat(+) innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44. *Immunity*, *38*(6), 1223-1235. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.013
- Godeau, B., Porcher, R., Fain, O., Lefrere, F., Fenaux, P., Cheze, S., . . . Bierling, P. (2008). Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune

- thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood*, 112(4), 999-1004. doi:10.1182/blood-2008-01-131029
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I., Lamichhane, A., . . . Kiyono, H. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science*, 345(6202), 1254009. doi:10.1126/science.1254009
- Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., & Diefenbach, A. (2016). Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol Lett*, 179, 9-18. doi:10.1016/j.imlet.2016.07.004
- Grozovsky, R., Begonja, A. J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J. H., Falet, H., & Hoffmeister, K. M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*, 21(1), 47-54. doi:10.1038/nm.3770
- Gudbrandsdottir, S., Brimnes, M., Kollgaard, T., Hasselbalch, H. C., & Nielsen, C. H. (2018). Effects of rituximab and dexamethasone on regulatory and proinflammatory B-cell subsets in patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 100(1), 45-52. doi:10.1111/ejh.12978
- Halim, T. Y., Krauss, R. H., Sun, A. C., & Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, 36(3), 451-463. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.020
- Hams, E., Armstrong, M. E., Barlow, J. L., Saunders, S. P., Schwartz, C., Cooke, G., . . . Fallon, P. G. (2014). IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1), 367-372. doi:10.1073/pnas.1315854111
- Hams, E., Locksley, R. M., McKenzie, A. N., & Fallon, P. G. (2013). Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J Immunol*, 191(11), 5349-5353. doi:10.4049/jimmunol.1301176
- Hanash, A. M., Dudakov, J. A., Hua, G., O'Connor, M. H., Young, L. F., Singer, N. V., . . . van den Brink, M. R. (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*, 37(2), 339-350. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.028
- Harms Pritchard, G., & Pepper, M. (2018). Memory B cell heterogeneity: Remembrance of things past. *J Leukoc Biol*, 103(2), 269-274. doi:10.1002/JLB.4MR0517-215R
- Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingsworth, J. W., & Moore, C. V. (1951). Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*, 38(1), 1-10.
- Hepworth, M. R., Fung, T. C., Masur, S. H., Kelsen, J. R., McConnell, F. M., Dubrot, J., . . . Sonnenberg, G. F. (2015). Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4(+) T cells. *Science*, 348(6238), 1031-1035. doi:10.1126/science.aaa4812
- Herberman, R. B. (1975). <Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells - Herberman 1975.pdf>.
- Heyns Adu, P., Badenhurst, P. N., Lotter, M. G., Pieters, H., Wessels, P., & Kotze, H. F. (1986). Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous ¹¹¹In-labeled platelets and homologous ⁵¹Cr-labeled platelets differ. *Blood*, 67(1), 86-92.
- Honda, K., Nakano, H., Yoshida, H., Nishikawa, S., Rennert, P., Ikuta, K., . . . Nishikawa, S.-I. (2001). Molecular Basis for Hematopoietic/Mesenchymal Interaction during Initiation of Peyer's Patch Organogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(5), 621-630. doi:10.1084/jem.193.5.621

- Houwerzijl, E. J., Blom, N. R., van der Want, J. J., Esselink, M. T., Koornstra, J. J., Smit, J. W., . . . de Wolf, J. T. (2004). Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, *103*(2), 500-506. doi:10.1182/blood-2003-01-0275
- Hu, Y., Ma, D. X., Shan, N. N., Zhu, Y. Y., Liu, X. G., Zhang, L., . . . Hou, M. (2011). Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One*, *6*(10), e26522. doi:10.1371/journal.pone.0026522
- Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., . . . Paul, W. E. (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, *16*(2), 161-169. doi:10.1038/ni.3078
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L. A., Huber, F. J., Bosurgi, L., Hu, B., . . . Flavell, R. A. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*, *491*(7423), 259-263. doi:10.1038/nature11535
- Huntington, N. D., Carpentier, S., Vivier, E., & Belz, G. T. (2016). Innate lymphoid cells: parallel checkpoints and coordinate interactions with T cells. *Curr Opin Immunol*, *38*, 86-93. doi:10.1016/j.coi.2015.11.008
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., & Glimcher, L. H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, *307*(5708), 430-433. doi:10.1126/science.1103336
- Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H., Yoshimoto, T., . . . Yamanishi, K. (2013). Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(34), 13921-13926. doi:10.1073/pnas.1307321110
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., . . . Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, *126*(6), 1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., . . . Tedder, T. F. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, *117*(2), 530-541. doi:10.1182/blood-2010-07-294249
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., . . . Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, *31*(10), 3121-3127. doi:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4
- Ji, L., Zhan, Y., Hua, F., Li, F., Zou, S., Wang, W., . . . Cheng, Y. (2012). The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia. *PLoS One*, *7*(12), e50909. doi:10.1371/journal.pone.0050909
- Kamhieh-Milz, J., Ghosoun, N., Sterzer, V., & Salama, A. (2018). Effect of glucocorticoid treatment on BAFF and APRIL expression in patients with immune thrombocytopenia (ITP). *Clin Immunol*, *188*, 74-80. doi:10.1016/j.clim.2017.12.010
- Kanamori, Y. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(4), 1449-1459. doi:10.1084/jem.184.4.1449
- Khellaf, M., Charles-Nelson, A., Fain, O., Terriou, L., Viillard, J. F., Cheze, S., . . . Godeau, B. (2014). Safety and efficacy of rituximab in adult immune thrombocytopenia: results

- from a prospective registry including 248 patients. *Blood*, 124(22), 3228-3236. doi:10.1182/blood-2014-06-582346
- Kiessling, K. H., Pilstrom, L., Bylund, A. C., Piehl, K., & Saltin, B. (1975). Effects of chronic ethanol abuse on structure and enzyme activities of skeletal muscle in man. *Scand J Clin Lab Invest*, 35(6), 601-607. doi:10.1080/00365517509095786
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 5(2), 117-121. doi:10.1002/eji.1830050209
- Kim, B. S., Wang, K., Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Brestoff, J. R., Monticelli, L. A., . . . Artis, D. (2014). Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. *J Immunol*, 193(7), 3717-3725. doi:10.4049/jimmunol.1401307
- Kim, H. S., Jang, J.-H., Lee, M. B., Jung, I. D., Park, Y.-M., Kim, Y. M., & Choi, W. S. (2016). A novel IL-10-producing innate lymphoid cells (ILC10) in a contact hypersensitivity mouse model. *BMB Reports*, 49(5), 293-296. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.5.023
- Kim, H. Y., Lee, H. J., Chang, Y. J., Pichavant, M., Shore, S. A., Fitzgerald, K. A., . . . Umetsu, D. T. (2014). Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*, 20(1), 54-61. doi:10.1038/nm.3423
- Kirchberger, S., Royston, D. J., Boulard, O., Thornton, E., Franchini, F., Szabady, R. L., . . . Powrie, F. (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med*, 210(5), 917-931. doi:10.1084/jem.20122308
- Klose, C. S., & Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol*, 17(7), 765-774. doi:10.1038/ni.3489
- Klose, C. S., Kiss, E. A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., . . . Diefenbach, A. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ mat⁺ innate lymphoid cells. *Nature*, 494(7436), 261-265. doi:10.1038/nature11813
- Klose, C. S. N., Flach, M., Mohle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., . . . Diefenbach, A. (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, 157(2), 340-356. doi:10.1016/j.cell.2014.03.030
- Kojouri, K., Vesely, S. K., Terrell, D. R., & George, J. N. (2004). Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood*, 104(9), 2623-2634. doi:10.1182/blood-2004-03-1168
- Kosugi, S., Tomiyama, Y., Shiraga, M., Kashiwagi, H., Mizutani, H., Kanakura, Y., . . . Matsuzawa, Y. (1996). Platelet-associated anti-glycoprotein (GP) IIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura mainly recognize cation-dependent conformations: comparison with the epitopes of serum autoantibodies. *Thromb Haemost*, 75(2), 339-345.
- Kotze, H. F., Heyns, A. D., Wessels, P., Pieters, H., Badenhorst, P. N., & Lotter, M. G. (1986). Evidence that ¹¹¹In-labelled platelets pool in the spleen, but not in the liver of normal humans and baboons. *Scand J Haematol*, 37(3), 259-264.
- Koues, O. I., Collins, P. L., Cella, M., Robinette, M. L., Porter, S. I., Pyfrom, S. C., . . . Oltz, E. M. (2016). Distinct Gene Regulatory Pathways for Human Innate versus Adaptive Lymphoid Cells. *Cell*, 165(5), 1134-1146. doi:10.1016/j.cell.2016.04.014
- Koyasu, S. (2015). Inflammatory ILC2 cells: disguising themselves as progenitors? *Nat Immunol*, 16(2), 133-134. doi:10.1038/ni.3080

- Kramer, B., Goeser, F., Lutz, P., Glassner, A., Boesecke, C., Schwarze-Zander, C., . . . Nattermann, J. (2017). Compartment-specific distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy. *PLoS Pathog*, *13*(5), e1006373. doi:10.1371/journal.ppat.1006373
- Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat Rev Immunol*, *15*(3), 149-159. doi:10.1038/nri3802
- Kuter, D. J. (2008). New drugs for familiar therapeutic targets: thrombopoietin receptor agonists and immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol Suppl*(69), 9-18. doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00999.x
- Kuter, D. J., & Rosenberg, R. D. (1995). The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, *85*(10), 2720-2730.
- Kuwana, M., Iki, S., & Urabe, A. (2007). The role of autoantibody-producing plasma cells in immune thrombocytopenic purpura refractory to rituximab. *Am J Hematol*, *82*(9), 846-848. doi:10.1002/ajh.20951
- Kuwana, M., Okazaki, Y., & Ikeda, Y. (2009). Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, *7*(2), 322-329. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03161.x
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Kaburaki, J., & Ikeda, Y. (2003). Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med*, *114*(4), 322-325.
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Kaburaki, J., Kawakami, Y., & Ikeda, Y. (2002). Spleen Is a Primary Site for Activation of Platelet-Reactive T and B Cells in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *The Journal of Immunology*, *168*(7), 3675-3682. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3675
- Lalic, I. M., Bichele, R., Repar, A., Despotovic, S. Z., Petricevic, S., Laan, M., . . . Milicevic, N. M. (2018). Lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor receptor-1 independent relocation of lymphocytes from the red pulp of the mouse spleen. *Ann Anat*, *216*, 125-134. doi:10.1016/j.aanat.2017.12.002
- Lee, A. Y., & Korner, H. (2017). CCR6/CCL20 chemokine axis in human immunodeficiency virus immunity and pathogenesis. *J Gen Virol*, *98*(3), 338-344. doi:10.1099/jgv.0.000691
- Lev, P. R., Grodzielski, M., Goette, N. P., Glembotsky, A. C., Espasandin, Y. R., Pierdominici, M. S., . . . Marta, R. F. (2014). Impaired proplatelet formation in immune thrombocytopenia: a novel mechanism contributing to decreased platelet count. *Br J Haematol*, *165*(6), 854-864. doi:10.1111/bjh.12832
- Li, D., Guabiraba, R., Besnard, A. G., Komai-Koma, M., Jabir, M. S., Zhang, L., . . . Xu, D. (2014). IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol*, *134*(6), 1422-1432 e1411. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.011
- Li, X., Zhong, H., Bao, W., Boulad, N., Evangelista, J., Haider, M. A., . . . Yazdanbakhsh, K. (2012). Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, *120*(16), 3318-3325. doi:10.1182/blood-2012-05-432575
- Liebman, H. A. (2008). Viral-associated immune thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 212-218. doi:10.1182/asheducation-2008.1.212

- Lim, A. I., Li, Y., Lopez-Lastra, S., Stadhouders, R., Paul, F., Casrouge, A., . . . Di Santo, J. P. (2017). Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell*, *168*(6), 1086-1100 e1010. doi:10.1016/j.cell.2017.02.021
- Lim, A. I., Menegatti, S., Bustamante, J., Le Bourhis, L., Allez, M., Rogge, L., . . . Di Santo, J. P. (2016). IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med*, *213*(4), 569-583. doi:10.1084/jem.20151750
- Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'Connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., . . . Hanash, A. M. (2015). Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*, *528*(7583), 560-564. doi:10.1038/nature16460
- Ling, Y., Cao, X., Yu, Z., & Ruan, C. (2007). Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol*, *79*(4), 310-316. doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00917.x
- Liu, B., Zhao, H., Poon, M. C., Han, Z., Gu, D., Xu, M., . . . Han, Z. C. (2007). Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, *78*(2), 139-143. doi:10.1111/j.1600-0609.2006.00780.x
- Liu, X. G., Liu, S., Feng, Q., Liu, X. N., Li, G. S., Sheng, Z., . . . Peng, J. (2016). Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP. *Blood*, *128*(6), 852-861. doi:10.1182/blood-2016-01-690727
- Liu, X. G., Ma, S. H., Sun, J. Z., Ren, J., Shi, Y., Sun, L., . . . Peng, J. (2011). High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fcγ receptors on monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood*, *117*(6), 2061-2069. doi:10.1182/blood-2010-07-295477
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 925135. doi:10.1155/2012/925135
- Ma, L., Zhou, Z., Zhang, D., Yang, S., Wang, J., Xue, F., . . . Yang, R. (2012). Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. *Thromb Haemost*, *107*(5), 937-950. doi:10.1160/TH11-08-0596
- Mackley, E. C., Houston, S., Marriott, C. L., Halford, E. E., Lucas, B., Cerovic, V., . . . Withers, D. R. (2015). CCR7-dependent trafficking of RORγ(+) ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat Commun*, *6*, 5862. doi:10.1038/ncomms6862
- Maggi, L., Montaini, G., Mazzoni, A., Rossetini, B., Capone, M., Rossi, M. C., . . . Annunziato, F. (2017). Human circulating group 2 innate lymphoid cells can express CD154 and promote IgE production. *J Allergy Clin Immunol*, *139*(3), 964-976 e964. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.032
- Magri, G., Miyajima, M., Bascones, S., Mortha, A., Puga, I., Cassis, L., . . . Cerutti, A. (2014). Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*, *15*(4), 354-364. doi:10.1038/ni.2830
- Mahevas, M., Patin, P., Huetz, F., Descatoire, M., Cagnard, N., Bole-Feysot, C., . . . Reynaud, C. A. (2013). B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest*, *123*(1), 432-442. doi:10.1172/JCI65689
- Maia, M. H., Peixoto Rde, L., de Lima, C. P., Magalhaes, M., Sena, L., Costa Pdo, S., . . . dos Santos, E. J. (2009). Predisposition to idiopathic thrombocytopenic purpura maps close

- to the major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum Immunol*, 70(3), 179-183.
- Manzotti, C. N., Tipping, H., Perry, L. C., Mead, K. I., Blair, P. J., Zheng, Y., & Sansom, D. M. (2002). Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 32(10), 2888-2896. doi:10.1002/1521-4141(200210)32:10<2888::AID-IMMU2888>3.0.CO;2-F
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., . . . Baba, Y. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, 41(6), 1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
- Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, 30, 221-241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934
- McHedlidze, T., Waldner, M., Zopf, S., Walker, J., Rankin, A. L., Schuchmann, M., . . . Wirtz, S. (2013). Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, 39(2), 357-371. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.018
- McMillan, R. (2007). The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*, 44(4 Suppl 5), S3-S11. doi:10.1053/j.seminhematol.2007.11.002
- McMillan, R., Wang, L., Tomer, A., Nichol, J., & Pistillo, J. (2004). Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*, 103(4), 1364-1369. doi:10.1182/blood-2003-08-2672
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, 5(8), 606-616. doi:10.1038/nri1669
- Mebius, R. E., Rennert, P., & Weissman, I. L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*, 7(4), 493-504.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295-298.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397. doi:10.1038/41131
- 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(10), 2645-2654. doi:10.1002/eji.200324341
- Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*, 45(3), 471-482. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.001
- Mjosberg, J. M., Trifari, S., Crellin, N. K., Peters, C. P., van Drunen, C. M., Piet, B., . . . Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol*, 12(11), 1055-1062. doi:10.1038/ni.2104
- Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., Liang, H. E., Van Dyken, S. J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., . . . Locksley, R. M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med*, 210(3), 535-549. doi:10.1084/jem.20121964
- Montaldo, E., Teixeira-Alves, L. G., Glatzer, T., Durek, P., Stervbo, U., Hamann, W., . . . Romagnani, C. (2014). Human RORgammat(+)/CD34(+) cells are lineage-specified progenitors of group 3 RORgammat(+) innate lymphoid cells. *Immunity*, 41(6), 988-1000. doi:10.1016/j.immuni.2014.11.010

- Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Abt, M. C., Alenghat, T., Ziegler, C. G., Doering, T. A., . . . Artis, D. (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*, *12*(11), 1045-1054. doi:10.1031/ni.2131
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., . . . Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, *463*(7280), 540-544. doi:10.1038/nature08636
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y., & Merad, M. (2014). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*, *343*(6178), 1249288. doi:10.1126/science.1249288
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, *7*, 145-173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Nardi, M., Tomlinson, S., Greco, M. A., & Karpatkin, S. (2001). Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia. *Cell*, *106*(5), 551-561.
- Narni-Mancinelli, E., Chaix, J., Fenis, A., Kerdiles, Y. M., Yessaad, N., Reynders, A., . . . Vivier, E. (2011). Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(45), 18324-18329. doi:10.1073/pnas.1112064108
- Newland, A. C., & Macey, M. G. (1994). Immune thrombocytopenia and Fc receptor-mediated phagocyte function. *Ann Hematol*, *69*(2), 61-67.
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, *8*(1), 34-47. doi:10.1038/nri2206
- Noval Rivas, M., Burton, O. T., Oettgen, H. C., & Chatila, T. (2016). IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J Allergy Clin Immunol*, *138*(3), 801-811 e809. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.030
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., . . . Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*, *29*(1), 138-149. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.009
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., . . . Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, *325*(5943), 1001-1005. doi:10.1126/science.1176676
- O'Sullivan, T. E., Johnson, L. R., Kang, H. H., & Sun, J. C. (2015). BNIP3- and BNIP3L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity*, *43*(2), 331-342. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.012
- Oldenborg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D., & Lindberg, F. P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, *288*(5473), 2051-2054.
- Olsson, B., Andersson, P. O., Jernas, M., Jacobsson, S., Carlsson, B., Carlsson, L. M., & Wadenvik, H. (2003). T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med*, *9*(9), 1123-1124. doi:10.1038/nm921
- Olsson, B., Ridell, B., Carlsson, L., Jacobsson, S., & Wadenvik, H. (2008). Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood*, *112*(4), 1078-1084. doi:10.1182/blood-2008-02-139402

- Paclik, D., Stehle, C., Lahmann, A., Hutloff, A., & Romagnani, C. (2015). ICOS regulates the pool of group 2 innate lymphoid cells under homeostatic and inflammatory conditions in mice. *Eur J Immunol*, *45*(10), 2766-2772. doi:10.1002/eji.201545635
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, *8*(12), 1353-1362. doi:10.1038/ni1536
- Panitsas, F. P., Theodoropoulou, M., Kouraklis, A., Karakantza, M., Theodorou, G. L., Zoumbos, N. C., . . . Mouzaki, A. (2004). Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood*, *103*(7), 2645-2647. doi:10.1182/blood-2003-07-2268
- Paradis, M., Mindt, B. C., Duerr, C. U., Rojas, O. L., Ng, D., Boulianne, B., . . . Fritz, J. H. (2014). A TNF-alpha-CCL20-CCR6 axis regulates Nod1-induced B cell responses. *J Immunol*, *192*(6), 2787-2799. doi:10.4049/jimmunol.1203310
- Patel, M. M., Chillrud, S. N., Deepti, K. C., Ross, J. M., & Kinney, P. L. (2013). Traffic-related air pollutants and exhaled markers of airway inflammation and oxidative stress in New York City adolescents. *Environ Res*, *121*, 71-78. doi:10.1016/j.envres.2012.10.012
- Patel, V. L., Mahevas, M., Lee, S. Y., Stasi, R., Cunningham-Rundles, S., Godeau, B., . . . Bussel, J. B. (2012). Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood*, *119*(25), 5989-5995. doi:10.1182/blood-2011-11-393975
- Paust, S., Lu, L., McCarty, N., & Cantor, H. (2004). Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(28), 10398-10403. doi:10.1073/pnas.0403342101
- Pavkovic, M., Petlichkovski, A., Karanfilski, O., Cevreska, L., & Stojanovic, A. (2018). FC gamma receptor polymorphisms in patients with immune thrombocytopenia. *Hematology*, *23*(3), 163-168. doi:10.1080/10245332.2017.1377902
- Picard, C., Casanova, J. L., & Puel, A. (2011). Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clin Microbiol Rev*, *24*(3), 490-497. doi:10.1128/CMR.00001-11
- Poli, A., Michel, T., Theresine, M., Andres, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, *126*(4), 458-465. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x
- Price, A. E., Liang, H. E., Sullivan, B. M., Reinhardt, R. L., Eisley, C. J., Erle, D. J., & Locksley, R. M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(25), 11489-11494. doi:10.1073/pnas.1003988107
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., . . . Casanova, J. L. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*, *332*(6025), 65-68. doi:10.1126/science.1200439
- Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L., & Germain, R. N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature*, *455*(7214), 764-769. doi:10.1038/nature07345
- Ralainirina, N., Poli, A., Michel, T., Poos, L., Andres, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2007). Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, *81*(1), 144-153. doi:10.1189/jlb.0606409
- Rand, M. L., & Dean, J. A. (1998). Platelet function in autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Suppl*, *424*, 57-60.

- Rankin, L. C., Girard-Madoux, M. J., Seillet, C., Mielke, L. A., Kerdiles, Y., Fenis, A., . . . Vivier, E. (2016). Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, *17*(2), 179-186. doi:10.1038/ni.3332
- Ravetch, J. V. (1997). Fc receptors. *Curr Opin Immunol*, *9*(1), 121-125.
- Reimer, D., Lee, A. Y., Bannan, J., Fromm, P., Kara, E. E., Comerford, I., . . . Korner, H. (2017). Early CCR6 expression on B cells modulates germinal centre kinetics and efficient antibody responses. *Immunol Cell Biol*, *95*(1), 33-41. doi:10.1038/icb.2016.68
- Renoux, V. M., Zriwil, A., Peitzsch, C., Michaelsson, J., Friberg, D., Soneji, S., & Sitnicka, E. (2015). Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues. *Immunity*, *43*(2), 394-407. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.011
- Robinette, M. L., Fuchs, A., Cortez, V. S., Lee, J. S., Wang, Y., Durum, S. K., . . . Immunological Genome, C. (2015). Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol*, *16*(3), 306-317. doi:10.1038/ni.3094
- Rocha, A. M., Souza, C., Rocha, G. A., de Melo, F. F., Clementino, N. C., Marino, M. C., . . . Queiroz, D. M. (2011). The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Haematologica*, *96*(10), 1560-1564. doi:10.3324/haematol.2011.046417
- Rodeghiero, F., & Ruggeri, M. (2009). Chronic immune thrombocytopenic purpura. New agents. *Hamostaseologie*, *29*(1), 76-79.
- Roediger, B., Kyle, R., Yip, K. H., Sumaria, N., Guy, T. V., Kim, B. S., . . . Weninger, W. (2013). Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, *14*(6), 564-573. doi:10.1038/ni.2584
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, *42*(4), 607-612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005
- Sakakura, M., Wada, H., Tawara, I., Nobori, T., Sugiyama, T., Sagawa, N., & Shiku, H. (2007). Reduced Cd4+ Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*, *120*(2), 187-193. doi:10.1016/j.thromres.2006.09.008
- Salimi, M., Barlow, J. L., Saunders, S. P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., . . . Ogg, G. S. (2013). A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*, *210*(13), 2939-2950. doi:10.1084/jem.20130351
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Scharniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., . . . Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, *28*(9), 2760-2769. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N
- Satoh-Takayama, N., Lesjean-Pottier, S., Vieira, P., Sawa, S., Eberl, G., Vosshenrich, C. A., & Di Santo, J. P. (2010). IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J Exp Med*, *207*(2), 273-280. doi:10.1084/jem.20092029
- Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H. J., Langa, F., . . . Eberl, G. (2010). Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. *Science*, *330*(6004), 665-669. doi:10.1126/science.1194597
- Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darche, S., Begue, B., . . . Cerf-Bensussan, N. (2012). Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*, *37*(1), 108-121. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.013
- Scoville, S. D., Mundy-Bosse, B. L., Zhang, M. H., Chen, L., Zhang, X., Keller, K. A., . . . Freud, A. G. (2016). A Progenitor Cell Expressing Transcription Factor RORgammat Generates All

- Human Innate Lymphoid Cell Subsets. *Immunity*, 44(5), 1140-1150. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.007
- Seillet, C., Rankin, L. C., Groom, J. R., Mielke, L. A., Tellier, J., Chopin, M., . . . Carotta, S. (2014). Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *J Exp Med*, 211(9), 1733-1740. doi:10.1084/jem.20140145
- Serafini, N., Vosshenrich, C. A., & Di Santo, J. P. (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*, 15(7), 415-428. doi:10.1038/nri3855
- Shao, Q., Ning, H., Lv, J., Liu, Y., Zhao, X., Ren, G., . . . Qu, X. (2012). Regulation of Th1/Th2 polarization by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via modulating dendritic cells. *Blood*, 119(20), 4636-4644. doi:10.1182/blood-2011-08-376418
- Shih, H. Y., Sciume, G., Mikami, Y., Guo, L., Sun, H. W., Brooks, S. R., . . . O'Shea, J. J. (2016). Developmental Acquisition of Regulomes Underlies Innate Lymphoid Cell Functionality. *Cell*, 165(5), 1120-1133. doi:10.1016/j.cell.2016.04.029
- Shimomura, M., Hasegawa, S., Seki, Y., Fukano, R., Hotta, N., & Ichiyama, T. (2012). Intravenous immunoglobulin does not increase FcγRIIB expression levels on monocytes in children with immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol*, 169(1), 33-37. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04591.x
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., . . . Kurosaki, T. (2016). Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol*, 17(7), 861-869. doi:10.1038/ni.3460
- Shulman, Z., Gitlin, A. D., Weinstein, J. S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R. A., . . . Nussenzweig, M. C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*, 345(6200), 1058-1062. doi:10.1126/science.1257861
- Silver, J. S., Kearley, J., Copenhaver, A. M., Sanden, C., Mori, M., Yu, L., . . . Humbles, A. A. (2016). Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol*, 17(6), 626-635. doi:10.1038/ni.3443
- Simoni, Y., & Newell, E. W. (2018). Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets. *Immunology*, 153(3), 297-303. doi:10.1111/imm.12862
- Solanilla, A., Pasquet, J. M., Viallard, J. F., Contin, C., Grosset, C., Dechanet-Merville, J., . . . Ripoche, J. (2005). Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 105(1), 215-218. doi:10.1182/blood-2003-07-2367
- Sollazzo, D., Trabanelli, S., Curti, A., Vianelli, N., Lemoli, R. M., & Catani, L. (2011). Circulating CD4+CD161+CD196+ Th17 cells are not increased in immune thrombocytopenia. *Haematologica*, 96(4), 632-634. doi:10.3324/haematol.2010.038638
- Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*, 21(7), 698-708. doi:10.1038/nm.3892
- Sonnenberg, G. F., Monticelli, L. A., Alenghat, T., Fung, T. C., Hutnick, N. A., Kunisawa, J., . . . Artis, D. (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*, 336(6086), 1321-1325. doi:10.1126/science.1222551
- Sonnenberg, G. F., Monticelli, L. A., Elloso, M. M., Fouser, L. A., & Artis, D. (2011). CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity*, 34(1), 122-134. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.009
- Spencer, N. C., Gilchrist, H. G., & Mallory, M. L. (2014). Annual movement patterns of endangered ivory gulls: the importance of sea ice. *PLoS One*, 9(12), e115231. doi:10.1371/journal.pone.0115231

- Spencer, S. P., Wilhelm, C., Yang, Q., Hall, J. A., Bouladoux, N., Boyd, A., . . . Belkaid, Y. (2014). Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science*, *343*(6169), 432-437. doi:10.1126/science.1247606
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., . . . Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*, *13*(2), 145-149. doi:10.1038/nri3365
- Stasi, R., Cooper, N., Del Poeta, G., Stipa, E., Laura Evangelista, M., Abruzzese, E., & Amadori, S. (2008). Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*, *112*(4), 1147-1150. doi:10.1182/blood-2007-12-129262
- Stasi, R., Del Poeta, G., Stipa, E., Evangelista, M. L., Trawinska, M. M., Cooper, N., & Amadori, S. (2007). Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, *110*(8), 2924-2930. doi:10.1182/blood-2007-02-068999
- Steiniger, B. S. (2015). Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*, *145*(3), 334-346. doi:10.1111/imm.12469
- Steiniger, B. S., Seiler, A., Lampp, K., Wilhelmi, V., & Stachniss, V. (2014). B lymphocyte compartments in the human splenic red pulp: capillary sheaths and periarteriolar regions. *Histochem Cell Biol*, *141*(5), 507-518. doi:10.1007/s00418-013-1172-z
- 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*(2), 139-145. doi:10.1038/nm1551
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., & Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, *21*, 713-758. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
- Tang, Y., Peitzsch, C., Charoudeh, H. N., Cheng, M., Chaves, P., Jacobsen, S. E., & Sitnicka, E. (2012). Emergence of NK-cell progenitors and functionally competent NK-cell lineage subsets in the early mouse embryo. *Blood*, *120*(1), 63-75. doi:10.1182/blood-2011-02-337980
- Thai, L. H., Le Gallou, S., Robbins, A., Crickx, E., Fadeev, T., Zhou, Z., . . . Mahevas, M. (2018). BAFF and CD4(+) T cells are major survival factors for long-lived splenic plasma cells in a B-cell-depletion context. *Blood*, *131*(14), 1545-1555. doi:10.1182/blood-2017-06-789578
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, *164*(1), 183-190.
- Toh, M. L., Kawashima, M., Hot, A., Miossec, P., & Miossec, P. (2010). Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12Rbeta2 inhibition. *Ann Rheum Dis*, *69*(8), 1562-1567. doi:10.1136/ard.2009.111757
- Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Kruglov, A. A., Shebzukhov, Y. V., Koroleva, E. P., Piao, Y., . . . Nedospasov, S. A. (2010). Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. *Blood*, *116*(18), 3456-3464. doi:10.1182/blood-2009-10-249177
- Turner, V. M., & Mabbott, N. A. (2017). Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes. *Biogerontology*, *18*(5), 723-738. doi:10.1007/s10522-017-9707-7
- Vainchenker, W., Besancenot, R., & Favale, F. (2013). [Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin]. *Bull Acad Natl Med*, *197*(2), 395-406.

- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Sollner, S., Akdis, D. G., . . . Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*, *131*(4), 1204-1212. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.014
- van der Laan, A. M., Ter Horst, E. N., Delewi, R., Begieneman, M. P., Krijnen, P. A., Hirsch, A., . . . Piek, J. J. (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*(6), 376-385. doi:10.1093/eurheartj/eh331
- Velasquez-Lopera, M. M., Eaton, V. L., Lerret, N. M., Correa, L. A., Decresce, R. P., Garcia, L. F., & Jaramillo, A. (2008). Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol*, *19*(2), 127-135. doi:10.1016/j.trim.2008.02.003
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24*(2), 179-189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Vely, F., Barlogis, V., Vallentin, B., Neven, B., Piperoglou, C., Ebbo, M., . . . Vivier, E. (2016). Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat Immunol*, *17*(11), 1291-1299. doi:10.1038/ni.3553
- Viant, C., Rankin, L. C., Girard-Madoux, M. J., Seillet, C., Shi, W., Smyth, M. J., . . . Belz, G. T. (2016). Transforming growth factor-beta and Notch ligands act as opposing environmental cues in regulating the plasticity of type 3 innate lymphoid cells. *Sci Signal*, *9*(426), ra46. doi:10.1126/scisignal.aaf2176
- Villanova, F., Flutter, B., Tosi, I., Grysb, K., Sreeneebus, H., Perera, G. K., . . . Nestle, F. O. (2014). Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol*, *134*(4), 984-991. doi:10.1038/jid.2013.477
- Vincent, F. B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. A., Fairfax, K. A., & Mackay, F. (2013). The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, *24*(3), 203-215. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.04.003
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., . . . Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, *331*(6013), 44-49. doi:10.1126/science.1198687
- von Burg, N., Chappaz, S., Baerenwaldt, A., Horvath, E., Bose Dasgupta, S., Ashok, D., . . . Finke, D. (2014). Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(35), 12835-12840. doi:10.1073/pnas.1406908111
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, *529*(7585), 221-225. doi:10.1038/nature16161
- Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V. L., Hernandez, P. P., Kiss, E. A., Hoyler, T., . . . Diefenbach, A. (2010). Regulated expression of nuclear receptor RORgammat confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORgammat(+) innate lymphocytes. *Immunity*, *33*(5), 736-751. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.017
- Walker, J. A., Barlow, J. L., & McKenzie, A. N. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*, *13*(2), 75-87. doi:10.1038/nri3349

- Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., & Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther*, *5 Suppl 1*, S49-59. doi:10.1517/14712598.5.1.S49
- Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., . . . Fan, Z. (2017). Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*, *171*(1), 201-216 e218. doi:10.1016/j.cell.2017.07.027
- Wang, T., Zhao, H., Ren, H., Guo, J., Xu, M., Yang, R., & Han, Z. C. (2005). Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, *90*(7), 914-923.
- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., . . . Ouyang, W. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature*, *514*(7521), 237-241. doi:10.1038/nature13564
- Weinstein, J. S., Herman, E. I., Lainez, B., Licona-Limon, P., Esplugues, E., Flavell, R., & Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol*, *17*(10), 1197-1205. doi:10.1038/ni.3554
- Wijngaarden, S., van de Winkel, J. G., Jacobs, K. M., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., & van Roon, J. A. (2004). A shift in the balance of inhibitory and activating Fcγ receptors on monocytes toward the inhibitory Fcγ receptor IIb is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*(12), 3878-3887. doi:10.1002/art.20672
- Withers, D. R., Gaspal, F. M., Mackley, E. C., Marriott, C. L., Ross, E. A., Desanti, G. E., . . . Lane, P. J. (2012). Cutting edge: lymphoid tissue inducer cells maintain memory CD4 T cells within secondary lymphoid tissue. *J Immunol*, *189*(5), 2094-2098. doi:10.4049/jimmunol.1201639
- Wluka, A., & Olszewski, W. L. (2006). Innate and adaptive processes in the spleen. *Ann Transplant*, *11*(4), 22-29.
- Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D. L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., . . . Zhu, J. (2014). The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7Rα-expressing innate lymphoid cells. *Immunity*, *40*(3), 378-388. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.012
- Yasuda, K., Muto, T., Kawagoe, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y., Matsushita, K., . . . Nakanishi, K. (2012). Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(9), 3451-3456. doi:10.1073/pnas.1201042109
- Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., & Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*, *397*(6721), 702-706. doi:10.1038/17812
- Yu, J., Heck, S., Patel, V., Levan, J., Yu, Y., Bussel, J. B., & Yazdanbakhsh, K. (2008). Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, *112*(4), 1325-1328. doi:10.1182/blood-2008-01-135335
- Zahran, A. M., Youssef, M. A. M., Elsayh, K. I., Embaby, M. M., & Ibrahim, A. I. M. (2017). Clinical Significance of T-Cell Immunoglobulin Mucin 3 Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Pediatric Acute Immune Thrombocytopenia. *Clin Appl Thromb Hemost*, 1076029617730638. doi:10.1177/1076029617730638
- Zhang, F., Chu, X., Wang, L., Zhu, Y., Li, L., Ma, D., . . . Hou, M. (2006). Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, *76*(5), 427-431. doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00622.x
- Zhang, J., Goode, K. M., Cuddihy, P. E., Cleland, J. G., & Investigators, T.-H. (2009). Predicting hospitalization due to worsening heart failure using daily weight measurement: analysis

- of the Trans-European Network-Home-Care Management System (TEN-HMS) study. *Eur J Heart Fail*, 11(4), 420-427. doi:10.1093/eurjhf/hfp033
- Zhang, J., Ma, D., Zhu, X., Qu, X., Ji, C., & Hou, M. (2009). Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 94(9), 1326-1329. doi:10.3324/haematol.2009.007823
- Zhang, W., Nardi, M. A., Borkowsky, W., Li, Z., & Karpatkin, S. (2009). Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood*, 113(17), 4086-4093. doi:10.1182/blood-2008-09-181073
- Zhang, X. L., Peng, J., Sun, J. Z., Liu, J. J., Guo, C. S., Wang, Z. G., . . . Hou, M. (2009). De novo induction of platelet-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 113(11), 2568-2577. doi:10.1182/blood-2008-03-148288
- Zhao, C., Li, X., Zhang, F., Wang, L., Peng, J., & Hou, M. (2008). Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. *Haematologica*, 93(9), 1428-1430. doi:10.3324/haematol.12889
- Zhao, L., Liu, J., He, C., Yan, R., Zhou, K., Cui, Q., . . . Dai, K. (2017). Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis. *J Clin Invest*, 127(12), 4338-4351. doi:10.1172/JCI95109
- Zheng, H., Lefebvre, G., & Laurent, C. (2008). Fast-learning adaptive-subspace self-organizing map: an application to saliency-based invariant image feature construction. *IEEE Trans Neural Netw*, 19(5), 746-757. doi:10.1109/TNN.2007.911741
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., . . . Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*, 14(3), 282-289. doi:10.1038/nm1720
- Zhou, Z., Chen, Z., Li, H., Chen, X., Xu, J., Gu, D., . . . Yang, R. (2009). BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity*, 42(2), 112-119. doi:10.1080/08916930802397848
- Zhu, X. J., Shi, Y., Peng, J., Guo, C. S., Shan, N. N., Qin, P., . . . Hou, M. (2009). The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia. *Blood*, 114(26), 5362-5367. doi:10.1182/blood-2009-05-217513

ANNEXES

Article en revisions - Journal of Autoimmunity

Manuscript Details

Manuscript number	YJAUT_2018_210
Title	Altered distribution and function of splenic innate lymphoid cells in adult chronic immune thrombocytopenia.
Article type	Short Communication

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.

Keywords	innate lymphoid cells; immune thrombocytopenia; spleen
Manuscript category	Research paper
Corresponding Author	Sylvain Audia
Corresponding Author's Institution	CR INSERM 1098
Order of Authors	Sylvain Audia, Thomas Moulinet, Marion Ciudad-Bonté, Maxime Samson, olivier facy, Pablo Ortega-Deballon, Philippe Saas, Bernard Bonnotte

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

ILC in ITP 2018_05_02.doc [Manuscript File]

Figure 1.jpg [Figure]

Figure 2.jpg [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

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.

Keywords: innate lymphoid cells; immune thrombocytopenia; spleen

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. ILC1 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, notably in autoimmune diseases (AID) such as systemic sclerosis [7], psoriasis [8], during the early stages of rheumatoid arthritis [9], and also in graft versus host disease [10].

Immune thrombocytopenia (ITP) is an AID with a complex pathogenesis that is better understood [11]. Briefly, B-cells produce antiplatelet 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 [12]. Splenic T lymphocyte polarization is skewed to Th1 and cytotoxic T cells also participate to platelet destruction [11].

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.

2. Methods

2.1. Patients

Patients and healthy donors were enrolled after giving an informed consent in accordance with the declaration of Helsinki (Clinicaltrials.gov: NCT02042560). This study was approved by the local ethic committee. Primary ITP were included (platelet count $<100 \times 10^9/L$ with exclusion of familial, viral, drug-induced thrombocytopenia, and other autoimmune disease-related thrombocytopenia). Splenectomy was performed as second line therapy, at least one year after the onset of the disease, as recommended [13, 14]. Spleens of 18 ITP patients were compared with 11 post-traumatic spleens. Their characteristics are reported in **Table 1**. Blood was obtained from 9 healthy donors.

2.2. Spleen preparation

Sterile spleen tissues were mechanically disrupted using a syringe plunger. After the cells were dissociated, they were filtered through a 100 µm nylon strainer. Red blood cells were removed by a 10-minute incubation in a hemolytic solution (150mM ammonium chloride, 10mM potassium bicarbonate, and 0.1mM EDTA) at room temperature. Cells were washed and filtered again. Splenocytes were stored in liquid nitrogen until needed.

2.3. Flow cytometry

The following antibodies were used for splenocyte and peripheral blood cell staining : lineage cocktail 3 (CD3, CD14, CD19, CD20) fluorescein isothiocyanate (FITC), CD8 pacific-blue (PB), CD34 FITC, CD123 FITC, CXCR3 phycoerythrin (PE; BD Bioscience), TCRαβ FITC, TCRγδ FITC, FcεRI FITC, CD4 Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7), CD16 FITC, CD56 PE-Cy7, CD86PE, CD94 FITC, CD336 (NKp44) peridinin-chlorophyll-protein eFluor 710 (PerCP-eFluor 710), IFN-γ Allophycocyanin (APC), BAFF APC, IL-2 APC, IL-4 FITC, IL-17 PE, IL-22 PE, TNF-α PE, T-bet PE, RORγt APC (eBioscience), CD3 BV510, CD117 Brilliant Violet™ (BV)421, CD83 APC, CD127 BV510, CD161 BV605, CD294 PE-Cy7, CD303 FITC, CCR6 AlexaFluor 647 (Biolegend), HLA-DR APC, GM-CSF APC, IL-5 APC, CD25 PE, Ki67 PE (Miltenyi).

Lineage (Lin) cells were defined by the expression of at least one of the following markers: CD3, CD14, CD19, CD20, CD94, FcεRI, TCRαβ, TCRγδ, CD123 and CD34. For membrane staining, 1-2x10⁶ cells were incubated for 20 minutes with the appropriate antibodies or control isotypes. Intracellular staining was performed after cells were fixed and permeabilized using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) following the manufacturer's instructions. For cytokine measurement, intracellular staining was performed on 1x10⁶ cells cultured in 24-well plates in 1 mL RPMI with 10% fetal bovine serum, after stimulation with 0.1 µg/ml phorbol 12-myristate 23-acetate (PMA) and 1 µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) for 4 hours, in presence of brefeldin A (BD Golgi Plug; BD Biosciences) at 1µL/ml to block cytokine secretion.

Data were acquired on a BD Biosciences FACSCanto II cytometer (Flow cytometry department, IFR 100, Burgundy University) and analyzed with FlowJo software. The median fluorescence intensity (MFI) is reported as the MFI of the marker minus the MFI of the isotype control.

2.4. Statistics

Mann-Whitney U test was used to compare quantitative data. Fisher's exact test was used to compare qualitative data. Spearman's rank test was used for correlation analyses. Unless specified, results are given by median [interquartile range]. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism. *P*<0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. ILC3 are more abundant in the spleen than in the blood

ILC subsets were determined in the blood and in the spleen of controls (**Figure 1A**), based on the phenotype recommended in the literature [1, 2]: Lin⁻CD127⁺CD161⁺CRTH2⁻CD117⁻ for ILC1, Lin⁻CD127⁺CD161⁺CRTH2⁺ for ILC2, and Lin⁻CD127⁺CD161⁺CRTH2⁻CD117⁺ for ILC3. NCR⁺ ILC3 were identified by the expression of NKp44 (CD336). The proportions of total ILC (lin⁻CD127⁺CD161⁺) among lymphoid cells were not different between blood and spleens (772 [531-1372] vs. 2443 [311-3392]/10⁶ lymphocytes, $P=0.29$). However, the frequencies of ILC1 and ILC2 were lower in spleens than in blood (4.8% [1.8-16.1] vs. 27.1 [13.4-39.5] of total ILC, $P=0.003$ and 2.5% [1-4.6] vs. 14.6 [7.2-25.2], $P=0.0004$, respectively). The proportion of ILC3 was higher in spleens (90.7% [81.9-95.9] vs. 50 [40-68.4] of total ILC, $P=0.001$; **Figure 1B**) and was mostly composed of NCR⁻ cells (75% of total ILC3), thus confirming in a large series that ILC3 was the most abundant ILC splenic subset [4]. The proportion of CCR6⁺ ILC was higher in spleens than in blood (69.8% [49.4-81.6] vs. 39.6 [24.6-47.8], $P=0.006$), consistent with their lymphoid tissue inducer function [2]. The proportion of total ILC expressing HLA-DR was higher in spleens, notably 68.5% [41-83.3] of splenic ILC3 were HLA-DR⁺, as compared to 16.6% [8.8-18.5] in blood ($P=0.004$; **Figure 1C**).

3.2. Splenic ILC1 and ILC3 are over-activated in ITP patients

Despite similar amount of splenic ILC in controls and ITP patients, a higher production of IL-2 and GM-CSF was measured in ITP (18% [11-29] vs. 10 [4.6-17.4] of total ILC, $P=0.03$ and 8.2% [6.5-15.9] vs. 2.7 [0.3-8.1], $P=0.015$, respectively; **Figure 2A**). TNF- α was produced by almost 50% of total ILC in both groups, while BAFF was produced by only 10%. IL-17 was not detected in splenic ILC (not shown), which is in accordance with a previous report [4], while the production of IL-22 tended to be higher in ITP patients (1.1% [0.3-2.3] vs. 0.2 [0-0.8] of total ILC, $P=0.06$). The expression of HLA-DR was not different between ITP and controls. Interestingly, ILC were not proliferating as shown by the low expression of Ki67 (1.3% [0.4-2] in total ILC vs. 5.6% [1.5-10] in lineage cells, $P=0.1$). Analysis of the different splenic ILC subsets, except for ILC2 whose frequency was too low, demonstrated an increase in ILC1 during ITP (236.8 [74-388] vs. 84 [33-129] /10⁶ lymphocytes, $P=0.03$; **Figure 2B**) which produced more IL-2 and IFN- γ (18% [15-29] vs. 9 [5-14] of ILC1, $P=0.004$ and 8.7% [4.9-14.5] vs. 3.2 [0.1-6.8], $P=0.03$, respectively). The expression of CXCR3, a receptor of the IFN- γ -induced chemokines CXCL9/10/11, was also higher (4.3% [1.5-7.3] vs. 1.5 [0-3.3], $P=0.03$) and positively correlated with the production of IFN- γ ($r=0.64$, $P=0.002$). Considering that IFN- γ promotes Th1 polarization by the induction

of the canonical transcription factor T-bet [15], and that IL-2 supports T cell survival and proliferation [16], such an increase in IFN- γ and IL-2-producing ILC1 could participate to the Th1 polarization and the survival of splenic T cells during ITP. However, the percentages of ILC1 and Th1 do not correlated (not shown), suggesting that other signals participate to CD4 T cell polarization.

Although total splenic ILC3 were not expanded in ITP (**Figure 2C**), the proportion of GM-CSF-producing ILC3 was increased in ITP (6.4% [4.9-14.1] vs. 1.6 [0.1-5.3] of ILC3, $P=0.008$), while the production of IL-2 and IL-22 were not different. In mice, ILC3 can internalize exogenous antigens, acquire an antigen-presenting cell-like phenotype, upregulate the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 [5], and participate to the maintenance of memory CD4 T cells [17]. In our study, 75% of ILC3 were HLA-DR⁺ but only 20% expressed CD86, which argues for similar functions in a minor part of human splenic ILC3. On the contrary, it has been shown that a subset of HLA-DR⁺CCR6⁺ILC3 display regulatory functions in the gut as it triggers the apoptosis of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells by presenting antigens to CD4 T cells without expressing costimulatory molecules [18] and by competing for IL-2 [3] or IL-7 [19] in the milieu. To date, such a regulatory mechanism has not been demonstrated in SLO, however the phenotype of splenic ILC3 in ITP argues for such a regulatory function.

4. Conclusions

This is the first description of an altered distribution of splenic ILC during ITP that could contribute to the dysregulation of the adaptive immune response: IFN- γ - and IL-2-producing splenic ILC1 could participate to the Th1 polarization, while GM-CSF-producing ILC3 could stimulate phagocytosis function of splenic macrophages.

Authorship Contributions

S.A. and B.B. designed the study; T.M., M.C.; S.A. and B.B. recruited the patients; OF and PO-D performed the splenectomies; S.A. and B.B. designed the experiments; T.M. and M.C. performed the experiments; T.M., M.S., S.A., B.B. analyzed the results; T.M., P.S., S.A. and B.B. wrote the manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We would like to thank the European Commission and the "Conseil Régional de Bourgogne Franche Comté" for its financial support (PARI 2014-A00676-41).

References

- [1] Mjosberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2016;138:1265-76.
- [2] Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood*, 2014;124:700-9.
- [3] Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J *et al.* Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4(+) T cells. *Science*, 2015;348:1031-5.
- [4] Magri G, Miyajima M, Bascones S, Mortha A, Puga I, Cassis L *et al.* Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*, 2014;15:354-64.
- [5] von Burg N, Chappaz S, Baerenwaldt A, Horvath E, Bose Dasgupta S, Ashok D *et al.* Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014;111:12835-40.
- [6] Withers DR. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology*, 2016;149:123-30.
- [7] Roan F, Stoklasek TA, Whalen E, Molitor JA, Bluestone JA, Buckner JH *et al.* CD4+ Group 1 Innate Lymphoid Cells (ILC) Form a Functionally Distinct ILC Subset That Is Increased in Systemic Sclerosis. *J Immunol*, 2016;196:2051-62.
- [8] Villanova F, Flutter B, Tosi I, Grys K, Sreeneebus H, Perera GK *et al.* Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2014;134:984-91.
- [9] Rodriguez-Carrio J, Hahnlein JS, Ramwadhoebe TH, Semmelink JF, Choi IY, van Lienden KP *et al.* Altered Innate Lymphoid Cells subsets in human lymph node biopsies during the at risk and earliest phase of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2016.
- [10] Munneke JM, Bjorklund AT, Mjosberg JM, Garming-Legert K, Bernink JH, Blom B *et al.* Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood*, 2014;124:812-21.
- [11] Audia S, Mahevas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev*, 2017.
- [12] Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C *et al.* Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood*, 2014;124:2858-66.
- [13] Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Jr., Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*, 2011;117:4190-207.

- [14] Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB *et al.* International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2010;115:168-86.
- [15] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2003;21:713-58.
- [16] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2012;12:180-90.
- [17] Withers DR, Gaspal FM, Mackley EC, Marriott CL, Ross EA, Desanti GE *et al.* Cutting edge: lymphoid tissue inducer cells maintain memory CD4 T cells within secondary lymphoid tissue. *J Immunol*, 2012;189:2094-8.
- [18] Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 2013;498:113-7.
- [19] Martin CE, Spasova DS, Frimpong-Boateng K, Kim HO, Lee M, Kim KS *et al.* Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. *Immunity*, 2017;47:171-82 e4.

Table 1. Characteristics of splenectomized subjects

	Controls (n=11)	ITP (n=18)	p-value
Age, years	47 [28.5-66.5]	48.4 [29.2-54.8]	0.7
Sex ratio (Female/Male)	6/5	9/9	1
Platelet count, 10⁹/L	231.5 [138-285]	25 [15-28]	<0.001
Disease duration, months		24 [16.5-61.8]	
Previous treatments, n (%)			
Steroids		16 (88.8)	
IVIg		14 (77.7)	
Rituximab		8 (44.4)	
TPO-RA		8 (44.4)	
Dapsone		7 (38.8)	
Hydroxychloroquine		2 (11.1)	
Vincristine		1 (5.5)	
Danazol		1 (5.5)	
Treatment within the 2 weeks prior to splenectomy, n (%)			
IVIg		7 (38.8)	
TPO-RA		6 (33.3)	
Steroids		4 (22.2)	
None		1 (5.5)	
Response to splenectomy, n (%)		14 (77.7)	

Figure legends

Figure 1. Comparison of circulating ILC and splenic ILC.

A) ILC subsets were determined by flow cytometry within the lin-CD127⁺CD161⁺ population as CRTH2⁺ for ILC2, CD117⁺ for ILC3 that were subsequently categorized as NCR⁺ and NCR⁻ ILC3 depending on the expression of NKp44, while ILC1 were defined as CRTH2⁻CD117⁻. **B)** The proportion of total ILC and their different subsets measured in the blood of 9 controls and the spleens of 10 other controls were compared. The expression of HLA-DR and CCR6 were also compared. Data are depicted in dot plots, the horizontal lines represent the median with interquartile range. *P*-value derived by Mann-Whitney U test. *: *P*<0.05, **: *P*<0.01, ***: *P*<0.001.

Figure 2. Phenotype of human splenic ILCs. The expression of HLA-DR, homing molecules (CCR6, CXCR3), transcription factors (T-bet, RORγt), the proliferation marker Ki67 and the production of cytokines (BAFF, IFN-γ, IL-2, IL-17, IL-22, GM-CSF, TNF-α) were measured by flow cytometry. **A)** The proportions and phenotypes of total ILC, **B)** ILC1 and **C)** ILC3 were compared between 11 controls (black triangles) and 18 ITP patients (white diamonds). Data are depicted in dot plots, the horizontal lines represents the median with interquartile range. *P*-value derived by Mann-Whitney U test. *: *P*<0.05, **: *P*<0.01. The correlation between IFN-γ production and CXCR3 expression was derived by Spearman test. The line represents the linear regression.

Figure 1

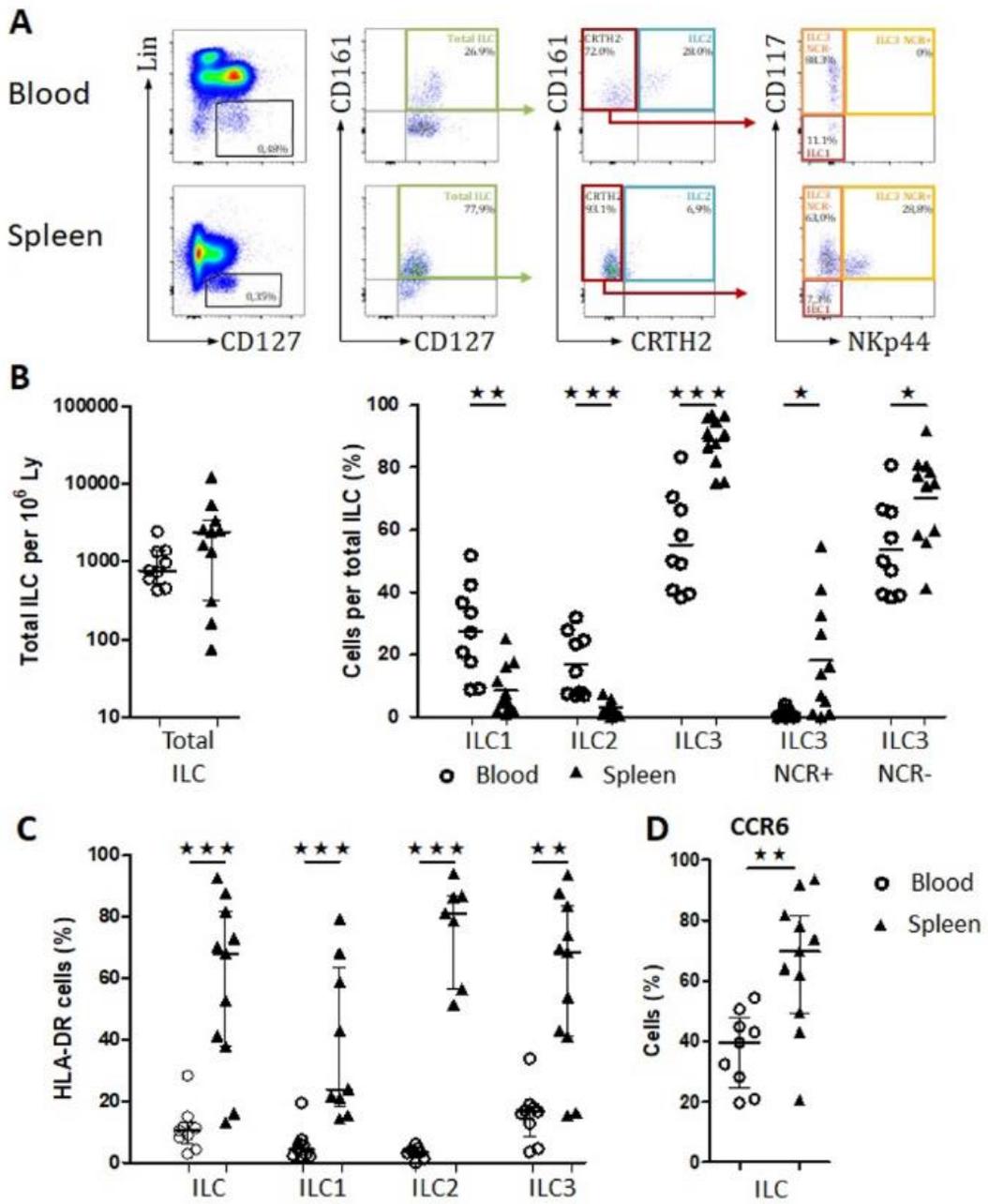
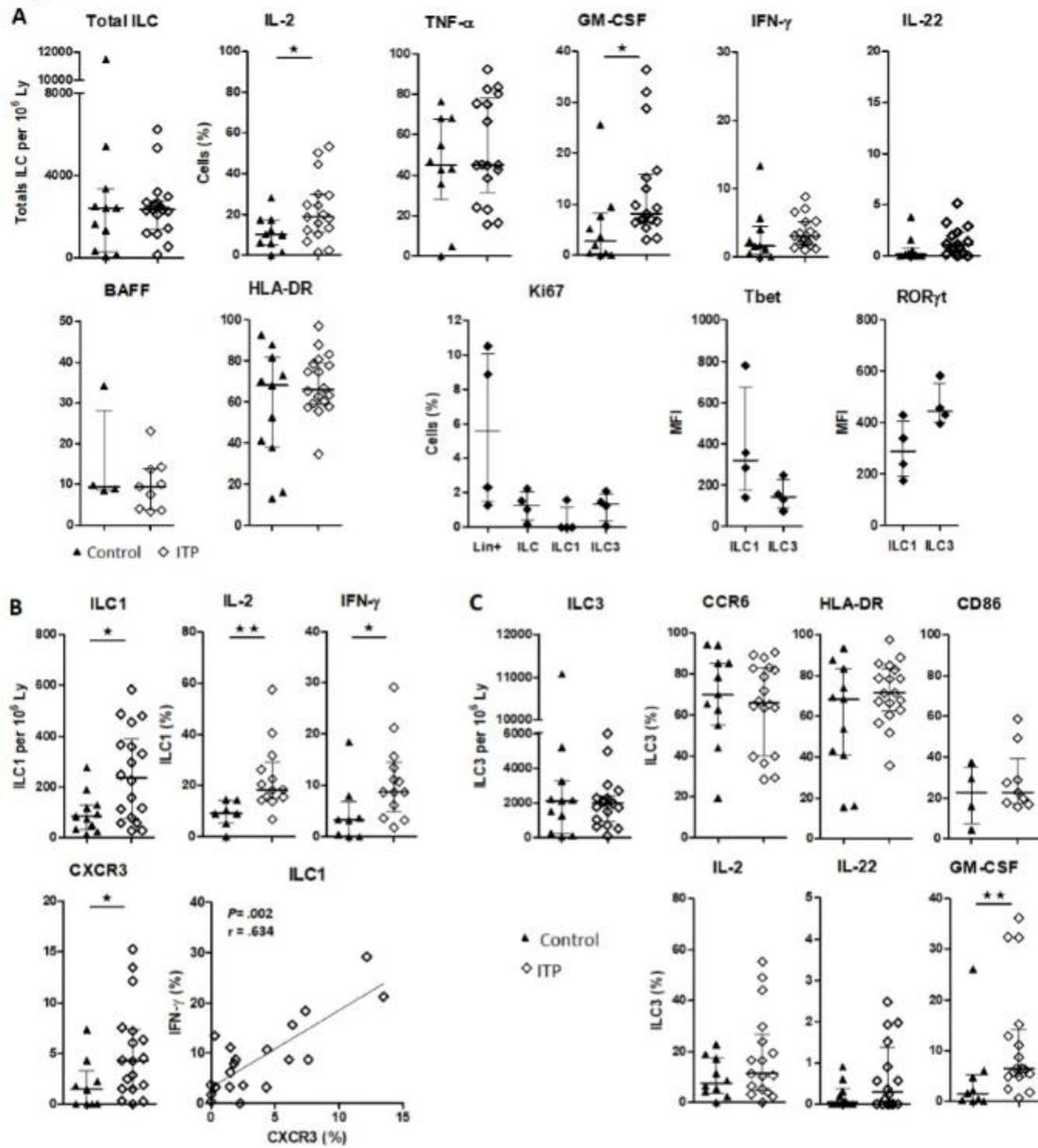


Figure 2



Autres publications personnelles

B cell depleting therapy regulates splenic and circulating T follicular helper cells in immune thrombocytopenia - Audia S, Rossato M, Trad M, Samson M, Santegoets K, Gautheron A, Bekker C, Facy O, Cheynel N, Ortega-Deballon P, Boulin M, Berthier S, Leguy-Seguin V, Martin L, Ciudad M, Janikashvili N, Saas P, Radstake T, Bonnotte B. - *J Autoimmun.* **2017** Feb;77:89-95. doi: 10.1016/j.jaut.2016.11.002. Epub 2016 Nov 15. - PMID: 27863820

Involvement and prognosis value of CD8(+) T cells in giant cell arteritis. - Samson M, Ly KH, Tournier B, Janikashvili N, Trad M, Ciudad M, Gautheron A, Devilliers H, Quipourt V, Maurier F, Meaux-Ruault N, Magy-Bertrand N, Manckoundia P, Ornetti P, Maillefert JF, Besancenot JF, Ferrand C, Mesturoux L, Labrousse F, Fauchais AL, Saas P, Martin L, Audia S, Bonnotte B. - *J Autoimmun.* **2016** Aug;72:73-83. doi: 10.1016/j.jaut.2016.05.008. Epub 2016 May 25. - PMID: 27236507

T Lymphocyte Inhibition by Tumor-Infiltrating Dendritic Cells Involves Ectonucleotidase CD39 but Not Arginase-1. - Trad M, Gautheron A, Fraszczak J, Alizadeh D, Larmonier C, LaCasse CJ, Centuori S, Audia S, Samson M, Ciudad M, Bonnefoy F, Lemaire-Ewing S, Katsanis E, Perruche S, Saas P, Bonnotte B. - *Biomed Res Int.* **2015**;2015:891236. doi: 10.1155/2015/891236. Epub 2015 Sep 30. - PMID: 26491691

Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. - Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, Samson M, Lamarthée B, Bonnefoy F, Lemaire-Ewing S, Ciudad M, Rekhviashvili K, Seaphanh F, Gaugler B, Perruche S, Bateman A, Martin L, Audia S, Saas P, Larmonier N, Bonnotte B. - *J Allergy Clin Immunol.* **2015** Jun;135(6):1614-24.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1868. Epub 2015 Jan 25. - PMID: 25630940

Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. - Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, Bloem A, Boon L, Flinsenberg T, Compeer E, van den Broek T, Facy O, Ortega-Deballon P, Berthier S, Leguy-Seguin V, Martin L, Ciudad M, Samson M, Trad M, Lorcerie B, Janikashvili N, Saas P, Bonnotte B, Radstake TR. - *Blood.* **2014** Oct 30;124(18):2858-66. doi: 10.1182/blood-2014-03-563445. Epub 2014 Sep 16. - PMID: 25232056

Preferential splenic CD8(+) T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia. - Audia S, Samson M, Mahévas M, Ferrand C, Trad M, Ciudad M, Gautheron A, Seaphanh F, Leguy V, Berthier S, Salles B, Martin L, Lorcerie B, Ortega-Deballon P, Facy O, Caillot D, Soudry-Faure A, Michel M, Godeau B, Larmonier N, Saas P, Janikashvili N, Bonnotte B. - *Blood.* **2013** Oct 3;122(14):2477-86. doi: 10.1182/blood-2013-03-491415. Epub 2013 Aug 20. - PMID: 23963041

Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. - Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, Ciudad M, Leguy V, Berthier S, Vinit J, Manckoundia P, Maillefert JF, Besancenot JF, Aho-Glele S, Olsson NO, Lorcerie B, Guillevin L, Mouthon L, Saas P, Bateman A, Martin L, Janikashvili N, Larmonier N, Bonnotte B. - *Arthritis Rheum.* **2012** Nov;64(11):3788-98. doi: 10.1002/art.34647. - PMID: 22833233

Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. - Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, Ornetti P, Maillefert JF, Miossec P, Bonnotte B. - *Arthritis Rheum.* **2012** Aug;64(8):2499-503. doi: 10.1002/art.34477. - PMID: 22488116

Immunologic effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. - Audia S, Samson M, Guy J, Janikashvili N, Fraszczak J, Trad M, Ciudad M, Leguy V, Berthier S, Petrella T, Aho-Gléle S, Martin L, Maynadié M, Lorcerie B, Rat P, Cheynel N, Katsanis E, Larmonier N, Bonnotte B. - *Blood.*

2011 Oct 20;118(16):4394-400. doi: 10.1182/blood-2011-03-344051. Epub 2011 Aug 29. - PMID: 21876120

Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients. - Lakomy D, Janikashvili N, Fraszczak J, Trad M, Audia S, Samson M, Ciudad M, Vinit J, Vergely C, Caillot D, Foucher P, Lagrost L, Chouaib S, Katsanis E, Larmonier N, Bonnotte B. - **J Immunol.** 2011 Sep 1;187(5):2775-82. doi: 10.4049/jimmunol.1004146. Epub 2011 Jul 29. - PMID: 21804019

Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. - Droin N, Jacquel A, Hendra JB, Racœur C, Truntzer C, Pecqueur D, Benikhlef N, Ciudad M, Guery L, Jooste V, Dufour E, Fenaux P, Quesnel B, Kosmider O, Fontenay M, Ducoroy P, Solary E. - **Blood.** 2010 Jan 7;115(1):78-88. doi: 10.1182/blood-2009-05-224352. Epub 2009 Oct 28. - PMID: 19864642

TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. - Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racœur C, Jooste V, Vey N, Quesnel B, Fenaux P, Bastie JN, Beyne-Rauzy O, Stamatoulas A, Dreyfus F, Ifrah N, de Botton S, Vainchenker W, Bernard OA, Birnbaum D, Fontenay M, Solary E; Groupe Francophone des Myélodysplasies. - **Haematologica.** 2009 Dec;94(12):1676-81. doi: 10.3324/haematol.2009.011205. Epub 2009 Oct 1. - PMID: 19797729

Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. - Jacquel A, Benikhlef N, Paggetti J, Lalaoui N, Guery L, Dufour EK, Ciudad M, Racœur C, Micheau O, Delva L, Droin N, Solary E. - **Blood.** 2009 Oct 22;114(17):3633-41. doi: 10.1182/blood-2009-03-208843. Epub 2009 Aug 31. - PMID: 19721010

ETUDE DES CELLULES LYMPHOÏDES INNEES SPLENIQUES HUMAINES ET DE LEURS IMPLICATIONS AU COURS DE LA THROMBOPENIE IMMUNOLOGIQUE

De découverte récente, les ILC ont été caractérisées comme cellules effectrices de l'immunité innée capables de moduler les réponses lymphocytaires T et B dans les muqueuses. Cependant, leur rôle au sein des organes lymphoïdes chez l'Homme au cours des maladies auto-immunes n'a pas été étudié.

La thrombopénie immunologique est une maladie auto-immune responsable d'une destruction périphérique des plaquettes associée à une production médullaire inadaptée. La rate joue un rôle central dans la physiopathologie en étant le site principal de la destruction des plaquettes et du maintien de la réponse auto-immune. La splénectomie faisant partie du traitement de cette maladie, cela donne une occasion unique d'étudier la réponse immunitaire au sein d'un organe lymphoïde secondaire au cours d'une maladie auto-immune chez l'Homme.

Dans le cadre de ce projet nous avons étudié le phénotype des ILC spléniques dans des conditions physiologiques et au cours du PTI.

L'étude du compartiment splénique humain dans des conditions physiologiques nous a permis de quantifier les ILC totales qui représentent 0,24 % des cellules lymphoïdes et d'identifier les différentes sous-populations d'ILC spléniques. Les ILC totales expriment majoritairement le récepteur de chémokine CCR6 et sécrètent d'importantes quantités de TNF- α . Les ILC3 sont les plus représentées, constituées essentiellement d'ILC3 NCR⁻, tandis que les ILC2 sont très peu nombreuses dans la rate.

Au cours du PTI, la fréquence des ILC spléniques totales est similaire à celle des témoins, en revanche elles sont plus nombreuses à exprimer CD62L, ligand de MadCam, exprimé dans la zone marginale. Les ILC1, plus nombreuses dans les rates des patients, contribuent vraisemblablement à alimenter l'environnement pro-inflammatoire splénique. Elles sont plus nombreuses à exprimer CXCR3, CD62L et à sécréter de l'IL-2 et de l'IFN- γ . La fréquence des ILC3 spléniques totales est similaire entre les patients et les témoins mais la proportion de cellules sécrétant du GM-CSF est plus importante au cours du PTI. De même, la sous-population d'ILC3 « naïves » NCR⁻CD62L⁺, est augmentée et sa fréquence est corrélée à celle des ILC1 CD62L⁺.

Enfin, la répartition des sous-populations d'ILC spléniques des patients non répondeurs à la splénectomie diffère des patients répondeurs par une diminution des ILC3 NCR⁻CD62L⁺, des ILC3 NCR⁺ et ILC1 CD62L⁺, au profit des ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺. L'augmentation de cette population d'ILC3 NCR⁻HLA-DR⁺ n'exprimant pas ou peu les molécules de costimulation et l'augmentation de la proportion d'ILC3 sécrétant de l'IL-10 et peu d'IL-2 sont autant de signes en faveur d'un rôle principalement régulateur des ILC3 dans la rate des patients non répondeurs à la splénectomie.

Ces résultats viennent enrichir les connaissances sur la physiopathologie du PTI et sur la contribution des ILC1 et des ILC3 à l'environnement pro-inflammatoire splénique. Ils ouvrent également de nouvelles perspectives sur une possible implication des ILC3 dans le maintien de la tolérance, notamment chez les patients non répondeurs à la splénectomie.

MOTS-CLES : Cellules lymphoïdes innées, rate, thrombopénie immunologique.