

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MEDECINE

---

École doctorale CHIMIE BIOLOGIE DE NANTES

Année 2010

N°attribué par la bibliothèque



Analyse quantitative des cellules dendritiques  
circulantes et fonction des cellules T régulatrices  
dans les vascularites à ANCA

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Marie RIMBERT**

*Le 26 octobre 2010, devant le jury ci-dessous :*

Président : Mohamed HAMIDOU, PU- PH, Nantes

Rapporteurs : Brigitte LEMAUFF, PU-PH, Caen

Loïc GUILLEVIN, PU-PH, Paris

Examineur : Michelle ROSENZWAJG, MCU-PH, Paris

Marc BONNEVILLE, DR1 INSERM, Nantes

*Directeur de thèse : Régis JOSIEN, PU-PH Nantes*

## SOMMAIRE :

ABREVIATIONS .....	5
LISTE DES FIGURES .....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
INTRODUCTION .....	8
I. Les cellules dendritiques.....	10
I.1. Définition .....	10
I.2. Classification des Cellules dendritiques .....	11
I.2.a. Ontogénèse des DC.....	11
I.2.b. Les Cellules dendritiques conventionnelles.....	13
I.2.b.i Les DC tissulaires .....	13
I.2.b.ii Les DC résidentes .....	14
I.2.c. Les cellules dendritiques circulantes .....	16
I.2.d. Les DC inflammatoires .....	17
I.3. Fonctions des DC myéloïdes .....	17
I.3.a. La capture antigénique .....	17
I.3.b. Les récepteurs de reconnaissance des pathogènes .....	17
I.3.c. Présentation antigénique .....	20
I.4. Les DC plasmacytoïdes.....	21
I.5. DC et maladies auto-immunes .....	22
II. Polarisation de la réponse T .....	24
II.1. Les lymphocytes T effecteurs .....	24
II.2. Activation des lymphocytes T .....	25
II.3. Le paradigme Th1/Th2 et ses paradoxes .....	31
II.3.a. La voie Th1 .....	31
II.3.b. La voie Th2 .....	32
II.3.c. Facteurs influençant la différenciation des lymphocytes T CD4.....	32
II.3.c.i La différenciation Th1 .....	33
II.3.c.ii La différenciation Th2 .....	33
II.3.d. Les cellules Th17 .....	34
III. L'Auto-immunité .....	38
III.1. Les facteurs favorisant l'auto-immunité .....	39
III.1.a. Prédisposition endocrinienne .....	39
III.1.b. Prédispositions génétiques .....	39
III.1.c. Facteurs environnementaux .....	40
III.2. Mécanismes mis en cause dans les maladies auto-immunes .....	41
III.2.a. Rôle des infections .....	41
III.2.b. Modification de l'antigène.....	42
III.2.c. Mécanismes effecteurs lésionnels des maladies auto-immunes .....	44
III.3. Mécanismes de rupture de tolérance.....	45
III.3.a. Tolérance.....	45
III.3.a.i Tolérance centrale .....	45
III.3.a.ii Tolérance périphérique .....	48
IV. Les lymphocytes T régulateurs CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> .....	52
IV.1. Origine et mécanisme d'action des Treg: .....	52
IV.1.a. Développement des cellules Treg « naturelles ».....	52

IV.1.b.	Les Tréguateurs FOXP3 induits .....	53
IV.1.c.	Mécanismes de suppression des Treg .....	54
IV.2.	Phénotype des Treg .....	59
IV.3.	Différentes sous populations de Treg .....	60
IV.4.	Rôle des Treg dans la prévention des MAI.....	61
V.	Physiopathologie des vascularites à ANCA .....	64
V.1.	Introduction.....	64
V.2.	Les Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles .....	64
V.3.	Classification des vascularites .....	67
V.4.	Clinique des VAA.....	69
V.4.a.	Manifestations communes aux VAA .....	69
V.4.b.	La granulomatose Wegener .....	69
V.4.c.	La polyangéite microscopique .....	71
V.4.d.	Le Syndrome de Churg-Strauss .....	71
V.4.e.	Traitement des vascularites à ANCA.....	74
V.5.	Rôle des polynucléaires neutrophiles et des ANCA dans les VAA.....	75
V.6.	Importance des facteurs environnementaux dans la physiopathologie des VAA.....	79
V.6.a.	Rôle des infections .....	79
V.6.a.i	La piste du Staphylococcus Aureus .....	79
V.6.a.ii	La piste du bacille gram négatif.....	80
V.6.a.iii	La piste infectieuse .....	81
V.6.b.	Place de l'exposition à la silice dans les VAA .....	81
V.6.c.	Place des médicaments dans la physiopathologie des VAA.....	82
V.7.	Facteurs génétiques associés aux vascularites à ANCA .....	83
V.7.a.	Système HLA .....	83
V.7.b.	Expression de la PR3 .....	84
V.7.c.	L'α1-antitrypsine.....	84
V.7.d.	Gène de PTPN22.....	85
V.7.e.	Gène de CTLA-4.....	85
V.7.f.	Cytokines .....	86
V.7.g.	Récepteurs Fc.....	86
V.7.h.	Molécules d'adhésions.....	87
V.8.	Les cellules dendritiques dans les vascularites à ANCA .....	88
V.9.	Implication des cellules T dans les vascularites à ANCA .....	89
V.9.a.	Preuves de l'implication des cellules T dans les VAA .....	89
V.9.b.	Persistance de l'état activé des cellules T .....	90
V.9.c.	Lymphopénie .....	91
V.9.d.	Expansion des cellules T effectrices mémoires .....	91
V.9.e.	Polarisation Th1/Th2 .....	92
V.9.f.	Diminution de l'expression de la molécule de co-stimulation CD28 ...	93
V.9.g.	Augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice CTLA-4.....	94
V.10.	Les lymphocytes Th17 .....	95
V.11.	Les cellules T régulatrices naturelles .....	96

RESULTATS .....	98
I. 1 <sup>ère</sup> Partie : Analyse quantitative des cellules dendritiques circulantes et fonction des cellules T régulatrices dans les vascularites à ANCA .....	99
I.1. Résumé.....	99
I.2. Article .....	100
I.3. Résultats complémentaires.....	133
I.3.a. Répartition des DC circulantes dans le syndrome de Churg Strauss: .	133
I.3.b. Étude fonctionnelle des cellules dendritiques circulantes .....	135
I.3.c. Résultats complémentaires sur les lymphocytes .....	140
II. 2 <sup>ème</sup> Partie : Exploration des cellules dendritiques après transplantation rénale	141
II.1. Introduction.....	141
II.2. Résultats :.....	142
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	 144
BIBLIOGRAPHIE.....	153
Annexes.....	186

## **ABREVIATIONS**

ANCA : “Antibody ”  
AICD : “Activation-Induced Cellular Death”  
CD: “Cluster Differentitio”  
CL: Cellules de Langerhans  
CLP: “Common lymphoid Progénitor”  
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité  
CMP: “Common Myeloid Progénitor”  
CPA : Cellules Présentatrices d’Antigènes  
CTL: “Cytotoxic T Lymphocyte”  
DC : “Dendritic Cell”  
FOXP3: Forkhead bOX P3  
IFN: Interféron  
Ig: Immunoglobuline  
IL: Interleukine  
iNOS: inductible NO synthase  
IPEX: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked syndrome  
LPS: lipopolysaccharide  
Ly : lymphocyte  
MAI: Maladie auto-immune  
MPO: Myélopéroxydase  
NK:Natural Killer  
NO : monoxyde de carbone  
PAM: Polyengéite Microscopique  
PBMC: "Peripheral Blood Mononuclear Cell"  
pDC: "plasmacytoïde Dendritic Cell"  
PGN: PeptidoGlycane  
PR3: Protéinase 3  
Poly I:C: PolyInosine-polyCytidilique acid  
SCS: Syndrome de Churg Strauss  
TCR: "T Cell Receptor"  
TLR: Toll-Like Receptor  
Th: T helper  
TNF: "Tumor Necrois Factor"  
Th: T helper ou T auxiliaire  
Tr1: T regulatory 1  
VAA: Vascularite à ANCA  
WG: Granulomatose de Wegener

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Développement des DC chez la souris .....	12
Figure 2 : Sous-groupes de DC in vivo chez l'homme.....	13
Figure 3 : Les récepteurs Toll et leurs ligands .....	19
Figure 4 : Rôles de CD28 et CTLA4 dans la régulation de l'activation T .....	29
Figure 5 : La polarisation des réponses T par les DC est dépendante des pathogènes.....	30
Figure 6: Différenciations des lymphocytes T naïfs.....	37
Figure 7 : Origines multifactorielles des maladies auto-immunes.....	43
Figure 8 : Induction de la tolérance au soi dans la médullaire thymique .....	47
Figure 9 : Mécanismes périphériques d'induction de la tolérance .....	51
Figure 10 : Principaux mécanismes suppresseurs utilisés par les Treg .....	54
Figure 11 : Aspect des ANCA sur frottis de PNN fixés à l'éthanol par immunofluorescence indirecte .....	66
Figure 12 : Classification de Chapel Hill.....	68
Figure 13 : Glomérulonéphrite nécrisante en croissant .....	70
Figure 14 : Facteurs impliqués dans la pathogénie des vascularites à ANCA.....	78
Figure 15 : Répartition des cellules dendritiques circulantes en fonction du type de vascularites.....	134
Figure 16: Exemples de résultats de marquages des DC après stimulation par les ligands de TLR.....	136
Figure 17 : Production de cytokines dans les DC après stimulation par des ligands de TLR .....	138
Figure 18: Pourcentage de TNF sécrété après stimulation par la loxoribine.....	139
Figure 19 : Exploration des DC chez les tolérants de greffe rénale.....	143

## ***LISTE DES TABLEAUX***

Tableau 1 : Mécanismes de suppression des Treg .....	58
Tableau 2 : Marqueurs des Treg .....	60
Tableau 3 : Manifestations cliniques, biologiques et histologiques des VAA. ....	73
Tableau 4 : Résultats de production de cytokines les DC après stimulation par les ligands de TLR .....	137
Tableau 5 : Nombres de DC circulantes .....	142
Tableau 6 : Expression de TLR4, CD86, CD62L et CCR7 sur les mDC et les pDC .....	142

## ***INTRODUCTION***

## **Avant propos**

Les réponses immunitaires servent à protéger l'organisme de tout agent potentiellement pathogène pour lui. L'organisme a mis en place un système de défenses dont l'étape initiale consiste à déterminer ce qui est potentiellement pathogène de ce qui ne l'est pas. Pour cela le système immunitaire est basé sur un paradigme qui consiste à s'attaquer à tout ce qu'il reconnaît comme étranger (non soi) et à tolérer tout ce qu'il reconnaît comme faisant partie du soi. Ainsi le système immunitaire protège l'organisme des infections et de certains cancers. Mais il arrive que le système immunitaire ne contrôle plus les réactions de défenses qu'il a lui-même mises en place. Ces dysfonctionnements sont à l'origine de pathologies comme les maladies inflammatoires, les maladies allergiques ou bien les maladies auto-immunes.

Le système immunitaire peut être divisé en deux phases : une réponse immunitaire archaïque qui confère une immunité innée, et une réponse immunitaire d'apparition plus récente qui confère une immunité adaptative. Les cellules effectrices de l'immunité innée possèdent des récepteurs pour des structures conservées par de nombreux micro-organismes, qui leur permettent d'interagir avec les pathogènes et de les détruire. Ces cellules sont immédiatement mobilisables et fonctionnelles. Le système immunitaire adaptatif est caractérisé par des cellules effectrices spécialisées possédant des récepteurs dont la spécificité, beaucoup plus fine, leur permet de reconnaître les antigènes sous différentes formes. Ce sont les lymphocytes. L'immunité adaptative est elle-même subdivisée en deux sous-ensembles : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale, ayant pour cellules effectrices respectives les lymphocytes T et les lymphocytes B. La réponse immunitaire adaptative est plus lente à intervenir que la réponse innée. Les cellules dendritiques sont au carrefour de ces deux réponses. Elles se situent partout dans l'organisme au niveau de la peau et des muqueuses, où elles agissent comme des sentinelles, captent les antigènes, les dégradent et les présentent aux lymphocytes T sous forme de peptides, associés à leurs molécules d'histocompatibilité. Cette étape déclenche la mise en place de la réponse adaptative au cours de laquelle les lymphocytes T et B coopèrent pour éliminer l'antigène reconnu comme étranger. Suite à une réponse primaire, une mémoire immunologique se met en place, qui permet lors d'une réinfection par le même antigène une réponse adaptative plus rapide et plus efficace.

*Les cellules dendritiques***Définition**

Les premières cellules de type dendritique ont été découvertes par Langerhans en 1868. Langerhans décrit alors des terminaisons dites nerveuses dépourvues d'attaches avec les kératinocytes, situées dans la couche de l'épiderme de Malpighi, et connues depuis sous le nom de cellules de Langerhans. Ce n'est qu'en 1973 que Ralph Steinman et Zanvil Cohn travaillant sur des cellules dites « accessoires », dont la présence était nécessaire pour obtenir une réponse primaire spécifique d'un antigène par des lymphocytes, caractérisent les cellules dendritiques (Steinman and Cohn 1973). Ces cellules accessoires possèdent des caractéristiques qui leur sont propres : des propriétés d'adhérence au verre et au plastique qui permettent de les séparer des autres cellules, de longs prolongements cytoplasmiques ( $>10\mu\text{m}$ ), une forte mobilité (Steinman 1991). Elles ont été nommées cellules dendritiques (DC pour « Dendritic Cell ») en raison de leurs caractéristiques morphologiques (longs prolongements cytoplasmiques ou dendrites). **Ce sont les meilleures cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'organisme et les seules cellules présentatrices capables de stimuler les cellules T naïves** (Banchereau and Steinman 1998). Les DC sont des cellules complexes qui ne constituent pas une lignée individualisée. Phénotypiquement il n'existe pas chez l'homme de marqueurs spécifiques communs à toutes les cellules dendritiques. Elles possèdent une certaine versatilité, qui dépend de leur état, de leur microenvironnement cytokiniques, et de leur localisation dans l'organisme. Il est établi que le système des DC comprend de nombreuses populations possédant différentes fonctions (Banchereau and Steinman 1998). **Elles peuvent être définies au niveau fonctionnel par leur richesse en molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type II et par leur capacité de phagocytose associée à celle de présentation de l'antigène permettant ainsi d'initier la réponse immunitaire adaptative.** Chez l'homme les DC sont des cellules minoritaires puisqu'elles ne représentent pas plus de 1% de l'ensemble des cellules mononucléées circulantes. Malgré leur faible représentation périphérique, **elles jouent un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires** contre les antigènes viraux, bactériens, tumoraux, allogéniques mais aussi dans les mécanismes de tolérance (Ueno, Klechevsky et al. 2007).

# Classification des Cellules dendritiques

## I.1.a. Ontogenèse des DC

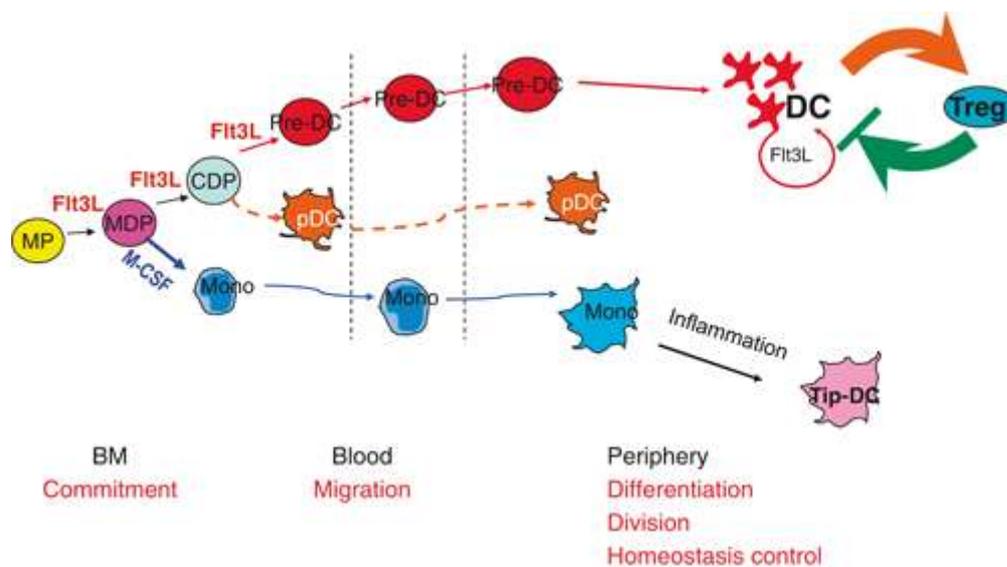
Les DC sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Aujourd'hui, le modèle le plus décrit chez l'homme est celui selon lequel il existe deux voies principales pour l'ontogenèse des DC à partir des cellules souches hématopoïétiques  $CD34^+$  (CSH). Une voie qui génère les DC myéloïdes (mDC) et l'autre les DC plasmacytoïdes (pDC). Flt3L apparaît clairement comme un facteur important pour le maintien de l'homéostasie des DC. (Maraskovsky, Brasel et al. 1996 ; Maraskovsky, Daro et al. 2000 ; Pulendran, Banchereau et al. 2000). Le progéniteur hématopoïétique commun (qui est aussi celui de toutes les cellules sanguines) se différencie dans la moelle osseuse en précurseurs lymphoïdes communs (common lymphoid progenitor, CLP) et en précurseurs myéloïdes communs (common myeloid progenitor, CMP) qui sont respectivement à l'origine des pDC et des mDC. Les DC myéloïdes sont aussi appelées DC conventionnelles. Ces précurseurs migrent via le sang vers divers tissus où ils se différencient en DC immatures. La différenciation à partir des CMP sous l'influence du GM-CSF et de  $TNF\alpha$  passe par 2 précurseurs différents, les précurseurs  $CD14^- CD1a^+$  qui se transforment en cellules de Langerhans et les précurseurs  $CD14^+ CD1a^-$  qui se différencient en DC immatures (Caux, Massacrier et al. 1997) et deviennent des cellules dendritiques interstitielles. Ces précurseurs peuvent aussi générer des monocytes  $CD14^+$  qui sont aussi à l'origine de DC immatures qui, elles-mêmes selon l'environnement, deviennent des DC matures ou bien des macrophages (Randolph, Beaulieu et al. 1998).

Il faut noter qu'un autre modèle de différenciation des DC est proposé. Cet autre modèle qui remet en cause l'existence de 2 voies passant par les CLP et les CMP est bien documenté chez la souris. Dans ce modèle, il semble que les DC proviennent d'une même lignée distincte, malgré leur hétérogénéité (Liu and Nussenzweig 2010). Les DC dériveraient en grande majorité des CMP et elles auraient ainsi une origine myéloïde commune avec les monocytes, les macrophages et les PNN. Dans la moelle osseuse, les CMP se différencieraient en précurseurs communs aux monocytes, aux macrophages et

aux DC (macrophage-DC progéniteurs, MDP), qui à leur tour donnent lieu à des monocytes ou à des progéniteurs des DC (CDP). Puis, les CDP pourraient se transformer en pré-DC ou en pDC, mais pas en monocyte. Les pré-DC migreraient de la moelle osseuse vers les tissus via le sang pour se différencier en sous-ensembles de DC avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui leur sont propres (figure 1). Contrairement à ce qui était décrit dans le premier modèle, il semblerait que les monocytes à l'état quiescents ne puissent pas se transformer en DC. Mais, qu'ils gardent la plasticité nécessaire pour se différencier en DC dans un contexte inflammatoire (Liu and Nussenzweig 2010).

Chez l'homme la différenciation des DC reste sujet à controverse et l'existence d'un progéniteur commun aux pDC et aux mDC n'est pas encore tranchée.

**Figure 1 : Développement des DC chez la souris**



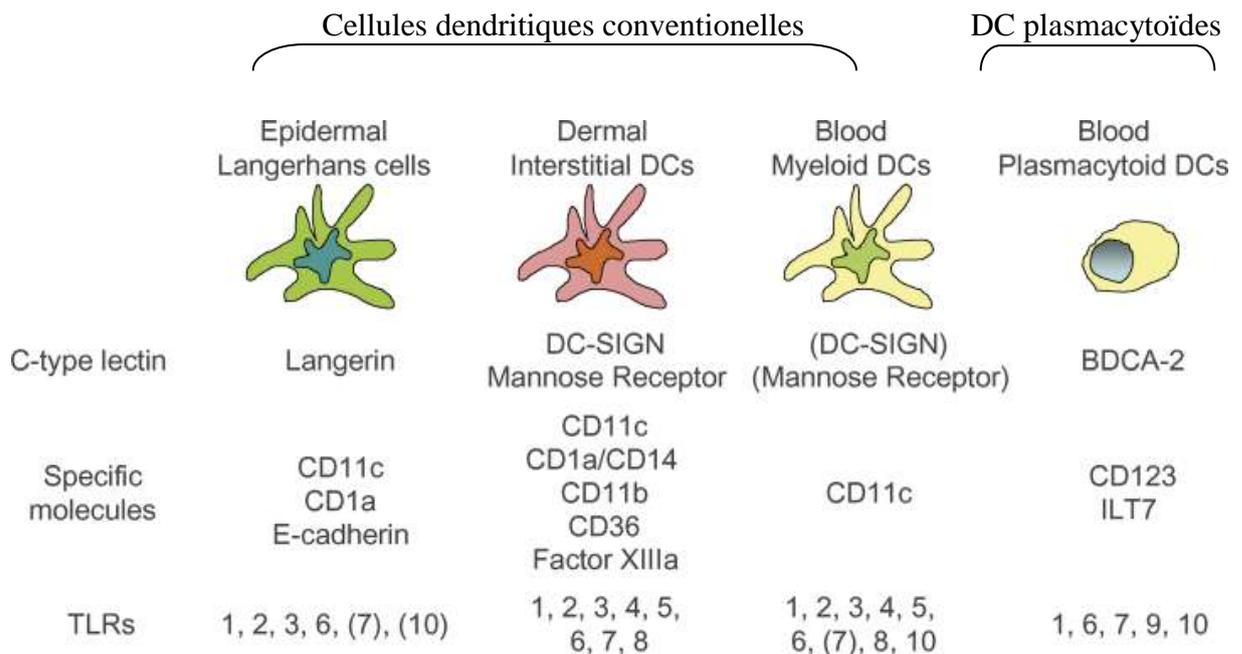
D'après Liu et Nussenzweig (Liu and Nussenzweig 2010).

Cette figure représente le développement des mDC et des pDC à partir d'un progéniteur commun aux DC (CDP) dans la moelle osseuse, ainsi que la flexibilité des monocytes à se transformer en DC « inflammatoires » (Tip-DC) dans un environnement inflammatoire. Flt3L agit comme un important facteur de croissance des DC et comme médiateur clé dans les interactions DC/Treg.

### I.1.b. Les Cellules dendritiques conventionnelles

Les DC peuvent être séparées en DC dites conventionnelles, DC plasmacytoïdes et DC inflammatoires (figure 2).

**Figure 2 : Sous-groupes de DC in vivo chez l'homme.**



D'après Ueno *et al.* (Ueno, Klechevsky et al. 2007).

Dans la peau, deux types de mDC résident dans deux couches distinctes les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques interstitielles. Le sang contient deux grands types de DC, les mDC et pDC qui expriment différents groupes de molécules dont les CLR (C-lectines receptors) et les TLR (Toll-Like Receptors).

#### I.1.b.i Les DC tissulaires

##### a. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans expriment la molécule CLA (cutaneous lymphocyte associated protein), un marqueur permettant leur migration vers la peau (Strunk, Egger et al. 1997). Dans l'épiderme, lieu privilégié pour la surveillance immunologique, elles forment un réseau particulier de cellules immatures (Romani, Ratzinger et al. 2001). Après activation, elles migrent vers les organes lymphoïdes. Elles représentent 2 à 4 % des cellules de l'épiderme et sont caractérisées par une morphologie très étirée et une expression spécifique de la lectine langerine (CD207) ainsi que la présence de granules

de Birbeck (Valladeau, Ravel et al. 2000). Ces granules seraient un compartiment d'apprêtement antigénique, elles disparaissent rapidement lors de la maturation. La langerine semble impliquée dans la biogenèse des granules de Birbeck et dans le trafic des antigènes extracellulaires sur le CMH de classe I (Valladeau, Duvert-Frances et al. 1999; Verdijk, Dijkman et al. 2005). Ainsi langerine et granules de Birbeck sont liées à la présentation des complexes CMH/peptide. Les cellules de Langerhans expriment CD1a qui intervient dans la présentation des antigènes d'origine lipidiques (Hunger, Sieling et al. 2004).

b. Les cellules dendritiques interstitielles

Les cellules dendritiques interstitielles (ou dermales) sont des cellules dendritiques immatures, douées de macropinocytose (Banchereau and Steinman 1998). Les DC interstitielles sont retrouvées dans le derme et d'autres organes comme les muqueuses des tractus digestifs, respiratoires et génitaux qui sont également des lieux stratégiques pour la surveillance et la capture antigénique (Caux, Vanbervliet et al. 1996). Elles colonisent les tissus par voie hématogène et leur nombre ne dépasse pas 1 % de l'ensemble des cellules du tissu. Elles n'expriment pas le CD1a mais expriment DC-SIGN (CD209), CD11b, le facteur XIIIa et CD14 (Geijtenbeek, Torensma et al. 2000). La molécule DC-SIGN se fixe aux molécules ICAM-3 des lyT. Cette interaction spécifique joue un rôle important dans l'initiation de la synapse immunologique entre les cellules dendritiques et les lyT (Steinman, Turley et al. 2000).

**I.1.b.ii Les DC résidentes**

Des cDC sont également retrouvées dans les organes lymphoïdes. Ce sont les DC résidentes, c'est à dire qu'elles ne proviennent pas des tissus périphériques mais se différencient localement à partir d'un progéniteur sanguin. Les DC résidentes sont les seules cDC retrouvées dans la rate. En effet, celle-ci ne possède pas de système de drainage lymphatique (Villadangos and Heath 2005).

a. Les DC thymiques

Dans le thymus, les DC se localisent dans la zone médullaire (Inaba, Witmer-Pack et al. 1994) et surtout à la jonction cortico-médullaire, elles sont nécessaires à l'éducation des thymocytes et ont un rôle crucial dans les phénomènes de tolérance centrale (Brocker, Riedinger et al. 1997). Il existe trois populations distinctes de DC dans le thymus selon

l'expression de CD11c et CD11b (Wu and Shortman 2005 ; Evans, Cameron et al. 2008). Le groupe majoritaire est CD11c<sup>-</sup> et CD123<sup>+</sup>, analogue des pDC circulantes, ces cellules expriment le CD45RA, de faible niveau de HLA-DR et secrètent de l'IFN $\alpha$  quand elles sont stimulées (Schmitt, Fohrer et al. 2000). Leur rôle dans le thymus reste mal compris, elles pourraient former une protection du thymus contre les infections virales ou bien avoir un rôle dans la sélection positive des LyT (Keir, Stoddart et al. 2002). En plus de cette population, il existe deux populations de cDC résidentes qui expriment CD11c, la première est HLA-DR intermédiaire et CD11c<sup>+</sup> avec un profil de DC immatures et la 2<sup>ème</sup> exprime de fort niveau de CD11c et de HLA-DR. Cette dernière population minoritaire dans le thymus est localisée dans la zone médullaire thymique et peut-être subdivisée en 2 sous-groupes grâce à l'expression de CD11b (Bendriss-Vermare, Barthelemy et al. 2001; Vandenabeele, Hochrein et al. 2001).

#### b. Les DC de la rate

Les DC spléniques sont des cDC résidentes CD11c<sup>+</sup> avec un phénotype immature, elles sont présentes dans la zone T périartériolaire, dans la zone B, et dans la zone marginale (McIlroy, Troadec et al. 2001). Lors d'infections, des DC matures s'accumulent dans les zones T (Pack, Trumpfheller et al. 2008 ; Nascimbeni, Perie et al. 2009). Dans la zone marginale de la rate les DC possèdent des récepteurs aux fragments Fc des Ig, CD32 et CD64. Dans les zones B, les DC ont un phénotype différent des deux autres, elles sont CD14<sup>+faible</sup>, ces cellules seraient plus proches des macrophages (McIlroy, Troadec et al. 2001).

#### c. DC des ganglions lymphatiques

Des DC transitent en permanence de manière constitutive des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques drainants *via* la lymphe. Après leur migration les cDC se retrouvent dans les ganglions lymphatiques au niveau des zones T. Ces DC meurent probablement après quelques jours, car on ne retrouve pas de DC dans la lymphe efférente qui contient essentiellement des cellules T naïves. Il a été montré que les DC du derme migrent de préférence près des follicules B alors que les LC migrent dans les zones T du paracortex des organes lymphoïdes (Kissenpfennig, Henri et al. 2005). Cette différence de migration implique une interaction avec des cellules différentes. Les DC du derme stimuleraient probablement les lyB (Dubois, Barthelemy et al. 1999) tandis que les LC stimuleraient les lyT.

### **I.1.c. Les cellules dendritiques circulantes**

Les DC retrouvées dans le sang représentent environ 1 % des cellules mononucléées. Les deux sous-populations circulantes, mDC et pDC se distinguent grâce à l'expression mutuellement exclusive de CD11c et CD123 (récepteur de l'IL-3) (Shortman and Liu 2002). Les DC myéloïdes circulantes se caractérisent par l'expression d'un vaste répertoire de TLR et la production de diverses cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP1 $\alpha$ , MIP-1b) et en particulier de l'IL-12 (Kadowaki et al., 2001 ; Ito et al., 2002), cytokine clé de la voie Th1. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les BDCA (blood dendritic cell antigens) a permis de distinguer 3 populations de DC dans le sang : les pDC (DC BDCA-2<sup>+</sup> BDCA-4<sup>+</sup>) et deux populations de DC myéloïdes mDC1 (DC BDCA-1<sup>+</sup>) et mDC2 (DC BDCA3<sup>+</sup>) (Hart 1997 ; Robinson, Patterson et al. 1999; Dzionek, Fuchs et al. 2000; Lindstedt, Lundberg et al. 2005). Il existe une troisième population de mDC qui exprime le CD16 (mDC3). Chaque sous-groupe présenterait des spécialisations fonctionnelles distinctes (MacDonald, Munster et al. 2002; Piccioli, Tavarini et al. 2007). Dans la population des mDC, les CD16<sup>+</sup> et les BDCA1<sup>+</sup> sont majoritaires. Les mDC CD16<sup>+</sup> ont une forte activité pro-inflammatoire, alors que les DC BDCA1 (= CD1a) ont une activité plus restreinte chimioattractante (Piccioli, Tavarini et al. 2007). Les DC BDCA-3<sup>+</sup> représentent une petite proportion des DC myéloïdes circulantes. Cette population de DC BDCA-3<sup>+</sup> (ou CD141<sup>+</sup>) semble être l'équivalent des DC résidentes CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> retrouvées chez la souris. Chez l'homme, des DC BDCA3<sup>+</sup> sont retrouvées dans les amygdales, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (Dzionek, Fuchs et al. 2000). Récemment quatre études publiées dans *J.exp.Med.* ont permis de mieux les caractériser. Ces cellules sont douées de propriétés de présentation croisée et sont de puissantes activatrices de la différenciation des lyT CD8 en cellules cytotoxiques. Elles représentent une communication importante entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Bachem, Guttler et al. 2010 ; Crozat, Guiton et al. 2010; Jongbloed, Kassianos et al. 2010 ; Poulin, Salio et al. 2010). En effet, elles expriment le récepteur de chemokines XCR-1 dont le ligand XLC-1 est sécrété par les cellules NK et les cellules TCD8. Le modèle proposé est celui de l'activation de l'immunité innée via les cellules NK activées qui sécrètent XCL-1 et attirent les DC BDCA-3<sup>+</sup> capables de phagocyter les débris cellulaires et de présenter les Ag infectieux sur des molécules du CMH de classe I (présentation croisée). Ainsi, les DC BDCA-3 activent la différenciation des LyT CD8 vers la cytotoxicité.

#### **I.1.d. Les DC inflammatoires**

Les DC inflammatoires sont des DC qui se différencient très rapidement à partir de progéniteurs immédiats ou de monocytes dans les tissus inflammatoires notamment lors d'infections virales ou bactériennes. Ces cellules sont recrutées via le CCR2 et jouent un rôle important dans la réponse innée *via* la production de TNF $\alpha$  et de monoxyde d'azote (NO) (Serbina and Pamer 2006). Ces DC sont également capables d'induire la réponse adaptative après migration du tissu inflammatoire vers les ganglions lymphatiques drainants. Dans ce groupes des DC inflammatoires, on distingue les TIP DC qui produisent du TNF et du NO, des MoDC dérivées des monocytes (Shortman and Naik 2007).

## **Fonctions des DC myéloïdes**

#### **I.1.e. La capture antigénique**

La capture antigénique est une caractéristique des DC immatures. Après leur capture par les DC, les Ag sont internalisés par pinocytose, endocytose dépendante de récepteurs, ou par phagocytose. La pinocytose est un mécanisme de capture non spécifique permettant d'internaliser de petites molécules. L'endocytose dépendante de récepteurs permet de concentrer les Ag. L'endocytose peut dépendre de différents récepteurs comme la clatherine, les récepteurs aux fragments Fc des Ig (Fc $\gamma$ R), les récepteurs du complément, les scavenger récepteurs ou encore les lectines. La phagocytose, mécanisme clé de la capture des Ag, permet le nettoyage des débris apoptotiques et, alimente ainsi en Ag la voie de présentation croisée (Albert, Pearce et al. 1998). La phagocytose est sous la dépendance de récepteurs PRR (pour « *pattern recognition receptor* »).

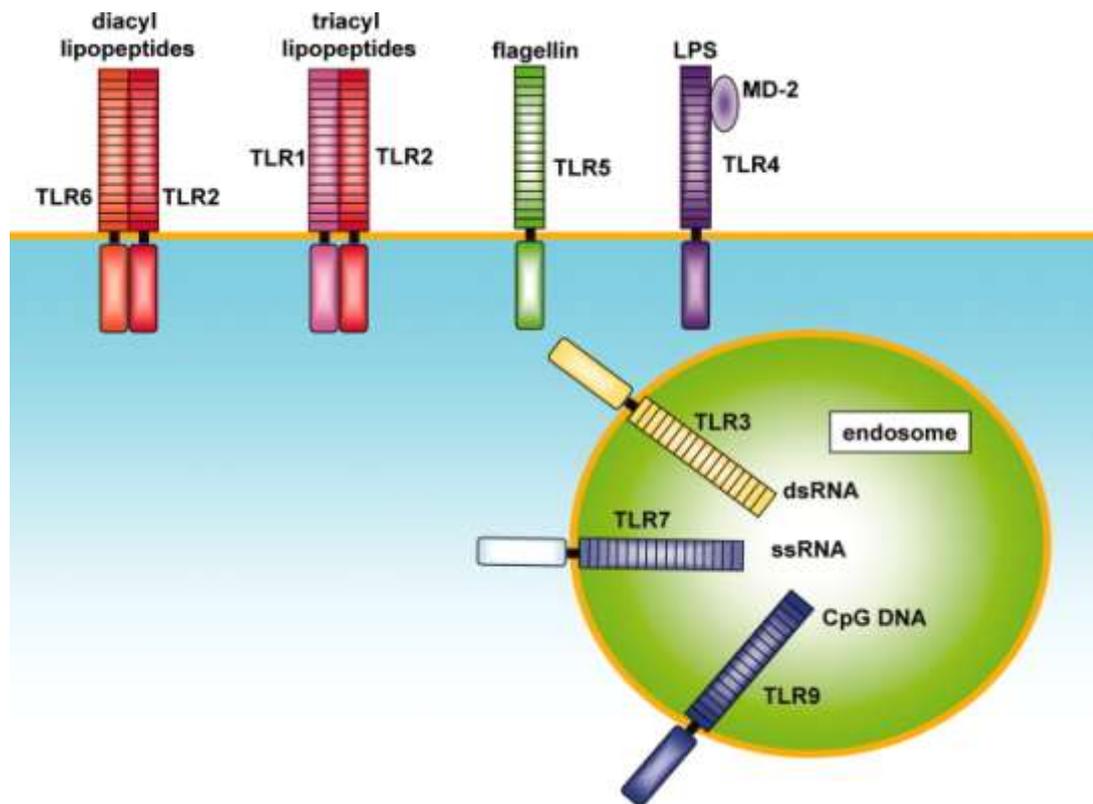
#### **I.1.f. Les récepteurs de reconnaissance des pathogènes**

Les PRR sont des récepteurs invariables, ils reconnaissent des motifs moléculaires spécifiques des agents pathogènes, les PAMPs (pour « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ») qui ne sont pas exprimés par les cellules du soi (Janeway 1989; Gordon 2002 ; Akira, Uematsu et al. 2006). Ces récepteurs peuvent reconnaître des motifs moléculaires au niveau membranaire ou intracellulaire. Ils sont

retrouvés à la surface des monocytes, macrophages, des cellules NK, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques. Contrairement aux récepteurs d'antigène de l'immunité adaptative (TCR et BCR), l'expression des PRR n'est pas clonale. Les PRR permettent d'initier une réponse immédiate en induisant la phagocytose, l'activation cellulaire et le chimiotactisme. Les PRR sont regroupés en plusieurs familles comprenant, les CLR (pour « C-type lectin receptor »), les NLR (pour « NOD-like receptor »), les RIG-like récepteurs (RLR) et la famille la mieux caractérisée à ce jour les TLR (pour « Toll-like Receptors ») (Kumagai and Akira 2010). Les NLR sont impliqués dans la reconnaissance du peptidoglycan des bactéries gram+ (Martinon, Mayor et al. 2009). Les RLR font partie des récepteurs intracytoplasmiques des virus à ARN (Kawai and Akira 2008).

L'implication des TLR dans l'immunité innée a été tout d'abord décrite chez la drosophile (Hashimoto, Hudson et al. 1988; Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Les TLR sont des récepteurs membranaires et intracellulaires, chez l'homme 10 TLR ont été identifiés. Ces récepteurs sont des glycoprotéines de membrane de type I qui possèdent une homologie importante dans leur région cytoplasmique. Ils sont spécialisés dans la reconnaissance de PAMP particuliers (Takeda and Akira 2005) (cf. figure 3). Les TLR sont surtout retrouvés sur les cellules myéloïdes (monocytes, PNN, cellules dendritiques). Certaines cellules épithéliales (au niveau de l'intestin et des tubules rénaux) expriment des TLR et peuvent donc répondre directement en présence d'un agent pathogène. La distribution des TLR à la surface des DC est variable. Les cellules dendritiques myéloïdes circulantes se caractérisent par l'expression d'un vaste répertoire de TLR (1,2,3,4,5,6,7,8,10), alors que les pDC ont un répertoire de TLR plus limité (Jarrossay, Napolitani et al. 2001). Les TLR sont responsables de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et de la maturation des cellules dendritique. Les cytokines qui sont produites par les DC lors de l'activation par les TLR sont responsables de l'orientation de la réponse T spécifique.

Figure 3 : Les récepteurs Toll et leurs ligands



D'après Takeda *et al.* (Takeda and Akira 2005).

Les membres de la famille des TLR reconnaissent des motifs spécifiques de composants microbiens :

- TLR2 reconnaît des lipoprotéines de pathogènes.
- TLR1 et TLR6 coopèrent avec TLR2 afin de discriminer les différences subtiles entre les triacyl et les diacyl lipopeptides.
- TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) des bacilles gram-négatifs.
- TLR9 est essentiel dans la reconnaissance de séquences d'ADN riches en motifs CpG non méthylés qui sont caractéristiques de l'ADN bactérien.
- TLR3 est impliqué dans la reconnaissance des ARN doubles brins viraux.
- TLR7 et TLR8 sont impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux simple brin, riches en nucléotides G/U.
- TLR5 reconnaît la flagelline.

### **I.1.g. Présentation antigénique**

La reconnaissance d'un signal associé à l'Ag (qui est le plus souvent un ligand de TLR) par les DC induit leur maturation. Cette maturation s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels majeurs transformant de façon coordonnée et séquentielle une cellule capturant l'antigène en une cellule présentant l'antigène. La maturation est intimement liée à la migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes. Au cours de cette étape, elles synthétisent en abondance des molécules du CMH, ainsi que des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). D'autres molécules, comme le récepteur de chimiokines CCR7 et la L-selectine CD62L sont aussi régulées positivement lors de cette étape. CD62L et CCR7 sont des molécules d'adhésions qui ont pour rôle d'orienter la migration des cellules dendritiques dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques (Forster, Schubel et al. 1999 ; Gunn 2003). Ce passage s'effectue au niveau d'un endothélium spécialisé, cuboïde, des veinules post-capillaire (HEV pour « high endothelial venules »). Les HEV existent dans tous les organes lymphoïdes secondaires à l'exception de la rate, où le passage des lymphocytes se fait au niveau des sinus marginaux médullaires. C'est en effet dans les organes lymphoïdes secondaires que les DC présentent les peptides antigéniques apprêtés sur les molécules du CMH de classe I et II aux cellules T naïves. Cette présentation aboutit à la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. L'activation spécifique des cellules T naïves est une caractéristique majeure et spécifique des DC (Banchereau and Steinman 1998). En plus des DC, il existe 2 autres types de cellules capables de présenter les antigènes : les macrophages et les lymphocytes B qui ont pour principale fonction d'éliminer les pathogènes et de produire des immunoglobulines respectivement. Il existe aussi des mécanismes de présentation dite croisée dans lesquels un Ag exogène peut être présenté par les molécules de classe I après endocytose (Vyas, Van der Veen et al. 2008).

En plus de l'activation spécifique des cellules T, les DC sont aussi capables d'entraîner une tolérance périphérique. Plusieurs mécanismes ont été décrits. Le premier impliquerait une population de DC dite régulatrice (Huang, Platt et al. 2000). Le second est basé sur une bi-fonctionnalité des DC qui pourraient induire soit une réponse tolérogène soit une réponse immunitaire. C'est l'état de maturation ou d'activation des DC et donc, l'environnement cytokinique qui déterminerait la fonction des DC. Ce modèle fait une distinction entre DC immatures et matures qui induisent respectivement la tolérance ou

l'immunité (Steinman, Turley et al. 2000 ; Dhodapkar, Steinman et al. 2001). Les DC immatures pourraient induire la tolérance en tuant ou en rendant anergiques les cellules T et en générant des cellules T régulatrices (Roncarolo, Levings et al. 2001). Cependant il a aussi été proposé que la tolérance soit induite par des DC dites semi-matures (Albert, Jegathesan et al. 2001 ; Steinman, Hawiger et al. 2003).

## Les DC plasmacytoïdes

Les pDC sont retrouvées dans les ganglions, le sang, la moelle osseuse et le thymus. Elles expriment spécifiquement BDCA-2, une lectine de type C, et BDCA-4 ou neuropiline-1 (Dzionek, Fuchs et al. 2000). Initialement ces cellules ont été identifiées dans les zones T des ganglions, et nommées cellules T plasmacytoïdes en raison de leur morphologie (noyau excentré et réticulum endoplasmique très développé). Puis, la découverte de l'expression du CMH de classe II et de l'absence d'expression du récepteur T à leur surface, a conduit à la dénomination de monocytes plasmacytoïdes (Facchetti, de Wolf-Peeters et al. 1988). Elles ont ensuite été caractérisées comme une population de DC immatures CD11c<sup>-</sup> ayant une faible capacité stimulatrice des lyT (O'Doherty, Peng et al. 1994). Par la suite, le lien a été établi avec les cellules productrices d'interféron de type I (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Les pDC ont aussi été nommées pré-DC2, pour précurseurs de DC de type 2, en raison de leur capacité à induire une différenciation Th2 en réponse à certains stimuli (Rissoan, Soumelis et al. 1999). La caractéristique de ces cellules est de produire de grandes quantités d'IFN $\alpha$  en réponse à une stimulation virale ou bactérienne (Hubert, Voisine et al. 2004). Récemment Di Pucchio *et al.* ont montré que les pDC possèdent la capacité de mettre rapidement en place une réponse T CD8 spécifique d'un antigène viral en apprêtant puis en présentant via des molécules du CMH de classe I les antigènes viraux (Di Pucchio, Chatterjee et al. 2008). Les pDC jouent donc un rôle central dans les réponses anti-virales (Dalod, Salazar-Mather et al. 2002). Elles ont également une importance dans la physiopathologie du lupus érythémateux disséminé (LED) au cours duquel elles produiraient de façon excessive de l'IFN $\alpha$ . Les pDC ont un répertoire de TLR limité (elles expriment surtout les TLR 7, 9 et plus faiblement les TLR 1, 6 et 10), et constitué essentiellement de TLR endosomaux reconnaissant des acides nucléiques d'origine virale ou bactérienne. Dépourvues de TLR 2, 4, 5, les pDC ont des

capacités de reconnaissance des composants provenant des parois bactériennes ou fongiques limitées.

Les pDC peuvent se distinguer en deux groupes en fonction de l'expression de CD2. Seules les pDC CD2<sup>+</sup> qui représentent 20 à 30% de l'ensemble des pDC circulantes expriment le lysozyme et sont capables de tuer efficacement une cellule cible de manière TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) dépendante. De plus, elles sécrètent des niveaux élevés d'IL12, et sont plus efficaces dans le déclenchement de la prolifération des cellules T naïves (Matsui, Connolly et al. 2009). Ces pDC CD2<sup>+</sup> seraient la contrepartie des IFN-producing Killer DC (IKDC) identifiées chez la souris.

## DC et maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes (MAI) sont des maladies inflammatoires chroniques dues à une réponse inappropriée vis-à-vis d'un auto-antigène. Comme pour toute réponse spécifique, l'initiation d'une réponse lymphocytaire auto-immune nécessite une présentation antigénique par des DC. Il a été montré que des DC qui présentent des auto-antigènes sont capables d'induire une réponse auto-immune dans des modèles murins de cardiomyopathie auto-immune (Eriksson, Ricci et al. 2003) ou de lupus érythémateux disséminé (LED) (Banchereau, Pascual et al. 2004). Une des étapes clé dans le déroulement des MAI est un déséquilibre de production de cytokines (Banchereau, Pascual et al. 2004). Par exemple, le rôle d'un déséquilibre de production de TNF $\alpha$  dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) a été démontré dans différentes études chez l'homme, ainsi que dans différents modèles animaux (Feldmann and Maini 2003). La meilleure preuve du rôle du TNF dans la PR étant sans doute l'effet bénéfique des anti-TNF chez les malades (Feldmann and Maini 2003). La production excessive de TNF $\alpha$  pourrait être due à une maturation anormale ou incontrôlée des DC ou à un défaut de tolérance périphérique. Les DC elles-mêmes pouvant représenter la source majeure de TNF $\alpha$ . Cependant, la MAI pour laquelle le rôle des DC a été le mieux caractérisé est le LED.

### **Exemple du rôle des DC dans la physiopathologie du LED :**

Le LED est caractérisé par la présence d'auto-anticorps dirigés contre les acides nucléiques et les protéines qui y sont associées, la formation de complexes immuns, directement responsables des lésions rénales associées à cette maladie, ainsi que par l'inflammation de nombreux organes. L'IFN $\alpha$  joue un rôle central dans la pathogenèse du LED (Blanco, Palucka et al. 2001). En effet, la plupart des patients présentent des taux élevés d'IFN $\alpha$  et de gènes induits par l'IFN qui sont corrélés à la gravité de la maladie et aux quantités d'auto-anticorps anti-nucléaires (Bengtsson, Sturfelt et al. 2000 ; Baechler et al., 2003 ; Ronnblom, Eloranta et al. 2006 ; Ronnblom and Pascual 2008). L'IFN $\alpha$  a de nombreuses actions immuno-régulatrices qui peuvent initier ou participer au processus d'auto-immunité, notamment l'induction de protéines, source importante de production d'auto-antigènes (Baccala, Kono et al. 2005 ; Theofilopoulos, Baccala et al. 2005). De plus, le polymorphisme de plusieurs gènes codant pour des molécules clés impliquées dans la production d'IFN est fortement associé au SLE (Sigurdsson, Nordmark et al. 2005). Enfin, dans un essai clinique de phase I, l'administration d'anti-IFN $\alpha$  a montré une efficacité prometteuse chez les patients atteints de LED (Yao, Richman et al. 2009). Dans le cas du lupus, il a été montré que les pDC sont capables de reconnaître des fragments d'ADN via le TLR 9 et le récepteur pour le fragment Fc des Ig de type II. Les complexes immuns contenant de l'ADN peuvent donc activer les pDC (Boule, Broughton et al. 2004). Cependant alors que de nombreux arguments indirects plaident en faveur du rôle des pDC dans la surproduction d'IFN $\alpha$  chez les patients lupiques, l'analyse des DC circulantes montre que leur nombre est réduit en phase active de la maladie, mais aussi qu'elles ont *in vitro* des capacités diminuées pour produire de l'IFN (Blanco, Palucka et al. 2001). Cet apparent paradoxe est attribué à un phénomène de «désensibilisation» des pDC suite à leur stimulation persistante *in vivo* via les TLR. Toutefois, on ne peut exclure que les techniques de purification des cellules dendritiques circulantes utilisées dans ces travaux aient pu contribuer à altérer leurs fonctions (Gerrits, Athanassopoulos et al. 2007). L'IFN $\alpha$  produit par les pDC entraîne d'une part l'activation et la maturation des mDC qui stimulent les lymphocytes T autoréactifs et d'autre part la différenciation des lymphocytes B autoréactifs en plasmocytes qui sont à l'origine de la formation des complexes immuns (Blanco, Palucka et al. 2001). Un tel réseau d'interactions cellulaires permet d'entretenir l'auto-immunité conduisant au caractère chronique du LED. Le mécanisme responsable de la première activation des pDC au contact avec l'ADN du soi dans le cadre du LED reste à définir. Cependant une étude suggère que la protéine

nucléaire HMGB1 (Highmobility group box 1) qui est relarguée par les cellules nécrotiques s'associe aux complexes immuns et se fixe à son récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end-products) conduisant à l'activation des pDC et constituerait l'élément déclencheur dans la rupture de tolérance (Tian, Avalos et al. 2007).

#### *Polarisation de la réponse T*

La réponse immunitaire adaptative est caractérisée par la spécificité de la réponse à un antigène grâce à des récepteurs clonaux et par l'établissement d'une mémoire immunitaire (Kaech, Hemby et al. 2002). Les principaux acteurs de l'immunité adaptative sont les lyT et les lyB qui expriment des récepteurs spécifiques d'un seul déterminant antigénique donné : le récepteur des cellules T (TCR) ou le récepteur des cellules B (BCR). Les lymphocytes B reconnaissent directement le déterminant antigénique à la surface des pathogènes alors que les lymphocytes T reconnaissent les antigènes lorsqu'ils sont présentés sous forme de peptides associés aux molécules du CMH (Kourilsky and Claverie 1989). La réponse spécifique des antigènes se met en place parallèlement à la réponse précoce innée indépendante des antigènes. Lors de la rencontre entre le lymphocyte T et la CPA, la reconnaissance par le TCR d'un complexe CMH-peptide entraîne l'activation du lymphocyte T. L'engagement du TCR et de différentes molécules membranaires conduit à une série de modifications moléculaires au niveau membranaire, cytoplasmique, et nucléolaire qui permettent, au lymphocyte T d'acquies ses fonctions effectrices. Ces événements conditionnent la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

## **Les lymphocytes T effecteurs**

Une fois sortis du thymus où ils ont acquis le répertoire T et la tolérance au soi grâce aux mécanismes de sélection positive et négative, les lyT matures naïfs sont exportés dans le reste de l'organisme. Ils vont y patrouiller, recirculant à travers les organes lymphoïdes secondaires via le réseau lymphatique et la circulation sanguine, à la recherche de leur antigène. La rencontre avec ce dernier provoque une intense prolifération donnant lieu à une expansion clonale. Elle aboutit, grâce à un mécanisme de différenciation, à la génération de lymphocytes T effecteurs et de lymphocytes T

mémoires. Les lymphocytes T effecteurs ont pour mission d'éliminer immédiatement l'antigène et se répartissent en plusieurs sous-populations aux caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes, selon la nature du pathogène qu'ils détectent :

- Les pathogènes qui se multiplient dans le cytosol des cellules (virus essentiellement) sont détectés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>cytolytiques ou CTL (pour « cytotoxic T lymphocytes »). Ces pathogènes sont pris en charge par la voie de routage des antigènes de classe I du CMH. Puis, ils sont apprêtés par les molécules du CMH de classe I, ils sont reconnus par le TCR du CTL de façon spécifique. CTL, dont la fonction est de lyser les cellules infectées.
- Les pathogènes qui se multiplient dans les vésicules intra-cellulaires, et ceux qui proviennent de bactéries ou de toxines extra-cellulaires phagocytées, rejoignent la voie de routage des antigènes de classe II du CMH, et sont présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>auxiliaires. Ces lyT auxiliaires ou "helper" (Th) ont pour mission de recruter, d'aider et d'activer les autres cellules immunocompétentes. Les lyTh peuvent emprunter différentes voies de signalisation selon le pathogène ou le contexte dans lequel se fait la présentation antigénique. Cette polarisation de la réponse immune peut se faire selon 4 profils principaux : **les lyT auxiliaires 1 (Th1), les lyT auxiliaires 2 (Th2), les lyT auxiliaires 17 (Th17) et les cellules T régulatrices (Treg).**

## Activation des lymphocytes T

L'interaction moléculaire entre TCR et le CMH-peptide active différentes voies de signalisation. Ces voies de signalisation ont pour finalité d'activer plusieurs facteurs de transcription qui décideront de l'orientation de la réponse de la cellule T: prolifération, différenciation, production de cytokines ou encore mise en place du potentiel cytotoxique. La génération de lymphocytes T effecteurs actifs nécessite la présence de trois signaux : la reconnaissance de l'antigène, un co-signal et l'action de cytokines. Seules les DC sont capables d'apporter ces 3 signaux de manière optimale.

- **Signal 1 : reconnaissance de l'antigène**

Dans les organes lymphoïdes secondaires, la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR constitue le signal 1 de l'activation du lymphocyte. L'agrégation lyT-DC est entraînée par de nombreuses molécules d'adhésion de part et d'autre, telles que CD2/LFA-3 (Leucocytes Function Ag-3), ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 ou CD54) et ICAM-2 (CD50)/LFA-1, ICAM-3/DC-SIGN. L'ensemble de ces interactions stabilise le contact entre la DC et le lyT. Cette zone de contact cellulaire dans laquelle a lieu la transmission du signal est appelée synapse immunologique (Norcross, et al 1984). Parallèlement, l'engagement des co-récepteurs CD4 ou CD8 qui se lient respectivement au domaine  $\beta 2$  du CMH de classe II ou au domaine  $\alpha 3$  du CMH de classe I augmente l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide. Cet engagement potentialise alors l'activation de la cellule T. En retour, les lymphocytes T peuvent activer les DC via CD40 ligand (CD40L). La liaison de CD40L à CD40 conduit à l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et à la sécrétion de cytokines comme l'IL-1, le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-12 et de chimiokines (Cella, Scheidegger et al. 1996). L'activation complète du lyT naïf nécessite la synthèse de l'IL-2 et l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25). L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur permet alors l'expansion clonale et la phase effectrice de la réponse immune.

#### ○ **Transduction du signal**

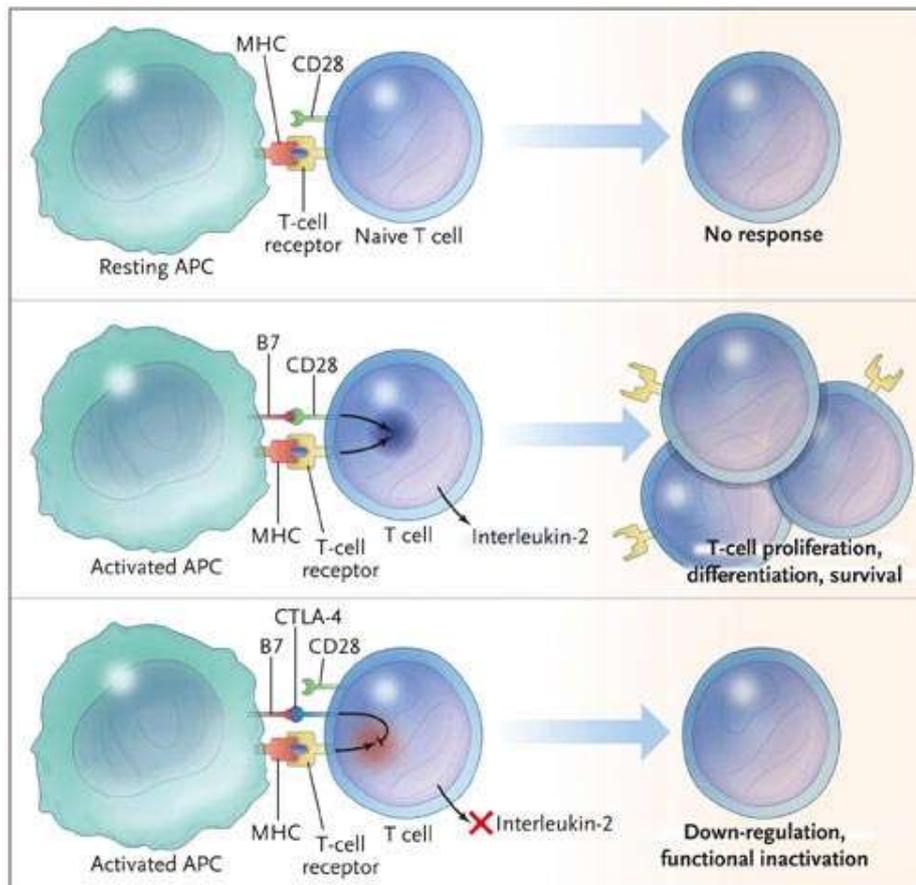
Lorsque le TCR reconnaît l'antigène présenté par les molécules du CMH, cela provoque l'agrégation des domaines extra-cellulaires et des portions intra-cytoplasmiques des sous-unités de signalisation qui leur sont associées. Il y a alors transmission des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule T. L'engagement du TCR par l'antigène donne lieu à une importante diversité de réponses, qui conduisent soit à la prolifération et à la différenciation cellulaire, soit à l'anergie lymphocytaire, soit enfin à la mort cellulaire par apoptose (AICD pour « activation induced cell death »). Cet engagement entraîne la transformation d'un signal mécanique, en un signal chimique. En effet, la signalisation est sous la dépendance de la phosphorylation de protéines qui résulte de la balance entre l'activité de kinases, et de phosphatases. Une protéine phosphorylée devient un site de recrutement pour une autre protéine. La phosphorylation permet donc des interactions entre protéines intra-cellulaires. Cette cascade de phosphorylation aboutit au recrutement de molécules adaptatrices et est à l'origine de voies métaboliques qui propagent les signaux dans les cellules. L'activation cellulaire aboutit donc à l'expression de gènes

cellulaires responsables de la synthèse de protéines (cytokines, récepteurs de cytokines, kinases et cyclines) intervenant dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

○ **Signal 2 : Les signaux de Costimulation :**

Le signal fourni par le TCR n'est pas suffisant pour l'activation complète du lymphocyte T. En effet, la liaison du TCR en l'absence de signal de costimulation induit généralement l'apoptose ou un état d'anergie des lymphocytes T (Allison 1994). Dans un premier temps, la liaison du co-récepteur CD28 à ses ligands CD80 ou CD86 présents sur les CPA augmente considérablement l'amplitude de la réponse. La fonction principale de CD28 est d'augmenter et de soutenir la réponse T initiée par le TCR, en promouvant la survie cellulaire, l'expansion clonale et la différenciation (Sharpe and Freeman 2002). CD28 est présent constitutivement sur les lymphocytes T CD4 et la majorité des cellules CD8. Son expression diminue au cours du processus de différenciation des cellules T en cellules mémoires effectrices, CD28 est donc une molécule essentiellement impliquée dans l'activation des cellules T naïves. Il existe d'autres co-récepteurs activateurs comme ICOS (pour « Inducible Costimulatory Molecule »). ICOS, à l'inverse de CD28, n'est pas exprimé sur les lyT naïfs (Rudd and Schneider 2003). En effet, l'expression d'ICOS est rapidement induite sur les lyT après activation et est influencée à la fois par la signalisation du TCR et de CD28. ICOS comme CD28, induit l'activation et la différenciation des lyT et le développement de la réponse immunitaire B. Mais, ICOS n'induit pas la synthèse d'IL-2. Par contre, il induit celle d'IL-10 et de cytokines Th2 (Hutloff, Dittrich et al. 1999). ICOS-L est exprimé constitutivement sur les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B non stimulés, mais également sur des cellules non hématopoïétiques comme le rein, le foie, le cœur ou le cerveau (Swallow, Wallin et al. 1999). Dans une deuxième phase, la régulation de la réponse immune a lieu grâce aux signaux inhibiteurs activés par des co-récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 (pour « Cytotoxic T lymphocyte Antigen-4 ») ou PD-1 (Freeman, Long et al. 2000). CTLA-4 possède une affinité beaucoup plus importante que CD28 pour CD80 et CD86, mais exerce une activité opposée à la sienne (figure 3). Il est absent sur les cellules T au repos, sauf sur les cellules régulatrices. Son expression, induite par l'activation du TCR, est amplifiée par le signal 2. Après interaction avec ses ligands CD80 et CD86, les lyT exprimant CTLA-4 sont inhibés : ils subissent un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire et de la synthèse d'IL-2 (figure 4).

**Figure 4 : Rôles de CD28 et CTLA4 dans la régulation de l'activation T**



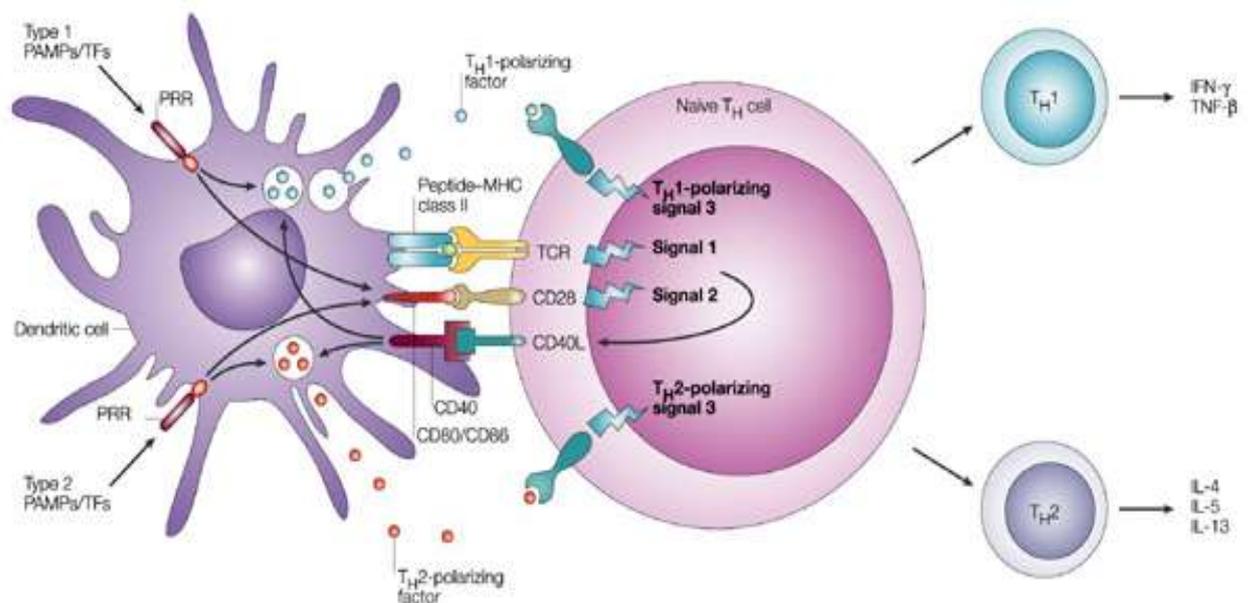
D'après Sharpe et Abbas. (Sharpe and Abbas 2006)

Les DC à l'état quiescent expriment un faible niveau de molécules de costimulation et ne peuvent pas activer les cellules T naïves (en haut). Quand les DC sont activées après reconnaissance et phagocytose des pathogènes, l'expression des molécules B7 de costimulation (CD80 et CD86) est augmentée. Puis, les interactions B7/CD28 entraînent l'expansion et la différenciation des cellules T naïves (au milieu). CTLA4, le récepteur de haute affinité, pour CD80 et CD86, inhibe la réponse T (en bas).

○ **Signal 3 : Les cytokines**

Le signal 3 correspond à la production de cytokines par les DC. Ce signal oriente les cellules T vers un phénotype effecteur. Ainsi, c'est l'environnement cytokinique produit par les DC qui détermine l'orientation du profil des cellules effectrices (figure 5).

**Figure 5 : La polarisation des réponses T par les DC est dépendante des pathogènes.**



D'après Kapsenberg (Kapsenberg 2003)

Le signal 1 est le signal spécifique de l'antigène, il passe par la reconnaissance des complexes CMH/peptide issus des pathogènes suite à leur internalisation et leur reconnaissance par les PRR des DC. Le signal 2 est le signal de costimulation, principalement obtenu par l'interaction entre le CD28 et CD80 ou CD86 exprimés par les DC. Le signal 3 est délivré par les cytokines qui orientent la réponse T. La nature du signal 3 dépend de l'activation des DC par les TLR et les autres PRR.

- **Les lymphocytes T mémoires :**

Une fois les antigènes éliminés et la réponse inflammatoire jugulée, la grande majorité des lymphocytes T activés meurent par apoptose, tandis qu'un petit nombre constitue un groupe de cellules mémoires. Pour les lyT mémoires, la stimulation ne nécessite pas la présence du second signal (Croft, Bradley et al. 1994). Si l'IL-2 n'est donc pas primordiale, la prolifération des lyT mémoires est assurée par l'IL-7 ou l'IL-15 (Geginat, Sallusto et al. 2001). Lors de la réintroduction de l'Ag, les cellules mémoires confèrent une protection immédiate, précoce et plus intense que la réponse primaire. Cette fonction de mémoire est portée par deux types cellulaires distincts. La mémoire protectrice est exercée par des cellules T effectrices mémoires (T<sub>EM</sub>) qui migrent dans les tissus sur le lieu de l'infection et exercent une fonction effectrice immédiate. Tandis que la mémoire réactive est portée par les cellules T centrales mémoires (T<sub>CM</sub>) qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, et ont peu ou pas de fonction effectrice (Sallusto, Lenig et al. 1999).

## **Le paradigme Th1/Th2 et ses paradoxes**

En réponse à la stimulation antigénique, les cellules T CD4 naïves prolifèrent et se différencient en cellules T effectrices qui se distinguent par leur production de cytokines et leurs fonctions. En 1986, Tim Mosmann *et al.* proposèrent un modèle de différenciation des cellules T CD4 qui permettait de relier la fonction des effecteurs T CD4 et la nature de la réponse immunitaire induite, réponse à médiation cellulaire ou humorale. Les cellules T effectrices ont été classées en deux catégories, les cellules Th1 qui produisent principalement de l'IFN $\gamma$  et les cellules qui produisent essentiellement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Mosmann, Cherwinski et al. 1986 ; Mosmann and Coffman 1989).

### **I.1.h. La voie Th1**

Les cellules Th1 activent les fonctions bactéricides des macrophages et peuvent détruire les cellules infectées (*via* FasL ou TRAIL). Elles jouent un rôle majeur dans le **contrôle des bactéries intracellulaires**, des virus et l'hypersensibilité retardée. Elles induisent une forte inflammation et des lésions tissulaires. Les cellules Th1 sécrètent de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2, du TNF $\alpha$ , et du TNF $\beta$ . L'IFN $\gamma$  permet l'activation des macrophages en augmentant leur activité phagocytaire et leur pouvoir bactéricide (Nathan, Murray et al. 1983; Robinson, Hamid et al. 1992; Karupiah, Xie et al. 1993) et, favorise la production d'IgG qui permet l'opsonisation et la phagocytose des pathogènes. L'IL-2 et l'IFN $\gamma$  induisent la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules cytotoxiques actives.

### **I.1.i. La voie Th2**

Inversement, les cellules Th2 favorisent la commutation isotypique et la production d'IgG1, IgE et IgA et, ont donc un rôle majeur dans le contrôle de certains **pathogènes extracellulaires** et des helminthes. En effet, les cellules Th2 sont caractérisées par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. L'IL-4 favorise la commutation isotypique en IgE, qui a un rôle prépondérant dans la dégranulation des mastocytes. Les Th2 favorisent la production d'IgG4 par les lymphocytes B. L'IL-5 est la principale cytokine responsable de la différenciation, de l'activation et du recrutement des éosinophiles. Quant à l'IL-13, elle est, comme l'IL-4, importante pour stimuler la croissance et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE.

Ce modèle dichotomique a été étudié dans de nombreuses circonstances pathologiques. Ainsi, chez l'Homme et chez la souris, l'asthme allergique résulte d'une exacerbation de la réponse Th2 (Robinson, Hamid et al. 1992). En revanche, de nombreuses études suggèrent que le développement de pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le lupus érythémateux disséminé, le diabète insulino dépendant, ou la polyarthrite rhumatoïde résulte d'une activation incontrôlée d'effecteurs Th1 spécifiques d'antigènes du «soi» (Szabo, Sullivan et al. 2003). Mais ces données ont récemment été remises en question par la découverte des Th17.

### **I.1.j. Facteurs influençant la différenciation des lymphocytes T CD4**

Les sous populations de DC peuvent être spécialisées dans l'induction de réponses T distinctes (REIS e SOUSA 2006). Les DC sont définies par des marqueurs, des profils de TLR et cytokiniques différents. Les pDC qui expriment TLR7 et TLR9 reconnaissent les virus et produisent de l'INF $\gamma$ , alors que les mDC qui expriment préférentiellement TLR1, 2, 3, 4 et 5 reconnaissent les bactéries et produisent des cytokines proinflammatoires TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6. De plus les conditions de stimulations influencent la réponse immunitaire. En effet, les mDC ont toutes la capacité de produire de l'IL-12 qui polarise la réponse immunitaire vers un profil Th1. Cependant, en fonction du pathogène rencontré la réponse est différente. Ainsi, le LPS d'*E. coli* ou de *T. gondii* induit un profil Th1, alors que celui de *Candida Albicans* induit un profil Th2 (Kadowaki 2007).

#### **I.1.j.i La différenciation Th1**

L'IL-12 l'INF $\gamma$  et l'IL-18 sont des cytokines importantes dans la différenciation Th1 (Hsieh, Macatonia et al. 1993 ; Boehm, Klamp et al. 1997 ; Yoshimoto, Takeda et al. 1998). **L'IL-12** joue un rôle central en promouvant la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules effectrices Th1 matures. De plus, l'IL-12 stimule la production d'INF $\gamma$  par les cellules NK (Natural Killer) et les lyT CD8. **L'INF $\gamma$**  est une cytokine pléiotropique qui joue un rôle essentiel à la fois dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Boehm, Klamp et al. 1997). Les NK, les T CD8 et les Th1 sont les sources les plus importantes d'INF $\gamma$ . L'INF $\gamma$  induit l'expression du facteur de transcription T-bet, essentiel au développement des Th1 (Szabo, Kim et al. 2000), qui entraîne une sécrétion autocrine d'INF $\gamma$  (Mullen, High et al. 2001) créant ainsi une boucle de régulation positive de différenciation Th1. Parallèlement, T-bet réprime GATA-3, facteur clé de la différenciation Th2 (Hwang, Szabo et al. 2005), ainsi que le gène de l'IL-4 (Djuretic, Levanon et al. 2007). **L'IL-18** sert de co-facteur pour l'induction des Th1 via l'IL12 et pour l'augmentation de la production d'INF $\gamma$  par les Th1 effecteurs. L'IL-18 est produite essentiellement par les macrophages et les cellules dendritiques.

#### **I.1.j.ii La différenciation Th2**

**L'IL-4** est la cytokine clé du développement des Th2. Les lymphocytes T CD4 naïfs semblent en être la source initiale (Ansel, Djuretic et al. 2006). L'IL-4 peut-être également produite par les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les cellules NKT. Une nouvelle population de cellules de l'immunité innée source d'IL-4 et nommée nuocyte a été décrite récemment (Neill, Wong et al.). L'IL-4 conduit à l'activation de

facteur de transcriptions dans les LyT naïfs qui induisent l'expression de cette dernière et du facteur de transcription GATA-3 (Zheng and Flavell 1997). GATA-3 favorise la réponse Th2 en induisant la transcription de l'IL-5 et de l'IL-13 et prévient la réponse Th1 en inhibant l'expression de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-12.

### **I.1.k. Les cellules Th17**

#### **Découverte des cellules Th17**

La découverte de l'IL-17 et celle de IL-23 ainsi que ses liens avec l'IL-12, ont amené à reconsidérer les mécanismes de l'immunité cellulaire. Ce sont les résultats supposés contradictoires de plusieurs études sur le rôle de la voie Th1 et de L'IL-12 dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) qui ont, entre autre, conduit à la découverte de la voie Th17. En effet, certains modèles murins déficitaires en IL-12 entraînent une résistance à l'EAE alors que d'autres la favorisent. L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique formée d'une chaîne p35 et d'une chaîne p40. Or, les modèles résistants à l'EAE sont ceux où les souris sont génétiquement déficitaires pour la chaîne p40. Alors que les souris déficitaires pour la chaîne p35, exprimant aussi une perte d'expression de l'IL-12 et un défaut de différenciation Th1, sont susceptibles de développer une EAE. De même, les souris susceptibles à l'EAE sont déficitaires pour l'IFN $\gamma$ , le récepteur de l'IFN $\gamma$  ou le facteur de transcription STAT1 (Ferber, Brocke et al. 1996; Bettelli, Sullivan et al. 2004). En revanche, des souris déficitaires pour T-bet, le facteur de transcription initiateur de la différenciation Th1, ou STAT4, le facteur de transcription intervenant en aval du récepteur de l'IL-12, sont résistantes à l'EAE (Chitnis, Najafian et al. 2001 ; Bettelli, Sullivan et al. 2004). Il était donc difficile de conclure quant au rôle direct des cellules Th1 dans ces pathologies auto-immunes. La découverte de l'IL-23 a permis de résoudre certains de ces paradoxes (Oppmann, Lesley et al. 2000). L'IL-23 fait partie de la famille des cytokines hétérodimériques IL-6/IL-12. Elle est constituée de la chaîne p19, homologue de la chaîne p35, et de la chaîne p40 de l'IL-12. Ainsi, les souris invalidées pour la chaîne p40, résistantes à l'EAE sont déficitaires à la fois pour l'IL-12 et l'IL-23, alors que l'invalidation de la chaîne p35, qui est associée à une susceptibilité accrue à l'EAE, induit uniquement la perte d'IL-12. Ces observations suggéraient donc un rôle essentiel de l'IL-23 et non de l'IL-12 dans le développement de l'EAE, rôle confirmé par la résistance à l'EAE des souris invalidées pour la chaîne IL-23p19 (Cua, Sherlock et al. 2003). Des résultats similaires sont obtenus

dans un modèle murin de Rhumatisme Articulaire induit par l'injection de collagène (Cua, Sherlock et al. 2003). Parallèlement, il a été montré que l'IL-23 induit la production d'IL-17 et non d'IFN $\gamma$ , par des cellules T CD4 effectrices ou mémoires (Aggarwal, Ghilardi et al. 2003). De plus, les souris déficientes pour l'IL-17 sont résistantes à l'EAE. Ces travaux sur des modèles murins d'encéphalite expérimentale et de polyarthrite ont donc révélé que ces modèles de pathologies inflammatoires étaient essentiellement dépendants de l'IL-23 et non de l'IL-12, et du développement de cellules T CD4 productrices d'IL-17 ainsi que de l'IFN $\gamma$ , ouvrant ainsi la voie à une nouvelle lignée lymphocytaire effectrice appelée Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005 ; Park, Li et al. 2005).

### **Fonctions physiologiques des cellules Th17**

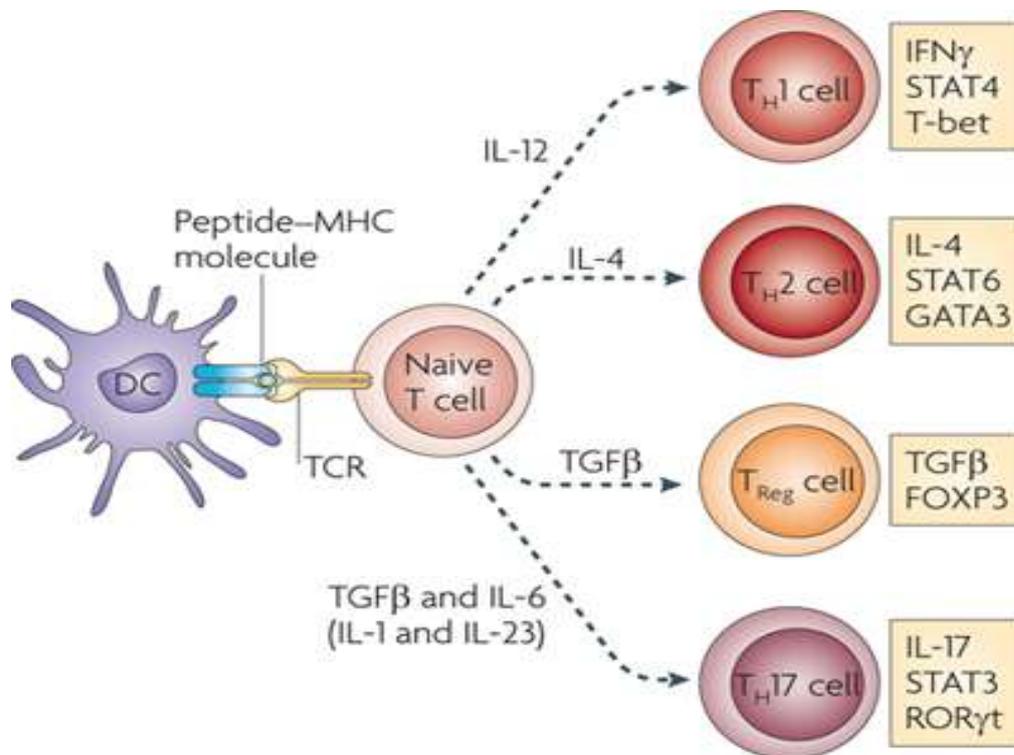
Le développement des cellules Th17 est sous la dépendance du TGF $\beta$ , et nécessite également la présence de l'IL-6, IL-1 et l'IL-23 (Manel, Unutmaz et al. 2008 ; Volpe, Servant et al. 2008 ; Yang, Anderson et al. 2008). La famille de l'IL-17 est composée de 6 membres, dont l'IL-17A appelée IL-17 cytokine effectrice de la voie Th17 (Kolls and Linden 2004). Les cellules Th17 produisent aussi l'IL-17F, très homologue à l'IL-17A. IL-17A et IL-17F se lient au même récepteur, l'IL-17RA, dont l'expression est relativement ubiquitaire bien que plus prononcée dans les poumons et les intestins. Dans ces tissus l'IL-17 a pour cible essentielle les cellules épithéliales dans lesquelles elle induit la production de facteurs de croissance, de chimiokines et de mucines au niveau des cellules épithéliales bronchiques. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire, qui selon la cellule cible, induit l'expression de d'IL-6, de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et de chimiokines, permettant ainsi le recrutement de cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles (Chakravarti, Allaey et al. 2007). Les lymphocytes Th17 participent ainsi au niveau des épithéliums à la défense contre les bactéries extracellulaires (Ouyang, Kolls et al. 2008). De plus, l'IL-17 et l'IL-22, également sécrétée par les Th17, rétablissent les jonctions entre cellules épithéliales. Ceci suggère un rôle essentiel des cellules Th17 dans le contrôle des procaryotes extracellulaires au niveau des épithéliums. Or, les cellules Th17 sont naturellement présentes dans les organes lymphoïdes du tractus intestinal et l'IL-17 est constitutivement exprimée dans ce tissu, suggérant un rôle essentiel de cette population dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la barrière intestinale. Ces cellules ont donc des propriétés pro-inflammatoires marquées et contrôlent les bactéries extracellulaires principalement à la surface des épithéliums.

Le rôle de la lignée Th17 dans les pathologies auto-immunes chez l'homme est suggéré par de nombreux travaux, notamment dans la Polyarthrite Rhumatoïde (Chabaud, Lubberts et al. 2001 ; Hwang and Kim 2005) et les maladies inflammatoires du tube digestif (Fujino, Andoh et al. 2003 ; Baumgart and Carding 2007 ; Seiderer, Elben et al. 2008), mais aussi dans la Sclérose en Plaque (Matusevicius, Kivisakk et al. 1999), le Psoriasis (Homey, Dieu-Nosjean et al. 2000 ; Arican, Aral et al. 2005), et le Lupus Erythémateux Disséminé (Wong, Lit et al. 2008). De plus il a été mis en évidence que l'induction de lymphocytes Th17 ou de Treg est sous la dépendance du TGF $\beta$  mais qu'en fonction des conditions de stimulation les lymphocytes T naïfs étaient orientés vers une différenciation soit Th17 soit Treg, celles-ci apparaissant mutuellement exclusives (Bettelli, Carrier et al. 2006).

**Conclusion :**

L'induction de la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype Th1, Th2, Th17 ou Treg est en grande partie sous le contrôle des cellules présentatrices d'antigènes via le mode de présentation antigénique, la délivrance de co-signaux d'activation membranaire et la sécrétion de cytokines spécifiques (figure 6). Chacune des sous-populations Th1, Th2, Th17 est capable de promouvoir son propre développement et d'inhiber le développement des autres sous-populations via les cytokines qu'elles sécrètent. L'orientation des réponses immunitaires est donc sous le contrôle d'un équilibre entre les voies Th1 Th2 et Th17 et, un déséquilibre vers l'une de ces voies est susceptible d'affecter le développement de la réponse immune.

Figure 6: Différenciations des lymphocytes T naïfs.



D'après Zou et Restifo. (Zou and Restifo)

À la suite de la stimulation par la CPA, les cellules T CD4 naïves se différencient en cellules effectrices définies par les cytokines qu'elles produisent :

- L'IFN $\gamma$  : produit par les cellules T naïves et d'autres cellules de l'immunité innée, permet l'activation du facteur de transcription STAT1. Conjointement aux signaux du TCR, STAT1 initie la différenciation Th1 en induisant l'expression de T-bet et de la chaîne du récepteur de l'IL-12 (IL-12R $\beta$ 2). Ces cellules engagées vers la voie Th1 se différencient en effecteurs Th1 sous l'influence de l'IL-12 qui active STAT4.
- L'IL-4 : produit par les cellules T naïves et d'autres types cellulaires, induit l'activation de STAT6 et ainsi l'expression de GATA3 et donc une différenciation Th2.
- TGF $\beta$ , IL-6, l'IL-23, l'IL-1 $\beta$ : induisent la différenciation Th17, caractérisée par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, potentialisé par l'IL-2 et inhibé par le TGF $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-12.
- Le TGF $\beta$  seul induit l'expansion de cellules T régulatrices exprimant le facteur de transcription FOXP3.

## *L'Auto-immunité*

### **Introduction :**

L'auto-immunité concerne toutes les réactions immunitaires développées vis-à-vis de constituants du soi. L'auto-immunité dite naturelle est présente chez tous les individus et, la régulation de la réponse immunitaire physiologique est responsable dans la majorité des cas d'une homéostasie qui ne permet pas le développement de pathologies auto-immunes. Cependant dans certain cas une auto-immunité pathologique survient, entraînant le développement de maladies auto-immunes. Les MAI représentent le 3<sup>ème</sup> grand processus pathologique avec une prévalence globale de 6 à 7 % de la population dans les pays occidentaux (après les maladies cardiovasculaires et cancéreuses). La mortalité associée à ces maladies est très élevée et leur fréquence ne cesse d'augmenter depuis ces 30 dernières années. Les 6 pathologies auto-immunes les plus fréquentes sont la polyarthrite rhumatoïde, l'hyperthyroïdie de Basedow, le diabète de type 1, l'anémie de Biermer, le lupus érythémateux disséminé et la sclérose en plaques, elles représentent à elles seules la moitié des MAI. Ces pathologies sont caractérisées par leur caractère chronique, conséquence de l'impossibilité d'éradiquer l'Ag. Au plan épidémiologique, il existe des variations géographiques, avec un gradient Nord sud. Les facteurs mis en cause sont des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs environnementaux comme l'exposition à certains toxiques ou aux maladies infectieuses. Bien que la réponse auto-immune implique l'ensemble des acteurs de la réponse immune, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle majeur et central dans cette réponse. Les MAI sont classées, en fonction du spectre des auto-anticorps, en deux groupes : les MAI spécifiques d'organe comme le diabète de type I, le syndrome de Goopasture ou l'Anémie de Biermer et les MAI systémiques comme la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodermie, le lupus érythémateux disséminé ou les vascularites à ANCA (VAA).

# Les facteurs favorisant l'auto-immunité

Les maladies auto-immunes ont des origines « multifactorielles » (figure 7). À de rares exceptions près (FOXP3, AIRE, FASL), il n'existe pas de gène unique ou de pathogène environnemental entraînant systématiquement une MAI. Les gènes de susceptibilités interfèrent avec les voies de la tolérance et entraînent une persistance des lyT et B auto-réactifs. Les stimuli environnementaux, principalement les infections agissent comme des facteurs déclenchants.

## I.1.l. Prédisposition endocrinienne

Les MAI s'observent préférentiellement chez la femme. Pour le LED par exemple, le sexe ratio est de 9 femmes pour 1 homme ; pour la sclérodermie, il est de 3 à 6 femmes pour 1 homme. La prédominance féminine qui se retrouve dans certaines maladies auto-immunes s'explique par l'imprégnation hormonale qui favorise certaines de ces pathologies. Les rôles parfois aggravants de la grossesse et de la contraception hormonale confirment l'importance des hormones dans la physiopathologie des MAI. De façon générale, les oestrogènes sont impliqués dans le déclenchement de l'auto-immunité. Ils jouent très probablement le rôle de facteur déclenchant révélant la présence d'un terrain auto-immun sous-jacent. Cependant, la prédominance femme/homme n'est pas évidente dans toutes les MAI, elle n'est pas observée dans les VAA.

## I.1.m. Prédispositions génétiques

L'observation de formes familiales et la concordance des MAI chez les jumeaux homozygotes (25 % de concordance dans le LED) montrent l'importance du terrain génétique comme facteur prédisposant dans les MAI. De plus, l'association des MAI avec certains phénotypes du CMH vient renforcer cette théorie. Ces associations MAI/HLA sont variables selon les MAI étudiées. Il a été montré une association forte entre la polyarthrite rhumatoïde et les allèles HLA-DR1 DR4 (Gregersen, Silver et al. 1987). Dans le cas du DID, l'association aux allèles DR3 et DR4 et plus précisément, aux

allèles DQB1 peut être une association protectrice ou une association de susceptibilité en fonction de l'acide aminé exprimé en position 57 sur ce gène (Kukreja and Maclaren 1999). Les polymorphismes sont des variations présentes dans l'ADN avec une fréquence allélique supérieure ou égale à 1% dans la population. Parmi les gènes candidats aux MAI on retrouve fréquemment des polymorphismes dans les gènes des récepteurs des Ig, des cytokines, des facteurs de l'apoptose, de molécules d'activation des lymphocytes CTLA4 ou de CD40L. Certains polymorphismes peuvent être des facteurs prédisposant pour plusieurs MAI en même temps. Par exemple, les variants du gène codant pour CTLA4 sont associés au diabète auto-immun, à l'hyperthyroïdie de Basedow et à la cirrhose biliaire primitive (Awata, Kurihara et al. 1998 ; Agarwal, Jones et al. 2000; Kouki, Sawai et al. 2000). Ce point peut expliquer l'observation de l'existence de susceptibilité familiale pour des MAI différentes (Ginn, Lin et al. 1998). Plus récemment, une autre source de variabilité génétique a été décrite, il s'agit de « La variation du nombre de copies » (ou CNV pour « copy number variations »). Les CNV sont définies comme des répétitions de segments d'acides nucléiques de plus de 1 kbase à quelques mega bases en comparaison à un génome référent (Beckmann, Estivill et al. 2007). Ces variations affectent des régions beaucoup plus grandes dans l'ADN. Les implications d'une telle variation sont encore incertaines, mais certains variants de nombre de copies ont clairement un effet fonctionnel. Par exemple, le nombre de copies de CCL3L1 a été associé à une susceptibilité pour le LED (Mamtani, Rovin et al. 2008), la PR et le diabète de type 1 (McKinney, Merriman et al. 2008). Il faut noter aussi qu'il existe une vulnérabilité des organes cibles qui peut être génétiquement déterminée. Ainsi, pour une même anomalie sérologique, on observe des expressions cliniques variables (Liao, Sindhvani et al. 1995). Les maladies auto-immunes sont donc des maladies polygéniques.

### **I.1.n. Facteurs environnementaux**

Il existe aussi, pour de nombreuses MAI, un gradient géographique de fréquence Nord/Sud. Ce gradient géographique suggère une implication des facteurs génétiques mais aussi environnementaux. Les facteurs environnementaux comprennent les infections, les médicaments ou les substances toxiques. L'implication des infections est suggérée par des arguments indirects, comme, par exemple, une fréquence anormalement élevée d'anticorps anti-virus d'Epstein-Barr dans la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose

en plaques. Les infections peuvent expliquer une rupture de tolérance par plusieurs mécanismes qui sont précisés dans le chapitre suivant. A côté des infections, certains médicaments peuvent induire l'apparition d'auto-Ac et de certaines manifestations cliniques de maladies auto-immunes. C'est le cas de médicaments récents comme l'IFN $\alpha$  prescrits dans le traitement des hépatites virales ou du mélanome et qui peut induire une auto-immunité biologique et plus rarement, des manifestations cliniques d'auto-immunité. Parmi les substances toxiques, l'exposition à la silice est retrouvée chez les patients présentant une sclérodermie, une PR ou une vascularite à ANCA. Les rayons ultraviolets font aussi partis des facteurs environnementaux qui peuvent déclencher une maladie auto-immune, notamment les éruptions cutanées photosensibles du lupus.

## **Mécanismes mis en cause dans les maladies auto-immunes**

### **I.1.o. Rôle des infections**

Les agents pathogènes peuvent initier une réponse auto-immune par l'intermédiaire de différents mécanismes :

#### **- Mimétisme moléculaire**

Lorsqu'un Antigène exogène présente des similitudes de structure avec un Ag du soi, il peut y avoir des réactions croisées entre ces deux Ag. Les lyT reconnaissent l'épitope étranger non toléré et peuvent alors coopérer avec les lyB dirigés contre l'épitope commun au soi et à l'Ag exogène. Ceci permet aux lyB de produire des auto-Ac. Le prototype de la MAI avec mimétisme moléculaire est le rhumatisme articulaire aigu. Cette maladie provoquée par des streptocoques était très fréquente aux Etats-Unis et en Europe jusqu'aux années 1950. Sa gravité, en l'absence d'antibiothérapie, est liée à ses conséquences cardiaques. Celles-ci sont dues à une réaction auto-immune dirigée contre différentes parties du cœur. Une réaction croisée avec des Ag du streptocoque et la myosine cardiaque a été décrite (Froude, Gibofsky et al. 1989 ; Galvin, Hemric et al. 2000 ; Malkiel, Liao et al. 2000). De tels mimétismes moléculaires ont aussi été décrits ou proposés dans le syndrome de Guillain-Barré entre le ganglioside GM1 humain et le lipopolysaccharide de *C. Jejuni* (Yuki 1999), dans le diabète auto-immun entre un peptide dérivé de l'acide glutamique décarboxylase et le virus de Coxsakie (Richter, Mertens et al.

1994) et dans la sclérose en plaques entre un peptide de la protéine basique de la myéline et des peptides du virus d'Epstein-Barr, de l'influenza virus type A et du papillomavirus.

- Activation polyclonale de lyT auto-réactifs par des superantigènes

Les superantigènes sont des molécules capables de se lier directement à certaines chaînes V $\beta$  du TCR et capables de stimuler de façon polyclonale l'ensemble des lyT exprimant ce segment V $\beta$  indépendamment de leur spécificité pour l'antigène.

- Rupture des barrières tissulaires

La rupture de barrières tissulaires provoquée par des infections au niveau de sites privilégiés peut entraîner une libération d'Ag séquestrés et provoquer une réaction immunologique vis-à-vis de ces Ag jusque là « ignorés ». C'est le mécanisme mise en cause dans l'ophtalmie sympathique (Dreyer, Zegarra et al. 1981).

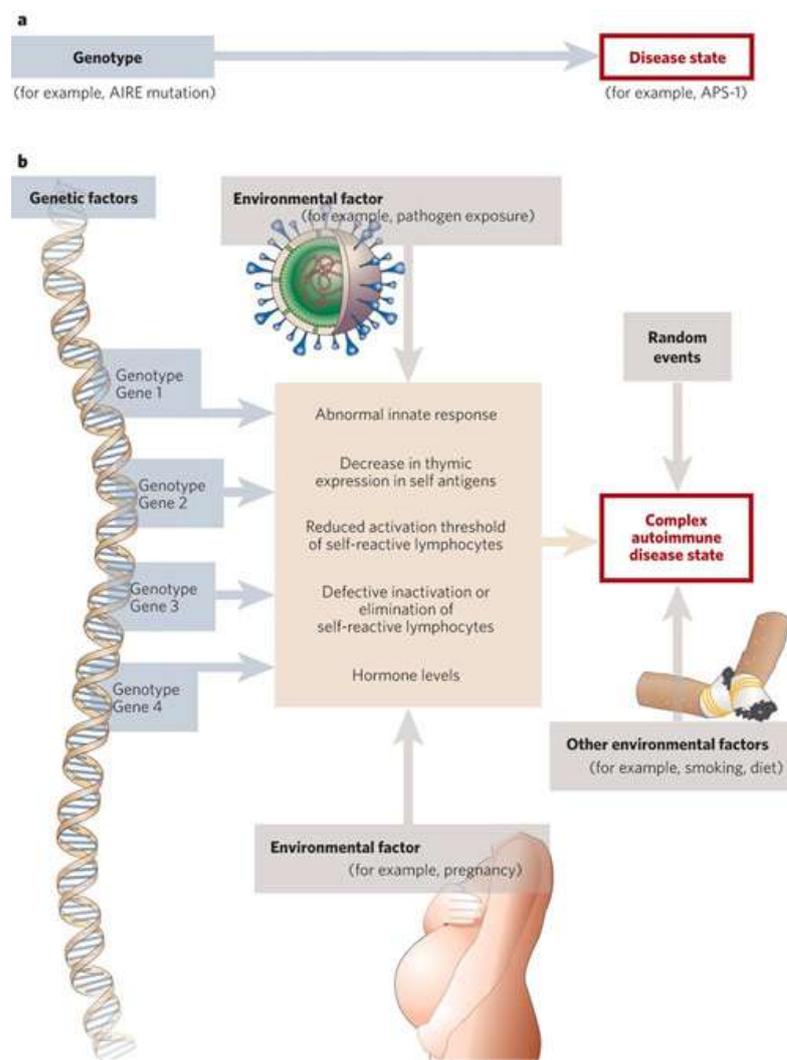
- Inflammation de l'organe cible et libération de médiateurs favorisant l'auto-immunité

L'infection de certains organes par divers agents infectieux entraîne une inflammation locale qui peut induire l'expression aberrante de molécules de co-stimulation à la surface des cellules infectées. Ainsi, une cellule infectée par un virus peut devenir plus « immunogénique », et peut provoquer une réponse auto-immune qui ne serait pas survenue sans l'infection virale. L'inflammation locale peut aussi provoquer des dégâts tissulaires et la libération d'antigènes séquestrés aboutissant à la re-stimulation de cellules T auto-réactives au repos.

### **I.1.p. Modification de l'antigène**

La modification physique par les UV ou chimique par des médicaments hapténiques d'un auto-antigène peut aussi déclencher une auto-immunisation. C'est ce qui se passe dans les anémies hémolytiques suite au traitement par l'alpha-méthyl-dopa, par les pénicillines ou par les céphalosporines. Ces molécules se fixent sur les hématies et forment de nouveaux antigènes qui entraînent la formation d'auto-antigènes responsables de l'anémie hémolytique (Arndt, Leger et al. 1999).

Figure 7 : Origines multifactorielles des maladies auto-immunes



D'après Rioux et Abbas (Rioux and Abbas 2005).

**A**, La relation entre le génotype et la maladie peut être déterminante. **B**, Plus fréquemment la maladie résulte d'interaction entre de multiples génotypes et l'environnement. Des génotypes individuels peuvent affecter un ou plusieurs composants du système immunitaire adaptatif ou inné et conduire à une réponse auto-immune.

### **I.1.q. Mécanismes effecteurs lésionnels des maladies auto-immunes**

Les cellules T auto-réactives et les auto-anticorps peuvent être responsables des lésions tissulaires.

- Les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> peuvent entraîner la lyse des cellules cibles par nécrose suite à la libération de perforines ou, par apoptose suite à la libération de granzymes B (Thomas and Kay 2000). Les cytokines secrétées par les ly CD4 ont aussi un rôle direct dans la formation des lésions tissulaires (Juedes, Hjelmstrom et al. 2000).
- Les auto-anticorps peuvent être directement pathogènes et être responsables des lésions observées dans les MAI. Ils peuvent bloquer ou stimuler les récepteurs. Dans la myasthénie, les Ac anti-récepteurs de l'acétylcholine sont bloquants (Balasa and Sarvetnick 2000). Alors que, dans la maladie de Basedow des anti-TSH sont stimulants (Takasu, Oshiro et al. 1997). Les auto-Ac peuvent aussi bloquer des molécules circulantes. Par exemple, dans l'anémie de Biermer les auto-anticorps se fixent au facteur intrinsèque empêchant ainsi l'absorption de la vitamine B12. Ces Ac peuvent entraîner une cytolysse directe de la cellule cible ou indirecte par opsonisation. Dans l'anémie hémolytique auto-immune, la fixation des auto-Ac sur les globules rouges entraîne une lyse complément dépendant. Alors que dans le Purpura thrombopénique auto-immun (PTAI), l'auto-Ac fixé sur la plaquette joue le rôle d'opsonine qui favorise la phagocytose par les macrophages (Chong and Ho 2005). L'importance des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA) dans l'initiation de la formation des lésions des vascularites à ANCA est bien documentée. (Ce point est rediscuté plus loin dans le chapitre consacré aux vascularites à ANCA). Enfin, les Ac peuvent déclencher et entretenir les réactions inflammatoires à cause de la formation de complexes immuns (CI) responsables d'une réaction localisée dans les tissus où ils s'accumulent, c'est ce qui se passe dans les néphropathies glomérulaires lupiques.

# Mécanismes de rupture de tolérance

## I.1.r. Tolérance

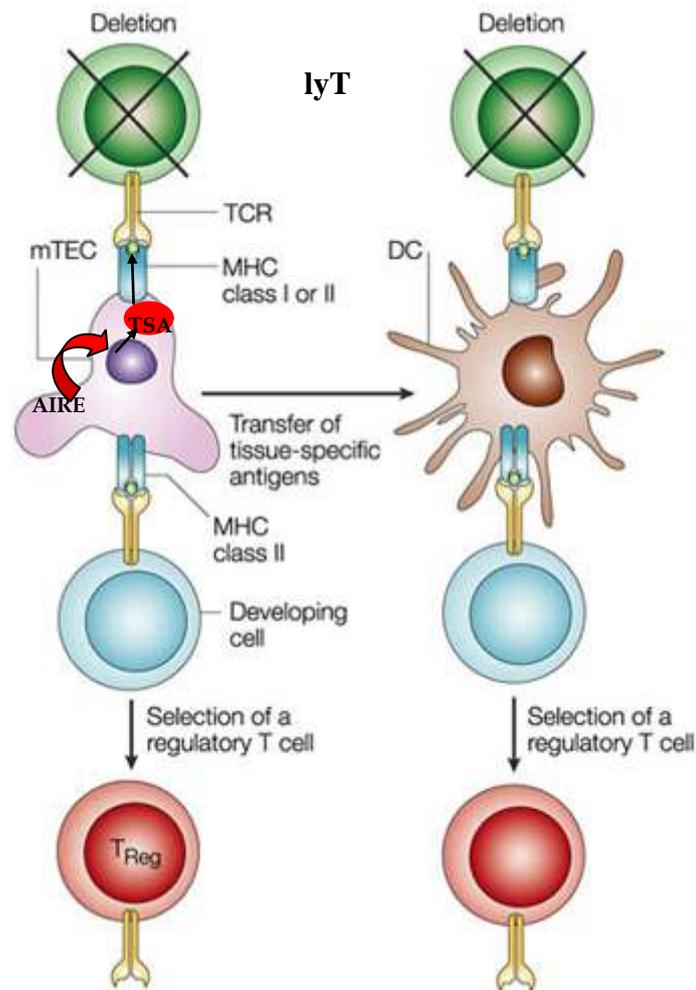
La tolérance est caractérisée par l'absence de réponse immunitaire dirigée contre un antigène donné, tout en conservant les réponses contre d'autres antigènes. Ces antigènes appartiennent au soi, et le but de la tolérance est d'éviter les maladies auto-immunes. Il existe une tolérance centrale dans le thymus où les lymphocytes T auto-réactifs sont éliminés (sélection négative) et une tolérance périphérique au cours de laquelle les lyT effecteurs sont rendus inactifs par tolérance passive ou bien sous contrôle de lyT régulateurs. Les DC jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la tolérance centrale et périphérique.

### I.1.r.i Tolérance centrale

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir de précurseurs provenant de la moelle osseuse. Les réarrangements des gènes du TCR se produisent lors du développement du lyT dans le thymus et conduisent à l'établissement d'un large répertoire T. Une fois leur TCR réarrangé, les lyT sont sélectionnés dans le thymus. Au cours de ce processus de sélection, plus de 90 % des cellules T sont éliminées. La sélection positive permet de conserver les thymocytes capables de reconnaître via leur TCR un peptide associé à une molécule du CMH du soi (Fink and Bevan 1978 ; Starr, Jameson et al. 2003). Au cours de ce processus, les cellules épithéliales du cortex thymique présentent aux cellules T des complexes CMH/peptide et fournissent un signal de survie aux cellules capables d'interagir avec les molécules du CMH du soi (Benoist and Mathis 1989). Les cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH du soi de manière trop faible meurent par apoptose dans le cortex. C'est après cette étape de sélection positive, que le répertoire T subit différents mécanismes de tolérance. Au cours de la sélection négative, les thymocytes avec un TCR de haute affinité pour les antigènes du soi sont éliminés (Sprent, Lo et al. 1988). Ceci entraîne l'élimination de plus de la moitié des thymocytes sélectionnés positivement (van Meerwijk, Marguerat et al. 1997).

La sélection négative ou délétion clonale permet l'élimination des lyT ayant une forte affinité pour les antigènes du soi et donc potentiellement auto-réactifs (Matzinger, Zamoyska et al. 1984 ; Rammensee and Bevan 1984). Cette sélection est exercée par les cellules épithéliales de la médulla et par les DC thymiques (Anderson, Partington et al. 1998). L'impact crucial de la médulla sur la sélection négative s'explique par une propriété exclusive des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC), qui présentent des antigènes de façon ectopique, c'est-à-dire des antigènes exclusivement exprimés dans certains tissus, comme l'insuline, un antigène spécifique des îlots pancréatiques (Kyewski, Derbinski et al. 2002 ; Gotter, Brors et al. 2004) (figure 8). Ce phénomène est sous le contrôle du facteur de transcription AIRE (autoimmune regulator), qui semble être à l'origine d'une dérégulation transcriptionnelle menant à l'expression de nombreux antigènes extrathymiques par les cellules épithéliales de la médulla thymique (Anderson, Venanzi et al. 2002 ; Anderson, Venanzi et al. 2005). En absence du gène AIRE, on observe un échappement à la délétion clonale de thymocytes auto-spécifiques (Liston, Lesage et al. 2003). Chez l'homme, il existe un syndrome de transmission autosomique récessive, lié aux mutations du gène AIRE : le syndrome auto-immun polyendocrinien appelé APECED (pour « auto-immune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy »). Il entraîne des maladies d'une grande variabilité phénotypique allant des formes pauci symptomatiques atypiques à des formes graves avec des atteintes potentiellement létales (hépatite ou syndrome de malabsorption sévère). Les patients présentent généralement l'association d'une candidose cutanéomuqueuse chronique, d'une hypoparathyroïdie et d'une insuffisance surrénale d'origine auto-immune (Nagamine, Peterson et al. 1997). En outre, l'implication d'une déficience dans l'expression ectopique d'un antigène a été démontrée dans plusieurs pathologies auto-immunes (Kyewski and Derbinski 2004). Cependant, il a été estimé que le nombre de mTEC exprimant un type d'antigène spécifique d'organe était faible, de l'ordre du millier chez l'homme (Hanahan 1998). Un thymocyte devra donc « scanner » l'ensemble de ces mTEC afin d'avoir une vision globale du répertoire des peptides du soi. Il semble que les DC puissent collaborer avec les mTEC afin d'augmenter la présentation des antigènes spécifiques de tissus en présentant à leur tour ces Ag et induisant ainsi à la délétion des thymocytes auto-réactifs (Humblet, Rudensky et al. 1994 ; Peterson and Alpert 1998).

Figure 8 : Induction de la tolérance au soi dans la médullaire thymique



D'après Kyewski (Kyewski and Derbinski 2004)

L'induction de la tolérance au soi dans la médullaire thymique fait intervenir au moins deux populations de cellules, les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et les cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques (DC). Et, deux mécanismes, la délétion et l'induction de cellules T  $CD4^+$   $CD25^+$  régulateurs (Treg). Les mTEC sont compétentes de manière autonome pour supprimer les cellules T auto-réactives. Les mTEC sont aussi efficaces pour sélectionner des Treg spécifiques d'antigènes dont l'expression est limitée aux mTEC. En outre, la présentation croisée d'auto-antigènes dérivés des mTEC par les DC a été mise en évidence in situ et dans un modèle transgénique. De même, les CPA hématopoïétiques peuvent induire la sélection des cellules Treg. À l'heure actuelle, les différents types de cellules stromales qui contribuent à la présentation des antigènes ectopiques ne sont pas connus. La redondance apparente de présentation de l'antigène est cependant limitée par le flux unidirectionnel de l'antigène de mTEC aux DC. TSA=Ag tissulaire ; mTEC=cellule épithéliale médullaire ; AIRE=auto-immunregulator

### **I.1.r.ii Tolérance périphérique**

La présentation d'une grande variété d'antigènes du soi permet donc de sélectionner négativement les lymphocytes T auto-spécifiques. Cependant, tous les antigènes tissulaires ne sont pas exprimés dans le thymus ou, sont exprimés à des niveaux insuffisants pour induire la délétion de l'ensemble des cellules auto-réactives. Il existe donc en périphérie des lymphocytes T matures auto-réactifs (Peterson, DiPaolo et al. 1999 ; Bouneaud, Kourilsky et al. 2000). La mise en place de mécanismes de tolérance périphérique est donc nécessaire. Les lyT auto-réactifs peuvent être rendus tolérants de manière passive par anergie et par délétion ou, de manière dominante par l'action de cellules T dites régulatrices ou suppressives (figure 8).

#### **a. Tolérance périphérique passive**

##### **- *L'ignorance***

Le phénomène d'ignorance antigénique peut avoir lieu dans des sites dits "privilégiés", non accessibles aux cellules T auto-réactives tels que l'oeil ou les testicules (Niederhorn 2006). De plus, l'absence ou la faible expression de molécules du CMH de classe I à la surface des neurones et des cellules oculaires permet une protection de ces cellules vis-à-vis des CTL. Ce mécanisme est un point sensible de développement de l'auto-immunité, la levée de l'ignorance par exemple lors d'infections virales ou d'un traumatisme peut conduire au développement de maladies auto-immunes (Streiff 1955 ; Oldstone, Nerenberg et al. 1991).

##### **- *Tolérance périphérique par anergie des lyT***

L'anergie est un état d'inactivation fonctionnelle de la cellule T, qui devient réfractaire à toute re-stimulation par l'antigène (Schwartz 2003). Les lyT deviennent alors incapables de proliférer et de produire de l'Il-2. Bien que la simple absence de costimulation suffise à induire l'anergie *in vitro*, l'engagement de CTLA-4 semble être nécessaire pour permettre l'anergie des lymphocytes T naïfs *in vivo*. En effet, le blocage de CD80 et CD86 inhibe l'induction de tolérance et le blocage de CTLA-4 perturbe l'induction d'anergie (Perez, Van Parijs et al. 1997). La molécule PD-1, fortement exprimée sur les cellules anergiques, a également été reconnue pour son implication dans l'induction de l'anergie (Khoury and Sayegh 2004). Des souris déficientes pour cette molécule développent différents syndromes auto-immuns. Il a été suggéré que PD-1 fonctionne en inhibant la sécrétion de cytokines ou en induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Il a aussi été

montré que la phagocytose de corps apoptotiques par les DC induisait un état de tolérance (Steinman and Nussenzweig 2002). En effet les DC qui ingèrent des cellules apoptotiques n'évoluent pas vers un phénotype mature mais malgré tout acquièrent l'expression de CCR7 qui leur permet de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Gallucci, Lolkema et al. 1999 ; Hirao, Onai et al. 2000). Il y aurait donc une migration vers les ganglions lymphatiques de DC semi-matures incapables d'activer les lyT et donc potentiellement tolérogènes. Les DC jouent un rôle important dans la tolérance périphérique, mais les mécanismes restent mal connus. Elles agissent en induisant l'anergie ou la délétion des lyT (Steinman, Hawiger et al. 2003).

- ***Tolérance périphérique par délétion clonale des lyT***

La façon la plus directe de prévenir l'auto-immunité est l'élimination physique des lymphocytes T auto-réactifs (ou délétion). Les DC peuvent conduire à la mort des lyT par différents mécanismes :

- Mort cellulaire induite par activation (ou AICD pour « activation-induced cell death »), mécanisme mettant en jeu le système Fas/FasL. Un défaut d'AICD aboutit à l'expansion de cellules T auto-réactives. Chez les souris, le déficit d'expression de Fas ou de FasL conduit à une maladie auto-immune proche du lupus érythémateux (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992). Tandis que chez l'Homme, un défaut dans la signalisation induite par Fas est à l'origine d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS). Ce syndrome associe au défaut d'apoptose lymphocytaire, une lymphoprolifération non maligne et des phénomènes auto-immunitaires atteignant surtout les cellules sanguines avec de véritables auto-anticorps dirigés contre les hématies, les neutrophiles et les plaquettes (Fisher, Rosenberg et al. 1995).
- IDO : Les DC pourraient aussi par le biais d'une signalisation inhibitrice (passant par CD80 et CD86) induire l'activité de l'enzyme IDO (l'indoleamine 2,3-dioxygénase). IDO catalyse l'élimination du tryptophane, un acide aminé essentiel, et augmente la production de métabolites immuno-régulateurs (kynurénines) qui inhibent la prolifération des cellules T et induisent l'apoptose des cellules T activées (Terness, Bauer et al. 2002). Les DC CD123<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> peuvent acquérir l'expression d'IDO après stimulation avec de l'IFN $\gamma$  ou de la PGE2 ou après liaison avec CTLA-4 (Terness, Bauer et al. 2002 ; Braun, Longman et al. 2005 ; Fallarino,

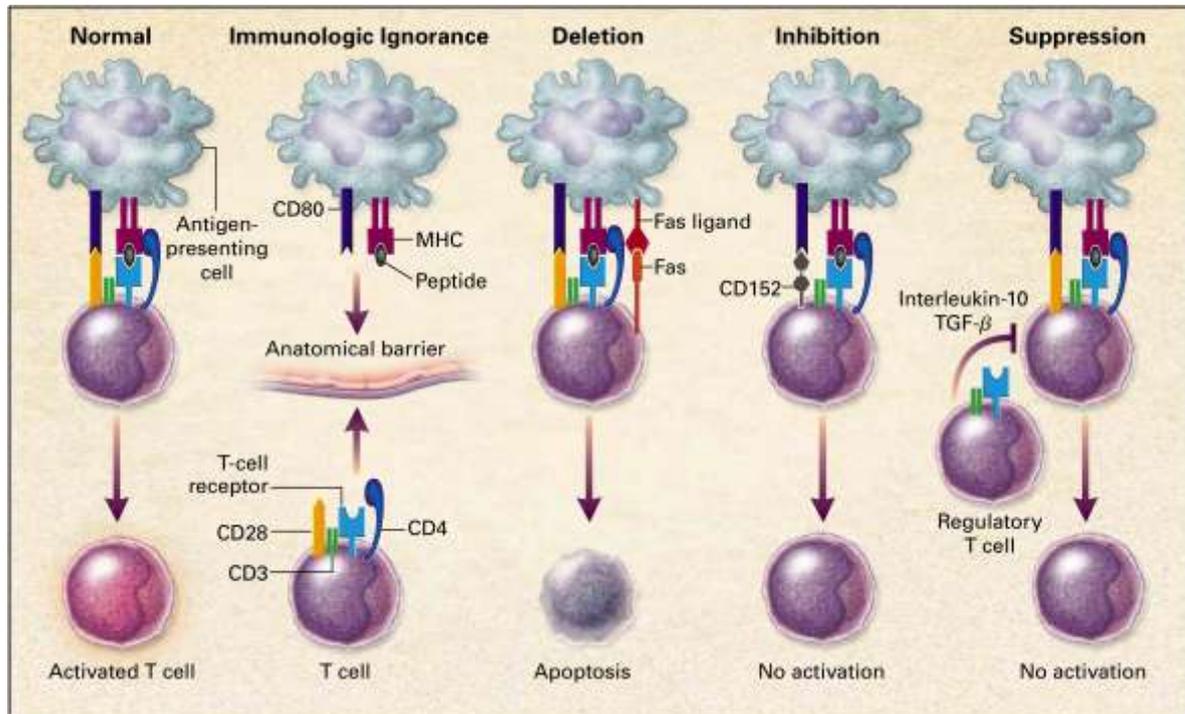
Grohmann et al. 2003 ; Mellor, Baban et al. 2003 ; Munn, Sharma et al. 2004). Il est intéressant de noter ici que l'expression d'IDO par les DC serait un des mécanismes de suppression des lymphocytes Treg. Chez l'homme les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices peuvent réguler les réponses des cellules T CD8<sup>+</sup> à travers l'induction de DC exprimant IDO (Munn, Sharma et al. 2004).

### **b. Tolérance périphérique dominante**

Contrairement aux autres mécanismes de tolérance périphérique, il s'agit d'un processus actif dans lequel une population de cellules contrôle ou régule l'activité d'une autre population. À l'heure actuelle, différentes populations de lymphocytes T avec des capacités régulatrices leur permettant de contrôler les réponses immunitaires normales et pathologiques ont été identifiées. Ces cellules jouent un rôle indiscutable dans la tolérance périphérique, notamment en prévenant le développement de maladies auto-immunes. Ces cellules T régulatrices sont classées selon deux catégories : les cellules induites et les cellules T régulatrices naturellement présentes dans l'organisme. Les cellules Treg naturelles sont originaires du thymus et font l'objet du prochain chapitre. Les cellules régulatrices induites acquièrent des fonctions régulatrices suite à une stimulation antigénique spécifique dans des milieux cytokiniques particulier. Elles se distinguent donc des Treg dit « naturels », comme une sous-population de cellules T distincte et spécialisée dans la fonction suppressive après induction. Ces cellules régulatrices induites comprennent les lymphocytes TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> sécréteurs d'IL-10 appelés Tr1, les cellules régulatrices T *helper* 3 (Th3), les cellules TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>, les cellules TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, les cellules *natural killers* T ou NKT (Hammond, Poulton et al. 1998 ; Lehuen, Lantz et al. 1998) et les cellules T $\gamma\delta$  (Girardi, Lewis et al. 2002 ; Jameson, Witherden et al. 2003). Les cellules Tr1 ont été décrites par le groupe de Roncarolo qui a montré que des cellules T CD4<sup>+</sup> murines activées en présence d'IL-10 se différencient en cellules régulatrices produisant de forts taux d'IL-10, capables d'inhiber la colite auto-immune (Roncarolo, Gregori et al. 2006). Les Th3 sont des cellules qui ont été identifiées initialement chez la souris, où l'administration orale de MBP les protégeait du développement de l'EAE (Chen, Kuchroo et al. 1994), puis chez l'homme (Fukaura, Kent et al. 1996). Elles sont caractérisées par leur forte production de TGF- $\beta$ . Les cellules dendritiques sont fortement impliquées dans la tolérance et dans l'induction des cellules régulatrices (Roncarolo, Levings et al. 2001). En effet, l'équipe de Yamazaki a montré

qu'en présence de  $TGF\beta$  les DC étaient capables d'induire la transformation de LyT  $CD4^+Foxp3^-$  en LyT  $CD4^+Foxp3^+$  (Yamazaki, Bonito et al. 2007).

**Figure 9 : Mécanismes périphériques d'induction de la tolérance**



D'après Kamradt et Mitchison (Kamradt and Mitchison 2001)

Sur cette figure sont représentés plusieurs mécanismes périphériques d'induction de la tolérance :

- **L'ignorance immunologique :** les cellules T sont séparées physiquement de leur antigène.
- **La délétion clonale par apoptose :** l'interaction entre les cellules T qui expriment FAS (CD95) et les CPA exprimant FAS ligand entraîne la mort par apoptose des cellules T.
- **L'anergie :** Une inhibition de l'activation peut-être obtenue après interaction entre CTLA-4 (CD152) du LyT et la molécule CD80 exprimée par la CPA.
- **Des cellules T régulatrices peuvent aussi inhiber ou supprimer d'autres cellules T.**

*Les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>*

Les cellules T régulatrices expriment le facteur de transcription *forkhead box P3* (FOXP3) et sont naturellement présentes dans le système immunitaire. Elles jouent un rôle considérable dans la tolérance périphérique des cellules T en contrôlant notamment l'effet potentiellement délétère des cellules T auto-réactives qui ont échappé à la délétion thymique. Elles sont donc indispensables pour le maintien de la tolérance au soi (Sakaguchi 2004). Leur dysfonctionnement entraîne des maladies auto-immunes qui peuvent être fatales (Bennett, Christie et al. 2001 ; Wildin, Ramsdell et al. 2001). Les cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> expriment le CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de IL-2). Elles peuvent supprimer l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des ly T, des cellules natural killer (NK) et des cellules NKT, des cellules B et des cellules présentatrices d'antigène *in vitro* et *in vivo* (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). C'est cette capacité unique de contrôle des réponses immunitaires qui fait des Treg un acteur central dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, de l'allergie ainsi que dans le maintien de la tolérance d'allogreffé et de la tolérance fœto-maternelle pendant la grossesse (Baecher-Allan, Wolf et al. 2006). D'un autre côté, les Treg peuvent aussi avoir des effets délétères en supprimant les réponses immunitaires antitumorales favorisant ainsi la progression des tumeurs.

## Origine et mécanisme d'action des Treg:

### **I.1.s. Développement des cellules Treg « naturelles »**

Avant la découverte et la caractérisation des cellules Treg naturelles (nTreg), la cause des maladies auto-immunes spontanées était attribuée un problème de tolérance centrale. Plusieurs études chez la souris et le rat thyméctomisés montrent que le thymus normal produit des cellules T caractérisées par leur fonction de prévention dans l'auto-immunité (Nishizuka and Sakakura 1969 ; Penhale, Irvine et al. 1976 ; Penhale, Stumbles et al. 1990; Fowell and Mason 1993). Chez l'homme, des thymocytes immatures FOXP3<sup>+</sup> ont été identifiés (Fattorossi, Battaglia et al. 2008 ; Tuovinen, Kekalainen et al. 2008 ; Tuovinen,

Pekkarinen et al. 2008 ; Lee and Hsieh 2009). Mais les exigences nécessaires au développement des cellules Treg thymiques chez l'homme sont peu connues. Le développement des nTreg commence *in utero* dans le thymus (Darrasse-Jeze, Marodon et al. 2005). Les cellules dendritiques activées par une lymphopoiétine thymique contribueraient à la sélection positive de thymocytes auto-réactifs et à leur transformation en cellules Treg FOXP3<sup>+</sup> matures (Watanabe, Wang et al. 2005 ; Liu, Soumelis et al. 2007).

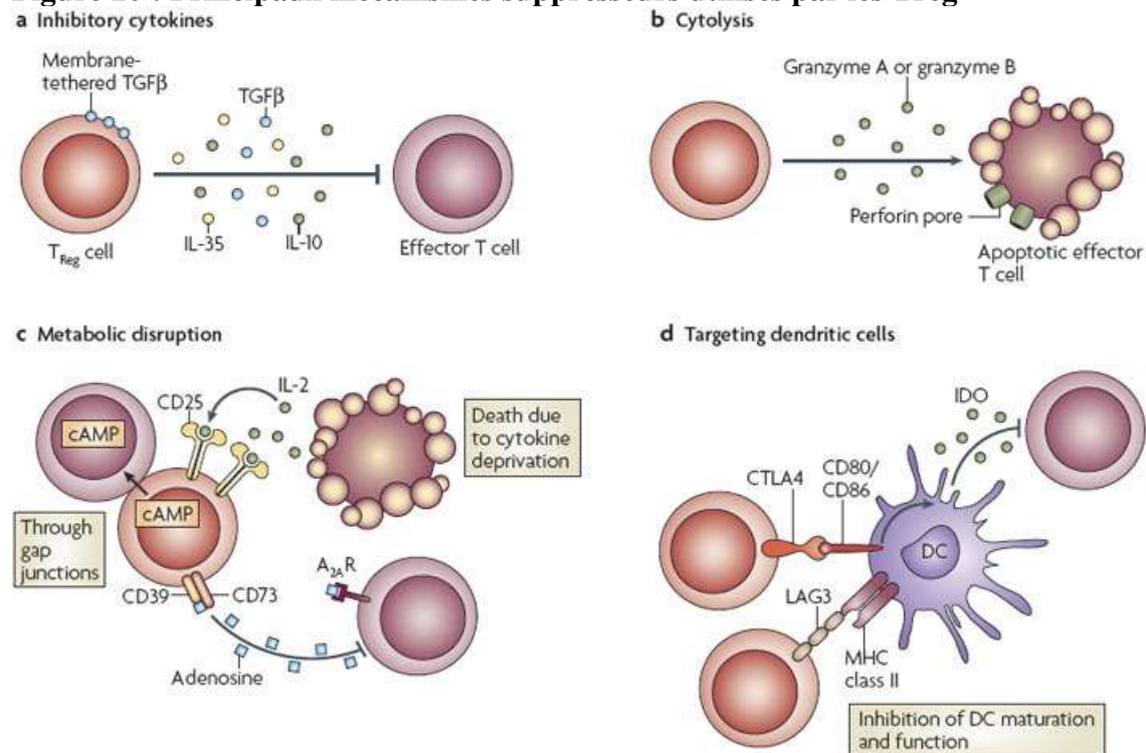
### **I.1.t. Les Régulateurs FOXP3 induits**

Chez l'homme les personnes âgées de plus de 70 ans possèdent un groupe de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> régulatrices fonctionnellement actif dans le sang, malgré l'involution du thymus (Vukmanovic-Stejic, Zhang et al. 2006). L'explication probable est la génération thymo-indépendante de Treg ou iTreg (Treg induit). Quand le gène FOXP3 est transduit dans des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, ces cellules acquièrent l'expression de CD25 et d'autres caractéristiques phénotypiques des nTreg ainsi que leurs capacités suppressives (Chen, Jin et al. 2003). Des études chez l'homme et chez la souris montrent que plusieurs cytokines sont nécessaires pour la production d'iTreg extra-thymique, les stimuli essentiels comprennent TGF- $\beta$ , l'IFN- $\gamma$ , ou la stimulation d'anticorps anti-CD3/CD28 antigène spécifique (Horwitz, Zheng et al. 2003). Chez l'homme, la mise en évidence ces iTreg FOXP3<sup>+</sup> se heurte aux manques de marqueurs spécifiques des Treg. Les iTreg ont donc des propriétés semblables aux nTreg générées dans le thymus. Les deux types de cellules sont anergiques, ne prolifèrent pas après stimulation du TCR et peuvent inhiber la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Il est donc admis que les Treg FOXP3<sup>+</sup> circulants sont issus de Treg naturels issus du thymus et de Treg induits issus de cellules FOXP3<sup>-</sup> périphériques. Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs permettant de les distinguer (Yamazaki and Steinman 2009). Ainsi, dans le travail effectué sur les vascularites, quand nous parlons de Treg, cela comprend donc probablement des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> régulatrices naturelles et induites (nTreg et iTreg).

### I.1.u. Mécanismes de suppression des Treg

L'activité suppressive des Treg nécessite une stimulation spécifique via le TCR et semble ensuite s'exercer essentiellement via des molécules membranaires de manière non spécifique (Sanchez-Fueyo, Sandner et al. 2006). Une étude de Caramalho *et al.* (Caramalho, Lopes-Carvalho et al. 2003) a montré que la stimulation *in vitro* des lymphocytes T régulateurs naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> par de fortes doses de LPS, *via* son ligand le TLR4, induisait leur prolifération et augmentait leur capacité suppressive, même sans CPA. Il a également été montré récemment que la protéine heat shock 60 pouvait stimuler la capacité suppressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> *via* le TLR2 (Zanin-Zhorov, Cahalon et al. 2006). Par conséquent, des signaux non spécifiques passant par les TLR pourraient aussi moduler l'activation et la fonction des cellules Treg. Les Treg peuvent supprimer leurs cibles soit par sécrétion de cytokines inhibitrices, soit par cytolysse directe des cellules cibles, soit par déprivation métabolique ou enfin, par modulation des DC (figure 10) (Vignali, Collison et al. 2008).

**Figure 10 : Principaux mécanismes suppresseurs utilisés par les Treg**



D'après (Vignali, Collison et al. 2008)

a. Sécrétion de cytokines inhibitrices IL-10, IL-35 et TGF- $\beta$

b. Cytolyse

c. Perturbation du métabolisme des effecteurs

d. Modulation des cellules dendritiques

### **a) Sécrétion de cytokines immunosuppressives**

Les Treg secrètent les cytokines immunosuppressives TGF- $\beta$  et IL-10 (Levings, Sangregorio et al. 2002 ; Dieckmann, Plottner et al. 2001). Cette propriété va à l'encontre du dogme qui distingue les Treg naturels des autres cellules régulatrices grâce leur mécanisme d'action contact-dépendant (Dieckmann, Plottner et al. 2001). Le blocage de ces cytokines par des Ac ainsi que l'utilisation de souris déficientes en IL-10 ou TGF $\beta$  ne permet pas de bloquer l'activité des Treg (Piccirillo, Letterio et al. 2002 ; Shevach 2002). Ces résultats montrent que le TGF $\beta$  et l'IL-10 auraient une place mineure dans les mécanismes de suppressions des Treg.

#### - L'IL-10

L'IL-10 est capable d'influencer la différenciation et les fonctions effectrices de la plupart des cellules immunitaires et elle est essentielle à leur efficacité dans le modèle murin de la gastrite auto-immune dans lequel les cellules TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> contrôlent la réponse immune par production d'IL10 (Asseman, Mauze et al. 1999 ; Suri-Payer and Cantor 2001). L'implication de l'IL-10 semble toutefois varier selon les pathologies. Cette implication pourrait être fonction de la composante inflammatoire induite par des pathogènes ou des agressions de l'environnement. En plus de son action inhibitrice sur les cellules T, l'IL-10 aurait un effet d'atténuation des fonctions des DC les rendant tolérogènes (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Une partie de l'effet de l'IL-10 pourrait également découler de l'induction de lyT Tr1. Les DC et les Tr1 ainsi induits produisent à leur tour de l'IL-10 et participeraient à une boucle d'amplification de la suppression (Kryczek, Wei et al. 2006).

#### - Le TGF $\beta$

La fixation du TGF $\beta$  à la surface des Treg a une importance cruciale dans la fonction des Treg (Nakamura, Kitani et al. 2001; Green, Gorelik et al. 2003). Le TGF $\beta$  intervient, entre autres sur la maturation des DC (Yamaguchi, Tsumura et al. 1997) et participe à la génération *de novo* de Treg à partir de lyT CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (Chen, Jin et al. 2003). De même que pour l'IL-10 une boucle amplificatrice d'un micro-environnement tolérogène pourrait faire suite à la sécrétion de TGF $\beta$  par les DC. Le TGF $\beta$  joue donc un rôle dans les mécanismes immunosuppresseurs des Treg soit par action indirecte en modulant l'activation des DC et en favorisant la synthèse de Treg induit, soit en agissant directement sur les cellules cibles.

- L'IL-35:

Plus récemment une nouvelle cytokine immunosuppressive est venue rejoindre l'IL-10 et le TGF- $\beta$  : l'IL-35 (Collison, Workman et al. 2007). L'IL-35 appartient à la famille de l'IL-12, son expression semble spécifique aux Treg (Collison, Workman et al. 2007 ; Gavin, Rasmussen et al. 2007). Une expression ectopique d'IL-35 confère une activité régulatrice et l'IL-35 recombinante supprime la prolifération des cellules T *in vitro* (Collison, Workman et al. 2007).

- les galectines

Les galectines, membres de la famille des lectines, ont très récemment été proposées comme nouvelles molécules suppressives employées par les Treg. Ainsi, la neutralisation de la galectine-1, diminuerait l'activité suppressive des Treg *in vitro* (Garin, Chu et al. 2007). La galectine-1 entraîne une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires, l'anergie, voire la mort cellulaire (Perillo et al, 1995 ; Rabinovich, Ariel et al. 1999).

**b) cytotoxicité**

Les Treg seraient doués de propriétés cytotoxiques et entraîneraient la mort des cellules T et des lyB effectrices par apoptose grâce à un mécanisme perforine/granzyme dépendant (Grossman, Verbsky et al. 2004 ; Gondek, Lu et al. 2005 ; Zhao, Thornton et al. 2006). Mais les Treg pourraient aussi exercer leur activité cytotoxique via la voie FAS/FASL (Strauss, Bergmann et al. 2009).

**c) Perturbation du métabolisme des effecteurs :**

Plusieurs mécanismes mettant en cause une perturbation du métabolisme des effecteurs sont décrits. Le premier est une consommation de l'IL-2 par les Treg qui expriment le récepteur de l'IL-2 de haute affinité. Cette consommation entraînerait une diminution de la transcription de l'IL-2 par les cellules cibles (Thornton and Shevach 1998; Dieckmann, Plottner et al. 2001). Dernièrement, une étude a montré que le TGF $\beta$  exerçait son action inhibitrice sur les premiers stades d'activation des cellules effectrices seulement en cas de déprivation de l'IL-2 (Wang, Khattar et al.). La déprivation d'IL-2 serait alors une condition nécessaire mais pas suffisante pour que les Treg puissent inhiber les lyT effecteurs.

Deux autres mécanismes faisant intervenir la libération d'adénosine ont été décrits. L'adénosine relarguée par les cellules apoptotiques lors de l'inflammation constitue un

mécanisme physiologique de rétrocontrôle sur les lyT activés qui expriment le récepteur A2A. Or, la coexpression des ectoenzymes CD39 et CD73 par les Treg permet la transformation de l'ATP en adénosine (Kobie, Shah et al. 2006 ; Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007 ; Deaglio, Dwyer et al. 2007). De plus, la fixation de l'adénosine à son récepteur entraînerait aussi la génération de Treg induites en inhibant l'IL-6 et en favorisant la sécrétion de TGF $\beta$  (Zarek, Huang et al. 2008). Ainsi, la production d'adénosine orienterait les lyT vers la voie régulatrice tout en inhibant les différenciations Th1 et Th17. L'adénosine pourrait aussi moduler l'activation des DC en faveur d'un phénotype tolérologique (Wilson, Ross et al. 2009).

#### **d) Modulation des cellules dendritiques**

Plusieurs études ont montré le rôle immunmodulateur que les Treg exercent sur les DC (Serra, Amrani et al. 2003 ; Misra, Bayry et al. 2004 ; Lewkowich, Herman et al. 2005 ; Houot, Perrot et al. 2006 ; Kryczek, Wei et al. 2006). Une étude chez la souris a montré le rôle crucial de CTLA-4 dans le mécanisme de suppression des Treg *in vitro et in vivo* (Wing, Onishi et al. 2008). CTLA-4 exprimé par les Treg, peut moduler l'expression de CD80 et CD86 sur les DC, et ainsi inhiber l'activation des cellules T effectrices (Cederbom, Hall et al. 2000; Paust, Lu et al. 2004). Chez l'homme il faut noter que seuls les Treg CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> expriment de haut niveau de CTLA-4 (Miyara, Yoshioka et al. 2009). L'utilisation d'Ac bloquant le CTLA-4 ou de Treg déficients en CTLA-4 entraîne une diminution de l'activité suppressive de ces Treg (Serra, Amrani et al. 2003) (Oderup, Cederbom et al. 2006). De plus la liaison de CTLA-4 aux DC, induit l'expression d'IDO par ces dernières, qui *via* la déplétion en tryptophane et la synthèse de kynurénines contribue à la création d'un environnement inhibiteur (Fallarino, Grohmann et al. 2003; Mellor and Munn 2004). Les Treg pourraient aussi moduler les fonctions des DC par l'intermédiaire de LAG3 (pour « lymphocyte activation gene 3 »). LAG3 est un homologue de CD4 qui se lie avec une très forte affinité aux molécules de classe II du CMH et qui est nécessaire pour une activité optimale des Treg (Huang, Workman et al. 2004). Or, la liaison de LAG3 au CMH II des cellules dendritiques entraîne une suppression de la maturation et des propriétés stimulatrices des DC (Liang, Workman et al. 2008).

## **Conclusion**

Les Treg possèdent donc plusieurs mécanismes d'actions (cf. tableau 1) qui semblent s'adapter au microenvironnement et à la spécificité de leurs cibles cellulaires. L'importance de la composante inflammatoire et la rapidité de la progression de la pathologie peuvent notamment influencer les mécanismes à mettre en jeu.

**Tableau 1 : Mécanismes de suppression des Treg**

MOLECULE(S)	FONCTION
<i><b>Mécanismes de suppression contact dépendant</b></i>	
CTLA4 (CD152)	Régulation à la baisse des signaux de co-stimulation des DC Interaction avec CD80 et CD86 sur les cellules T conventionnelles
CD73–CD39	Hydrolyse de l'ATP extracellulaire
LAG3	Induction de signaux inhibiteurs par les molécules de classe II du CMH
Granzyme B (souris) et granzyme A (homme)	Lyse des cellules T conventionnelles
CD95–CD95 ligand	Induction de l'apoptose des cellules T conventionnelles
<i><b>Mécanismes de suppression médiés par les cytokines</b></i>	
TGFβ et LAP	Induction de FOXP3 dans les cellules T conventionnelles
IL-10	Atténuation de la fonction des DC Conversion des cellules T conventionnelles en cellules T <sub>R</sub> 1
Galectine1	Arrêt du cycle cellulaire et apoptose des cellules T conventionnelles
CD25	Adsorption de l'IL-2
IL-35	Induction d'IL-35 par les cellules T conventionnelles

**D'après Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Miyara *et al.* 2010)**

## Phénotype des Treg

L'identification des Treg *in vitro* reste sujet à controverse. Les Treg n'ont pas un phénotype unique et clairement défini. La recherche de marqueurs caractéristiques des Treg fait suite aux travaux publiés chez la souris qui ont montré que les Treg de souris expriment de manière constitutive la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (IL2R $\alpha$  = CD25) (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Plusieurs études, cette fois-ci chez l'homme ont caractérisé les Treg comme des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Dieckmann, Plottner et al. 2001 ; Levings, Sangregorio et al. 2001 ; Taams, Vukmanovic-Stejic et al. 2002). Mais chez l'homme, seules les cellules exprimant fortement le CD25 (CD25<sup>high</sup>) possèdent des propriétés suppressives (Baecher-Allan, Brown et al. 2001), alors qu'un niveau d'expression intermédiaire correspond aux cellules activées. Ainsi, contrairement aux Treg murins il n'est pas possible d'identifier les Treg humains avec CD25 comme unique marqueur. Le facteur de transcription FOXP3 apparaît comme le marqueur le plus spécifique (Bettini and Vignali 2010). Régulièrement de nouveaux marqueurs des Treg sont découverts mais ils ne sont pas exclusifs des Treg. Les marqueurs exprimés par les Treg sont récapitulés dans le tableau 2 (Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Les marqueurs FOXP3, GITR et CTLA-4 sont aussi exprimés par les T activés (Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Les Treg peuvent être caractérisés par l'absence ou le faible niveau d'expression de CD127, la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL7 (Codarri, Vallotton et al. 2007). L'absence de CD127 semble être un bon marqueur, car l'expression de CD127 est inversement corrélée avec l'expression de FOXP3 et la fonction suppressive des Treg (Liu, Putnam et al. 2006). Mais, CD127 ne peut pas être utilisé seul parcequ'il est diminué après activation (Mazzucchelli and Durum 2007 ; Aerts, Dombrecht et al. 2008). Le CD62L pourrait être utilisé en complément du CD25 et du CD127. En effet, même si ce marqueur n'est pas exclusif des Treg, son expression sur les cellules conventionnelles T CD4<sup>+</sup> activées est faible (CD62L<sup>low</sup>). Ainsi les Treg peuvent être définies comme des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup>CD62L<sup>+</sup> (Hamann, Klugewitz et al. 2000 ; Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

**Tableau 2 : Marqueurs des Treg**

<i>Facteur de transcription</i>	<i>Activation et mémoire</i>	<i>Homing et origine</i>	<i>Fonctions suppressive et effectrice</i>	<i>Apoptose, survie et autres</i>
FOXP3	CD45RA CD45RO CD25 HLA-DR absence de CD127 CD69	CD62L CCR4 CCR6 CCR9 CD103 CD304 CD31 absence de CD49d	CTLA4 ICOS CD39–CD73 LAP Granzyme B Galectin 1 Galectin 10 TRANCE CD80 and CD86 IL-10 IL-17 CD2 Lack of IL-2	CD27 OX40 CD95 PD1 GITR Galectin 3 GARP MS4A4B IL-1R CD6
CCR : CC-chemokine receptor; CTLA4 : cytotoxic T lymphocyte antigen 4; FOXP3 : forkhead box P3; GARP, glycoprotein A repetitions predominant; GITR : glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein; ICOS, inducible T cell co-stimulator; LAP, latency-associated peptide; MS4A4B, membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B; PD1, programmed cell death 1; R, receptor; TRANCE, TNF-related activation-induced cytokine				

D'après Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Miyara *et al.* 2010)

## Différentes sous populations de Treg

Parallèlement à la recherche de marqueurs spécifiques, des travaux ont montré que les Treg forment une population hétérogène et régulièrement, de nouveaux sous-groupes fonctionnels sont identifiés.

Ainsi LAP (Latency-associated peptide) est retrouvé sur les Treg qui expriment de fort niveau de FOXP3, GITR et CTLA-4 (Chen, Yan *et al.* 2008), et permet de distinguer un sous-groupe de Treg qui exprime le TGF $\beta$ . Ce sous-groupe a un pouvoir de suppression important dans les modèles d'EAE (Encéphalite expérimentale auto-immune).

Toujours dans l'EAE, des Treg exprimant le CCR6 s'accumulent dans le système nerveux central des souris malades. Ces Treg CCR6<sup>+</sup> sont minoritaires en périphérie et pourraient avoir un rôle important dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau des tissus inflammatoires (Kleinewietfeld, Puentes *et al.* 2005).

L'ectoenzyme CD39 permet aussi de distinguer un sous-groupe de Treg CD39<sup>+</sup> qui seraient capables de supprimer l'activation des Th17 contrairement aux Treg n'exprimant pas le CD39 (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007 ; Mandapathil, Lang et al. 2009). Or, cette sous population de Treg CD39<sup>+</sup> est très diminuée dans la SEP au moment des poussées (Fletcher, Loneran et al. 2009).

### **Treg naïfs et Treg effecteurs :**

Plusieurs études montrent que l'utilisation de CD45RA et de CD45RO serait particulièrement intéressante combinées au CD25 et à l'expression de FOXP3 pour distinguer des Treg dit naïfs (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>) des Treg dit effecteurs (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) (Valmori, Merlo et al. 2005; Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006 ; Miyara, Yoshioka et al. 2009). Les Treg naïfs possèdent aussi des fonctions suppressives et sont caractérisées par un niveau faible d'expression de FOXP3, ce sont des cellules CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>low</sup> (Fritzsching, Oberle et al. 2006 ; Miyara, Yoshioka et al. 2009). Après stimulation via leur TCR, elles se convertissent en cellules Treg effectrices à forte activité suppressive *in vitro* CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>high</sup> (Miyara, Yoshioka et al. 2009). Ces cellules Treg effectrices ont les caractéristiques de cellules récemment activées et leur prévalence augmente chez l'adulte et les personnes âgées contrairement aux cellules Treg naïves qui prédominent *in utero* (Sakaguchi, Miyara et al. 2010). L'expression de HLA-DR permet de distinguer, les Treg effecteurs HLA-DR<sup>+</sup> qui sont plus efficaces pour la suppression *in vitro*, de celles qui ont perdu l'expression de HLA-DR et qui se différencient vers un stade Treg effecteurs terminal (Baecher-Allan, Wolf et al. 2006).

## **Rôle des Treg dans la prévention des MAI**

Chez l'homme, la mutation du gène FOXP3 est à l'origine d'un syndrome auto-immun polyviscéral de transmission récessive liée à l'X associant une maladie auto-immune polyendocrinienne, une entéropathie inflammatoire et un terrain allergique (syndrome de l'IPEX pour « immune disorder polyendocrinopathy enteropathy X linked syndrome ») (Powell, Buist et al. 1982 ; Bennett, Christie et al. 2001; Wildin, Ramsdell et al. 2001). Dans le syndrome d'IPEX, les taux de Treg sanguin restent normaux et c'est un déficit

fonctionnel qui est à l'origine des signes cliniques plus qu'un défaut de différenciation des Treg (Bacchetta, Passerini et al. 2006). Chez ces patients, la greffe de moelle allogène entraîne une correction des dysfonctionnements et la guérison clinique ainsi qu'une régénération de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Wildin, Smyk-Pearson et al. 2002; Zhan, Sinclair et al. 2008).

De plus, plusieurs défauts fonctionnels et/ou quantitatifs ont été observés dans différentes maladies auto-immunes. Dans le diabète de type 1, un déficit fonctionnel des Treg a été observé (Lindley, Dayan et al. 2005). Une étude récente montre que la réversion du diabète par l'IL-2 chez les souris NOD, passe par une augmentation des Treg au niveau du pancréas (Grinberg-Bleyer, Baeyens et al. 2010). Dans la maladie de Kawasaki, un déficit quantitatif accompagné d'une diminution de l'expression de FOXP3 a été observée en phase aiguë de la maladie (Furuno, Yuge et al. 2004). Dans l'arthrite juvénile, il a été démontré que les formes les plus sévères s'associaient à un nombre réduit de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et que ces cellules avaient un déficit fonctionnel (de Kleer, Wedderburn et al. 2004). Dans la SEP, si les Treg sont identifiées comme des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> elles présentent un déficit fonctionnel, alors que lorsqu'elles sont identifiées comme T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> elles ont les mêmes capacités suppressives que les Treg de témoins (Michel, Berthelot et al. 2008). Dans la polyarthrite rhumatoïde, les études quantitatives ne vont pas toutes dans le même sens. Une majorité des études ne montre pas de différences significatives du nombre de Treg circulants (Cao, Malmstrom et al. 2003 ; Ehrenstein, Evans et al. 2004 ; van Amelsfort, Jacobs et al. 2004 ; Aerts, Dombrecht et al. 2008). Par contre, une augmentation du nombre de Treg dans le liquide synovial, accompagné d'un déficit fonctionnel est retrouvée dans plusieurs études (van Amelsfort, Jacobs et al. 2004 ; Mottonen, Heikkinen et al. 2005 ; Lawson, Brown et al. 2006). De plus, dans la PR, il a aussi été observé une résistance des cellules effectrices circulantes à la suppression exercée par les Treg (van Amelsfort, Jacobs et al. 2004). Dans cette pathologie le TNF est surexprimé et les traitements par anti-TNF ont fait leur preuve. Or il a été montré, que sous l'action du TNF, les Treg des patients expriment moins de FOXP3 et que cette diminution entraîne une diminution de l'activité suppressive des Treg (Valencia, Stephens et al. 2006). Chez l'homme, la mise en évidence des mécanismes par lesquels le déficit des Treg joue un rôle dans la physiopathologie du lupus est sujet à controverse. Les études quantitatives sur les Treg donnent des résultats divergents. Les premières études, dans lesquelles les Treg sont identifiés par cytométrie comme CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont montré une diminution (Crispin,

Martinez et al. 2003 ; Fathy, Mohamed et al. 2005 ; Yang, Lu et al. 2005 ; Lee, Wang et al. 2006). Par la suite plusieurs équipes ont signalé une diminution du pourcentage des cellules  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  (Liu, Wang et al. 2004 ; Miyara, Amoura et al. 2005; Mellor-Pita, Citores et al. 2006; Barath, Aleksza et al. 2007; Lyssuk, Torgashina et al. 2007; Valencia, Yarboro et al. 2007; Bonelli, von Dalwigk et al. 2008; Lee, Hong et al. 2008). Quatre de ces groupes ont montré une corrélation inverse entre le pourcentage de cellules  $CD4^+CD25^+$  et l'activité de la maladie (Miyara, Amoura et al. 2005; Valencia, Yarboro et al. 2007; Bonelli, von Dalwigk et al. 2008; Lee, Hong et al. 2008). Deux groupes ont révélé une augmentation des cellules  $CD4^+CD25^{high}$  chez les patients lorsque la maladie en phase de rémission (Miyara, Amoura et al. 2005; Lin, Chen et al. 2007). Les corticoïdes influenceraient aussi le nombre de Treg en les augmentant. (Suarez, Lopez et al. 2006 ; Yates, Whittington et al. 2008). Etant donné que le nombre total de cellules T chez les patients atteints de LED actif est diminué, le nombre absolu de cellules  $CD4^+CD25^{high}$  circulantes devrait être diminué. Malgré tout, des études récentes rapportent le contraire : le nombre de cellules Treg chez des patients lupiques serait similaire à celui de témoins sains (Alvarado-Sanchez, Hernandez-Castro et al. 2006; Venigalla, Tretter et al. 2008; Yates, Whittington et al. 2008). Enfin un troisième groupe montre que bien que le pourcentage de cellules  $CD4^+CD25^{high}$  chez les patients atteints de LED actif soit normal, le nombre relatif (par rapport aux cellules effectrices) de ces Tregs est en fait diminué en raison d'une expansion des Lymphocytes T effecteurs (Zhao, Li et al. 2008). La fonction suppressive des Treg a aussi été largement étudiée dans le LED et donne aussi des résultats contradictoires. Certaines études ont trouvé que cette fonction était altérée (Lyssuk, Torgashina et al. 2007; Valencia, Yarboro et al. 2007 ; Bonelli, von Dalwigk et al. 2008 ; Venigalla, Tretter et al. 2008). Dans la majorité des cas le déficit était attribué aux Tregs, mais un groupe a signalé une résistance accrue des T effecteurs à la suppression (Venigalla, Tretter et al. 2008).

Aujourd'hui, il semble clair que les lymphocytes Treg jouent un rôle dans la physiopathologie des MAI. Mais l'ensemble de ces résultats montrent qu'il est difficile d'explorer quantitativement et qualitativement les Treg dans l'auto-immunité. En effet, de nombreux paramètres influencent ces résultats. Certains sont intrinsèques aux patients (traitement immunosuppresseurs, stade de la maladie) et d'autres sont dépendants des conditions expérimentales. Les divergences de résultats entre les différentes études peuvent s'expliquer par des différences de marquage et de définition des cellules Treg. Certaines études ont été faites en tenant compte de la totalité des  $CD4^+CD25^+$ . Or, il a été

montré que l'activité suppressive des Treg et l'expression de FOXP3 se trouvait dans la fraction CD25<sup>high</sup> de ces cellules. Le problème est qu'il n'existe pas de marqueur unique permettant de définir les Treg.

### *Physiopathologie des vascularites à ANCA*

## **Introduction**

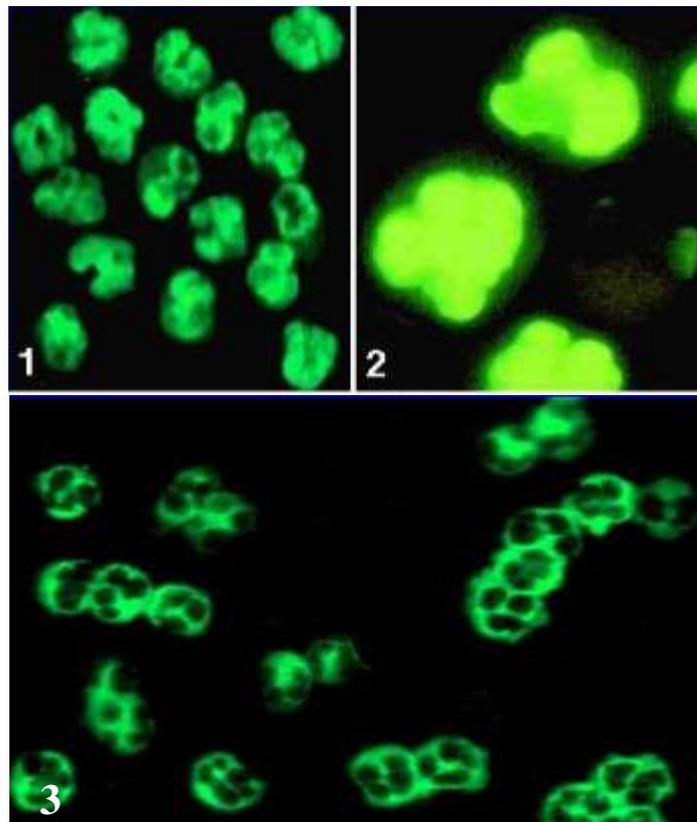
Les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) constituent un groupe d'affections systémiques caractérisées par une atteinte inflammatoire et nécrosante des vaisseaux de petit calibre. Les vascularites associées aux ANCA (VAA) sont les vascularites des petits et moyens vaisseaux les plus répandues chez l'homme. En Europe et aux Etats-Unis, l'incidence annuelle est de 1 à 5 cas pour 100 000 habitants (de Lind van Wijngaarden, van Rijn et al. 2008). Ces vascularites à ANCA sont des maladies auto-immunes caractérisées par des auto-anticorps, dirigés contre les constituants cytoplasmiques des neutrophiles (Kallenberg, Brouwer et al. 1994). Elles conduisent à une occlusion des vaisseaux et à des lésions potentiellement importantes dans de nombreux organes (Jennette and Falk 1997). Ces vascularites regroupent trois maladies majeures : la granulomatose de Wegener (GW), la polyangéite microscopique (PAM) et le syndrome de Churg-Strauss (SCS).

## **Les Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles**

Les ANCA ont été découverts par hasard en 1982 par *Davies et al* (Davies, Moran et al. 1982). Alors qu'ils étudiaient les anticorps antinucléaires, par immunofluorescence indirecte (IFI), dans des sérums de patients atteints de glomérulonéphrite nécrosante segmentaire, ils ont observé sur des frottis de neutrophiles une image cytoplasmique diffuse, mais non nucléaire. En 1985, l'équipe de van der Woude constate que les ANCA cytoplasmiques sont produits principalement chez des patients avec une granulomatose de Wegener (van der Woude, Rasmussen et al. 1985). Puis c'est en 1988, que Falk et

Jennette retrouvent dans le sérum d'un patient atteint de vascularite systémique idiopathique et d'une glomérulonéphrite nécrosante en croissant, des ANCA avec une image périnucléaire dont la cible antigénique est la myéloperoxydase (MPO) (Falk and Jennette 1988). Deux ans plus tard, la protéinase 3 (PR3) a été reconnue comme l'auto antigène majeur dans les WG avec des ANCA de type cytoplasmique (Jennette, Hoidal et al. 1990; Pettigrew 1990). Aujourd'hui il existe plusieurs études qui montrent que les ANCA sont directement impliqués dans la pathogénie des VAA. Au total, les ANCA sont donc dirigés contre des composants des granules primaires des neutrophiles et des monocytes : la protéinase 3 (PR3) et la myéloperoxydase (MPO). Il existe d'autres cibles antigéniques qui sont accessoires : l'élastase, la cathepsine G, la BPI (pour *bactericidal permeability increasing*), la lactoferrine et LAMP-2 (Kain, Matsui et al. 1995). Deux types de marquages sont reconnus en immunofluorescence indirecte sur frottis de PNN: une image cytoplasmique (cANCA) et une image périnucléaire (pANCA) (Figure 11). L'image périnucléaire est un artefact dû à une réorganisation des composants du PNN suite à la fixation à l'éthanol. En effet, la fixation des neutrophiles dans l'éthanol perméabilise les membranes des organelles intracellulaires et entraîne le déplacement des composés chargés positivement (comme la MPO) vers la membrane nucléaire chargée négativement. Grâce à cet artefact, les anti-MPO et les anti-PR3 donnent deux images différentes en IFI, respectivement pANCA et cANCA. L'identification de la cible antigénique MPO ou PR3 se fait par des techniques immuno-enzymatiques. Dans la GW, les ANCA sont le plus souvent de fluorescence cytoplasmique et de spécificité anti-PR3; ils sont présents dans plus de 80 % des cas en phase active, et sont des marqueurs de la maladie. Dans la polyangéite microscopique, ils sont généralement de spécificité anti-MPO avec une image de p-ANCA (Hoffman and Specks 1998). En plus de la spécificité des ANCA, l'affinité de ces ANCA pour leur cible est importante. Ainsi, Yoshida et al ont montré que les anti-MPO peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur affinité, élevée ou basse et que l'importance de l'affinité corrélait avec l'activité de la maladie (Yoshida, Sasaki et al. 2009).

**Figure 11 : Aspect des ANCA sur frottis de PNN fixés à l'éthanol par immunofluorescence indirecte**



- Aspect pANCA (1 et 2) : La fluorescence est localisée soit sur la périphérie du noyau, soit sur la totalité du noyau. L'antigène reconnu par les pANCA est souvent la MPO.
- Aspect cANCA (3) : La fluorescence est localisée dans le cytoplasme des PNN, l'antigène est souvent la PR3. Ces anticorps sont très évocateurs de la granulomatose de Wegener.

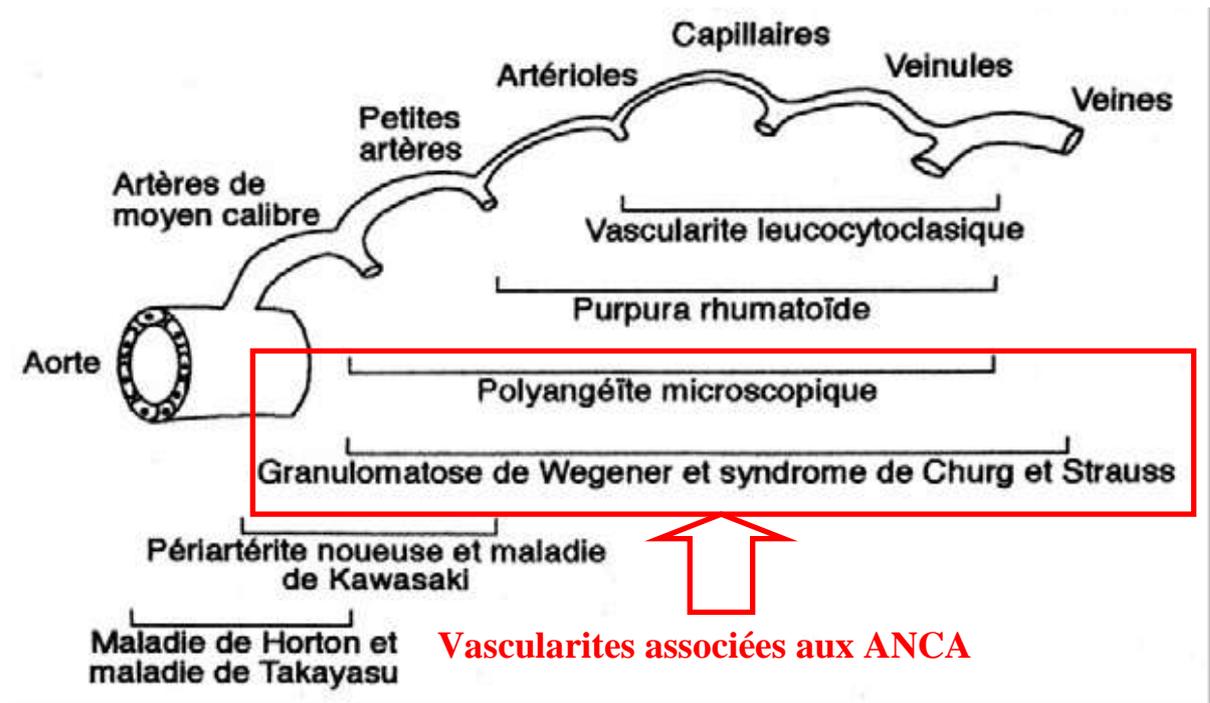
## Classification des vascularites

Les critères de classification pour les grandes formes de vascularites ont été établis par l'American College of Rheumatology (ACR) en 1990 (Hunder, Arend et al. 1990 ; Leavitt, Fauci et al. 1990). Ces critères sont fondés sur des données prospectives à partir d'une banque de données de 800 patients atteints de vascularite. Ils déterminent des caractéristiques cliniques, biologiques et histologiques qui peuvent aider à distinguer notamment la maladie de Wegener et le Syndrome de Churg et Strauss d'autres vascularites. Les critères proposés ne permettent pas de différencier parfaitement les différents types de vascularites des petits vaisseaux et notamment ne différencient pas un purpura rhumatoïde d'une maladie sérique. En 1994, la Conférence de Consensus de Chapel Hill propose de nouveaux critères de nomenclature des vascularites systémiques et établit officiellement le concept de la polyangéite microscopique (PAM). Cette nomenclature est basée sur des données anatomopathologiques et cliniques. Elle identifie trois groupes selon la taille des vaisseaux les plus souvent touchés (Jennette, Falk et al. 1994 ; Jennette and Falk 1997) (figure 12). Cependant dans une même maladie il peut y avoir des chevauchements importants de la taille des vaisseaux touchés. Ce consensus ne prend pas en compte les données immunologiques, en particulier la présence d'ANCA. Les vascularites à ANCA sont classées dans le groupe des « vascularites des petits vaisseaux » atteignant les petites artères, les artérioles et les capillaires. Dans ce groupe, l'atteinte rénale est très fréquente et constitue un élément de gravité de la maladie. C'est le résultat de la biopsie rénale et la présence d'ANCA qui permet de distinguer deux sous groupes de vascularites des petits vaisseaux : un premier groupe de vascularites avec dépôt de complexes immuns, sans ANCA, qui comprend les cryoglobulinémies mixtes, les vascularites lupiques et le purpura rhumatoïde, et un deuxième qui comprend les vascularites sans dépôts glomérulaires, avec des ANCA, appelées aussi vascularites « pauci-immune ». Les derniers critères de classification validés par l'agence de médecine européenne tiennent compte des critères de l'ACR, de ceux de la conférence de consensus de Chapel Hill, de la présence d'ANCA et de marqueurs cliniques caractéristiques. Ces critères ont donné lieu à un algorithme qui permet une classification mais qui doit encore être révisé (Watts and Scott 2009).

Pour ce qui est du diagnostic, en pratique clinique il repose essentiellement sur l'interprétation rigoureuse des données anatomopathologiques dans un contexte clinique

évocateur où la présence d'ANCA vient conforter le diagnostic de VAA. L'activité de la maladie peut être quantifiée par le BVAS (pour « Birmingham Vasculitis Activity Score ») (Jayne, Rasmussen et al. 2003).

Figure 12 : Classification de Chapel Hill.



D'après Jenette *et al.* 1994

## **Clinique des VAA**

### **I.1.v. Manifestations communes aux VAA**

Les vascularites associées aux ANCA sont souvent graves et parfois fatales, elles doivent donc être diagnostiquées et traitées rapidement. Ces pathologies évoluent sous traitement en périodes de rémissions entrecoupées de rechutes. Il peut y avoir atteinte de plusieurs organes en même temps ou d'un organe isolé (cf. tableau 3). Les signes cliniques résultent de l'atteinte inflammatoire des différents organes, une VAA peut donc être suspectée chez tout patient présentant des signes cliniques d'une maladie multi-systémique tel que :

- Des signes cutanés qui traduisent la vascularite et qui sont en rapport avec la taille des vaisseaux intéressés.
- Des arthralgies qui peuvent être inaugurales.
- Des manifestations neurologiques, le plus souvent périphériques rarement centrales.
- Une atteinte musculaire.
- Une atteinte pulmonaire avec des infiltrats pulmonaires.
- Une atteinte rénale, caractérisée par une glomérulonéphrite nécrosante et proliférative extra-capillaire (Jennette, Falk et al. 1994), qui est une cause majeure d'insuffisance rénale terminale en l'absence d'instauration rapide de traitement.

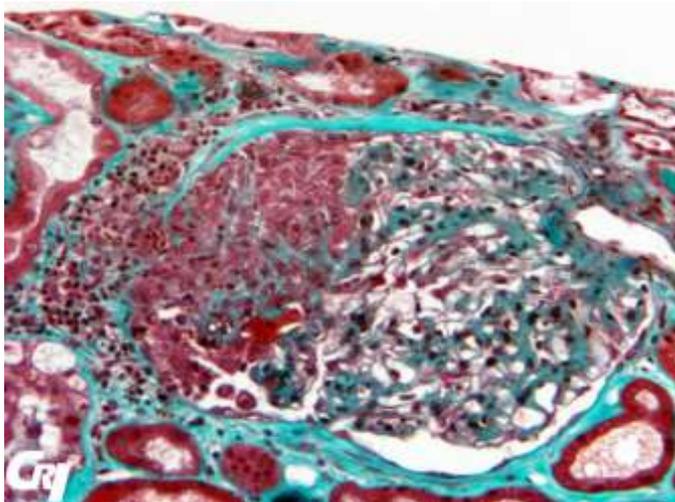
Les symptômes généraux (fièvre et amaigrissement) sont également communs.

### **I.1.w. La granulomatose Wegener**

C'est Friedrich Wegener qui réalisa l'étude détaillée de la maladie dans les années 1936-39 et qui donna son nom à la maladie. Cette vascularite est aussi appelée vascularite granulomateuse idiopathique (VGI). La maladie de Wegener est caractérisée par une granulomatose avec rhinite et néphropathie. Les signes d'appels peuvent être oto-rhino laryngés (ORL) (Angel, Chen et al. 2009) ou pulmonaires. Les manifestations ORL peuvent persister de façon isolée sans que le diagnostic de la maladie soit posé. C'est la survenue de nouvelles manifestations qui fait suspecter une GW. Ces signes ORL se manifestent le plus fréquemment par une sinusite ou une rhinite traînante et plus rarement

par des épistaxis ou une surdité. Des lésions de destruction osseuse peuvent être observées à ce stade. Les signes d'appel pulmonaires ne sont pas spécifiques et peuvent se manifester sous forme de toux, de dyspnée, de douleurs thoraciques ou d'hémoptysie, avec des nodules à la radiographie. L'atteinte pulmonaire, sous forme de capillarite alvéolaire nécrosante, peut mettre le pronostic vital en jeu en évoluant en hémorragie alvéolaire diffuse (Cordier, Valeyre et al. 1990). Les atteintes pulmonaires et ORL sont très souvent associées à une atteinte rénale. L'atteinte rénale caractérise la majorité des formes systémiques de la maladie et peut entraîner une glomérulonéphrite rapidement évolutive à la suite d'une glomérulonéphrite nécrosante en croissant pouvant conduire à une insuffisance rénale terminale (figure 13). Dans les formes généralisées de GW, les ANCA anti-PR3 sont présents dans 80 à 90 % des cas et les ANCA anti-MPO dans 10 % des cas (Hoffman, Kerr et al. 1992 ; Matteson, Gold et al. 1996). Les formes localisées de la granulomatose de Wegener sont habituellement limitées aux yeux, aux oreilles, au nez et aux poumons et les ANCA ne sont détectées que dans 60 % des cas. Histologiquement, la WG est caractérisée par une inflammation granulomateuse touchant les voies respiratoires et une vascularite nécrosante touchant les vaisseaux de petits et moyens calibres. Il est intéressant de noter que le pronostic dépend de l'atteinte clinique. Ainsi l'atteinte rénale à prédominance granulomateuse serait un facteur de mauvais pronostic, alors qu'une atteinte ORL avec une prédominance vasculaire serait un facteur de bon pronostic.

**Figure 13 :** Glomérulonéphrite nécrosante en croissant



**Image issue de la bibliothèque d'image du CRI rubrique VAA par Loïc Guillevin  
Biopsie rénale montrant une glomérulonéphrite extracapillaire avec un croissant cellulaire occupant une large place dans le glomérule.**

### **I.1.x. La polyangéite microscopique**

Dans la polyangéite microscopique, l'atteinte rénale est presque constante et caractérisée par une vascularite nécrosante pauci-immune des petits vaisseaux sans formation de granulomes (Savage, Winearls et al. 1985). Le spectre clinique est semblable à celui de la WG, bien que l'atteinte ORL et pulmonaire soit beaucoup moins fréquente, l'atteinte rénale peut donc être la seule manifestation. Environ la moitié des patients atteints de PAM développe des hémorragies pulmonaires induites par une capillarite alvéolaire nécrosante (Jayne 2004). La PAM est la cause la plus fréquente de syndrome pulmonaire et rénal. Les ANCA sont présents dans 60 % à 75 % des cas et ils sont essentiellement de type anti-MPO (Guillevin, Durand-Gasselin et al. 1999).

### **I.1.y. Le Syndrome de Churg-Strauss**

Le SCS est caractérisé par un asthme grave associé à une hyperéosinophilie sanguine et pulmonaire. La glomérulonéphrite rapidement progressive et l'hémorragie pulmonaire sont moins fréquentes que dans la GW et dans la PAM. Les caractéristiques histopathologiques typiques du SCS comprennent une hyperéosinophilie, une inflammation granulomateuse touchant les voies respiratoires et une vascularite nécrosante touchant les petits et moyens vaisseaux. L'histoire naturelle du SCS est caractérisée par trois stades cliniques : une phase prodromique composée d'un asthme sévère (99 % des patients), suivie par l'infiltration d'éosinophiles dans les tissus (par exemple, des infiltrats pulmonaires) et enfin, une vascularite systémique associée à des anticorps anti-MPO touchant essentiellement la peau, les reins et les nerfs périphériques en plus de l'éosinophilie périphérique et de l'asthme. Il peut y avoir une maladie granulomateuse lors de la troisième étape. Toutefois, les trois étapes peuvent survenir indépendamment les unes des autres. Le tableau clinique diffère selon la présence ou l'absence d'ANCA : les patients dépourvus d'ANCA présentent des manifestations liées à l'infiltration éosinophilique présente soit au niveau cardiaque avec une myocardopathie ou une péricardite, soit au niveau pulmonaire sous la forme de pleurésie éosinophilique (Sable-Fourtassou, Cohen et al. 2005). Les patients ayant des ANCA ont plus volontiers des manifestations directement liées à la vascularite : glomérulonéphrite, hémorragie alvéolaire, purpura. Les ANCA sont présents chez environ 40 % des patients, dans plus

de 75 % des cas ces ANCA sont dirigés contre la MPO, le reste étant dirigé contre la PR3 (Sinico, Di Toma et al. 2005).

**Tableau 3 : Manifestations cliniques, biologiques et histologiques des VAA.**

	Granulomatose de Wegener	Micropolyangéite	Syndrome de Churg-Strauss
ANCA Positivité Spécificité	80–90 % ANCA 90 % cANCA-PR3 10 % pANCA-MPO	50–70 % ANCA 80 % pANCA-MPO 10 % cANCA-PR3	35–45 % ANCA 75 % pANCA-MPO 10 % cANCA-PR3
Histologie	Vascularite nécrosante des petits vaisseaux Une atteinte des artères de moyen calibre est possible Inflammation granulomateuse	Vascularite nécrosante des petits vaisseaux Une atteinte des artères de moyen calibre est possible Absence de granulome	Vascularite nécrosante des petits vaisseaux Infiltrat vasculaire et tissulaire riche en éosinophiles Granulomes extra-vasculaires
Atteinte <b>ORL</b>	<b>80–90 %</b> Rhinorrhée chronique, croûteuse et sanglante, sinusite, ulcérations nasales ou buccopharyngées, perforation de la cloison nasale, affaissement de l'ensellure nasale, otite séreuse, perte d'audition, sténose sous glottique	<b>20–30 %</b> Ulcération buccale, épistaxis, sinusite	<b>50–80 %</b> Rhinite allergique, polypose nasale, sinusite, perte d'audition
Atteinte <b>pulmonaire</b>	<b>50–80 %</b> Infiltrat, nodules volontiers excavés, Hémorragie alvéolaire	<b>20–60 %</b> Infiltrat, hémorragie alvéolaire, épanchement pleural	<b>96–100 %</b> Asthme <b>40–70 %</b> Infiltrat fugace, pleurésie, hémorragie alvéolaire
Atteinte <b>rénale</b>	<b>50–80 %</b> Glomérulonéphrite extracapillaire, rares granulomes	<b>90–100 %</b> Glomérulonéphrite extracapillaire	<b>15–40 %</b> Glomérulonéphrite extracapillaire
Atteinte <b>cardiaque</b>	<b>10–20 %</b> Péricardite, valvulopathie, infarctus	<b>10–20 %</b> Péricardite	<b>20–45 %</b> Cardiomyopathie spécifique, péricardite
Atteinte <b>SNP</b>	<b>10–50 %</b> Multinévrite, polyneuropathie sensitivomotrice	<b>15–60 %</b> Multinévrite, polyneuropathie sensitivomotrice	<b>70 %</b> Multinévrite, polyneuropathie sensitivomotrice
Atteinte <b>SNC</b>	<b>10 %</b> Atteinte de paires crâniennes, masse, pachyméningite	<b>10 %</b> Atteinte ischémique encéphalique	<b>15 %</b> Atteinte du système nerveux central
Atteinte <b>articulaire</b>	<b>50–80 %</b> Arthralgies, arthrites	<b>30–70 %</b> Arthralgies, arthrites	<b>25–60 %</b> Arthralgies, arthrites
Atteinte <b>cutanée</b>	<b>30–60 %</b> Purpura, ulcérations, nodules granulomateux sous cutanés	<b>40–70 %</b> Purpura, papules, ulcérations	<b>50–80 %</b> Purpura, papules, ulcérations
Atteinte <b>oculaire</b>	<b>30–60 %</b> Sclérite, épisclérite, uvéite, pseudotumeur granulomateuse rétro-orbitaire	<b>20–30 %</b> Sclérite, épisclérite, uvéite	<b>10 %</b> Sclérite, épisclérite, uvéite
Âge moyen	47 ans	49 ans	47 ans
Sexe	54 % H	59 % H	51 % H
Éosinophilie	Rare	Absente	90–100 %

Manifestations cliniques, biologiques et histologiques des VAA à partir de plus de 1600 observations issues de littérature. D'après Puéchal (Puéchal 2007)

SNP : système nerveux périphérique ; SNC : système nerveux central.

### **I.1.z. Traitement des vascularites à ANCA**

Actuellement, les immunosuppresseurs combinés avec des corticoïdes forment la pierre angulaire du traitement des VAA. Ils sont choisis et adaptés en fonction de la maladie concernée, de la sévérité, de l'extension de la maladie et du terrain. Le traitement comporte deux phases, une phase d'induction qui doit être débutée en urgence afin de limiter les séquelles et dont le but est d'obtenir la rémission, puis un traitement d'entretien de limiter les rechutes. Pour les formes systémiques de GW et les cas de mauvais pronostic des PAM et de SCS la corticothérapie associée au cyclophosphamide permet d'assurer une rémission prolongée (Jayne, Rasmussen et al. 2003 ; Mukhtyar, Guillevin et al. 2009). Dans la GW, ces traitements permettent d'obtenir une rémission dans plus de 80 % des cas et entraînent une amélioration spectaculaire de la survie. Néanmoins 25 % des patients font des événements graves (infections, néoplasies) liés aux effets indésirables du traitement. Le taux de rechute à 5 ans est de 50 % dans la GW. Les rechutes menacent le pronostic vital à court terme et sont la source de séquelles viscérales irréversibles (Hoffman, Kerr et al. 1992). Des rechutes répétées de la maladie conduisent alors à une intensification des immunosuppresseurs toxiques. Malgré les progrès réalisés, grâce à la recherche clinique, la prise en charge de ces patients reste donc difficile. Cependant, l'avènement des immunosuppresseurs a apporté un regard nouveau sur cette maladie qui est passée d'une maladie d'évolution rapide et fatale, à une maladie chronique. Le problème majeur, à l'heure actuelle, étant la survenue des récurrences qui nécessitent la prolongation des immunosuppresseurs, et donc la survenue d'effets secondaires graves. Une récente étude faite au Royaume Unis montre une augmentation de la prévalence de la maladie de Wegener de 28.8 cas par million à 64.8 cas par million entre 1990 à 2005 malgré une incidence constante de la maladie (à 8.4 par million). Cette étude prouve que l'amélioration de la prise en charge de ces malades entraîne l'augmentation de leur durée de vie (Watts, Al-Taiar et al. 2009). La toxicité du cyclophosphamide a conduit à la recherche de nouveaux traitements. Ainsi en relais de ce dernier pour le traitement d'entretien, l'Azathioprine ou le methotrexate sont utilisés. De même, les immunoglobulines par voie intraveineuse peuvent être utilisées chez les malades en rechute (Jayne, Chapel et al. 2000 ; Ito-Ihara, Ono et al. 2006). En cas d'atteinte rénale sévère, des échanges plasmatiques sont également indiqués (Mukhtyar, Guillevin et al. 2009). De nouvelles biothérapies sont testées dans le cadre d'essais cliniques. Ainsi les anti-TNF semblent donner de bons résultats (Bartolucci, Ramanoelina

et al. 2002). Les anti-CD20 semblent eux aussi donner de bons résultats, notamment dans l'induction de rémission de vascularites réfractaires (Keogh, Wylam et al. 2005), et font actuellement l'objet de 4 essais cliniques indépendants (Mukhtyar, Guillevin et al. 2009). Les résultats de deux de ces essais comparant les effets du rituximab à ceux du cyclophosphamide administré par voie intraveineuse ou par voie orale, montrent une efficacité du rituximab comparable à celle du cyclophosphamide dans l'induction d'une rémission de la maladie. Le rituximab pourrait donc être utilisé en première ligne comme une alternative au cyclophosphamide pour induire une rémission dans les VAA. Cependant, l'utilisation combinée de rituximab avec les corticoïdes plus ou moins le cyclophosphamide doit encore être déterminée (Falk and Jennette ; Jones, Cohen Tervaert et al.; Stone, Merkel et al.). Ces résultats soulignent le fait qu'il manque encore aujourd'hui de bons marqueurs biologiques de rémission et de rechute. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des VAA permettrait d'identifier de nouveaux marqueurs, d'anticiper les rechutes et ainsi d'adapter le traitement immunosuppresseur de manière optimale, afin d'en limiter les effets secondaires.

## **Rôle des polynucléaires neutrophiles et des ANCA dans les VAA**

Les ANCA jouent un rôle effecteur déterminant dans la maladie. Ils sont capables d'entraîner l'activation des PNN qui peuvent exprimer à leur surface la MPO et la PR3 après une exposition à des cytokines pro-inflammatoires. Les ANCA sont principalement de sous-classe IgG1 et IgG4 (Brouwer, Tervaert et al. 1991 ; Clayton and Savage 2000). Plusieurs modèles animaux démontrent le rôle joué par les ANCA. Ainsi, l'injection de splénocytes de souris déficientes pour la MPO et immunisées avec de la MPO, à des souris sauvages ou déficientes pour le gène de recombinaison Rag (sans lymphocytes B ou T) entraîne un phénotype très proche de celui des vascularites à ANCA, avec des lésions granulomateuses pulmonaires, une glomérulonéphrite et des ANCA anti-MPO (Xiao, Heeringa et al. 2002). Le transfert d'immunoglobulines purifiées des souris immunisées entraîne également des lésions et ce modèle, est dépendant de l'activation du

complément et de la présence de neutrophiles (Xiao, Heeringa et al. 2005). Un tel modèle n'a toutefois pas été reproduit dans les vascularites avec anti-PR3 (Huugen, Tervaert et al. 2004). Chez la souris, le transfert d'ANCA murins anti-PR3 montre seulement une amplification de l'inflammation locale provoquée artificiellement par injection de TNF $\alpha$  (Pfister, Ollert et al. 2004).

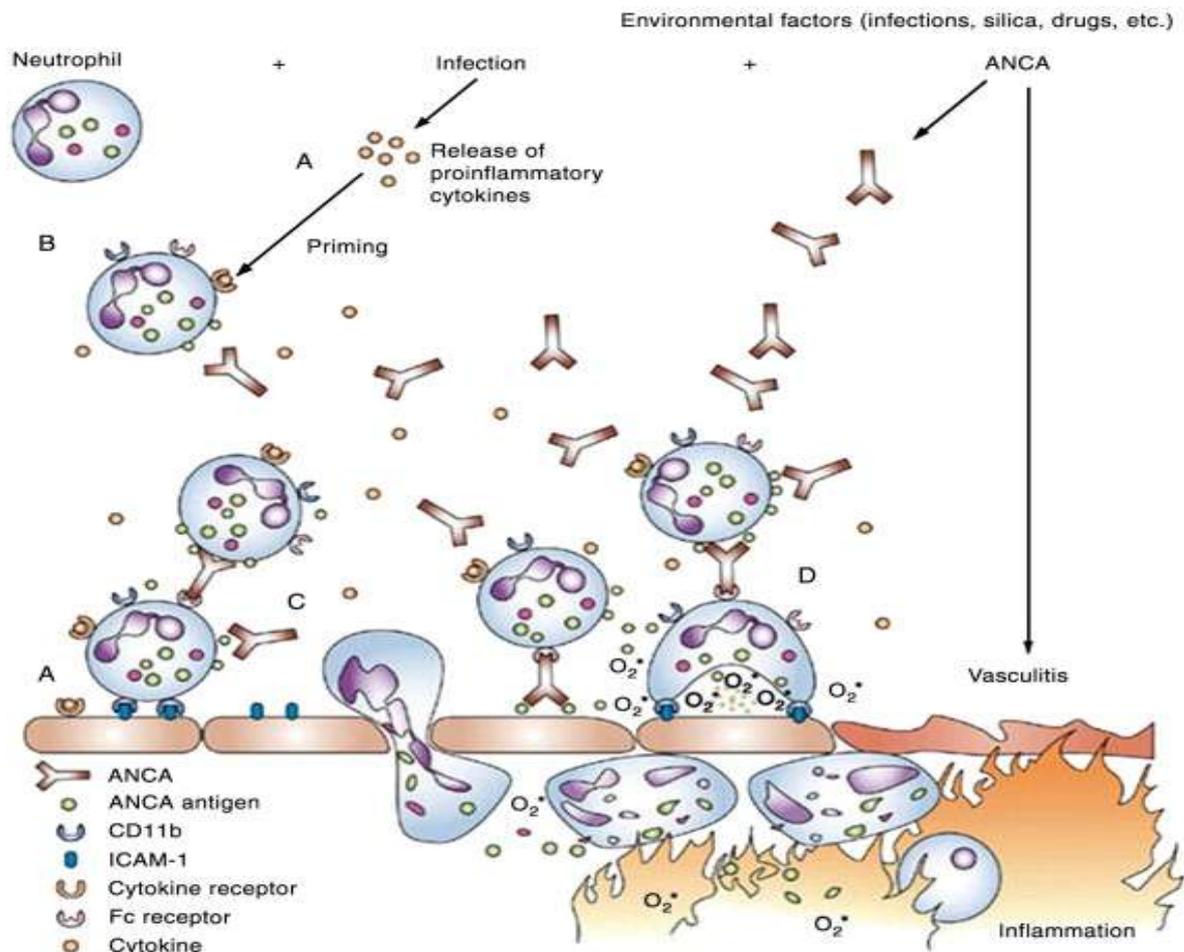
D'un point de vue clinique, les ANCA sont souvent reliés à l'activité de la maladie et aux rechutes (Tervaert, van der Woude et al. 1989). Chez les malades l'administration d'immunosuppresseurs à titre préventif, lors de l'augmentation du titre d'ANCA, permet de prévenir les rechutes (Kallenberg 2008). Mais ce point reste controversé (Tervaert, Huitema et al. 1990 ; Schmitt and van der Woude 2004 ; Finkielman, Merkel et al. 2007). Ainsi la diminution du taux d'ANCA n'est pas toujours associée à une rémission plus rapide et l'augmentation n'est pas toujours associée à une rechute (Finkielman, Merkel et al. 2007). De plus, les traitements par anti-CD20 entraînent une diminution du taux d'ANCA et une rémission maintenue de la maladie tant que les lymphocytes B sont absents (Keogh, Wylam et al. 2005). Chez l'homme un cas de transfert intra-placentaire d'ANCA anti-MPO d'une mère ayant une vascularite en phase active, vers son bébé, ayant entraîné chez celui-ci une hémorragie pulmonaire ainsi qu'une glomérulonéphrite, est sûrement la meilleure preuve *in vivo* du rôle pathogène des ANCA anti-MPO (Bansal and Tobin 2004).

Des études *in vitro* ont permis de montrer que la présence d'ANCA stabilise l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et favorise leur migration à travers les couches de cellules endothéliales (Radford, Luu et al. 2001 ; Calderwood, Williams et al. 2005). Puis, l'adhésion des PNN conduit au détachement et à la lyse des cellules endothéliales (Savage, Pottinger et al. 1992). Il a aussi été montré que les PNN expriment la PR3 et la MPO à leur surface lorsqu'ils sont activés avec de faibles doses de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Falk, Terrell et al. 1990). Les ANCA se lient d'une part à la PR3 et à la MPO, externalisées à la surface des PNN ainsi qu'aux récepteurs Fc (Mulder, Heeringa et al. 1994 ; Williams, Ben-Smith et al. 2003). Les PNN sont activés et produisent alors des radicaux oxygénés, relarguent des enzymes lytiques comme l'élastase et la PR3 et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Falk, Terrell et al. 1990 ; Harper, Cockwell et al. 2001 ; Hattar, Bickenbach et al. 2002 ; van Rossum, Rarok et al. 2004). De plus, le processus normal d'élimination des PNN par les phagocytes est altéré par les ANCA ce qui entraîne une nécrose au point de départ de l'inflammation (Harper, Ren et al. 2000 ; Harper, Cockwell et al. 2001). L'ensemble de ces résultats

montre que les PNN ont un rôle déterminant dans les VAA en tant que cellule effectrice. En présence de  $TNF\alpha$ , ils peuvent être activés par les ANCA, et s'accumuler au niveau de l'endothélium vasculaire (figure 14). Cette activation est à l'origine d'une cascade d'événements allant de l'inflammation des vaisseaux à une altération de l'endothélium vasculaire pouvant entraîner une nécrose et une atteinte de l'organe touché.

Les facteurs déclenchant la production d'ANCA ne sont pas encore connus. Le rôle d'épisodes infectieux précédents le déclenchement de la maladie est suggéré notamment dans la GW (Pinching, Rees et al. 1980). Une étude intéressante montre que *in vitro* les ANCA anti-PR3 ne seraient que de faibles activateurs directs des PNN et des monocytes mais, exerceraient un rôle important en favorisant et en potentialisant la réponse de ces leucocytes aux PAMP. Ceci, en entraînant l'augmentation de l'expression des PRR à leur surface. Ainsi les ANCA et les PAMP pourraient agir de concert en entraînant une exacerbation de la maladie au cours des infections et contribuer à la persistance des phénomènes inflammatoires (Uehara, Iwashiro et al. 2007).

**Figure 14 : Facteurs impliqués dans la pathogénie des vascularites à ANCA**



D'après Chen et Kallenberg (Chen and Kallenberg 2010)

Représentation schématique des facteurs qui sont potentiellement impliqués dans la pathogénie des VAA. Les facteurs environnementaux, tels que des agents infectieux, la silice et les drogues, peuvent induire le développement d'ANCA.

**A :** Les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ ) libérées, par exemple à la suite d'infections, entraînent l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence endothéliale.

**B :** Le priming des neutrophiles entraîne l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion des PNN et la translocation des Ag de leurs compartiments lysosomaux à la surface cellulaire.

**C :** L'engagement du complexe ANCA avec son antigène et les récepteurs Fc à la surface du PNN, entraîne l'activation des PNN, une augmentation de leur transmigration et augmente leur adhésion aux parois des vaisseaux.

**D :** Cet engagement peut aussi provoquer la libération de radicaux oxygénés par les PNN et entraîner leur dégranulation. La libération d'enzymes protéolytiques conduit à une vascularite.

# Importance des facteurs environnementaux dans la physiopathologie des VAA

## I.1.aa. Rôle des infections

### I.1.aa.i La piste du *Staphylococcus Aureus*

Dans les VAA et en particulier dans la GW une attention particulière a été apportée au *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*). Dans la GW, le portage nasal de *S. Aureus* est fréquent (63 % des patients contre 25 % des contrôles), et s'associe à un risque majoré de rechute (Stegeman, Tervaert et al. 1994 ; Popa, Stegeman et al. 2002). Une antibiothérapie préventive permet de réduire de 60 % le risque de rechute (Stegeman, Tervaert et al. 1996). Le mécanisme expliquant le lien entre *S. Aureus* et GW n'est pas clairement élucidé. Cela pourrait passer par un mécanisme de super antigène qui stimulerait les lyB ou T. En effet, 82 % des patients ayant une WG chronique ou intermittente sont porteurs de *S. aureus* et 72,5 % ont eut au moins une souche dans laquelle il est retrouvé un super antigène (Popa, Stegeman et al. 2007). De plus, la présence de la toxine TSST-1 (toxic-shock-syndrome toxin-1) spécifique de *S. aureus*, qui constitue un superantigène, est associée à un risque important de rechutes (Popa, Stegeman et al. 2007). Cependant il n'existe pas de biais du répertoire TCR V $\beta$  associé au portage du super antigène de *S. Aureus* (Popa, Stegeman et al. 2003). D'autres mécanismes peuvent être évoqués. Par exemple, il pourrait y avoir une stimulation polyclonale des lyB par des composants de la paroi bactérienne. *S. Aureus* pourrait aussi directement entraîner l'expression de la PR3 à la surface des PNN qui seraient alors la cible directe des ANCA (Kallenberg, Heeringa et al. 2006). Enfin, les enzymes cationiques (phosphatase) de *S. aureus*, qui peuvent se lier aux cellules endothéliales, notamment dans les glomérules, pourraient être à l'origine de lésions rénales. En effet, des Ac anti-phosphatase sont présents chez les patients atteints de GW, ils pourraient donc se lier aux dépôts de phosphatase dans le rein. De plus, chez le rat vacciné par la phosphatase, une perfusion rénale de cette enzyme entraîne de graves glomérulonéphrites nécrosantes qui sont comparables histopathologiquement aux lésions rénales des patients

atteints de GW (Brons, Bakker et al. 2000). Finalement, il a été récemment montré que l'immunisation par le peptide complémentaire de la PR3 pouvait induire des anticorps anti-PR3, et que ce peptide présentait une forte homologie avec certains peptides de *S. aureus*. Si ce mécanisme proche du mimétisme moléculaire intervient effectivement dans l'induction et l'entretien de l'auto-immunité dans les VAA, les raisons du développement d'une réponse anormale à un agent infectieux aussi ubiquitaire ne sont pas connues (Pendergraft, Preston et al. 2004). Par ailleurs, il a aussi été montré que chez les patients atteints de GW, la muqueuse du tractus respiratoire et les fonctions ciliaires respiratoires étaient altérées (Ullrich, Gustke et al. 2009 ; Laudien 2010). Cette altération pourrait favoriser la colonisation de *S. Aureus* (Laudien, Gadola et al. 2010). Ce qui modifierait la perception de la place de *S. Aureus* dans la physiopathologie des VAA, le plaçant plus comme une conséquence et non comme un phénomène déclenchant. Dans tous les cas la présence du *S. Aureus* dans le tractus respiratoire favorise et facilite l'inflammation chronique, ainsi que la formation de granulomes dans la GW.

#### **I.1.aa.ii La piste du bacille gram négatif**

En 1995 l'équipe de Kain a identifié de nouveaux ANCA anti-LAMP-2 (Lysosome-associated Membrane Proteine-2), détectés chez une majorité de patients atteints de glomérulonéphrite nérosante chez lesquels la présence d'ANCA (MPO ou PR3) était aussi retrouvée (Kain, Matsui et al. 1995). LAMP-2 est une protéine lysosomiale impliquée dans l'adhésion cellulaire et l'homéostasie. Plus récemment cette même équipe a mis en évidence, de façon élégante, dans un modèle de glomérulonéphrite nérosante, un mimétisme moléculaire entre le composant FimH de bactéries gram négatif et la protéine LAMP-2. LAMP-2 possède une homologie de 100 % avec l'adhésine bactérienne FimH, et les anticorps anti-LAMP-2 reconnaissent également cette protéine bactérienne (Kain, Exner et al. 2008). Chez le rat, l'injection d'ANCA anti-LAMP-2 ou du composant FimH induit une glomérulonéphrite nérosante et les Ac anti-FimH produits lors de cette immunisation reconnaissent la protéine LAMP-2 humaine (Kain, Exner et al. 2008). Cette découverte d'un mimétisme moléculaire entre la protéine LAMP-2 et le composant bactérien FimH suggère fortement l'implication des bactéries Gram négatif dans la pathogenèse des VAA.

### I.1.aa.iii La piste infectieuse

Une étude, qui consistait à mesurer de manière systématique les immunoglobulines dirigées contre un panel de virus et de bactéries chez des patients atteints de VAA, a montré une augmentation du titre d'Ig vis à vis de *Toxoplasma gondii*, du cytomégalo virus (CMV), de l'Epstein-Barr virus (EBV), du virus de l'hépatite C (HCV) et d'*Helicobacter pylori* chez les patients atteints de GW. Mais, pas de différence du taux d'Ig dirigé contre *Treponema pallidum* et le virus de l'hépatite B (HBV). Cette étude montre aussi un lien entre certaines localisations cliniques et le taux d'Ig contre certains virus : manifestations gastro-intestinales et CMV ; manifestations rénales et infection à EBV ancienne ; Manifestations ORL et infection à EBV récente (Lidar, Lipschitz et al. 2009). Cette étude suggère donc l'importance de l'implication des infections notamment HCV, *H. pylori*, *T.gondii*, CMV et EBV dans l'initiation et les exacerbations de VAA.

### I.1.bb. Place de l'exposition à la silice dans les VAA

Le lien avec l'exposition à la silice et les maladies auto-immunes est aujourd'hui démontré. Chez les hommes, le risque de développer une sclérodémie après une exposition prolongée à la silice est multiplié par 25 à 39, celui de développer un lupus est multiplié par 10 (D'Cruz 2000). De plus, il a été retrouvé des auto-anticorps chez les patients exposés à la silice (Otsuki, Maeda et al. 2007). Plusieurs études montrent un lien étiologique entre l'exposition à la poussière de silice et les vascularites à ANCA (Chevailler, Renier et al. 1991; Chevailler, Carrere et al. 1994 ; Neyer, Woss et al. 1994 ; Hogan, Satterly et al. 2001). Le potentiel toxique de la silice dans les vascularites à ANCA a été démontré par des études sur des modèles animaux. L'exposition aiguë à la silice chez des souris BALB.wt induit une apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques drainant la silice et dans les granulomes inflammatoires pulmonaires (Borges, Lopes et al. 2002). Dans ce modèle, le traitement in vivo par des inhibiteurs de caspases réduit l'afflux des PNN dans le tissu pulmonaire. Par conséquent, l'apoptose induite par la silice pourrait avoir un rôle important dans l'inflammation et provoquer des désordres immunologiques dans les ganglions lymphatiques régionaux drainant la silice. Chez des souris NZM (pour « New Zealand mixed » souris développant spontanément une maladie proche du LED) exposées à la silice Pfau *et al.* ont retrouvé des auto-anticorps qui reconnaissent des antigènes sur les cellules apoptotiques (Pfau, Brown et al. 2004). Il

est donc possible que l'accumulation de cellules apoptotiques dans un environnement inflammatoire conduise à la présentation d'auto-antigènes et à la production d'auto-anticorps. La silice entraîne la mort des macrophages qui la phagocyte normalement et provoque une inflammation chronique alimentée par sa re-libération. L'apoptose à répétition des cellules pourrait entraîner la présence d'un excès d'antigène, sans arrêt présenté au système immunitaire et à terme rompre la tolérance immune (Pernis 2005).

### **I.1.cc. Place des médicaments dans la physiopathologie des VAA**

Le développement d'ANCA a été associé à plusieurs médicaments : le propylthio-uracile (PTU), l'hydralazine, les anti-TNF $\alpha$ , la D-penicillamine et les minocyclines (Chen and Kallenberg 2010). La prévalence des ANCA induits par PTU est comprise entre 4 et 46 % (Slot, Links et al. 2005). Mais, les patients qui ont des ANCA induit par le PTU ne développent pas tous des vascularites. Ce sont les ANCA induits de spécificité anti-MPO qui entraînent plus souvent le développement de VAA. La clinique, des VAA induites par le PTU, diffère des VAA primaires. Les patients touchés sont plus jeunes et sont plus souvent des femmes. De plus, les ANCA induit par le PTU reconnaissent souvent plusieurs Ag. Les titres d'anti-MPO sont supérieurs à ceux qui sont rencontrés dans les VAA primaires mais, ils ont une moins grande avidité (Zhao, Chen et al. 2006). La physiopathologie des VAA induites par le PTU n'est pas claire. Certains auteurs incriminent les métabolites du PTU (Jiang, Khursigara et al. 1994). En effet, il a été proposé que la MPO puisse convertir le PTU en produit immunogénique susceptible d'activer les lyT.

## **Facteurs génétiques associés aux vascularites à ANCA**

Comme dans toutes les maladies auto-immunes, le terrain génétique semble être un facteur important. Ainsi, une étude montre que le risque relatif dans la GW est de 1,56 pour les parents au 1<sup>er</sup> degré de patients ayant eux-mêmes une GW (Knight, Sandin et al. 2008). De plus, Il existe une signature génétique caractéristique des patients atteints de VAA dans les PNN. En effet, une étude qui a exploré le profil d'expression génique, de patients avec ANCA en comparaison de patients atteints de LED ou de contrôles sains, montre plus de 200 gènes caractéristiques des VAA (Alcorta, Barnes et al. 2007).

### **I.1.dd. Système HLA**

Les gènes du CMH jouent un rôle clé dans l'activation du système immunitaire. Des associations positives entre l'allèle HLA-DR4 (Stassen, Cohen-Tervaert et al. 2009) et HLA-DR9 (Cotch, Fauci et al. 1995) ont été retrouvés respectivement chez des patients originaires des pays-bas et des sujets caucasiens d'Amérique du Nord. Le lien de l'association HLA-DR4 et vascularites est renforcé par deux études, l'une portant sur des populations d'origines italiennes, l'autre allemandes, qui montrent un risque accru de développer un SCS et des manifestations vasculaires chez les porteurs de cet allèle (Vaglio, Martorana et al. 2007; Wiczorek, Hellmich et al. 2008). Deux études chez des malades originaires d'Allemagne rapportent une forte association positive entre WG et HLA-DPB1\*0401 (Jagiello, Gencik et al. 2004 ; Heckmann, Holle et al. 2008). Chez les patients originaires des Pays-Bas il existe des différences de distribution des antigènes HLA entre les GW, la MPA et le SCS. HLA-DR8 serait associé au SCS, et une diminution de HLA-DR1 est observée dans la GW (Stassen, Cohen-Tervaert et al. 2009). Chez les Britanniques, une association positive avec HLADQw7 et DR1, ainsi qu'un effet protecteur de HLADR3 ont été retrouvés dans la GW (Papiha, Murty et al. 1992 ; Spencer, Burns et al. 1992). L'association protectrice HLA-DR3 est retrouvée chez des patients atteints de SCS (Vaglio, Martorana et al. 2007). Dans la population japonaise, l'association HLA-DRB1\*0901 a été retrouvée avec la PAM (Tsuchiya, Kobayashi et al. 2006).

### **I.1.ee. Expression de la PR3**

Certains PNN expriment la PR3 à la surface de leur membrane (mPR3) alors que d'autres non (Witko-Sarsat, Lesavre et al. 1999). La proportion de ces deux sous-populations est stable et génétiquement prédéterminée. Les patients atteints de la GW ont une proportion plus élevée de PNN exprimant la mPR3 (Witko-Sarsat, Lesavre et al. 1999), et ceci est associé à une augmentation des rechutes (Rarok, Stegeman et al. 2002). Il existe une association entre le polymorphisme dans la région promotrice de PR3 et la GW. Ce polymorphisme pourrait donc expliquer l'expression de hauts niveaux de PR3 (Gencik, Meller et al. 2000). De même un polymorphisme portant sur la région promotrice du gène de la MPO est associé à un risque accru de développer une VAA à ANCA anti-MPO, ainsi qu'à une augmentation du nombre de rechutes et à un âge précoce du diagnostic (Reynolds, Stegeman et al. 2002). Ces prédispositions génétiques qui portent sur l'expression des antigènes contre lesquels sont dirigés les ANCA, ont sûrement une place importante dans la physiopathologie des VAA.

### **I.1.ff. L' $\alpha$ 1-antitrypsine**

La PR3 appartient à la famille des sérines protéases qui sont inhibées par les serpins ou inhibiteur des sérines protéases. Lorsque la PR3 est relarguée à partir des granules des PNN activés, son action délétère pour l'endothélium est inhibée par une serpine, l' $\alpha$ 1-antitrypsine (AAT). Le gène qui code pour l'AAT est très polymorphe, certains de ces polymorphismes portant sur les allèles S et Z réduisent la fonction de cette enzyme inhibitrice. Or, plusieurs groupes ont trouvé une association entre la présence de ces allèles avec des ANCA anti-PR3 (Savigne, Chang et al. 1995) ou avec la GW (Esnault, Testa et al. 1993 ; Baslund, Szpirt et al. 1996 ; Borgmann, Endisch et al. 2001) ou bien avec toutes les VAA (Lhotta, Vogel et al. 1994 ; Callea, Gregorini et al. 1997). Cependant, si la fréquence de l'allèle Z est augmentée dans la GW, il a été montré grâce à l'étude d'une grande cohorte de patients déficitaires ZZ, que sa présence ne suffisait pas. En effet, le déficit en AAT ne peut pas induire une VAA, il agirait plus comme un phénomène amplificateur de la maladie (Audrain, Sesboue et al. 2001). Le bloc de gènes des serpins est situé sur le chromosome ch14q32.1 et code pour des protéines impliquées dans la régulation du processus inflammatoire : l'AAT, l' $\alpha$ 1chymotrypsine, l'inhibiteur de la protéine C (PCI), la corticostéroïde binding protéine (CBG) et le pseudogène AAT

like. Une altération fonctionnelle de ces molécules pourrait entraîner un mauvais contrôle de la réponse inflammatoire. Or, Borgmann *et al.* ont montré qu'une altération dans cette région ch14q32.1 pouvait être un facteur de susceptibilité pour développer une maladie de Wegener. Mais le gène directement responsable n'est pas encore identifié (Borgmann, Endisch et al. 2001).

#### **I.1.gg. Gène de PTPN22**

PTPN22 (pour « Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 ») est un facteur de régulation négatif de l'activation des lyT, également présent sur les cellules NK et les PNN. Le variant PTPN22 620W est lié à plusieurs MAI dont le diabète, le LED et la PR (Criswell, Pfeiffer et al. 2005 ; Michou, Lasbleiz et al. 2007). Le rôle précis de ce variant dans l'activation des lyT n'est pas connu, mais son association avec des MAI pour lesquelles la composante humorale est importante, suggère qu'il influence la réponse B. Ce variant PTPN22 620W a aussi été retrouvé associé à la WG avec un lien plus fort pour les formes systémiques de GW (Jagiello, Aries et al. 2005). Cette association est confortée par une 2<sup>ème</sup> étude qui montre en plus une association de polymorphisme avec la polyangéite microscopique (Carr, Niederer et al. 2009). Ce variant PTPN22 620W serait donc bien impliqué dans la physiopathologie des VAA mais son rôle reste à déterminer.

#### **I.1.hh. Gène de CTLA-4**

Dans la GW, l'augmentation de l'expression de CTLA-4 a été observée (Steiner, Moosig et al. 2001). Or, dans cette vascularite un polymorphisme de répétition dans le gène CTLA-4 a été identifié (Huang, Giscombe et al. 2000 ; Wang, Kakoulidou et al. 2002 ; Zhou, Huang et al. 2004 ; Slot, Sokolowska et al. 2008). Un autre polymorphisme dans la région promotrice de ce gène a été associé avec la GW (Giscombe, Wang et al. 2002). D'autres polymorphismes du gène PDC (PD-1) ont été étudié, et certaines combinaisons spécifiques de polymorphismes de CTLA-4 et de PD-1 seraient moins observées chez les patients VAA (Slot, Sokolowska et al. 2008).

### I.1.ii. Cytokines

Le TNF $\alpha$  joue un rôle important dans la phase précoce des VAA. Certains polymorphismes du TNF sont associés à une plus grande extension de la maladie (Gencik, Borgmann et al. 1999). Un autre polymorphisme du TNF $\alpha$  a aussi été retrouvé associé à la GW (Spriewald, Witzke et al. 2005). L'IL-10 est essentielle pour la polarisation de la réponse Th2. Dans la population suédoise, l'association d'un polymorphisme dans la région promotrice du gène de l'IL-10 avec la GW a été observé (Zhou, Giscombe et al. 2002). Cette association a été confirmée par une autre étude, portant sur une population caucasienne, qui a montré que le polymorphisme de l'IL-10 était retrouvé plus fréquemment, spécialement chez les femmes dans la GW et la PAM (Bartfai, Gaede et al. 2003). Cependant une étude plus récente chez 403 patients n'a pas retrouvé de polymorphisme de l'IL-10 associé à la GW (Wieczorek, Hellmich et al. 2008). D'autres polymorphismes portant sur les gènes de l'IFN $\gamma$  et du TGF $\beta$  sont augmentés dans les VAA (Csernok, Szymkowiak et al. 1996 ; Murakozy, Gaede et al. 2001 ; Spriewald, Witzke et al. 2005). L'association de deux polymorphismes portant, l'un sur le gène de l'IL-1 $\beta$  et l'autre sur le récepteur de l'IL-1 $\alpha$  appelé génotype pro-inflammatoire entraîne un risque accru d'évolution vers une atteinte rénale terminale chez les patients avec des ANCA PR3 (Borgmann, Endisch et al. 2003).

### I.1.jj. Récepteurs Fc

Étant donné l'implication des récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) du PNN dans la pathogénie des VAA, ceux-ci ont également été étudiés. Les PNN expriment deux Fc $\gamma$ R de faible affinité, le Fc $\gamma$ RII (CD32) et le Fc $\gamma$ RIII (CD16). Le Fc $\gamma$ RIIIa est aussi retrouvé à la surface des monocytes, des macrophages, des plaquettes et des DC. L'association des deux polymorphismes Fc $\gamma$ RIIIa-H/H131 et Fc $\gamma$ RIIIa-V/V159 est surreprésentée chez les patients atteints de GW et, est associée à une augmentation des rechutes (Dijstelbloem, Scheepers et al. 1999). De plus, ces patients auraient une capacité à phagocyter *S.Aureus* diminuée (van der Pol and van de Winkel 1998). Ce génotype pourrait donc entraîner une prédisposition aux rechutes de la maladie de Wegener par réduction de la clairance des *S.Aureus*. Cependant dans une étude anglaise aucune association entre le génotype Fc $\gamma$ RIIIa et VAA n'a été retrouvée (Tse, Abadeh et al. 2000). Le récepteur Fc $\gamma$ IIb

exclusivement porté par les PNN, a un polymorphisme qui donne lieu à 2 allèles HNA1a (HNA pour *Human Neutrophil Antigen*) et HNA1b. L'isoforme HNA1a ayant une affinité supérieure pour les IgG3, on pourrait s'attendre à ce que cette isoforme soit associée aux VAA. L'équipe de TSE *et al* a montré une tendance à l'augmentation des génotypes homozygotes pour l'allèle HNA1a chez les patients atteints de VAA avec des ANCA MPO ou PR3, cette tendance devient statistiquement significative si on compare uniquement les patients avec des ANCA MPO positifs par rapport à la population témoin (Tse, Abadeh et al. 2000). Le polymorphisme du gène FCGR3B pourrait donc être impliqué dans la susceptibilité pour les VAA avec des ANCA anti-MPO.

#### *Copy number variation*

L'association de CNV et VAA est sujet à controverse : Fanciulli *et al.* ont montré une association avec un CNV de FCGR3B bas dans deux cohortes de WG, de 80 et 84 patients, et dans une cohorte de PAM de 76 patients (Fanciulli, Norsworthy et al. 2007). Alors que, l'équipe de Willcocks a trouvé une association d'un grand nombre de copies de FCGR3B chez 556 patients atteints de VAA issue de 3 cohortes différentes (Willcocks, Lyons et al. 2008). Il se peut que ces discordances soient dues à un problème de technique (Hollox, Detering et al. 2009). Ainsi, bien que des données *in vitro* impliquent les récepteurs Fc des Ig dans l'activation des PNN par les ANCA, la contribution génétique de ce récepteur n'est pas encore clairement établie. Celle ci, devrait tenir compte des polymorphismes portant sur les nucléotides et des polymorphismes portant sur les CNV, ainsi que de leur interaction éventuelle (Fanciulli, Petretto et al. 2010).

#### **I.1.kk. Molécules d'adhésions**

L'adhésion des leucocytes à l'endothélium est un élément important dans la pathogénie des VAA. Cette adhésion fait intervenir des molécules comme le CD11a/CD18 (LFA-1), ICAM-1 et la E-sélectine. Cependant les études portant sur ces gènes n'ont pas montré de risque de facteurs pour la GW. Seul le lien entre un polymorphisme portant sur un allèle du gène de CD18 et les vascularites à ANCA anti-MPO a été mis en évidence (Gencik, Meller et al. 2000). Ce polymorphisme est associé à une augmentation de l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales (Meller, Jagiello et al. 2001).

#### **Conclusion:**

L'ensemble de ces résultats ne montre pas d'association franche entre polymorphismes génétiques et VAA.

## Les cellules dendritiques dans les vascularites à ANCA

Des données récentes suggèrent un rôle important des DC dans la pathogénie de la GW et des vascularites de façon plus générale. Buonocore *et al.* ont montré que l'injection, de DC syngéniques surexprimants la molécule Fas-Ligand à des souris, induisait en quelques semaines une vascularite pulmonaire, granulomateuse, mais sans ANCA (Buonocore, Flamand *et al.* 2004). Ce nouveau modèle animal très reproductible partage de nombreuses caractéristiques avec la GW. Plusieurs études ont montré que les PNN des patients atteints de VAA avaient la capacité de se « transdifférencier » en cellules semblables aux DC. Une observation montre la capacité des PNN à se différencier *in vitro* en présence de GM-CSF, d'IL-4 et de TNF $\alpha$  en cellules de type DC. Ces cellules expriment les marqueurs des DC (HLA-DR, CD1, CD80, CD86) et sont douées des mêmes fonctions que les DC (Oehler, Majdic *et al.* 1998). De plus, *in vivo* dans la GW, il a été montré que les PNN des patients exprimaient les molécules du CMH II (jusqu'à 15% des neutrophiles), et que cette expression était corrélée à l'activité de la maladie (Hansch, Radsak *et al.* 1999). Chez les patients en phase active, il a été observé une augmentation d'une population de lyT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> capables *in vitro* de provoquer la différenciation des PNN vers le phénotype (HLA-DR<sup>+</sup>) retrouvé *in vivo* en phase active (Iking-Konert, Vogt *et al.* 2001). Enfin, une autre étude a montré que l'antigène PR3 était capable d'activer *in vitro* les DC dérivées de monocytes de patients atteints de GW, lesquelles pouvaient induire la différenciation de lyT autologues vers un phénotype Th1. Cette activation des DC par la PR3 faisait intervenir le récepteur PAR-2 (protease activated receptor-2) (Csernok, Ai *et al.* 2006). Récemment, la même équipe a montré que l'expression de PAR-2 chez l'homme à la surface des cellules circulantes, comprenant les mDC, était diminuée chez les patients ayant une GW inactive par rapport aux patients en phase active et aux contrôles. Mais curieusement, dans cette étude il est mis en évidence que ni la PR3, ni un agoniste de PAR-2 n'induisent la maturation des DC chez les GW et chez les contrôles, indiquant que cette voie ne serait pas impliquée dans

la maturation de ces DC. Ceci est contradictoire avec leurs premières observations (Jiang, Grage-Griebenow et al. 2010). Une autre étude permet de suggérer le rôle des DC dans les VAA : l'utilisation d'un nouvel immunosuppresseur des DC, administré à des souris SCG/Kj qui développent une vascularite proche des VAA, entraîne une inactivation des DC et diminue la sévérité de la maladie ainsi que le titre des ANCA (Saiga, Tokunaka et al. 2006). Enfin, une étude anatomopathologique de biopsies rénales de patients VAA montre la présence de DC matures et immatures associées à des cellules T au niveau des glomérules rénaux de patients VAA. Cette observation montre que, dans les VAA, les DC participent au processus inflammatoire rénal (Wilde, van Paassen et al. 2009).

## **Implication des cellules T dans les vascularites à ANCA**

### **I.1.II. Preuves de l'implication des cellules T dans les VAA**

De nombreuses études suggèrent l'implication des lymphocytes T dans les mécanismes physiopathologiques des VAA. Il a été observé que les lymphocytes T s'accumulent dans le rein et que leur nombre est corrélé au degré d'atteinte rénale (Weidner, Carl et al. 2004 ; Mueller, Holl-Ulrich et al. 2008). Les immunosuppresseurs ayant pour cible les lymphocytes T ont un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie (Schmitt, Hagen et al. 2004). Sur le plan clinique, on retrouve chez de nombreux patients atteints de GW ou de SCS des inflammations granulomateuses et nécrosantes des voies respiratoires riches en éosinophiles pour le Syndrome de Churg et Strauss et en PNN pour la maladie de Wegener. Dans les deux cas, des lymphocytes T sont présents (Tipping and Holdsworth 2006). Il existe en fait une prédominance de lymphocytes T dans les lésions granulomateuses ORL (T mémoires notamment)(Coulomb-L'Hermine, Capron et al. 2001), et dans les lésions de glomérulonéphrite pauci-immune (Cunningham, Huang et al. 1999). Des lymphocytes T CD4 et CD8 sont aussi retrouvés au niveau du tissu interstitiel rénal (Weidner, Carl et al. 2004). Dans un modèle animal de glomérulonéphrite pauci-immune associée aux ANCA anti-MPO, il a été montré que les lymphocytes T CD4+ jouaient un rôle non négligeable (Ruth, Kitching et al. 2006). En effet, la déplétion des

lymphocytes T CD4 dans ce modèle atténue la maladie. Les auteurs proposent que des lyT CD4 anti-MPO reconnaissent la MPO au niveau glomérulaire et qu'avec l'aide du recrutement des macrophages, ils participent à l'amplification des lésions rénales. Or, plusieurs études ont montré la présence de cellules T pouvant proliférer en présence de PR3 et de MPO chez les patients porteurs d'une GW, mais également chez des volontaires sains (Griffith, Coulthart et al. 1996 ; Clayton and Savage 2000 ; Popa, Franssen et al. 2002). De même, des cellules T auto réactives anti-MPO ou anti-PR3 ont été retrouvées chez des patients mais aussi chez des témoins sains (Winek, Mueller et al. 2004; Seta, Tajima et al. 2008). L'équipe de SETA *et al.* a mesuré la prolifération par incorporation à la thymidine tritiée en réponse à 3 séquences peptidiques de la MPO. Dans cette étude, 4 patients sur 15 ont une réponse positive aux peptides. Alors que dans le groupe contrôle, les cellules de 3 contrôles sur 14 prolifèrent en réponse à 2 des peptides, tandis que le 3<sup>ème</sup> peptide entraîne une prolifération des cellules de 7 contrôles (Seta, Tajima et al. 2008). L'équipe de Winek *et al.* a étudié la réponse anti-PR3 par cytométrie, et n'a pas montré de différence de fréquence de réponse anti-PR3 entre les GW et les contrôles (Winek, Mueller et al. 2004). Enfin, Chez certain patients atteints de GW il a été retrouvé une augmentation de cellules T spécifiques de la séquence complémentaire de la PR3 (Yang, Bautz et al. 2008).

### I.1.mm. Persistance de l'état activé des cellules T

Les taux sériques de marqueurs de l'activité des cellules T comme le CD25 soluble, la néoptérine et le CD30 soluble sont élevés chez les patients atteints de VAA, et associés avec l'activité de la maladie (Schmitt, Heesen et al. 1992 ; Stegeman, Tervaert et al. 1993 ; Popa, Stegeman et al. 1999 ; Schonermarck, Csernok et al. 2000). A la surface des T plusieurs marqueurs d'activation comme CD25, HLA-DR, CD69 sont aussi augmentés au cours de la GW (Ludviksson, Sneller et al. 1998 ; Marinaki, Neumann et al. 2005). Dernièrement une équipe a montré que le pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (cellules sénescentes) concordait avec l'activité des VAA et le nombre d'organes touchés. Cela renforce l'hypothèse comme quoi les lyT CD8 sont activés dans les VAA (Iking-Konert, Vogl et al. 2009).

### **I.1.nn. Lymphopénie**

Il existe une lymphopénie chez les patients atteints de VAA. Cette lymphopénie porte sur les  $\text{lyT CD4}^+$  et n'est pas dépendante du stade de la maladie (Marinaki, Neumann et al. 2005). Cette lymphopénie pourrait être due à l'effet des traitements immunosuppresseurs et/ou à une mobilisation des lymphocytes dans les tissus touchés par la vascularite. Cependant dans l'étude de Marinaki *et al.* les patients en rémission et sans traitement immunosuppresseur sont aussi lymphopéniques (Marinaki, Neumann et al. 2005). Il semblerait donc que la lymphopénie observée dans les VAA soit relative à la maladie elle-même bien qu'aggravée par les traitements immunosuppresseurs. Par contre les pourcentages et les valeurs absolues de  $\text{lyT CD8}^+$  sont augmentés dans les VAA (Ikeda, Watanabe et al. 1993 ; Schlesier, Kaspar et al. 1995 ; Christensson, Pettersson et al. 2000). Il existe donc une diminution du rapport  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  chez les patients atteints de vascularite à ANCA (Ikeda, Tsuru et al. 1992). L'expansion des CD8 est représentée par une population de cellules T  $\text{CD8}^+\text{CD28}^+\text{CD11b}^+$ , productrices d' $\text{IFN}\gamma$  (Iking-Konert, Vogl et al. 2008).

### **I.1.oo. Expansion des cellules T effectrices mémoires**

Les rechutes fréquentes des VAA sont très probablement dues à la persistance de cellules T et B mémoires autoréactives. A la lymphopénie T, s'ajoute un déséquilibre entre les populations mémoires et naïves. Il a en effet été observé une diminution des cellules ( $\text{CD45RO}^-\text{CCR7}^+$  ou  $\text{CD45RB}^{\text{high}}$ ) en périphérie s'accompagnant d'une augmentation des cellules T effectrices mémoires ( $\text{T}_{\text{EM}}$ ;  $\text{CD45RO}^+\text{CCR7}^-$ ) (Lamprecht, Erdmann et al. 2003; Marinaki, Neumann et al. 2005; Abdulahad, van der Geld et al. 2006). Cette population  $\text{T}_{\text{EM}}$  est plus importante en périphérie chez les patients en rémission par rapport aux patients avec une maladie active. Ceci pourrait s'expliquer par une migration sélective de ces cellules pendant la phase active dans les sites inflammatoires notamment rénaux, ces cellules étant détectées dans les urines de patients ayant une glomérulonéphrite active (Abdulahad, Kallenberg et al. 2009). Ce déséquilibre de rapport de population naïve/mémoire ainsi que la persistance de cellules T activées pourraient être dus à la persistance d'un stimulus antigénique. Il n'existe pas de preuve directe de l'origine de ce stimulus, cependant plusieurs origines infectieuses potentielles sont documentées.

### I.1.pp. Polarisation Th1/Th2

Dans la Granulomatose de Wegener les travaux réalisés sur biopsie nasale, lavage broncho-alvéolaire ou prélèvements sanguins à différents stades de la maladie suggèrent que les lymphocytes Th1 et l'IFN $\gamma$  jouent un rôle prépondérant dans la composante granulomateuse initiale de la maladie (Lamprecht, Bruhl et al. 2003), alors que le versant vasculitique témoignerait du passage à une réponse de type Th2 (augmentation de la sécrétion d'IL-4 et faible production d'IFN $\gamma$  par les lyT) (Csernok, Trabandt et al. 1999 ; Muller, Trabandt et al. 2000). D'autres équipes ont montré une polarisation Th2 au niveau de la muqueuse nasale site primaire d'activité de la maladie compatible avec une réaction de type allergique locale et non associée à un biais Th2 au niveau rénal (Balding, Howie et al. 2001 ; Masutani, Tokumoto et al. 2003). Néanmoins, certaines équipes ont montré une forte polarisation Th1 au niveau périphérique et rénal (Masutani, Tokumoto et al. 2003). Il semblerait que la polarisation de la réponse T dépende de l'extension de la maladie : les formes localisées sont associées à une réponse Th1 et les formes systémiques à une polarisation Th2. En effet, une étude qui portait sur le rapport de l'expression de CCR5 (Th1) et CCR3 (Th2) sur les lyT circulants dans la GW montre une augmentation de CCR5 dans les formes localisées et pas de différence d'expression des 2 marqueurs CCR5 et CCR3 dans les formes généralisées (Lamprecht, Bruhl et al. 2003 ; Lamprecht, Erdmann et al. 2003). Une augmentation de CD26 soluble (marqueur Th1) a aussi été observée dans les formes localisées (Schonermark, Csernok et al. 2000).

Dans le Syndrome de Churg et Strauss des profils de réponse de type Th1 et Th2 ont aussi été observés. Le rôle des cytokines Th2 apparaît toutefois prépondérant (Kiene, Csernok et al. 2001 ; Hellmich, Csernok et al. 2005). Les lymphocytes de patients atteints de SCS produisent plus d'IL-5 que ceux de témoins sains et leur sécrétion d'IL-13 et d'IL-10 est plus importante que chez les patients atteints de GW (Schonermark, Csernok et al. 2000). Ces données expérimentales concordent avec la présentation « allergique » de cette affection où l'asthme et l'hyperéosinophilie sanguine sont constants. De plus les mêmes cellules sont aussi capables de sécréter de l'IFN $\gamma$ , cela pouvant expliquer la formation de granulomes (Kiene, Csernok et al. 2001).

Dans la polyangéite microscopique la polarisation Th1/Th2 n'est pas tranchée. L'activité de la maladie corrèlerait avec l'expression de CX3CR1 sur les lyT et l'augmentation des

taux sériques de son ligand CX3CL1 (chémokine appartenant à la famille des fractalkines et associée à une réponse Th1) (Fratice, Sironi et al. 2001). Mais une autre équipe a montré que le CD30 soluble (marqueur Th2) et le CD26 soluble (marqueur Th1) variaient dans le même sens au cours des différentes phases de la maladie (augmentation pendant la rémission, diminution pendant la phase active) (Schonermarck, Csernok et al. 2000). En ce qui concerne les LyT issus des biopsies dans la PAM, une étude a montré que ces lymphocytes étaient incapables de produire des cytokines de la voie Th1 alors qu'ils pouvaient *in vitro* produire des cytokines de la voie Th2 (Csernok, Muller et al. 1999).

Pour conclure : l'implication des lymphocytes Th1 et Th2 semble varier en fonction du type de vascularites (GW, PAM ou SCS) et du profil évolutif de la maladie : alors que les lésions granulomateuses ORL et pulmonaires correspondent à une réponse Th1, les lésions rénales (glomérulonéphrite extra-capillaire pauci-immune), véritable "capillarite" généralement sans granulome, correspondent à une réponse T de profil Th2. Les formes localisées et systémiques présenteraient un profil différent, respectivement Th1 et Th2.

#### **I.1.qq. Diminution de l'expression de la molécule de co-stimulation CD28**

Plusieurs équipes ont rapporté une expansion de la fraction CD28<sup>-</sup> des cellules T CD4<sup>+</sup> (Giscombe, Nityanand et al. 1998; Lamprecht, Moosig et al. 2001). Dans les VAA, CD28 est donc sous-exprimé sur les lymphocytes CD4 circulants et lésionnels. Dans la GW ces cellules CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sont décrites comme une source majeure de cytokines Th1 pro-inflammatoires (Komocsi, Lamprecht et al. 2002). Elles expriment la perforine et le NKG2D, elles ont donc un potentiel cytotoxique (Capraru, Muller et al. 2008). Enfin, elles expriment CD57 et ont des télomères raccourcis, ce sont donc des cellules sénescentes qui semblent correspondre à des cellules T mémoires effectrices (Komocsi, Lamprecht et al. 2002). Néanmoins de telles expansions de cellules T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ont été retrouvées dans d'autres pathologies inflammatoires, comme la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques (Markovic-Plese, Cortese et al. 2001 ; Fasth, Cao et al. 2004; Thewissen, Somers et al. 2007) mais aussi chez des patients HIV<sup>+</sup> et CMV<sup>+</sup> (van Leeuwen, Remmerswaal et al. 2004). Bien qu'il y ait une corrélation positive avec la sévérité de maladie et la présence de cellules de TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> chez les patients VAA, un rôle pathogène direct n'a pas encore été prouvé mais semble probable. Dans la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde il a été montré que ces cellules étaient moins

sensibles aux mécanismes de régulation et qu'elles pouvaient donc ainsi avoir un rôle en pathologie auto-immune, mais probablement pas d'implication directe auto-agressive dans la pathogenèse des maladies auto-immunes (Thewissen, Somers et al. 2007). Finalement, Giscombe *et al.* ont caractérisé des expansions de clones T chez des patients atteints de GW. Dans cette étude, ils rapportent la présence de 1 à 2 clones, représentant de 4 à 59 % du répertoire T, chez 9 patients. Ces expansions clonales persistent malgré les traitements, et ont les caractéristiques des cellules CD28<sup>-</sup> décrites dans l'ensemble des cellules T. Elles présentent une expression moindre de CD28, et augmentée de CTLA-4. Elles ont des caractéristiques de cellules cytotoxiques et sénescentes (Giscombe, Wang et al. 2006). Cette observation suggère qu'un Ag commun soit à l'origine de cette expansion. Par ailleurs, une expansion du TCR V $\beta$  avec un phénotype mémoire a été retrouvée dans le SCS (Guida, Vallario et al. 2008).

#### **I.1.rr. Augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice CTLA-4**

Une augmentation de l'expression de CTLA-4 sur les cellules CD4<sup>+</sup> a également été rapporté dans la granulomatose de Wegener (Steiner, Moosig et al. 2001). CTLA-4 apparaît après activation, et délivre un signal négatif au lymphocyte T effecteur, qui a pour conséquence de limiter la réponse immunitaire. La surexpression de CTLA-4 est accompagnée d'une résistance à l'apoptose par régulation à la hausse des molécules anti-apoptotiques de la famille bcl-2 (Pandiyan, Gartner et al. 2004).

**L'ensemble de ces informations montre donc que l'immunité cellulaire T contribue aux lésions des VAA. Les lésions vasculaires et les lésions granulomateuses contiennent, en plus des monocytes et des macrophages, des cellules T. Il existe un état d'activation permanent des lyT. De plus, certains paramètres indiquent une expansion clonale dépendante d'un antigène et une réplication sénescente des cellules T. Par ailleurs, l'expansion des cellules T présente un phénotype altéré de cellules T mémoires effectrices avec de puissantes fonctions effectrices malgré l'absence de CD28. Cette expansion précoce est présente pendant la phase active de la maladie mais aussi durant les périodes de rémissions et augmente avec la progression de la maladie. Les causes de cette expansion restent malgré tout inconnues, mais elle contribue au maintien de l'inflammation chronique dans les VAA.**

## Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont reconnus comme étant les acteurs principaux de l'inflammation locale grâce aux cytokines pro-inflammatoires (IL-17, 21, 22) qu'ils sécrètent et grâce à l'expansion et le recrutement des PNN qu'ils entraînent. Plusieurs arguments suggèrent l'implication des cellules Th17 dans la pathogénie des VAA. Certains travaux démontrent le rôle de l'IL-17 dans l'immunité muqueuse des voies respiratoires. En effet, chez la souris il a été mis en évidence que la réponse antimicrobienne dépend d'une sécrétion locale d'IL-17 qui stimule la libération par les cellules épithéliales de chémokines permettant le recrutement des PNN (Miyamoto, Prause et al. 2003). De plus, des lymphocytes activés de type Th17 ont pu être isolés à partir de prélèvements pulmonaires (Happel, Zheng et al. 2003). Il a par ailleurs été montré que l'administration intra-trachéale d'IL-17 provoquait un afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau des voies respiratoires avec libération de MPO et d'élastase (Hoshino, Laan et al. 2000). La voie Th17 est donc impliquée dans les processus inflammatoires, dans l'immunité des muqueuses notamment au niveau pulmonaire ainsi que dans le recrutement des PNN sur le site de l'inflammation. Ces trois facteurs sont retrouvés dans les VAA. En effet, le tractus respiratoire est un site précocement atteint dans les VAA et le rôle des PNN comme cellules effectrices au niveau des lésions est maintenant bien connu. On sait notamment que l'interaction des PNN avec l'endothélium vasculaire, induite via leur activation par les ANCA, nécessite une pré-activation des PNN. Il se pourrait que les cytokines Th17 contribuent à cette pré-activation. Notamment en induisant la production de  $TNF\alpha$  par les macrophages (Jovanovic, Di Battista et al. 1998). Progressivement, plusieurs études viennent conforter l'hypothèse du rôle de la voie Th17 dans les VAA. Récemment une étude chez la souris a montré que des PNN activés par des ANCA anti-MPO pouvaient sécréter de l'IL-17 et de l'IL-23 (Hoshino, Nagao et al. 2008). Enfin, dans un modèle animal de glomérulonéphrite induite par des anti-MPO, il a été montré que l'IL-17 contribuait à la physiopathologie de la glomérulonéphrite. En effet les souris déficientes en IL-17 sont presque totalement protégées de la glomérulonéphrite grâce à une diminution du recrutement du nombre de polynucléaires au niveau glomérulaire (Gan, Steinmetz et al. 2010). Chez l'homme, deux études tendent à montrer l'implication de la voie Th17 dans la physiopathologie des VAA. Abdulahad *et al* ont montré chez des patients atteints de

GW en rémission ayant des ANCA anti-PR3, que la stimulation par l'antigène PR3 des cellules mononucléées du sang entraîne une sécrétion supérieure de cytokines Th17 et Th2 sans variation des cytokines Th1 (Abdulahad, Stegeman et al. 2008). L'équipe de Nogueira a trouvé des taux sériques d'IL-17 et d'IL-23 significativement supérieur chez les patients en rechute par rapport aux contrôles, et élevé chez une partie des patients en rémission de VAA. Dans cette étude, le taux d'IL-23 corrèle avec le BVAS et le taux d'ANCA. De plus, chez certains patients en rémission des cellules mémoires Th17 spécifiques des ANCA ont été détecté (Nogueira, Hamour et al. 2010).

À ces arguments en faveur de l'implication de la voie Th17 dans la physiopathologie des VAA s'ajoute la constatation d'un déficit de la voie des Treg, dont la différenciation apparaît comme mutuellement exclusive de celle de la lignée Th17. Et enfin, même s'il n'existe pas de chevauchement clinique entre les VAA et les maladies inflammatoires intestinales, ces deux entités partagent un certain nombre d'éléments immunopathologiques, dans lesquelles le rôle des lymphocytes Th17 apparaît de mieux en mieux documenté : l'existence d'une réaction inflammatoire de type granulomateuse dans la maladie de Crohn, la possibilité de retrouver des ANCA dans la rectocolite hémorragique, le rôle de l'immunité muqueuse et probablement de ses interactions avec l'environnement microbien dans l'initiation et/ou l'entretien de la maladie.

## **Les cellules T régulatrices naturelles**

Les Treg jouent un rôle considérable dans la tolérance périphérique des cellules T, en contrôlant notamment l'effet potentiellement délétère des cellules T auto-réactives qui ont échappées à la délétion thymique (Sakaguchi 2004). Un déficit des Treg pourrait être un co-facteur important dans les vascularites à ANCA, et expliquerait l'activation récurrente de lymphocytes T mémoires probablement impliqués dans les rechutes. Une altération de la fonction suppressive des Treg a été retrouvée dans la maladie de Wegener chez des patients avec un traitement immunosuppresseur (Abdulahad, Stegeman et al. 2007 ; Klapa, Mueller et al. 2010 ; Morgan, Day et al. 2010). Concernant le nombre de Treg, deux équipes trouvent des résultats opposés, la première trouve une augmentation

des Treg avec l'utilisation couplée de CD25<sup>high</sup> et FOXP3 (Abdulahad, Stegeman et al. 2007). La deuxième équipe propose de regarder le nombre relatif de Treg par rapport aux T effecteurs plutôt que la proportion des Treg dans les cellules TCD4, et montre une relation entre la proportion relative des Treg CD4 FOXP3+ par rapport aux cellules T effectrices CD4 CD25<sup>high</sup> et le taux de rechute chez les patients (Morgan, Day et al. 2010). Une autre équipe montre la présence de cellules FOXP3+ dans des biopsies endonasales de patients atteints de granulomatose de Wegener ainsi qu'une altération de la fonction des Treg CD4+CD25<sup>high</sup> chez 3 patients (Klapa, Mueller et al. 2010). Toutes ces études ont été pratiquées chez des patients ayant un ou plusieurs traitements immunosuppresseurs, et l'isolation des Treg, qui ont servi à faire les expériences fonctionnelles, a été faite avec le seul marqueur CD25. Or, ce marqueur n'est pas spécifique des Treg, et n'est pas suffisant pour discriminer les Treg des T activées (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

**RESULTATS**

*1<sup>ère</sup> Partie : Analyse quantitative des cellules dendritiques circulantes et fonction des cellules T régulatrices dans les vascularites à ANCA*

## Résumé

Les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles sont caractérisées par une atteinte inflammatoire et nécrosante des vaisseaux de petit calibre, dont la physiopathologie reste encore mal établie. Les cellules dendritiques (DC) et les cellules T régulatrices (Treg) jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunes adaptatives. Dans les VAA, les rechutes sont fréquentes. Ce constat suggère l'existence de lymphocytes B mémoires et potentiellement de lymphocytes T mémoires auto-réactifs. Notre hypothèse de travail était que les lymphocytes auto-réactifs pourraient être réactivés en raison d'un défaut de régulation par les cellules T régulatrices. Ainsi, l'expansion des cellules T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> constatée au cours de la GW, par différentes équipes, pourrait être corrélée à un défaut quantitatif ou qualitatif de suppression. Dans ce travail, nous avons donc analysé les sous-populations de DC circulantes et les Treg chez des patients ayant une vascularite à ANCA.

Pour cette étude, les patients ont été inclus entre septembre 2005 et mars 2009. A notre connaissance, quand l'étude a commencé, il n'y avait pas de travaux publiés sur les lymphocytes Treg ou sur les cellules dendritiques, dans les vascularites à ANCA. Ce travail a été réalisé chez 18 volontaires sains et chez 36 patients atteints de vascularite avec une présence d'ANCA au moment du diagnostic. Les patients étaient divisés en 2 groupes en fonction de l'évolution de la maladie. Les patients en phase aiguë de leur maladie (n=19) ont été prélevés soit au moment d'une rechute d'une VAA déjà diagnostiquée, soit au moment d'une poussée correspondant à la découverte de la maladie. Dans les deux cas, les échantillons qui ont servi à l'analyse ont été prélevés avant la mise sous traitement immunosuppresseurs, corticoïdes compris. Les patients en rémission (n=17) n'avaient pas de traitement immunosuppresseurs ou, au maximum un traitement par corticoïdes inférieur à 10mg/jour. Le stade de rémission était défini par l'absence de signe clinique d'évolutivité et la normalité de la C réactive protéine (sans prendre en compte le taux d'ANCA).

Nos résultats ont montré une baisse significative du nombre de DC chez les patients en phase aiguë par rapport aux témoins et aux patients en rémission et, une diminution significative du nombre de DC des patients en rémission par rapport aux témoins. Cette diminution était observée dans les mêmes proportions pour les DC myéloïdes. La

diminution observée pour les DC plasmacytoïdes n'était significative que pour les patients en phase aiguë. L'état de maturation des DC ainsi que leur potentiel à migrer dans les organes lymphoïdes secondaires ont été étudiés grâce aux marqueurs CD86, CCR7, CD62L. Les niveaux de CD86 et CCR7 n'étaient pas significativement différents entre les 3 groupes. Par contre, nous avons observé une augmentation de l'expression de CD62L sur les DC des patients en phase aiguë de leur maladie, mais pas dans le groupe en rémission.

Concernant les Treg, nous avons observé une diminution modérée du nombre de cellules  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$  chez les patients en phase aiguë et en rémission, par rapport aux témoins. L'activité suppressive des Treg était aussi diminuée chez tous les patients, et de manière intéressante, effondrée chez les patients en phase aiguë (7 % de suppression en moyenne contre 78 % chez les témoins). Durant les rémissions, l'activité suppressive était diminuée mais dans des proportions moindres (36 % de moyenne de suppression). Ces résultats suggèrent que le déficit fonctionnel des Treg puisse jouer un rôle dans le caractère récidivant de la maladie et que les DC pourraient être impliquées dans cette modulation de la fonction des Treg .

L'ensemble des résultats sur les cellules dendritiques et les T régulateurs font l'objet d'une publication actuellement soumis à « *Annals of Rheumatic Diseases* » :

## **Article**

Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory T cells in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated vasculitis

Marie Rimbart<sup>1,2,3,4</sup>, Mohamed Hamidou<sup>4,5</sup>, Xavier Puéchal<sup>6</sup>, Luis Teixeira<sup>7,8</sup>, Cécile Braudeau<sup>1,2</sup>, Hélène Caillon<sup>1</sup>, Antoine Néel<sup>4,5</sup>, Marie Audrain<sup>1</sup>, Loic Guillevin<sup>7,8</sup> and Régis Josien<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie and <sup>2</sup> Institut de Transplantation-Urologie-Néphrologie (ITUN), Nantes, France

<sup>3</sup> INSERM, UMR643, Nantes, France

<sup>4</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

<sup>5</sup> CHU Nantes, Service de Médecine Interne, Nantes, France

<sup>6</sup> CH Le Mans, Service de Rhumatologie, Le Mans, France

<sup>7</sup> AP-HP, Hôpital Cochin, Service de Médecine Interne, Paris, France

<sup>8</sup> Université Paris Descartes, Paris, France

Running title: Dendritic cells and regulatory T cells in ANCA-associated vasculitis  
Keywords: ANCA-Vasculitis, Dendritic cells, Regulatory T cells

**Correspondence to :**

Régis Josien, M.D., Ph.D.

INSERM U643

CHU Nantes Hotel Dieu

30 bld Jean Monnet

44093 Nantes Cedex 1, FRANCE

Email: [Regis.josien@univ-nantes.fr](mailto:Regis.josien@univ-nantes.fr)

**ABSTRACT**

**Objective:** Dendritic cells (DC) and regulatory cells (Treg) play pivotal roles in controlling both normal and autoimmune adaptive immune responses. DC are the main antigen-presenting cells to T cells, and they also control Treg functions. In this study, we examined the frequency and phenotype of DC subsets, and the frequency and function of Treg from patients with ANCA-associated vasculitis (AAV).

**Methods:** Blood samples from 19 untreated patients with AAV during flares and before any immunosuppressive treatment were analyzed, along with 17 AAV patients in remission and 18 age-matched healthy controls. DC and Treg numbers, and phenotypes were assessed by flow cytometry, and in vitro suppressive function of Treg was determined by co-culture assay.

**Results:** When compared to healthy volunteers, absolute numbers of conventional and plasmacytoid DC were decreased in AAV patients. During the acute phase this decrease was significantly more pronounced and was associated with an increased DC expression of CD62L. Absolute numbers of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>Tcells) were moderately decreased in patients. FOXP3 and CD39 were expressed at similar levels on Treg from patients as compared to controls. The suppressive function of Treg from AAV patients was dramatically decreased as compared to controls, and this defect was more pronounced during flares than remission. This Treg functional deficiency occurred in the absence of obvious Th17 deviation.

**Conclusion:** In conclusion, these data suggest an increased recruitment of DC in lymphoid organs during AAV flares and point to a role for Treg functional deficiency in the pathogenesis of AAV.

Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitides (AAV) are the most common primary systemic small-vessel vasculitis in adults. AAV includes microscopic polyangiitis (MPA), Wegener's granulomatosis (WG), and Churg-Strauss syndrome (CSS). ANCA are directed against constituents of primary granules from neutrophils and against monocytic lysosomes. These can be detected by indirect immunofluorescence microscopy with two major staining patterns: cytoplasmic ANCA (c-ANCA) which are mainly directed against proteinase 3 (PR3),[1] and perinuclear ANCA (p-ANCA) mainly directed against myeloperoxidase (MPO).[2] PR3 ANCA are mostly found in patients with WG, whereas ANCA with specificity for MPO are associated with MPA and CSS. It is now well accepted that ANCA are directly involved in AAV pathogenesis. ANCA correlate with disease activity, [3] and their pathogenic role has been demonstrated in vitro and in vivo for anti-MPO antibodies, but only in vitro for anti-PR3 antibodies.[4] Xiao *et al.* provided evidence that MPO-ANCA directly cause pauci-immune glomerulonephritis and vasculitis in Rag2-deficient mice.[5] More recently, ANCA with specificity to lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP2) were described; interestingly these ANCA appeared to cross react with fimbriated bacteria suggesting a molecular mimicry mechanism.[6]

The involvement of T-cells in AAV has also been suggested by several studies.[7-9] It is well known that ANCA have a T-dependent isotype.[10] Reduced numbers of blood CD4<sup>+</sup> T cells were observed in AAV, together with a skew toward memory population, which could be the consequence of a persistent activation due to recurrent exposure to an unknown antigen.[11, 12] Recently Abdulahad *et al.* reported a functional defect in CD4<sup>+</sup> Regulatory T cells (Treg) in patients with Wegener's granulomatosis during remission.[13] So called naturally occurring Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells) are essential for maintaining peripheral tolerance, preventing autoimmune diseases and

limiting chronic inflammatory diseases. These cells suppress the activation and expansion of self-reactive T cells,[14] and reduced functional activity of Treg results in an increased susceptibility to autoimmune disease. As the percentage of Treg in patient's peripheral blood can be unaltered when compared with healthy controls, it has been suggested that it is mainly the defective Treg function, rather than their numbers, that contributes to disease development.[15] Patients with multiple sclerosis, polyglandular syndrome type II, active rheumatoid arthritis and type-I diabetes show a significant decrease in the suppressive function of their Treg as compared with cells from healthy donors.[15-17] In addition, in some autoimmune diseases, reduced numbers of Treg have been observed in the peripheral blood of patients. However, in these cases, the recruitment or migration of Treg from the blood to the inflammatory site may be responsible for the decreased number of Treg in peripheral blood.[18] Thus, quantitative or qualitative defects of Treg may be observed in human autoimmune diseases. Moreover, recent studies suggest that a CD39<sup>+</sup> subset of Treg could be involved in the control of autoimmune disease-mediated inflammation.[19, 20] Fletcher *et al* reported that these CD39<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg suppressed IL-17 production and were impaired in multiple sclerosis.[21]

Dendritic cells (DC) are the key antigen-presenting cells controlling the initiation of the T cell response.[22] DC are not only critical for the induction of primary immune responses, but may also be important for the induction of immunological tolerance, as well as for the regulation of the type of T cell-mediated immune response.[23] In the blood, DC are usually divided into two main populations: conventional DC (also known as myeloid DC, mDC), which are actually heterogeneous, and plasmacytoid DC (pDC).[24, 25] Whereas mDC produce large amounts of IL-12 and induce Th1 and cytotoxic responses, pDC have a strong capacity for secreting type I interferon in response to viruses.[26] pDC also express the IL-3 receptor chain  $\alpha$  (CD123) which is necessary for

survival and differentiation. Involvement of specific receptors on DC in response to particular self-antigens may contribute to the development of an autoimmune vasculitis. Interestingly, Csernok *et al.* showed that PR3 can induce DC maturation in vitro, and can license them for Th1 response potentially favouring granuloma formation in WG.[27]

In the present study we assessed firstly, the quantitative and phenotypic modifications of peripheral blood DC, and secondly the numbers, phenotype and function of Treg from patients with ANCA-associated vasculitis in remission or in acute phase compared with age matched healthy individuals. As DC are pivotal in the control of Treg, we hypothesize that both could have quantitative or functional defect in AAV.

## PATIENTS AND METHODS

### Study population

Blood samples from 19 untreated patients with AAV in acute phase (AP) with a BVAS above 3 (Birmingham Vasculitis Activity Score), 17 AAV patients in remission (RP, BVAS<3) and 18 age-matched healthy controls (HC) were analysed (Table1). The diagnosis of AAV was established according to the Chapel Hill criteria, and all patients had ANCA at this time. For patients in acute phase, either at presentation or during relapse, samples were drawn before any immunosuppressive therapy (included corticosteroids). Patients in remission included in this study either did not receive any immunosuppressant or received corticosteroids only with a maximum dosage 10 mg/d. All patients and healthy controls provided informed consent. Internal board and the local medical ethics committee reviewed the study.

**Table 1.**

	Healthy controls	Patients in remission (BVAS<3)	Patients in acute phase (BVAS>3)
Age, mean	55	58	57
Wegener's granulomatosis		11	14
Microscopic polyangiitis		4	5
Churg-Strauss syndrome		2	-
Total number	18	17	19

### Dendritic cells and regulatory T cells characterisation:

Circulating dendritic cells and regulatory T cell numbers were measured by flow cytometry. Whole blood cells were incubated with monoclonal antibodies (mAbs) followed by erythrocyte lysis with FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at room temperature. After washing with PBS, events were analysed in a LSRII cytometer (BD Biosciences). Absolute counts of lymphocytes/monocytes and CD4 lymphocytes were determined with BD Multitest™CD3/CD8/CD45/CD4 in BD Trucount™ Tubes.

To identify dendritic cells, a six-color flow cytometry assay was performed with the following mouse anti-human mAbs: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated lineage cocktail-1 Abs (Lin 1), Am Cyan conjugated anti-CD45 (clone HI30), Allophycocyanin (APC)-conjugated CD11c (clone S-HCL-3), phycoerythrin-cyanin5 (PECy5)-conjugated anti-CD123 (clone 9F5), Allophycocyanin cyanin7 (APC-Cy7)-conjugated anti-HLA-DR (clone L243) and Phycoerythrin (PE)-conjugated with CD86 (clone 2331), CD62L (clone DREG56), CCR7 (clone 150503) or IgG (1+2a) (all from BD Biosciences, except CCR7, R&D systems, Minneapolis, MN, USA and IgG (1+2a)-PE from Beckman Coulter, Miami FL). The Lin1 contained several mAbs: CD3 (T cells; clone SK7), CD14 (monocytes/macrophages; clone MΦP9), CD16 (natural killer cells; clone 3G8), CD19 (B cells; clone SJ25C1), and CD56 (natural killer cells, clone NCAM16.2). Dendritic Cells were identified as Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells within a lymphocytes-monocytes gate. CD11c and CD123 expression was determined within Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells in order to define myeloid DC (CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>) and plasmacytoid DC (CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>) subsets. Absolute DC numbers were calculated from the lymphocyte-monocyte counts. In each subtype, we analysed the percentage and the expression level of CD86, CD62L, CCR7. The expression levels were calculated by subtracting the mean fluorescence intensity (MFI) of the isotype from the MFIs of each marker (**Fig. 1A**).

Treg cells were identified with Peridinin chlorophyl protein (PerCP)-conjugated anti-CD45 (clone 2D1), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD127 (clone SB/199), phycoerythrin-cyanin7 (PC7)-conjugated anti CD25 (clone 2A3), and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 (cloneSK7), all from BD Biosciences, and Allophycocyanin-H7 (APC-H7)-conjugated anti-CD4 (clone 13B8.2) from Beckman Coulter. Treg were identified as CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>. The number of Treg were deduced from the CD4 T cells number multiplied by the proportion of

regulatory T cells in CD4 cells. To assess the expression of FOXP3 and CD39 in Treg, PBMC were labelled with CD4-APC-H7, CD127-FITC, CD25-PC7 (same clone as above) and CD39-APC (clone TU66) followed by fixation, permeabilisation, and intracellular staining with FOXP3 (clone PCH101) according to the manufacturer's instructions (all antibodies from BD Biosciences) (**Fig. 2A**). This last staining on PBMC was performed on 10 Healthy controls, 10 patients with AAV in acute phase, and 10 patients with AAV in remission.

#### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> Cell sorting

PBMCs were isolated from EDTA whole blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio). 45x10<sup>6</sup> freshly isolated PBMC were incubated for 10 min in 100µL of PBS- EDTA with anti-CD4 FITC (clone RPA-T4 BD biosciences), CD127 PE (clone SB/199 BD biosciences) and anti-CD25 AlexaFluor 647 (in house clone 33B3.1 conjugated to AF647 using a kit from Invitrogen). Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Responder T cells) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> were then separated using a high-speed cell sorter (FACS Aria; BD Biosciences). Purity was routinely >98% for Treg and >99% for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells (**Fig. 3A**).

#### In vitro suppression assay

Suppressive function of Treg was determined by co-culture assay, with all experiments performed on fresh peripheral blood lymphocytes. To assess the functional activity of T regulatory cells, 2 × 10<sup>4</sup> responder cells were co-cultured for 4 days with 2 × 10<sup>4</sup> Treg cells (ratio 1:1) in complete RPMI 1640 medium supplemented with HEPES, L-glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, and 10% human AB serum. All assays were performed in anti-CD3 (Orthoclone OKT3; Janssen-Cilag, 10 µg/mL) 96-well round-bottom plates in a final volume of 200µL of

complete medium, with soluble anti-CD28 at 5µg/ml (clone CD28.2 BD Biosciences). After 4 days of culture, the cells were pulsed with 1 µCi per well of <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Biosciences) for 8 hours. The cells were then harvested and counted in a scintillation counter. <sup>3</sup>H-thymidine incorporation was measured as cpm. The percentage of suppression of the responding cell proliferation was determined as  $1 - (\text{mean cpm of co-culture} / \text{mean cpm of responder alone}) \times 100$ .

### Cytokines

IL-17 was measured in supernatants of co-culture 4 days after the initiation using a multiplex fluorescent bead immunoassay (Biosource) together with a Luminex cytometer. For this experiment, supernatants of 10 HC, 14 RP and 11 AP were analysed.

### Statistical analysis

Statistical comparisons between mean values were performed using the Mann-Whitney U-test for unpaired data, and a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Decreased numbers of circulating pDC and mDC during AAV

Circulating DC are a rare population of blood leukocytes (<1% of PBMC), which can be identified as Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cells. Two subsets of DC can be separated on the basis of CD11c and CD123 expression: so-called myeloid or conventional DC that are CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>-</sup> and plasmacytoid DC (pDC) that are CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> (**Fig. 1A**). The numbers of circulating DC subsets were assessed on whole blood samples from controls and patients after staining with CD45-Amcyan, Lin-FITC, HLA-DR-APC-Cy7, CD11c-APC and CD123-PE-Cy5, and using calibrated beads. When compared to controls, AAV-patients exhibited a significant decrease in total DC numbers both during the acute phase and the remission phase (7.5 DC/ $\mu$ L vs 20 DC/ $\mu$ L,  $p < 0,0001$  ; 15 cells/ $\mu$ L vs 20 DC/ $\mu$ L ;  $p = 0.0238$ ). Moreover, the decrease in DC between the 2 groups was significant, with a more pronounced decrease seen during the acute phase than during the remission phase (7.5 DC/ $\mu$ L vs 15 cells/ $\mu$ L  $p = 0.0005$ ). The same significant decrease was observed for mDC between HC and RP ( $p = 0.0110$ ), between HC and AP ( $p < 0.0001$ ), and also between RP and AP ( $p = 0.0022$ ). For pDC the decrease was significant only in AP *versus* HC ( $p = 0.0001$ ), and AP *versus* RP ( $p = 0.0045$ ) (**Fig. 1B**).

### Increased expression of CD62L on DC during acute phase of AAV

To address the activation and the maturation status of circulating DC, we assessed the expression of CD86, CD62L and CCR7 on blood DC. CD86 (B7-2) is an important costimulatory molecule that is upregulated on mature DC. CD62L and CCR7 are important homing molecules for addressing DC to secondary lymphoid organs.

It is well known that blood DC have a semi mature phenotype characterised by an expression of CD86 and CCR7 but a lack of CD83. There was no significant difference between AAV patients and controls regarding the expression of CD86 and CCR7 on DC.

The large majority of mDC, but few pDC, were CD86<sup>+</sup> (94%, 92%, 90% on mDC, and 28%, 29%, 31% on pDC in HC, RP, AP respectively). The expression levels of CD86 on DC were equivalent for patients and controls. Between 82 and 92% of DC were CCR7<sup>+</sup> and the expression levels were not significantly different between patients and controls (data not shown). No surface expression of CD83 was detected on DC from patients or controls (data not shown). Although virtually all mDC and pDC expressed CD62L in the three groups of individuals, we observed a significant increase in CD62L expression levels on both pDC and mDC from acute phase patients as compared to patients in remission ( $p=0.0001$  and  $p=0.0021$  respectively). This difference was more pronounced for pDC than for mDC (**Fig. 1C**).

#### Decreased numbers but equivalent frequencies of circulating T reg cells in AAV.

The frequencies and the absolute numbers of circulating Treg were assessed in blood samples. Samples were stained with CD3-FITC, CD4-APC-H7, CD25-PC7, and CD127-PE, and analysed by flow cytometry. Tregs were identified among CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells as CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> cells. We confirmed that these cells indeed expressed FOXP3 both in controls and in AAV-patients (**Fig. 2A**). Although the frequencies of Treg among CD4<sup>+</sup> T cells were not significantly different between controls and patients, a significant decrease in absolute numbers of Treg in patients as compared to control individuals was observed (HC vs RP;  $p=0.0259$  and vs AP;  $p=0.0003$ ). However, this decrease was correlated with the lymphopenia usually observed in these patients (**Fig. 2B, C**). Regarding the frequencies and levels of FOX-P3 expression in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> cells, we did not observe any differences between controls and AAV patients ( $n=10$  for each group) (**Fig. 2D**). We also assessed the expression of CD39 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells in AAV patients. We

did not observe any differences between the 3 groups: 40%, 45% and 42% of Treg express CD39 in controls, acute phase AAV and remission AAV, respectively (**Fig.2E**)

Defective suppressive function of circulating Treg cells in AAV-patients in remission and in acute phase

We then addressed the in vitro suppressive activity of Treg using a polyclonal stimulation assay. Treg were isolated by FACS as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> and CD127<sup>low/-</sup> cells. T cells were stimulated in anti-CD3 mAb-coated 96-well plates in the presence of soluble anti-CD28 mAb. Treg alone incorporated less than 5,000 cpm. Means of proliferation for T responder cells alone were 69200 for healthy donors, 39300 for remission patients and 56600 for acute phase patients. For co-culture assays, the proliferation was higher for patients in acute phase and in remission (respectively 50769 and 24932) than in controls (14808) (**Fig. 3B**). As expected, Treg from controls exhibited a potent suppressive activity in vitro when mixed at 1:1 ratio with effector T cells. In contrast, Treg from patients exhibited a decrease in their suppressive activity: acute phase patients presented a significant decrease in suppressive activity as compared to controls (8% vs 78%;  $p<0.001$ ) and to the remission group (8% vs 36%;  $p=0.0337$ ). In addition, the remission group exhibited a decreased Treg suppressive function as compared to controls (36% vs 78%.  $p=0.0004$ ) (**Fig. 3C**). To determine whether the observed defect in suppression was related to patient Treg intrinsic defective suppression or to a resistance of patient effector cells to Treg-mediated suppression, we performed suppressive assays with Treg from patient and effector cells from control and *vice versa*. At a ratio of 1:1 HC Treg suppressed patient effector cells by 72% (compared with 75% inhibition of autologous HC effector T cells), whereas patient Treg cells were able to suppress HC effector cell proliferation by only 45% (39% of autologous effector cells). This indicates that the

suppressive function of Treg from AAV patients was indeed intrinsically defective (**Fig. 3D**).

#### Lack of Th17 deviation in AAV

Finally, we sought to determine whether the defective Treg function observed in AAV patients could be associated with a Th17 deviation. The in vitro production of IL-17 by patients and control CD4<sup>+</sup> T cells subsets after 4 days of stimulation by anti-CD3 + anti-CD28 mAbs was assessed. As shown in **Fig.4**, the levels of IL-17 produced by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were not statistically different between the 3 groups although there was a tendency to higher IL-17 secretion by T cells from acute phase patients. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> produced less IL-17 than CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, again with no significant difference between the three groups. Finally, co-culture of Treg with effector T cells did not result in the suppression of IL-17 production in any group. We also assessed the intracellular expression of IL-17 in CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry after polyclonal stimulation (PMA + ionomycine) of frozen PBMCs, and again found no differences between controls and patients (data not shown). Therefore, our data suggest that the defect in suppressive function of Treg in AAV patients is not associated with a Th17 deviation.

## DISCUSSION

Dendritic cells and Treg have been shown to play critical roles in the control and pathogenesis of autoimmune diseases. To our knowledge, this is the first report on the frequency and phenotype of circulating DC in AAV. Both mDC and pDC numbers were reduced in AAV patients during acute phase and even, although at a lesser extent, during remission. Our results also confirmed that Treg function is impaired in AAV during remission and more importantly, showed that this function is even more dramatically reduced in acute phase patients that did not received any immunosuppressive drug.

Animal models have shown that DC play a pivotal role in the induction and in the maintenance of peripheral T cell tolerance. Various mechanisms have been demonstrated such as induction of anergy or deletion of regulatory T cells. Moreover, DC were also shown to control the function of naturally induced regulatory T cells (Treg) during immune response. The role of T cells in the induction of AAV has been suggested by many studies. [4] A reduction in circulating DC subset numbers have been observed in various autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, [28, 29] celiac disease [30] rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis.[31, 32] Such a decrease in circulating DC could be related to a reduction of DC differentiation from bone marrow progenitors, to a reduced global half-life of DC or to a recruitment of blood DC to either lymphoid or non lymphoid tissues. A significant decrease in DC numbers was observed in AAV patients, both during the acute phase and the remission phase. However, the phenotype of both mDC and pDC from remission patients, which can be defined as semi mature, was not different from that observed in healthy donors. Interestingly, during the acute phase the decrease in the number of DC was more pronounced, and was associated with an increase in CD62L expression. This could obviously favor the recruitment of DC in secondary lymphoid organs. In contrast to our results, expression of CD62L was

reduced on DC from patients with psoriatic arthritis and with rheumatoid arthritis. [31] Indicating that variation in CD62L expression in AAV patients can not be simply related to inflammatory process. A recent study suggests that immature DC are recruited in the kidneys of AAV patients, and then cluster with T cells in the interstitial infiltrate. [33] Taken together, these data suggest that the reduced DC numbers we observed during the acute phase could be related to their recruitment in secondary lymphoid organs and in inflammatory tissues. It is interesting to note that this feature persisted during remission although a role for low doses of corticosteroids in reducing DC numbers is possible. Once in secondary lymphoid organs or even in tissue, it is possible that DC could modulate T-cell responses during AAV, either through direct presentation of auto-antigen or through the control of Treg function.

Treg suppress the activation of conventional T cell in vitro and play a key role in vivo in regulating the immune responses that drive autoimmune diseases. Abdulahad *et al* reported that WG patients in remission exhibited an increase in the proportion of memory-like Treg (FOXP3<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) among CD4<sup>+</sup> T cells that are functionally defective. [13] The absolute numbers were not reported in this study, and several patients were treated by immunosuppressive treatments. However, the authors suggested that these FOXP3<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup> cells could be chronically activated T cells rather than true Treg. In contrast, we observed a moderate decrease in the absolute numbers of circulating Treg, both in remission and in acute phase patients, whereas the proportion of Treg among CD4<sup>+</sup> T cells were not modified when compared to healthy controls. These discrepancies might be related to the fact that we performed our study on whole blood and used the CD127 marker to identify Treg as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> cells, whereas Abdulahad *et al.* used PBMC, with CD25 and FOXP3<sup>+</sup> as markers. It should be noted that the moderate decrease in Treg numbers in AAV patients was correlated to the

global lymphopenia that is usually observed in these patients, especially during flares. We furthermore confirmed that the expression level of FOXP3<sup>+</sup> in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells was similar in AAV patients and controls. More importantly, the ex vivo suppressive function of Treg from AAV patients was defective. In remission patients without immunosuppressive therapy or with low dose of corticosteroids only, this defect was actually moderate; therefore our results confirm the previous studies that shows a defective Treg function in WG patients and extend this finding to non WG AAV. [13, 34, 35] In addition, this defect was more dramatic during acute phase. Importantly, these patients were analysed before the administration of any immunosuppressive drugs which could obviously strongly modify in vitro assays. Treg cells were sorted in our study on the basis of CD25 and CD127 expression. [36] This is an important point, as there are controversies regarding the assessment of suppressive function of Treg in other autoimmune diseases, especially in multiple sclerosis, [37] which clearly depends on the markers used to sort Treg. In multiple sclerosis, Treg cells isolated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> expression had impaired function, but Treg cells defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> had the same suppressive function compared to controls. [37] We conclude that AAV patients have Treg suppressive defect and that this defect is not the consequence of immunosuppressive treatment.

These results point to a possible role for Treg functional deficiency in the pathogenesis of AAV and relapses. Development of naturally occurring Treg cells occurs in the thymus, and their maintenance and homeostasis possibly depends on the recognition of auto-antigens presented by dendritic cells in peripheral lymphoid organs. The suppressive mechanisms by which Treg cells exert their inhibitory effects in vitro were found to be dependent on a direct T-regulatory/T-effector cell contact. The inhibitory effect itself is antigen nonspecific but requires antigen-dependent activation of the regulatory T cells

through their T-cell receptor. In this respect, antigen presenting cells play a crucial role in activation of Treg, and previous studies have shown that DC can actually control Treg function. [38-41] Immature DC were shown to induce Treg suppressive activity whereas following DC maturation induced by TLR ligation, Treg suppressive activity was inhibited. Importantly, the defect of suppressive activity in AAV patients was Treg-intrinsic and not related to a relative resistance of effector T cells to Treg-mediated suppression. We hypothesized that the recruitment of DC in lymphoid organs during AAV plays a role in inhibiting Treg function. This hypothesis needs to be tested in vitro, together with the analysis of the roles mDC and pDC play in this inhibition. We have previously shown in an animal model that mature pDC, but not mDC were able to inhibit Treg function in vitro. [42] Experiments are ongoing to determine the function of blood DC subsets from AAV patients in response to TLR ligands.

Several studies have shown that Treg can be separated into subsets based on the expression of markers such as CD103, ICOS or CD39. [20, 43-45] It was shown that CD39<sup>+</sup> but not CD39<sup>-</sup> Treg were able to suppress Th17 activation, and that CD39<sup>+</sup> Treg were decreased in multiple sclerosis patients. [21] However, we showed here that this is not the case in AAV patients. Th17 cells, which are a subset of effector CD4<sup>+</sup> T cells specialized in the production of IL-17 and IL-22 and in recruitment and activation of neutrophils, have been implicated in autoimmune diseases, including multiple sclerosis, lupus and diabetes. [46] A recent study suggested that T cells from ANCA-positive WG patients also exhibited a skewed Th17 response following stimulation with the auto-antigen PR3.[47] More recently, Nogueira *et al* reported an increase in the level of IL-17 and IL-23 in the sera of AAV patients.[48] This is a tempting hypothesis as it is well known that Treg and Th17 are developmentally related.[49-52] We further assessed this Th17/Treg balance hypothesis by analysing the production of IL-17 by effector T cells

from AAV patients following polyclonal stimulation. We could not find any evidence of Th17 deviation, both in remission and in acute phase patients. Therefore the possible role of Th17 in AAV needs to be clarified by further studies.

In conclusion, we demonstrated that DC numbers, as well as Treg suppressive activity, are significantly reduced in untreated patients with AAV in a disease activity specific manner. The decrease in Treg suppressive function might be related to changes in DC function, and might be an important defective tolerance checkpoint in AAV.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the patients and the healthy controls who participated in this study, and also to thank Dr Laplaud DA for help to recruiting controls.

**REFERENCES**

- 1 FJ van der Woude, N Rasmussen, S Lobatto *et al.* Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;1:425-429.
- 2 RJ Falk, JC Jennette. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
- 3 MM Boomsma, CA Stegeman, MJ van der Leij, W Oost, J Hermans, CG Kallenberg, PC Limburg, JW Tervaert. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000;43:2025-2033.
- 4 JA Gomez-Puerta, X Bosch. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody pathogenesis in small-vessel vasculitis: an update. *Am J Pathol* 2009;175:1790-1798.
- 5 H Xiao, P Heeringa, P Hu *et al.* Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 2002;110:955-963.
- 6 R Kain, M Exner, R Brandes *et al.* Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008;14:1088-1096.
- 7 AR Clayton, CO Savage. What you should know about PR3-ANCA. Evidence for the role of T cells in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Arthritis Res* 2000;2:260-262.
- 8 P Lamprecht. Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clin Exp Immunol* 2005;141:201-210.
- 9 WH Abdulahad, CA Stegeman, CG Kallenberg. Review article: The role of CD4(+) T cells in ANCA-associated systemic vasculitis. *Nephrology (Carlton)* 2009;14:26-32.

- 10 E Brouwer, JW Tervaert, G Horst, MG Huitema, M van der Giessen, PC Limburg, CG Kallenberg. Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin Exp Immunol* 1991;83:379-386.
- 11 WH Abdulahad, YM van der Geld, CA Stegeman, CG Kallenberg. Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 2006;70:938-947.
- 12 S Marinaki, I Neumann, AI Kalsch *et al.* Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:181-191.
- 13 WH Abdulahad, CA Stegeman, YM van der Geld, B Doornbos-van der Meer, PC Limburg, CG Kallenberg. Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 2007;56:2080-2091.
- 14 S Sakaguchi. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-562.
- 15 S Lindley, CM Dayan, A Bishop, BO Roep, M Peakman, TI Tree. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:92-99.
- 16 MA Kriegel, T Lohmann, C Gabler, N Blank, JR Kalden, HM Lorenz. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004;199:1285-1291.
- 17 MR Ehrenstein, JG Evans, A Singh, S Moore, G Warnes, DA Isenberg, C Mauri. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-285.

- 18 M Mottonen, J Heikkinen, L Mustonen, P Isomaki, R Luukkainen, O Lassila. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:360-367.
- 19 S Deaglio, KM Dwyer, W Gao *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-1265.
- 20 G Borsellino, M Kleinewietfeld, D Di Mitri *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225-1232.
- 21 JM Fletcher, R Lonergan, L Costelloe, K Kinsella, B Moran, C O'Farrelly, N Tubridy, KH Mills. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009;183:7602-7610.
- 22 J Banchereau, RM Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
- 23 RM Steinman, MC Nussenzweig. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:351-358.
- 24 K Shortman, YJ Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-161.
- 25 H Ueno, E Klechevsky, R Morita *et al.* Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;219:118-142.
- 26 FP Siegal, N Kadowaki, M Shodell, PA Fitzgerald-Bocarsly, K Shah, S Ho, S Antonenko, YJ Liu. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-1837.

- 27 E Csernok, M Ai, WL Gross *et al.* Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 2006;107:4440-4448.
- 28 S Blomberg, ML Eloranta, M Magnusson, GV Alm, L Ronnblom. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:2524-2532.
- 29 K Migita, T Miyashita, Y Maeda, H Kimura, M Nakamura, H Yatsushashi, H Ishibashi, K Eguchi. Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005;142:84-91.
- 30 R Ciccocioppo, G Ricci, B Rovati *et al.* Reduced number and function of peripheral dendritic cells in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2007;149:487-496.
- 31 SL Jongbloed, MC Lebre, AR Fraser, JA Gracie, RD Sturrock, PP Tak, IB McInnes. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R15.
- 32 ZX Huang, BR Zheng, TW Li, YM Lu, JR Gu, XY Han. [Study on expressions of CD25 and CD127 in CD4+ peripheral T lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009;89:2476-2480.
- 33 B Wilde, P van Paassen, J Damoiseaux, P Heerings-Rewinkel, H van Rie, O Witzke, JW Tervaert. Dendritic cells in renal biopsies of patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2151-2156.
- 34 MD Morgan, CJ Day, KP Piper, N Khan, L Harper, PA Moss, CO Savage. Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells. *Immunology* 2010.
- 35 S Klapa, A Mueller, E Csernok, U Fagin, P Klenerman, K Holl-Ulrich, WL Gross, P Lamprecht. Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated

subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells from Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Rheumatol*;28:72-80.

36 W Liu, AL Putnam, Z Xu-Yu *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-1711.

37 L Michel, L Berthelot, S Pettre *et al.* Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* 2008;118:3411-3419.

38 K Mahnke, Y Qian, J Knop, AH Enk. Induction of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 2003;101:4862-4869.

39 K Kretschmer, I Apostolou, D Hawiger, K Khazaie, MC Nussenzweig, H von Boehmer. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6:1219-1227.

40 S Yamazaki, T Iyoda, K Tarbell, K Olson, K Velinzon, K Inaba, RM Steinman. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:235-247.

41 S Yamazaki, AJ Bonito, R Spisek, M Dhodapkar, K Inaba, RM Steinman. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- $\beta$  for the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 2007;110:4293-4302.

42 A Ouabed, FX Hubert, D Chabannes, L Gautreau, M Heslan, R Josien. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:5862-5870.

43 J Lehmann, J Huehn, M de la Rosa *et al.* Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13031-13036.

- 44 M Mandapathil, S Lang, E Gorelik, TL Whiteside. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 2009;346:55-63.
- 45 T Ito, S Hanabuchi, YH Wang *et al.* Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28:870-880.
- 46 JA Emamaullee, J Davis, S Merani, C Toso, JF Elliott, A Thiesen, AM Shapiro. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009;58:1302-1311.
- 47 WH Abdulahad, CA Stegeman, PC Limburg, CG Kallenberg. Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 2008;58:2196-2205.
- 48 E Nogueira, S Hamour, D Sawant, S Henderson, N Mansfield, KM Chavele, CD Pusey, AD Salama. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2010.
- 49 E Bettelli, Y Carrier, W Gao, T Korn, TB Strom, M Oukka, HL Weiner, VK Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.
- 50 CT Weaver, LE Harrington, PR Mangan, M Gavrieli, KM Murphy. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-688.
- 51 PR Mangan, LE Harrington, DB O'Quinn *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.
- 52 J Yang, Y Chu, X Yang, D Gao, L Zhu, X Yang, L Wan, M Li. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1472-1483.

## Figure legends

### Figure 1. Characterisation and count of dendritic cells using flow cytometry.

**A**, Gating strategy for identification of DC, and expression of CD86, CD62L and CCR7 on DC subset. **B**, Quantification of DC, myeloid DC and plasmacytoid DC using flow cytometry is shown for controls (HC ; n= 18), remission (RP ; n= 17) and acute patients (AP ; n= 19). There was a significant decrease in total number of Lin<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup> cells in acute phase versus healthy controls, in acute phase versus patients in remission, and in total number of DC with patients in remission versus healthy controls. A similar profile was observed for both mDCs and pDC. **C**, CD62L expression on pDC and mDC is shown with MFI of CD62L – MFI of isotype control. There is an increased expression of CD62L on DC only in the group of acute phase patients. Boxes shown represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles.

### Figure 2. Characterisation and count of Treg using flow cytometry.

**A**, Flow cytometry analysis of Treg and expression of FOXP3 and CD39 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> T cells. **B**, Proportions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> T cells within CD4<sup>+</sup> cells are shown for HC (6.8%, n = 18), remission (7.0%, n = 17), and active (6.7%, n = 19) patients. No significant difference was observed for percentage of T reg cells between the 3 groups. **C**, Absolute number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup> T cells in whole blood are shown for HC (60.3 cells/ $\mu$ L), remission (45.4cells/ $\mu$ L), and active patients (40.1cells/ $\mu$ L). The two groups of patients had a significant decrease in the number of circulating Treg. **D**, **E**. The expression of CD39 and FOXP3 in Treg is indicated for HC and patients. FOXP3 is shown with mean fluorescence intensity and CD39 as percentage within Treg. Boxes shown represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles.

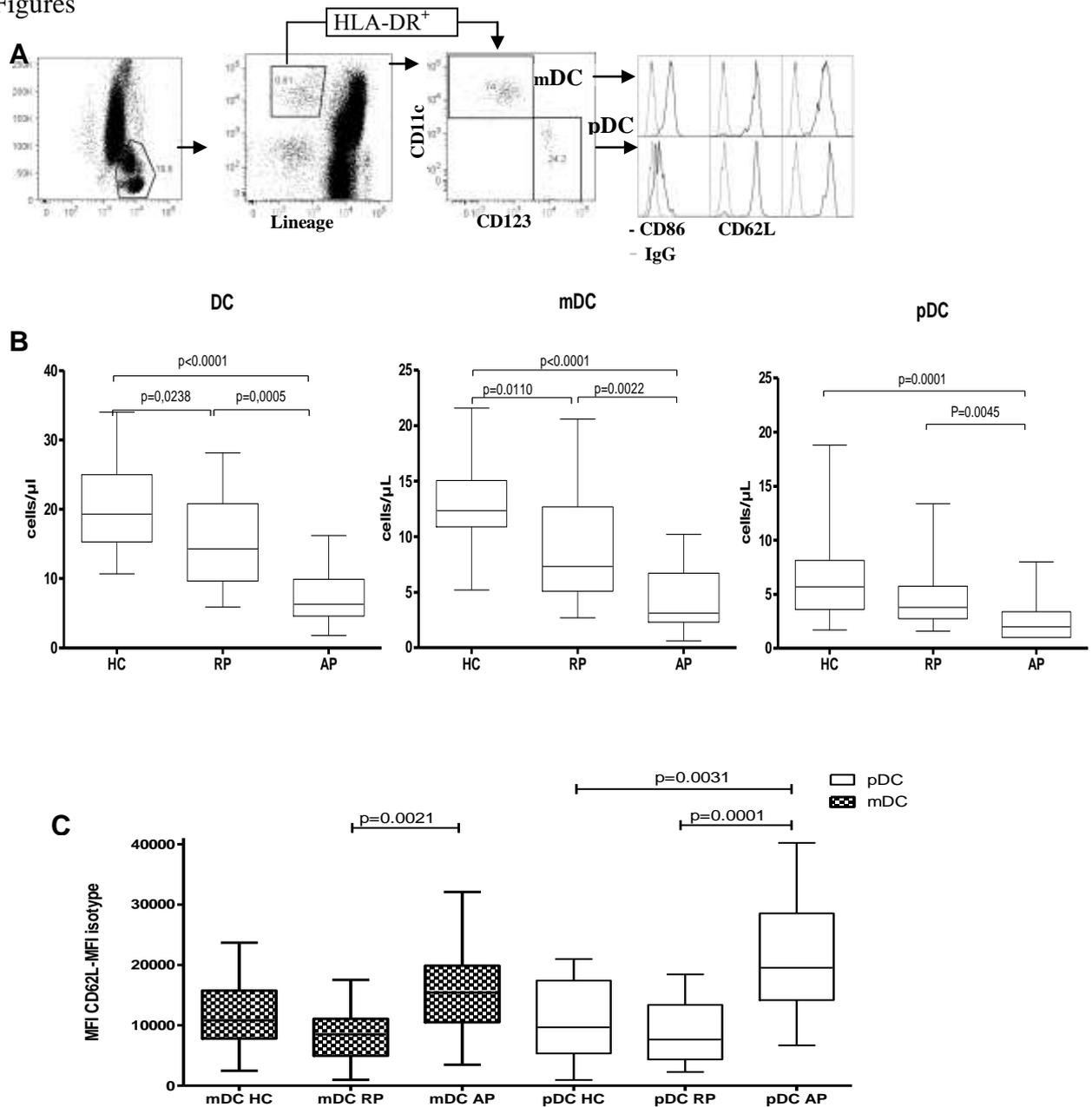
### Figure 3. Suppressive function of circulating T regulatory cells

**A**, Gating strategy for Treg sorting. **B**, The proliferative response was measured by incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine after 4 days of incubation for T regulatory cells alone, T responder cells alone and co-culture (ratio1/1). Results of proliferation in cpm are expressed as mean value (with SEM) of healthy controls (HC ; n= 18), remission patients (RP ; n= 17), and active patients (PA ; n= 19). **C**, The percentage of suppression of responding cells was determined as  $1 - (\text{proliferation of co-culture}/\text{proliferation of responder population alone}) \times 100$ . T cell patients exhibited less suppressive activity than healthy controls. Boxes shown represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles. **D**, Boxes represent results from suppressive assays with Treg from patient and effector cells from control. They were done with a patient in acute phase and a healthy control. Black boxes represent suppression with HC Treg, and white boxes with patient Treg.

**Figure 4 Concentration of IL-17 in co-culture supernatants.**

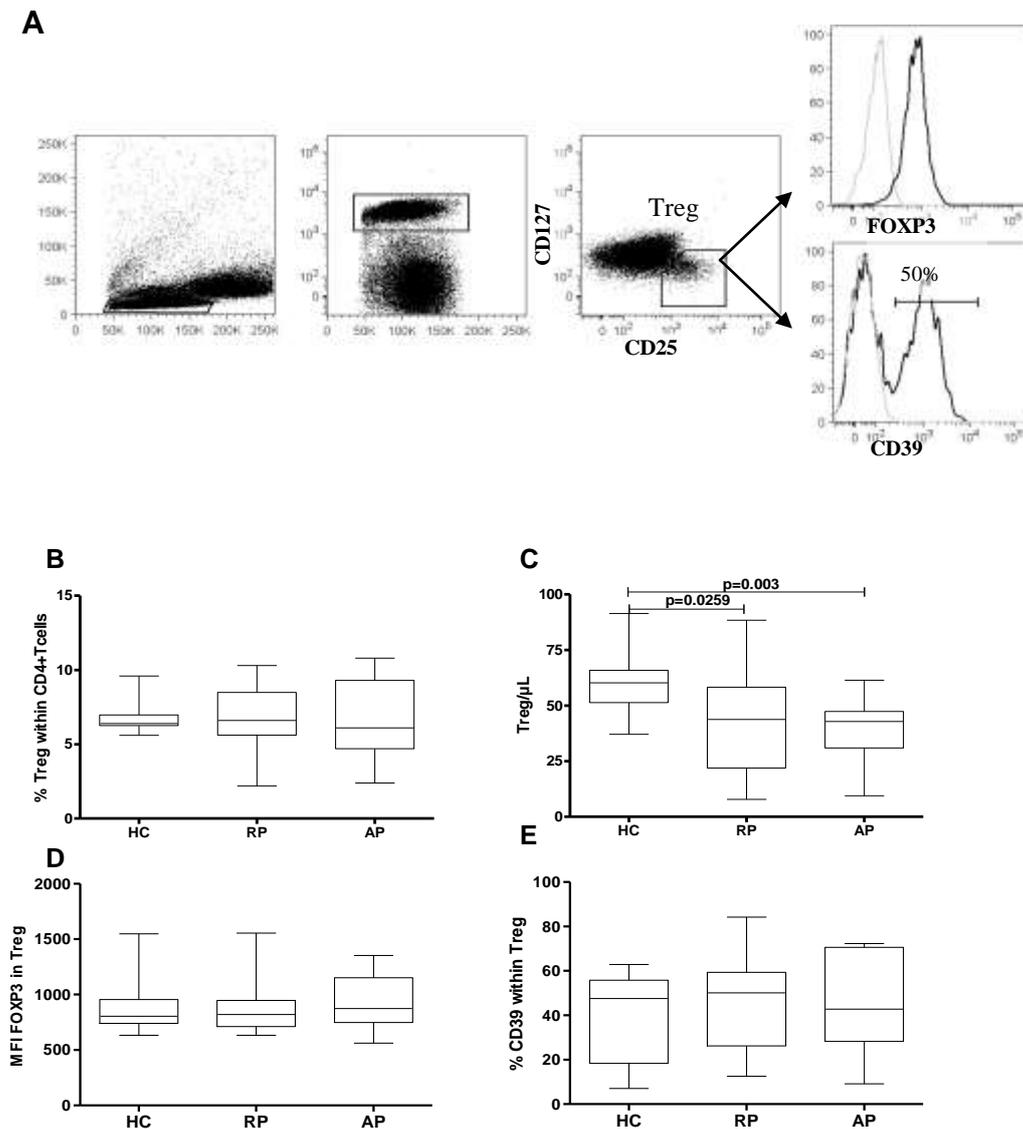
IL-17 was quantified in supernatant using a multiplex fluorescent bead immunoassay: the levels of IL-17 produced by Treg, T responder cells and co-culture were not statistically different between the 3 groups. Treg cells produced less IL-17 than T responder cells, and co-culture of Treg with effector T cells did not result in the suppression of IL-17 production in any group. No Th17 deviation in AAV patients was observed.

Figures



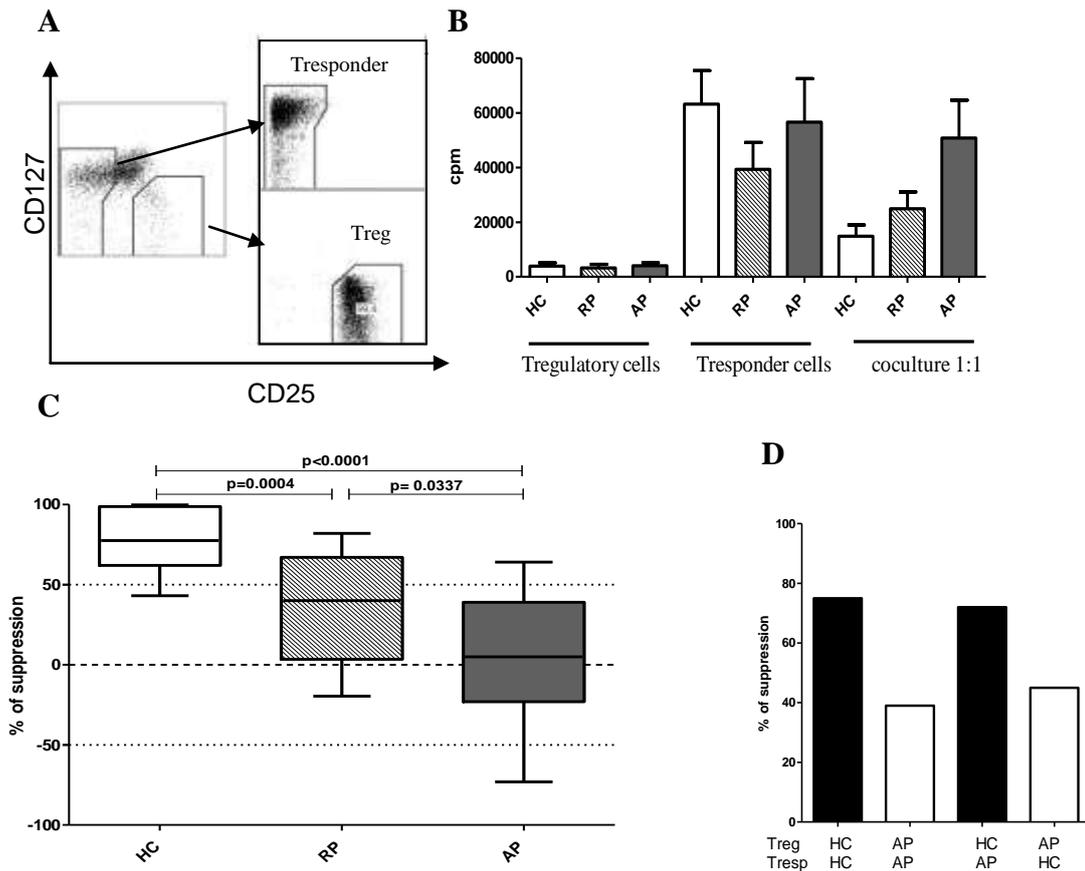
**Figure 1. Characterisation and count of dendritic cells using flow cytometry.**

**A**, Gating strategy for identification of DC, and expression of CD86, CD62L and CCR7 on DC subset. **B**, Quantification of DC, myeloid DC and plasmacytoid DC using flow cytometry is shown for controls (HC ; n= 18), remission (RP ; n= 17) and acute patients (AP ; n= 19). There was a significant decrease in total number of Lin<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup> cells in acute phase versus healthy controls, in acute phase versus patients in remission, and in total number of DC with patients in remission versus healthy controls. A similar profile was observed for both mDCs and pDC. **C**, CD62L expression on pDC and mDC is shown with MFI of CD62L – MFI of isotype control. There is an increased expression of CD62L on DC only in the group of acute phase patients. Boxes shown represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles.



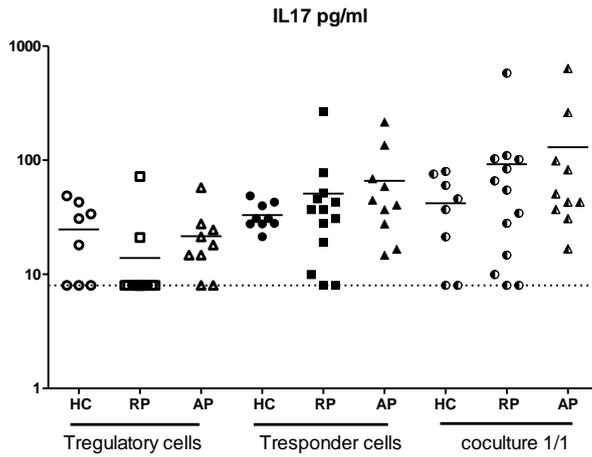
**Figure 2. Characterisation and count of Treg using flow cytometry.**

**A**, Flow cytometry analysis of Treg and expression of FOXP3 and CD39 in  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  T cells. **B**, Proportions of  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  T cells within  $CD4^+$  cells are shown for HC (6.8%,  $n = 18$ ), remission (7.0%,  $n = 17$ ), and active (6.7%,  $n = 19$ ) patients. No significant difference was observed for percentage of T reg cells between the 3 groups. **C**, Absolute numbers of  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$  T cells in whole blood are shown for HC (60.3 cells/ $\mu$ L), remission (45.4cells/ $\mu$ L), and active patients (40.1cells/ $\mu$ L). The two groups of patients had a significant decrease in the number of circulating Treg. **D**, **E**. The expression of CD39 and FOXP3 in Treg is indicated for HC and patients. FOXP3 is shown with mean fluorescence intensity and CD39 as percentage within Treg. Boxes shown represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles.



**Figure 3. Suppressive function of circulating T regulatory cells**

**A**, Gating strategy for Treg sorting. **B**, The proliferative response was measured by incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine after 4 days of incubation for T regulatory cells alone, T responder cells alone and co-culture (ratio1/1). Results of proliferation in cpm are expressed as mean value (with SEM) of healthy controls (HC ; n= 18), remission patients (RP ; n= 17), and active patients (PA ; n= 19). **C**, The percentage of suppression of responding cells was determined as  $1 - (\text{proliferation of co-culture} / \text{proliferation of responder population alone}) \times 100$ . T cell patients exhibited less suppressive activity than healthy controls. Boxes shown represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles. **D**, Boxes represent results from suppressive assays with Treg from patient and effector cells from control. They were done with a patient in acute phase and a healthy control. Black boxes represent suppression with HC Treg, and white boxes with patient Treg.



**Figure 4. Concentration of IL-17 in co-culture supernatants.** IL-17 was quantified in supernatant using a multiplex fluorescent bead immunoassay: the levels of IL-17 produced by Treg, T responder cells and co-culture were not statistically different between the 3 groups. Treg cells produced less IL-17 than T responder cells, and co-culture of Treg with effector T cells did not result in the suppression of IL-17 production in any group. No Th17 deviation in AAV patients was observed.

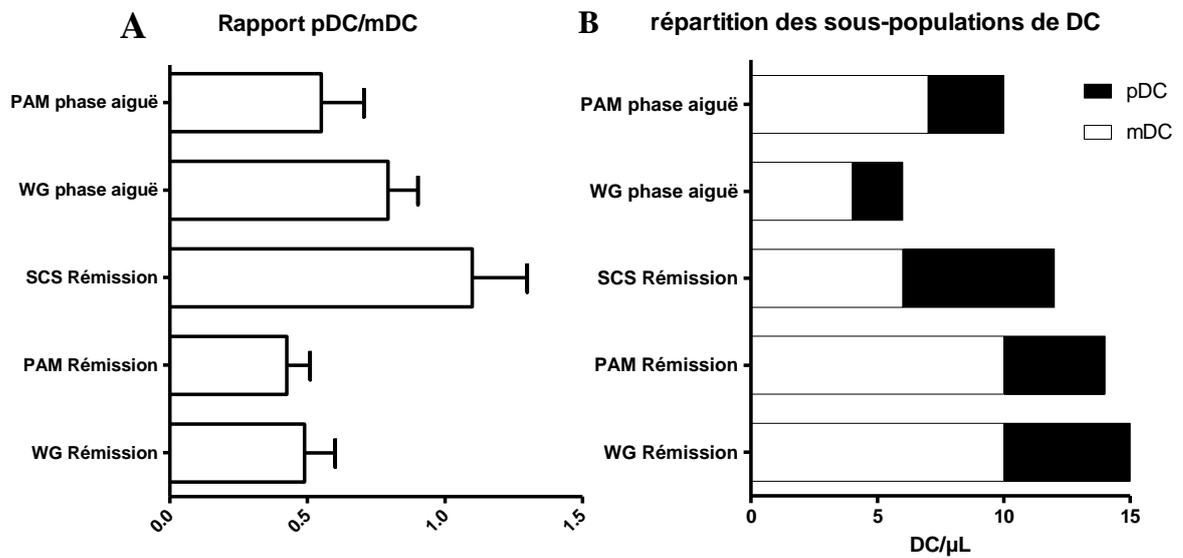
## Résultats complémentaires

### I.1.a. Répartition des DC circulantes dans le syndrome de Churg

#### Strauss:

L'analyse des DC et des Treg a volontairement été faite sur l'ensemble des patients ayant une vascularite à ANCA. En effet, tous les patients avaient des ANCA au diagnostic. Les mécanismes par lesquels ces ANCA entraînent la formation de lésions dans les vaisseaux sont connus et semblent communs aux différentes VAA. Nous sommes donc partis de l'hypothèse que les mécanismes physiopathologiques qui entraînent la production d'ANCA pouvaient être communs aux trois types de VAA. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, cette entité représente 3 maladies différentes et nous avons donc analysé s'il y avait des différences entre les trois types de VAA.

Il est tout d'abord important de noter que la répartition des VAA n'est pas équilibrée entre les différentes vascularites au sein de la cohorte de patients. Pour les patients en rémission, la majorité sont des granulomatoses de Wegener (11/17), les autres patients sont des PAM (4/17) et une minorité de SCS (2/17). Dans le groupe de patients en phase aiguë, les trois quarts des patients sont des GW, l'autre quart des PAM et, il n'y a pas de SCS. Le seul point notable de différence entre les 3 types de vascularites concerne la répartition des sous-types de DC circulantes. En effet, chez les patients SCS, nous avons observé une inversion du rapport pDC/mDC qui n'est pas retrouvé dans la PAM ni dans La GW (figure 15). Ce résultat est bien sur difficile à interpréter étant donné le petit nombre de patients SCS dans cette étude, mais pourrait s'avérer intéressant. Ainsi, cette augmentation de pDC dans les SCS par rapport aux autres VAA pourrait jouer un rôle dans la composante allergique de la maladie en favorisant l'orientation des cellules T vers la voie Th2. Les niveaux d'expression de CCR7 et de CD62L sur les DC se trouvent dans les valeurs inférieures pour ces deux patients, mais là encore ces résultats ne sont pas interprétables étant donné le petit nombre de patients. Concernant l'expression de CD86 sur les DC nous n'observons pas de différence entre les 3 types de vascularites.



**Figure 15 : Répartition des cellules dendritiques circulantes en fonction du type de vascularites**

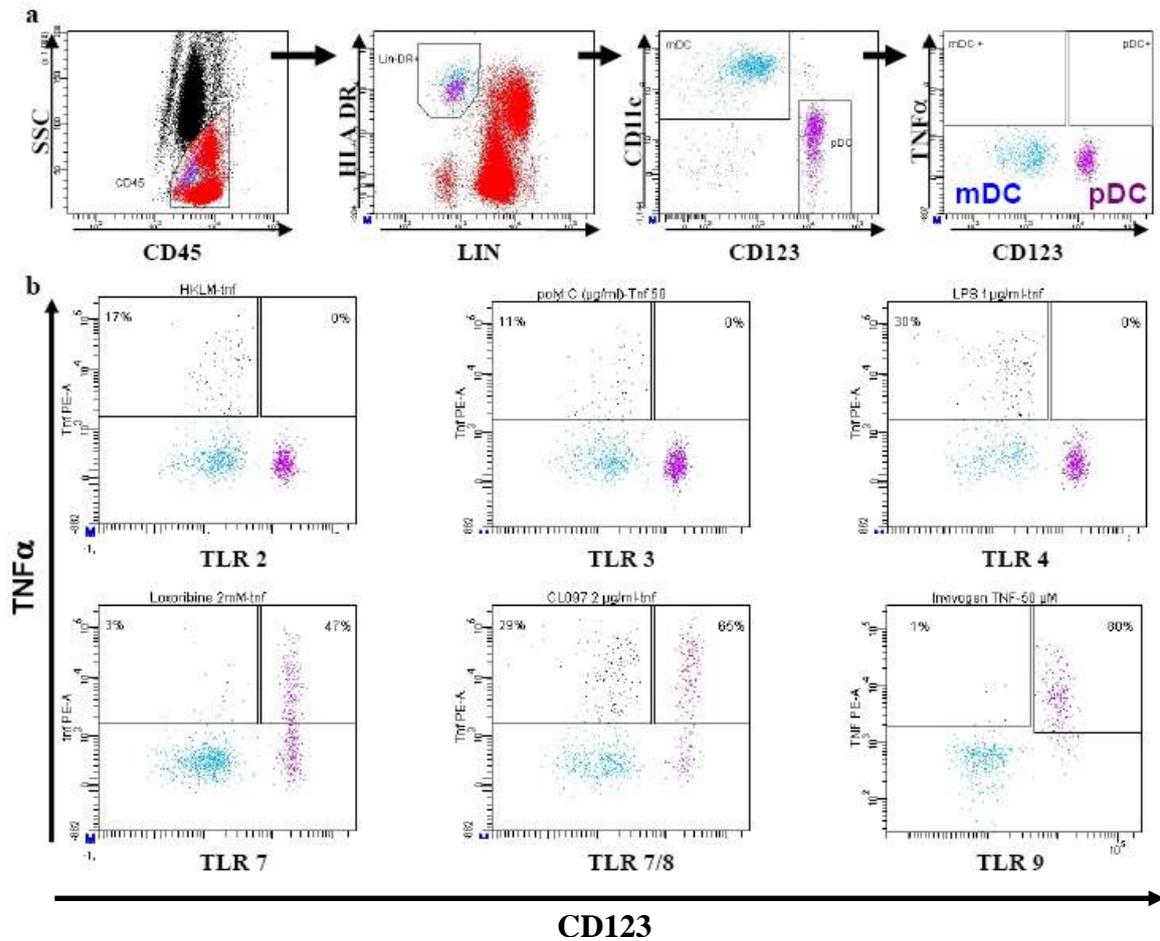
**A :** ratio du nombre de DC plasmacytoïdes sur le nombre de DC myéloïdes dans le sang. Chaque histogramme représente la moyenne des ratios pour les différentes catégories de patients. **B :** répartition des DC plasmacytoïdes et des DC myéloïdes par  $\mu\text{L}$  de sang. Chaque histogramme représente les moyennes du nombre de DC calculées pour chaque type de VAA en rémission et en phase aiguë. Les histogrammes noirs représentent les DC plasmacytoïdes et les blancs les DC myéloïdes.

### **I.1.b. Étude fonctionnelle des cellules dendritiques circulantes**

#### **Introduction**

Les résultats précédemment présentés nous ont conduit à penser que des anomalies fonctionnelles des DC pourraient participer à la physiopathologie des VAA. Par exemple, une réactivité anormale à l'activation des TLR pourrait contribuer à expliquer, d'une part, les relations qui semblent exister entre infections et VAA, d'autre part les relations entre le défaut fonctionnel des Treg et les DC. Ainsi, des modifications du profil de sécrétion de cytokines des DC pourraient être impliquées dans les phénomènes de rupture de tolérance vis-à-vis des auto-antigènes MPO et PR3. Cette hypothèse nous a amené à mettre en place une étude clinique, dont l'objectif est d'explorer les fonctions *ex vivo* des DC myéloïdes et plasmacytoïdes circulantes, afin de déterminer leur production de cytokines en réponse à différents ligands de TLR.

La technique développée dans le laboratoire nous permet d'étudier par cytométrie de flux, sur une faible quantité de sang total, la production de cytokines par les DC, après stimulation par les ligands de TLR. Brièvement, les ligands de TLR sont ajoutés à 90µl de sang et après une incubation de 3h30, un marquage membranaire permettant d'identifier les cellules dendritiques, puis un marquage intra-cytoplasmique avec des anticorps anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-12 et anti-INF $\alpha$  sont réalisés (figure 16).



**Figure 16: Exemples de résultats de marquages des DC après stimulation par les ligands de TLR.**

**Détection du TNF $\alpha$  dans les DC stimulées par 6 différents ligands de TLR.**

- a) **Stratégie d'analyse :** Les DC sont identifiées comme Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, puis l'expression de CD11c et de CD123 permet de distinguer les pDC CD123<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> (en rose) des mDC CD123<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> (en bleu). (Lin est un mélange d'anticorps : CD3, CD14, CD19, CD20, CD16, CD56)
- b) **Les pourcentages correspondent aux pourcentages de cellules TNF $\alpha$  positives dans chaque sous-population de DC. Les TLR, qui correspondent aux ligands de stimulation, sont indiqués sous chaque graphe.**

Ces données sont conformes aux résultats attendus : les mDC répondent aux ligands de TLR 2, 3, 4 et 7/8 et produisent du TNF $\alpha$  et de l'IL-12p40. Et les pDC répondent aux ligands de TLR 7, 7/8, et 9 et produisent du TNF $\alpha$  et de l'INF $\alpha$ , mais pas d'IL-12p40.

**Tableau 4 : Résultats de production de cytokines les DC après stimulation par les ligands de TLR**

LIGANDS		HKLM	PolyI:C	LPS	Loxoribine	CL097/R848	CpG2395
TLR		2+6	3	4	7	7+8	9
mDC	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	++	++	++	+/-	++	-
	<b>IL-12</b>	++	++	++	-	++	-
	<b>IFN<math>\alpha</math></b>	-	-	-	-	-	-
pDC	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-	-	-	++	++	++
	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	+/-	-
	<b>IFN<math>\alpha</math></b>	-	-	-	++	++	++

HKLM : Heat Killed Listeria Monocytogenes

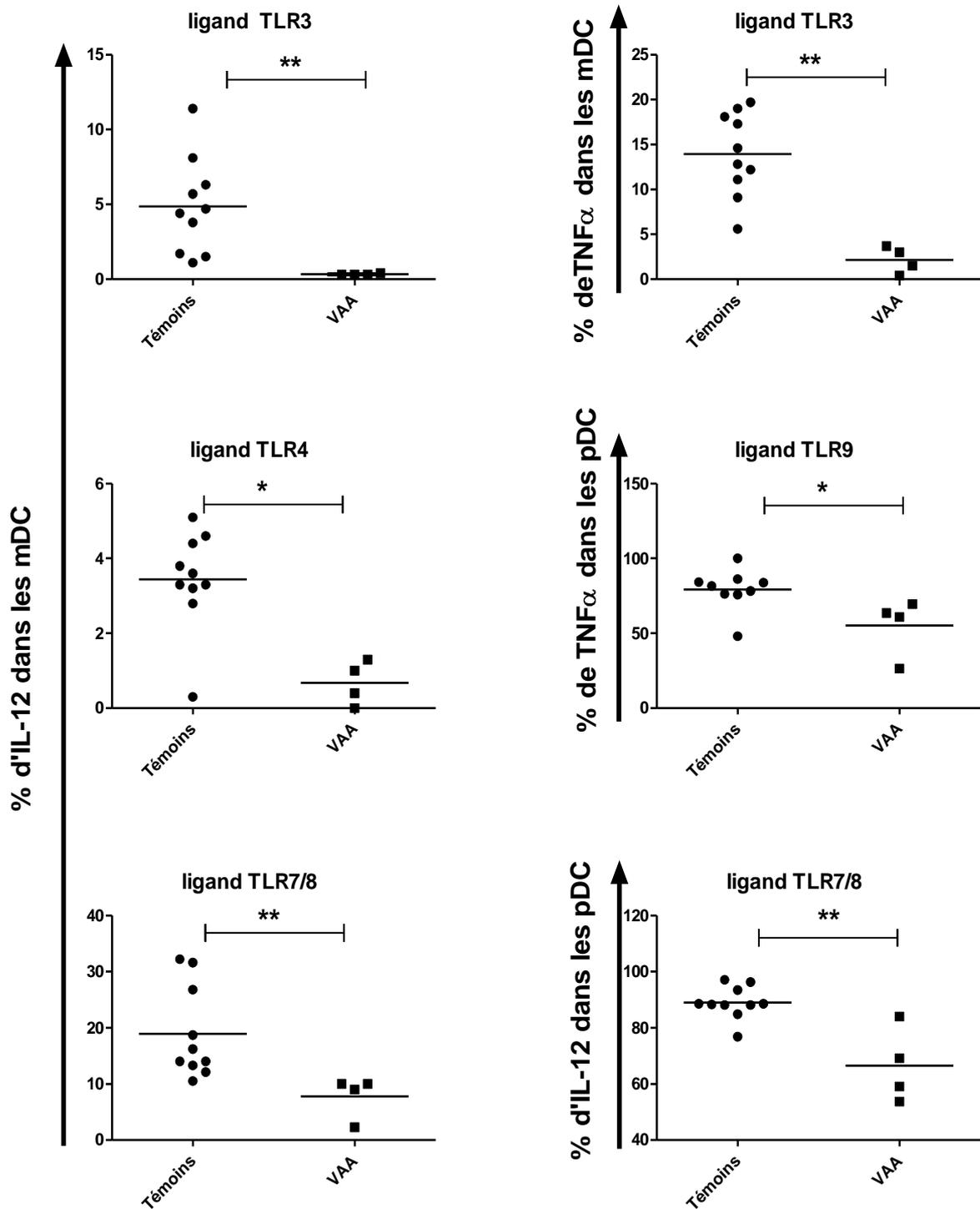
CL097 : Imidazoquinoline de type CL097

LPS : Lipopolysaccharide

CpG 2395 : CpG de type C

Tableau récapitulatif des résultats de production de cytokines des mDC et pDC, obtenus après stimulation par les différents ligands TLR, chez des volontaires sains. Ces données sont conformes aux résultats attendus.

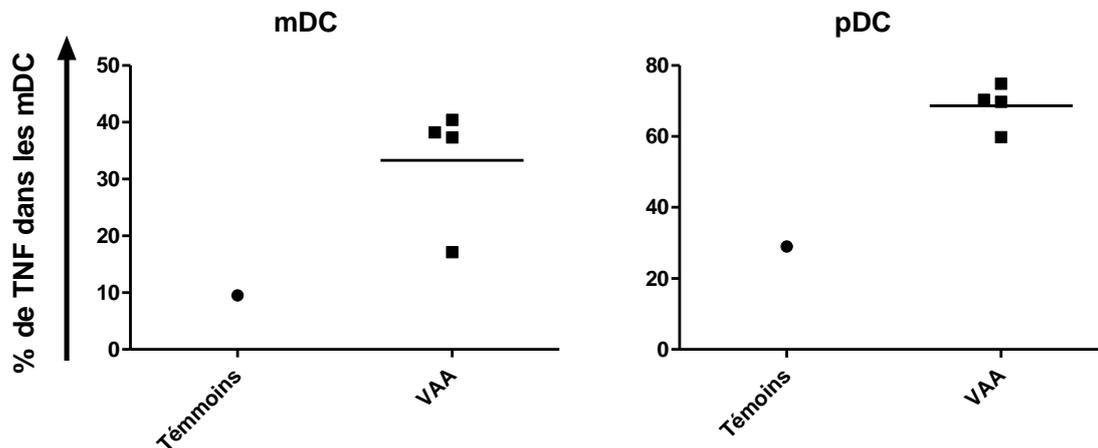
**Résultats :** Nous présentons ici les résultats de 4 patients en phase aiguë de VAA. Trois de ces patients ont été inclus au moment de la découverte de leur VAA. Parmi ces 3 patients, 2 ont une maladie de Wegener avec des ANCA anti-PR3 et le 3<sup>ème</sup> a une PAM avec des ANCA anti-MPO. Le quatrième patient est atteint d'une maladie de Wegener avec des ANCA anti-PR3 en rechute. Les résultats de ces patients sont comparés à ceux de 10 témoins. Les résultats préliminaires de cette étude montrent un défaut de production des cytokines par les DC lorsqu'elles sont activées par certains ligands de TLR. Les tests de stimulation par des ligands de TLR montrent une diminution de la production d'IL-12 par les mDC quand elles sont stimulées par les ligands des TLR3, 4 et 7+8 ainsi qu'une diminution de la production de TNF $\alpha$  lorsqu'elles sont stimulées par un ligand du TLR3. De plus, pour les pDC on observe aussi une diminution de TNF $\alpha$  avec les ligands de TLR7/8 et 9 (cf. figure 17). Nous observons aussi, une tendance à l'augmentation de la production de TNF $\alpha$  dans les pDC et les mDC, après stimulation par la loxoribine (TLR7) (cf. figure 18). Mais, ces derniers résultats n'ont pu être comparés qu'aux résultats de seulement 1 témoin, ils ne sont donc pas statistiquement significatifs, néanmoins ils confirment d'autres résultats préliminaires obtenus lors de la mise au point de la technique. Ces résultats devront donc être vérifiés sur un plus grand nombre de patients. L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement, qu'il existe des anomalies fonctionnelles des 2 populations de DC circulantes dans les VAA.



**Figure 17 : Production de cytokines dans les DC après stimulation par des ligands de TLR .**

La production de cytokine est exprimée en pourcentage dans les pDC ou les mDC. Ces graphes montrent, une diminution de la production d'IL-12 par les mDC quand elles sont

stimulées par les ligands des TLR3, 4 et 7+8, ainsi qu'une diminution de la production de TNF $\alpha$  lorsqu'elles sont stimulées par un ligand du TLR3. Pour les pDC, une diminution de TNF $\alpha$  avec les ligands de TLR7/8 et 9. Les barres horizontales correspondent aux moyennes des pourcentages et les p ont été déterminés par un test de Mann Whitney. Les résultats sont significatifs si  $p < 0,05$ . (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).



**Figure 18: Pourcentage de TNF sécrété après stimulation par la loxoribine (ligand TLR7).**

On observe une tendance à l'augmentation de la production de TNF $\alpha$ .

Tableau récapitulatif des résultats :

= Résultats équivalents entre les patients et les témoins.

↘ Résultats significativement diminués chez les patients par rapport aux témoins.

↗ Résultats augmentés (non significatifs) chez les patients

LIGAND		HKLM	Poly :IC	LPS	Loxoribine	CL097/R848	CpG2395
TLR		2+6	3	4	7	7+8	9
mDC	TNF $\alpha$	=	↘	=	(↗)	=	-
	IL-12	=	↘	=	-	↘	-
	IFN $\alpha$	-	-	-	-	-	-
pDC	TNF $\alpha$	-	-	-	(↗)	↘	↘
	IL-12	-	-	-	-	=	-
	IFN $\alpha$	-	-	-	=	↘ ns	=

### **I.1.c. Résultats complémentaires sur les lymphocytes**

Nous confirmons l'existence d'une lymphopénie chez les patients porteurs de VAA en l'absence de traitement immunosuppresseurs. Le taux moyen de lymphocytes est inférieur chez les patients en phase aiguë par rapport aux patients en rémission. Nous n'avons par contre pas trouvé de corrélation entre le taux d'ANCA et le taux de lymphocytes. Ceci concorde avec les études qui ne trouvent pas de corrélation entre le taux d'ANCA et l'évolution de la maladie (Tervaert, van der Woude et al. 1989; Schmitt and van der Woude 2004).

Afin de pouvoir expliquer le déficit des Treg nous avons mesuré la concentration de plusieurs cytokines dans les surnageants de co-culture qui ont servi à déterminer la fonction des Treg. Les surnageants ont été récoltés à 4 jours de culture puis congelés à -80°C. Le dosage des cytokines a été effectué par la technologie luminex<sup>TM</sup> (technique de microcytométrie en flux). Les surnageants de 7 témoins, 10 patients en rémission et 10 patients en phase aiguë ont été dosés. Les résultats pour l'IL-17 sont présentés dans l'article soumis. Nous avons observé des concentrations supérieures chez les patients porteurs de VAA par rapport aux témoins, pour l'IFN $\gamma$ , l'IL-2, l'IL-2R, l'IL-8, MCP1 (Monocyte chemoattractant protein 1), MIP1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1) et MIP1 $\alpha$ . Ces résultats montrent la présence d'un environnement en cytokines pro-inflammatoires IFN $\gamma$ , MCP1, MIP1 $\beta$  et MIP1 $\alpha$  chez les patients. L'IL-8 est une cytokine dont le rôle principal est d'assurer le recrutement des PNN, l'augmentation de production de cette cytokine par les lymphocytes T CD4 des patients porteurs de VAA concorde donc avec l'implication des PNN dans ces vascularites.

## Introduction

Une des équipes de l'unité INSERM U643 dans laquelle j'ai effectué mes travaux est spécialisée dans la caractérisation phénotypique et fonctionnelle, des cellules sanguines de patients tolérants un greffon rénal, à distance de la greffe et sans immunosuppression (équipe 4 P. JP Souillou et Dr Sophie Brouard). Dans le cadre d'un projet collaboratif, il nous a semblé pertinent de profiter de ces patients rares, afin de caractériser leurs DC circulantes. Nous avons donc quantifié et caractérisé les DC de 33 patients greffés rénaux. Ces 33 patients sont divisés en 2 groupes, un groupe de 18 patients tolérants (TOL) et un groupe de 15 patients en rejet chronique (RC). La tolérance immunitaire peut être définie, en transplantation, comme un état de paralysie immunitaire spécifique d'un antigène donné, coexistant avec le maintien d'une immunocompétence normale vis-à-vis des autres antigènes, sans destruction du greffon (Bach 2006). Le rejet chronique se manifeste par une dégradation progressive de la fonction rénale associée à des lésions histologiques particulières et, il conduit à la destruction du greffon. Ce sont les réponses immunes induites par les allo-antigènes du greffon qui provoquent les lésions histologiques.

Les DC de ces patients ont été caractérisées par cytométrie en flux avec les mêmes anticorps que ceux utilisés pour l'étude sur les patients VAA. Chez ces patients les deux principales sous-populations de DC, mDC et pDC ont été quantifiées et caractérisées avec les marqueurs CD86, CD62L et CCR7. Le marqueur TLR4 a été ajouté en raison de l'observation antérieure, d'une augmentation de TLR4 sur les monocytes des patients RC par rapport aux tolérants (Braudeau, Ashton-Chess et al. 2008).

Les valeurs des moyennes de chaque résultat ont été analysées entre les deux groupes de patients par le test statistique de Mann-Whitney, et une valeur de p inférieure à 0.05 était considérée comme statistiquement significative.

## Résultats :

1) Nous n'avons pas trouvé de différence de nombre de DC circulantes entre les RC et les tolérants. De même, il n'y avait pas de différence entre le nombre de pDC et de mDC dans les deux groupes. (cf. figure 19A et tableau 5)

	Lin-HLADR+/ $\mu$ L	mDC/ $\mu$ L	pDC/ $\mu$ L
TOL (n=18)	25	13	8.5
RC (n=15)	22	14	6,5

**Tableau 5 : Nombres de DC circulantes**

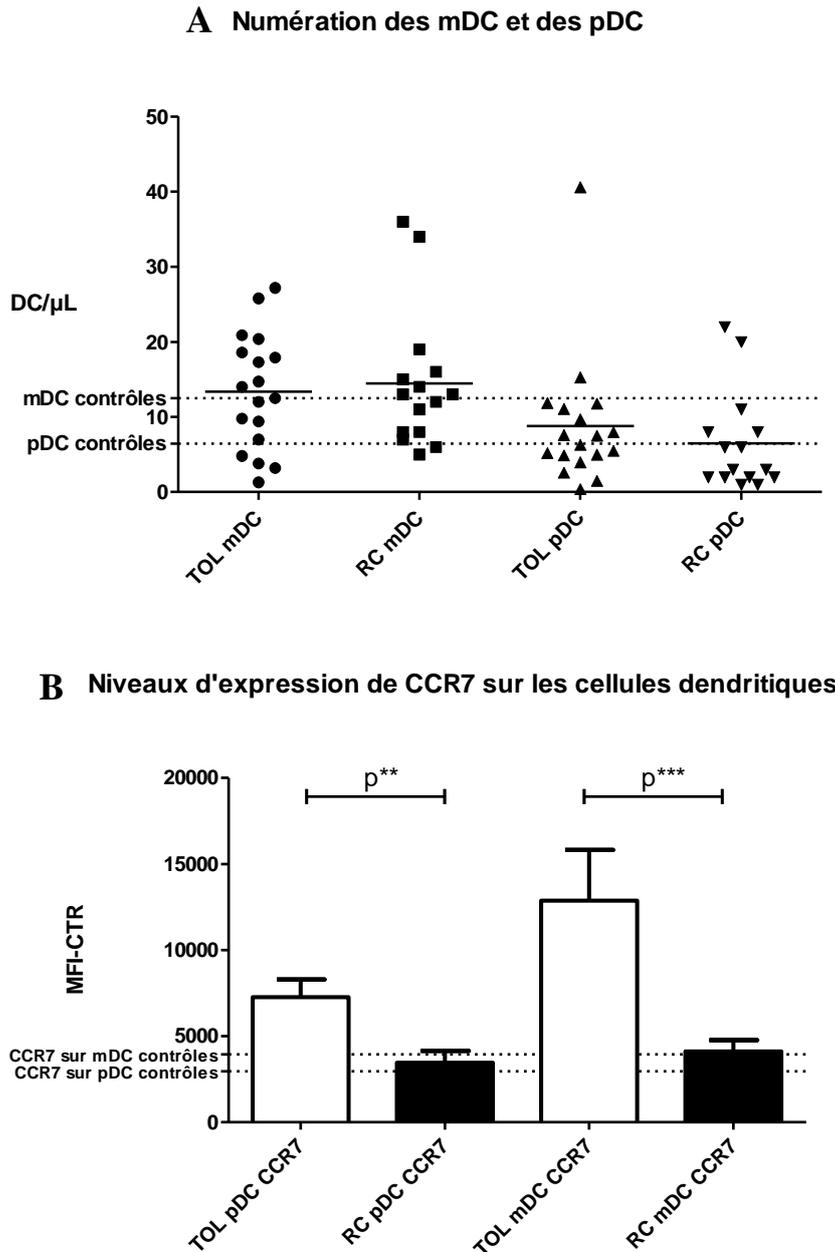
(en valeur absolue/ $\mu$ l)

2) Les niveaux d'expression de TLR4, CD86, CD62L sur les mDC et les pDC sont semblables chez les RC et chez les tolérants (cf. tableau 2). En revanche, l'expression de CCR7 est significativement supérieure chez les patients tolérants par rapport aux patients rejets chroniques sur les mDC ( $p= 0.0010$ ) ainsi que sur les pDC ( $p= 0.0025$ ) (cf. figure 19B)

	TLR 4		CD86		CD62L		CCR7	
	mDC	pDC	mDC	pDC	mDC	pDC	mDC	pDC
TOL	1118	254	1429	358	9535	12089	12874	7276
RC	747	180	1138	240	8275	14440	4112	3446

**Tableau 6 : Expression de TLR4, CD86, CD62L et CCR7 sur les mDC et les pDC**

(résultats exprimés en moyenne de fluorescence du marqueur - moyenne de fluorescence de l'isotype contrôle sur 100% des mDC ou des pDC)



**Figure 19 : Exploration des DC chez les tolérants de greffe rénale**

**A:** Numération des mDC et pDC circulantes. Il n'y a pas de différence entre les RC et les tolérants. **B :** Expression de CCR7 sur les DC : Chez les tolérants, sur les mDC et sur les pDC l'expression de CCR7 est supérieure par rapport aux rejets chroniques. Sur les deux graphes, les pointillés correspondent aux moyennes observées dans la cohorte des témoins de l'étude vascularites à ANCA. Les barres correspondent aux moyennes des intensités de fluorescence, les barres blanches pour les patients tolérants et les noires pour les rejets chroniques. Les pourcentages et les p ont été déterminés par un test de Mann Whitney, les résultats sont significatifs si  $p < 0,05$  ;  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,005$ .

***DISCUSSION ET PERSPECTIVES***

### **Pertinence du suivi des cellules dendritiques circulantes**

Les résultats obtenus chez les patients atteints de vascularites à ANCA et chez les patients tolérants sont intéressants d'un point de vue «monitorage» des DC. En effet, ils montrent que l'étude des DC circulantes sur du matériel non manipulé (sang frais), apporte des résultats pertinents et spécifiques de l'état pathologique étudié. Et cela, malgré la rareté des DC circulantes et malgré le fait, que les DC de ce compartiment ne sont que le reflet d'évènements qui ont lieu dans les tissus inflammatoires ou les organes lymphoïdes secondaires. Le nombre de DC circulantes peut varier en fonction des conditions physiologiques (comme l'âge) et des situations pathologiques. Il semblerait que le nombre de pDC diminue avec l'âge, alors que celui des mDC reste stable (Perez-Cabezas, Naranjo-Gomez et al. 2007). Les pDC représentent une petite partie des PBMC du sang et leur diminution avec l'âge est faible. La diminution des pDC peut donc passer inaperçue si on observe l'ensemble des DC du sang. Ceci peut expliquer certains résultats contradictoires quant à l'évolution des DC avec l'âge (Della Bella, Bierti et al. 2007). La technique utilisée pour quantifier les DC peut également influencer le résultat. Ainsi la numération des DC sur sang total, avec l'utilisation de billes calibrées, est plus précise qu'une technique de numération après séparation des cellules par ficoll, et calcul des valeurs absolues, à partir des pourcentages observés dans l'ensemble des PBMC (Perez-Cabezas, Naranjo-Gomez et al. 2007). L'étude de marqueurs complémentaires permet aussi d'apporter des résultats intéressants. Dans notre travail, nous rapportons une augmentation de l'expression de CD62L et de CCR7 dans deux situations pathologiques différentes. CD62L et CCR7 orientent la migration des DC dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, via les vaisseaux lymphatiques, pour présenter l'antigène aux lymphocytes T (Forster, Schubel et al. 1999; Gunn 2003). La régulation de l'expression de CCR7 et de CD62L joue donc un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immune. L'étude de leur expression peut aider à comprendre l'orientation des DC. Ainsi, des DC dites semi-matures qui acquièrent l'expression de CCR7 après ingestion de cellules apoptotiques ont été décrites. Ces DC semi-matures n'évoluent pas vers un phénotype mature, mais malgré tout, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Elles sont incapables d'activer les lyT et donc potentiellement tolérogènes (Gallucci, Lolkema et al. 1999; Hirao, Onai et al. 2000; Lutz and Schuler 2002).

## Les cellules dendritiques dans les VAA

Dans notre étude sur les vascularites à ANCA, l'âge des témoins correspond à celui des patients et, nous avons travaillé sur sang total avec des billes calibrées. Pour la première fois, à notre connaissance, nous avons montré une diminution du nombre de DC chez les patients atteints de vascularite à ANCA. Cette diminution est plus importante chez les patients en phase aiguë, et elle se répercute dans les mêmes proportions sur les mDC. Par contre, la diminution des pDC n'est significative que dans le groupe des patients en phase aiguë. Plusieurs événements sont susceptibles d'entraîner une diminution du nombre de DC circulantes. Cette diminution peut s'expliquer par un défaut de différenciation des progéniteurs dans la moelle osseuse, par une diminution de la survie des DC ou bien, par la mobilisation des DC dans les organes lymphoïdes ou sur le site de l'inflammation. Or, pendant la phase aiguë la diminution des DC est plus prononcée, et elle est associée à une augmentation de CD62L. Cette dernière observation est un argument en faveur du recrutement des DC dans les organes lymphoïdes secondaires lors des poussées de vascularites. Une diminution du nombre de DC a déjà été rapportée dans d'autres MAI. Dans la maladie cœliaque, une diminution des DC et plus particulièrement des pDC associée à un phénotype immature et à un déficit fonctionnel a été rapportée (Ciccocioppo, Ricci et al. 2007). Une diminution des DC a également été rapportée dans le diabète de type 1 (Vuckovic, Withers et al. 2007). Jongbloed *et al.* ont montré, chez des patients atteints de rhumatisme psoriasique ou de polyarthrite rhumatoïde une diminution de l'expression de CD62L sur les DC, accompagnée d'une réduction des pDC dans les deux pathologies et d'une réduction du nombre de mDC uniquement dans la polyarthrite rhumatoïde (Jongbloed, Lebre et al. 2006). Cette observation dans deux maladies inflammatoires est intéressante, car elle nous permet de supposer que l'augmentation de CD62L concomitante à la diminution des DC observée chez nos patients en phase aiguë, n'est pas la conséquence directe du processus inflammatoire. Une autre étude, cette fois-ci chez les patients VAA, montre la présence de DC dans les infiltrats interstitiels rénaux (Wilde, van Paassen et al. 2009). L'ensemble de ces résultats montre que durant la phase aiguë des VAA, les DC pourraient être recrutées au niveau des organes lymphoïdes secondaires, mais aussi au niveau des tissus inflammatoires.

De plus, les résultats préliminaires sur la fonction des DC suggèrent qu'il existe une modulation dans la fonction des DC des patients atteints de VAA. Nous avons en effet observé que les mDC présentaient une sensibilité inhabituelle à la stimulation du

TLR7. Or, l'expression de TLR7 par des cellules monocytaires est augmentée en présence d'IL-1, de TNF $\alpha$  ou d'IL-6 (Zarembek and Godowski 2002). De plus, il a aussi été mis en évidence que l'INF $\alpha$  pouvait induire l'expression de TLR7 sur les DC dérivées des monocytes et les mDC BDCA1 (Severa, Remoli et al. 2007). Or, chez les patients atteints de VAA une augmentation des taux sériques d'IL-1, de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et d'INF $\alpha$  a été rapportée (Kekow, Szymkowiak et al. 1993; Noronha, Kruger et al. 1993; Tesar, Masek et al. 1998). Enfin, il a été montré que la présence d'ANCA anti-PR3 pouvait entraîner une augmentation de la production de cytokines par des monocytes stimulés par des ligands de TLR. La présence d'ANCA pourrait aussi entraîner une augmentation de la voie de signalisation de plusieurs TLR dans les monocytes (Uehara, Iwashiro et al. 2007). Mais l'expression de PR3 sur les DC n'a pas été montrée. L'augmentation de l'expression de TLR7 sur les DC des patients pourrait être la conséquence d'un environnement cytokinique inflammatoire non contrôlé. Cette hypothèse séduisante demande à être confirmée sur un grand nombre d'échantillons.

Les résultats préliminaires qui montrent un défaut de sécrétion d'IL-12 et de TNF $\alpha$  après stimulation des TLR dans les DC sont comparés à plus de témoins et sont statistiquement significatifs. Ce déficit pourrait être à l'origine d'une altération de la réponse immune innée. Et, cette altération pourrait entraîner un défaut d'inhibition de la réponse inflammatoire et/ou infectieuse et ainsi augmenter l'environnement pro-inflammatoire favorable au développement des VAA. Le défaut de sécrétion de cytokines par les DC pourrait ainsi, entraîner un déséquilibre de l'environnement cytokinique et favoriser l'orientation de réponse immune adaptative vers un profil Th1 Th2 ou Th17. On peut également envisager que cette diminution de production de cytokine soit due au recrutement spécifique de DC productrices de cytokines dans les organes lymphoïdes.

Au total, nous avons montré dans les VAA une diminution des DC corrélée à l'activité de la maladie. De plus, des résultats préliminaires suggèrent qu'il existe des modifications des fonctions innées des DC circulantes chez les patients. Étant donné la place centrale des DC dans la réponse immune, il est possible que les anomalies observées aient un rôle dans le déclenchement des phases précoces des VAA ainsi que dans les rechutes.

- **Les cellules dendritiques chez les patients tolérants**

Dans une autre partie de notre travail, nous avons montré une augmentation du récepteur de chimiokines CCR7 sur les DC de patients tolérants par rapport à des patients en rejet chronique de greffe de rein, sans variation du nombre de DC circulantes. Outre son rôle dans l'orientation des DC vers les organes lymphoïdes secondaires, CCR7 aurait aussi un rôle dans la survie, la vitesse de migration et la maturation des DC (Kikuchi, Yanagawa et al. 2005; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2006). CCR7 a donc un rôle important dans l'initiation des réponses innées. Le rejet chronique se caractérise par une réponse aux allo-antigènes présents dans le greffon, ici l'augmentation de CCR7 sur les DC des patients tolérants pourrait être le reflet d'une activité immunologique bénéfique pour la suppression de la réponse allo-immune. Ce phénotype pourrait correspondre au phénotype semi-mature décrit précédemment sur des DC in vitro possédant une activité plutôt tolérogène (Lutz and Schuler 2002; Reis e Sousa 2006). Ce phénotype n'est pas retrouvé chez les rejets chroniques et il se peut que qu'il soit inhibé par les traitements immunosuppresseurs. Le but initial de cette étude était la recherche de marqueurs de tolérance, ici CCR7 apparaît donc comme un marqueur différentiel entre les rejets chroniques et les tolérants. Actuellement d'autres travaux, qui ont pour but d'évaluer la fonction des DC et l'expression de CCR7 sur les lymphocytes B chez les tolérants, sont en cours.

- **Les Treg dans les VAA**

Nous avons montré que l'activité des Treg était altérée chez les patients atteints de VAA. L'équipe d'Abdulahad a montré, chez des patients en rémission atteints de la granulomatose de Wegener, une augmentation de la proportion des Treg mémoires (FOXP3<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) dans les cellules T CD4 et un défaut de suppression des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Abdulahad, Stegeman et al. 2007). Dans cette étude la proportion de Treg était évaluée à partir de PBMC et la valeur absolue des Treg n'était pas indiquée. De plus, la majorité des patients étaient traités par immunosuppresseurs. Dans notre étude, nous observons une diminution modérée du nombre de Treg sans variation de la proportion de Treg dans les CD4 sur sang total par rapport aux témoins. Cette différence de résultats peut s'expliquer, par la différence du matériel étudié (PBMC versus sang

total) ou par la différence de marqueurs utilisés (FOXP3<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, CD45RO<sup>+</sup> versus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/-</sup>).

Cependant, les résultats les plus intéressants concernent la fonction des Treg. Un défaut fonctionnel des Treg a déjà été rapporté dans plusieurs études, uniquement dans la GW, chez des patients traités par immunosuppresseurs, et à chaque fois les Treg étaient isolés avec le CD25 comme unique marqueur (Klapa, Mueller et al.; Abdulahad, Stegeman et al. 2007; Morgan, Day et al. 2010). Notre étude renforce donc ces résultats et apporte des éléments nouveaux et intéressants. En effet, les patients de notre étude sont atteints de GW, de PAM ou de SCS. Ils n'ont pas de traitement immunosuppresseur et, le défaut de suppression est observé à deux moments différents de l'évolution de la maladie, montrant un déficit fonctionnel accru lors des poussées par rapport aux rémissions. De plus, nous avons utilisé le marqueur CD127 couplé au CD25 pour isoler les Treg. Or, nous avons vu plus haut que le CD25 seul est insuffisant pour identifier les Treg. Ce point est important, car dans la sclérose en plaques, *Michel et al.* ont montré que la fonction des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> était équivalente à celle des témoins (Michel, Berthelot et al. 2008). Tandis que d'autres équipes ont montré une diminution de cette fonction en utilisant uniquement le marqueur CD25 pour identifier les Treg. De plus, dans les VAA il existe une augmentation des cellules activées CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Il était donc nécessaire de vérifier que le défaut de suppression des Treg observé était bien la conséquence d'un déficit des Treg et non pas la conséquence d'une contamination par des cellules activées. Le déficit des Treg, que nous observons, pourrait être un co-facteur important dans les vascularites à ANCA, et il pourrait expliquer l'activation récurrente de lymphocytes T mémoires probablement impliqués dans les rechutes. En effet, un défaut des Treg entraînerait un défaut dans le contrôle des réponses auto-immunes et faciliterait la réactivation du groupe de cellules T mémoires effectrices observées dans les VAA. En situation non pathologique, il est établi que les Treg ont besoin pour survivre en périphérie d'être activées par la rencontre avec leur antigène spécifique, et que cette stimulation est également indispensable à l'exercice de leurs propriétés suppressives. Les CPA ont donc un rôle essentiel dans le fonctionnement des Treg. Plusieurs études ont montré que les DC pouvaient contrôler la fonction des Treg (Yamazaki, Iyoda et al. 2003; Chappert, Leboeuf et al. 2008; Yamazaki and Steinman 2009). Dans les VAA, nous observons un défaut de suppression des Treg associé à un déficit quantitatif et fonctionnel des cellules dendritiques circulantes. Le déficit des Treg est intrinsèque aux Treg, et n'est pas dû à une résistance des cellules effectrices vis à vis de la suppression

des Treg. Ces résultats nous conduisent à suggérer que les interactions entre Treg et cellules dendritiques puissent être altérées dans les VAA. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une production locale de cytokines inhibitrices, sur les sites de l'inflammation, soit à l'origine de ce déficit ou d'une amplification de ce déficit.

Plusieurs études ont montré que les Treg pouvaient être divisés en sous-groupes, en fonction de l'expression de marqueurs comme LAP (Chen, Yan et al. 2008), CD103 (Lehmann, Huehn et al. 2002) ou CD39 (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007). Ainsi, les Treg qui expriment l'ectoenzyme CD39 seraient capables de supprimer l'activation des Th17, contrairement aux Treg ne l'exprimant pas. Ce groupe de Treg est très diminué dans la SEP au moment des poussées (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007; Fletcher, Lonergan et al. 2009; Mandapathil, Lang et al. 2009). Nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression de CD39 sur les Treg des patients VAA. La voie Th17 est impliquée dans les processus inflammatoires, dans l'immunité des muqueuses notamment au niveau pulmonaire, ainsi que dans le recrutement des PNN sur le site de l'inflammation. Chez l'homme, la voie Th17 serait impliquée dans plusieurs pathologies auto-immunes (Matusevicius, Kivisakk et al. 1999; Chabaud, Lubberts et al. 2001; Hwang and Kim 2005; Wong, Lit et al. 2008). L'implication des PNN, l'atteinte des muqueuses et la composante inflammatoire observée dans les VAA, nous ont conduits à suggérer qu'une dérégulation de cette voie puisse être impliquée dans la physiopathologie des VAA. De plus, la mise en évidence de la différenciation des T CD4 naïfs en lymphocytes Th17, sous la dépendance du TGF $\beta$ , apparaît mutuellement exclusive de celle des Treg (Bettelli, Carrier et al. 2006). Nous avons donc voulu examiner s'il existait un déséquilibre dans la balance Th17/Treg dans les VAA. Chez l'homme, deux études tendent à montrer l'implication de la voie Th17 dans la physiopathologie des VAA. Abdulahad *et al.* ont montré une orientation accrue Th17 spécifique de PR3 chez des patients atteints de GW en rémission ayant des ANCA anti-PR3 (Abdulahad, Stegeman et al. 2008). Cette expression d'IL-17 est recherchée dans des cellules récemment activées CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, dont le nombre est diminué chez les patients par rapport aux contrôles. Les auteurs attribuent cette diminution, qui relativise l'augmentation d'IL-17 observée dans cette étude, à l'exposition aux traitements immunosuppresseurs. Dans une autre étude, l'équipe de Nogueira trouve des taux sériques d'IL-17 et d'IL-23 significativement supérieur chez les patients en rechute par rapport aux contrôles, et élevé chez une partie des patients en rémission de VAA. Nous n'avons pas retrouvé de déviation Th17 chez les patients de notre étude. En effet, la

faible augmentation de l'IL-17 dans les surnageants de culture des patients n'est pas significative. Pour étayer ces résultats nous avons étudié la sécrétion d'IL-17 après stimulation polyclonale, et là encore, nous n'avons pas retrouvé de différence entre les patients et les contrôles. Étant donné les arguments développés plus haut, la piste de la déviation Th17 dans les VAA est attirante, cependant des travaux complémentaires doivent être menés pour réussir à élucider cette thèse.

Nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression de FOXP3 dans les Treg des patients comparés aux témoins. Cependant, les dernières avancées sur le phénotype des Treg, nous conduisent à penser qu'il serait intéressant de mieux identifier les sous-populations de Treg dans les VAA. En effet, il serait intéressant de distinguer les cellules CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>low</sup> qui *in vitro*, ne suppriment pas les cellules effectrices mais produisent des cytokines pro-inflammatoires (incluant IL-2, IL-17, INF $\gamma$ ), des Treg CD45RO<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> (Miyara, Yoshioka et al. 2009). Les dosages de cytokines effectués dans les surnageants de culture ne nous ont pas permis de comprendre l'origine du dysfonctionnement des Treg dans les vascularites à ANCA. La recherche de gènes impliqués dans ce dérèglement pourrait apporter des indications précieuses pour comprendre quelle est l'origine de ce dysfonctionnement. Nous envisageons donc de comparer les gènes exprimés par les Treg de patients à ceux qui sont exprimés dans les Treg de témoins. Cette étude pourrait se faire par technique de puces à ADN sur les Treg isolés. Enfin, dernièrement, il a été mis en évidence qu'une hormone, la leptine module l'activité des Treg. En effet, *in vitro* la neutralisation de la leptine entraîne une expansion des Treg (De Rosa, Procaccini et al. 2007). Or, récemment une équipe a mis en évidence une diminution des taux de leptine chez les patients VAA (Kumpers, Horn et al. 2008). Il serait donc intéressant de déterminer la place de cette hormone dans le contrôle des Treg, dans les VAA.

L'ensemble des résultats sur les DC et les Treg chez les patients atteints de VAA, nous conduisent à penser qu'il existe une relation entre le déficit des DC et celui des Treg. En effet, il se peut que la réponse Treg soit compromise à cause du nombre limité de DC, qui pourrait entraîner une compétition et une persistance ou une altération fonctionnelle des cellules auto-immunes effectrices ou des Treg, et ainsi le développement d'une auto-immunité. Nous avons envisagé de faire des co-cultures de cellules T naïves en présence de mDC ou de pDC autologues et de ligands de TLR, afin de comparer l'induction de cellules Treg entre les patients et les témoins. Ces expériences pourraient apporter des

éléments sur l'importance du rôle des DC dans la différenciation des Treg, mais elles nécessitent des quantités importantes de sang et sont donc difficiles à mettre en œuvre.

- **Conclusion :**

Le risque de développer une VAA est déterminé par des facteurs environnementaux et génétiques. En particulier, les infections peuvent jouer un rôle dans l'initiation de la maladie ou dans l'incitation d'exacerbations ultérieures. Les lymphocytes T ont une place importante dans la physiopathologie des VAA. Les DC contrôlent à la fois les réponses immunes innées et les réponses adaptatives. Lors de la réponse adaptative, elles orientent la polarisation fonctionnelle Th1, Th2, Treg, Th17 des lymphocytes T. Toutes les anomalies qui pourraient être détectées dans le fonctionnement des cellules dendritiques des patients VAA pourraient servir d'indices dans la compréhension des étapes précoces du processus physiopathologique des VAA et des rechutes. Nous envisageons donc pour le futur, chez les patients VAA, de faire une étude différentielle des gènes des Treg et de continuer l'étude sur la fonction des DC ainsi que l'étude du phénotype des Treg.

**En conclusion, nous avons établi que le nombre de DC ainsi que l'activité suppressive des Treg étaient diminués chez les patients atteints de VAA non traité. L'intensité de ces déficits est supérieure dans les poussées de la maladie. Nous supposons que le déficit observé dans les cellules dendritiques pourrait avoir un lien avec le dysfonctionnement des Treg et pourrait être un point important dans le contrôle défectueux de la tolérance dans les VAA.**

***BIBLIOGRAPHIE***

- Abdulahad, W. H., C. G. Kallenberg, et al. (2009). "Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis." Arthritis Rheum 60(9): 2830-8.
- Abdulahad, W. H., C. A. Stegeman, et al. (2009). "Review article: The role of CD4(+) T cells in ANCA-associated systemic vasculitis." Nephrology (Carlton) 14(1): 26-32.
- Abdulahad, W. H., C. A. Stegeman, et al. (2008). "Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission." Arthritis Rheum 58(7): 2196-205.
- Abdulahad, W. H., C. A. Stegeman, et al. (2007). "Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission." Arthritis Rheum 56(6): 2080-91.
- Abdulahad, W. H., Y. M. van der Geld, et al. (2006). "Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis." Kidney Int 70(5): 938-47.
- Aerts, N. E., E. J. Dombrecht, et al. (2008). "Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis." Cell Immunol 251(2): 109-15.
- Agarwal, K., D. E. Jones, et al. (2000). "CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis." J Hepatol 32(4): 538-41.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem 278(3): 1910-4.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell 124(4): 783-801.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, et al. (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nat Immunol 2(11): 1010-7.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med 188(7): 1359-68.
- Alcorta, D. A., D. A. Barnes, et al. (2007). "Leukocyte gene expression signatures in antineutrophil cytoplasmic autoantibody and lupus glomerulonephritis." Kidney Int 72(7): 853-64.
- Allison, J. P. (1994). "CD28-B7 interactions in T-cell activation." Curr Opin Immunol 6(3): 414-9.
- Alvarado-Sanchez, B., B. Hernandez-Castro, et al. (2006). "Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." J Autoimmun 27(2): 110-8.
- Anderson, G., K. M. Partington, et al. (1998). "Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus." J Immunol 161(12): 6599-603.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." Immunity 23(2): 227-39.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science 298(5597): 1395-401.
- Angel, C. E., C. J. Chen, et al. (2009). "Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes." Blood 113(6): 1257-67.
- Ansel, K. M., I. Djuretic, et al. (2006). "Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility." Annu Rev Immunol 24: 607-56.

- Arican, O., M. Aral, et al. (2005). "Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity." Mediators Inflamm 2005(5): 273-9.
- Arndt, P. A., R. M. Leger, et al. (1999). "Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests." Transfusion 39(11-12): 1239-46.
- Asseman, C., S. Mauze, et al. (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med 190(7): 995-1004.
- Audrain, M. A., R. Sesboue, et al. (2001). "Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects." Nephrol Dial Transplant 16(1): 39-44.
- Awata, T., S. Kurihara, et al. (1998). "Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population." Diabetes 47(1): 128-9.
- Baccala, R., D. H. Kono, et al. (2005). "Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity." Immunol Rev 204: 9-26.
- Bacchetta, R., L. Passerini, et al. (2006). "Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations." J Clin Invest 116(6): 1713-22.
- Bach, J. F. (2006). "Induction of immunological tolerance using monoclonal antibodies: applications to organ transplantation and autoimmune disease." C R Biol 329(4): 260-2.
- Bachem, A., S. Guttler, et al. "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells." J Exp Med 207(6): 1273-81.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol 167(3): 1245-53.
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, et al. (2006). "MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells." J Immunol 176(8): 4622-31.
- Balasa, B. and N. Sarvetnick (2000). "Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis." Immunol Today 21(1): 19-23.
- Balding, C. E., A. J. Howie, et al. (2001). "Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis." Clin Exp Immunol 125(2): 332-9.
- Banchereau, J., V. Pascual, et al. (2004). "Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation." Immunity 20(5): 539-50.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392(6673): 245-52.
- Bansal, P. J. and M. C. Tobin (2004). "Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement." Ann Allergy Asthma Immunol 93(4): 398-401.
- Barath, S., M. Aleksza, et al. (2007). "Measurement of natural (CD4+CD25high) and inducible (CD4+IL-10+) regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." Lupus 16(7): 489-96.
- Bartfai, Z., K. I. Gaede, et al. (2003). "Different gender-associated genotype risks of Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis." Clin Immunol 109(3): 330-7.

- Bartolucci, P., J. Ramanoelina, et al. (2002). "Efficacy of the anti-TNF-alpha antibody infliximab against refractory systemic vasculitides: an open pilot study on 10 patients." Rheumatology (Oxford) 41(10): 1126-32.
- Baslund, B., W. Szpirt, et al. (1996). "Complexes between proteinase 3, alpha 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between alpha 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis." Eur J Clin Invest 26(9): 786-92.
- Baumgart, D. C. and S. R. Carding (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." Lancet 369(9573): 1627-40.
- Beckmann, J. S., X. Estivill, et al. (2007). "Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability." Nat Rev Genet 8(8): 639-46.
- Bendriss-Vermare, N., C. Barthelemy, et al. (2001). "Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells." J Clin Invest 107(7): 835-44.
- Bengtsson, A. A., G. Sturfelt, et al. (2000). "Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies." Lupus 9(9): 664-71.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet 27(1): 20-1.
- Benoist, C. and D. Mathis (1989). "Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur?" Cell 58(6): 1027-33.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature 441(7090): 235-8.
- Bettelli, E., B. Sullivan, et al. (2004). "Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med 200(1): 79-87.
- Bettini, M. L. and D. A. Vignali (2010). "Development of thymically derived natural regulatory T cells." Ann N Y Acad Sci 1183: 1-12.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al. (2001). "Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus." Science 294(5546): 1540-3.
- Blomberg, S., M. L. Eloranta, et al. (2003). "Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 48(9): 2524-32.
- Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol 15: 749-95.
- Bonelli, M., K. von Dalwigk, et al. (2008). "Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis." Ann Rheum Dis 67(5): 664-71.
- Boomsma, M. M., C. A. Stegeman, et al. (2000). "Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study." Arthritis Rheum 43(9): 2025-33.
- Borges, V. M., M. F. Lopes, et al. (2002). "Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis." Am J Respir Cell Mol Biol 27(1): 78-84.
- Borgmann, S., G. Endisch, et al. (2003). "Proinflammatory genotype of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist is associated with ESRD in proteinase 3-ANCA vasculitis patients." Am J Kidney Dis 41(5): 933-42.

- Borgmann, S., G. Endisch, et al. (2001). "A linkage disequilibrium between genes at the serine protease inhibitor gene cluster on chromosome 14q32.1 is associated with Wegener's granulomatosis." Clin Immunol 98(2): 244-8.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, et al. (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood 110(4): 1225-32.
- Boule, M. W., C. Broughton, et al. (2004). "Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes." J Exp Med 199(12): 1631-40.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, et al. (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." Immunity 13(6): 829-40.
- Braudeau, C., J. Ashton-Chess, et al. (2008). "Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients." Transplantation 86(1): 130-6.
- Braun, D., R. S. Longman, et al. (2005). "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation." Blood 106(7): 2375-81.
- Brocker, T., M. Riedinger, et al. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med 185(3): 541-50.
- Brons, R. H., H. I. Bakker, et al. (2000). "Staphylococcal acid phosphatase binds to endothelial cells via charge interaction; a pathogenic role in Wegener's granulomatosis?" Clinical & Experimental Immunology 119(3): 566-573.
- Brouwer, E., J. W. Tervaert, et al. (1991). "Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders." Clin Exp Immunol 83(3): 379-86.
- Buonocore, S., V. Flamand, et al. (2004). "Dendritic cells overexpressing Fas-ligand induce pulmonary vasculitis in mice." Clin Exp Immunol 137(1): 74-80.
- Calderwood, J. W., J. M. Williams, et al. (2005). "ANCA induces beta2 integrin and CXC chemokine-dependent neutrophil-endothelial cell interactions that mimic those of highly cytokine-activated endothelium." J Leukoc Biol 77(1): 33-43.
- Callea, F., G. Gregorini, et al. (1997). "alpha 1-Antitrypsin (AAT) deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis: genetic and clinical implications." Eur J Clin Invest 27(8): 696-702.
- Cao, D., V. Malmstrom, et al. (2003). "Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis." Eur J Immunol 33(1): 215-23.
- Capraru, D., A. Muller, et al. (2008). "Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomaous lesions in Wegener's granulomatosis." Clin Immunol 127(2): 144-50.
- Carr, E. J., H. A. Niederer, et al. (2009). "Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis." BMC Med Genet 10: 121.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

- plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." Blood 90(4): 1458-70.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "In vitro regulation of development and function of dendritic cells." Hematol Cell Ther 38(5): 463.
- Cederbom, L., H. Hall, et al. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol 30(6): 1538-43.
- Cella, M., D. Scheidegger, et al. (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med 184(2): 747-52.
- Chabaud, M., E. Lubberts, et al. (2001). "IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis." Arthritis Res 3(3): 168-77.
- Chakravarti, A., I. Allaey, et al. (2007). "[Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]." Med Sci (Paris) 23(10): 862-7.
- Chappert, P., M. Leboeuf, et al. (2008). "Antigen-driven interactions with dendritic cells and expansion of Foxp3+ regulatory T cells occur in the absence of inflammatory signals." J Immunol 180(1): 327-34.
- Chen, M. and C. G. Kallenberg (2010). "The environment, geoeidemiology and ANCA-associated vasculitides." Autoimmun Rev 9(5): A293-8.
- Chen, M. L., B. S. Yan, et al. (2008). "Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol 180(11): 7327-37.
- Chen, W., W. Jin, et al. (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): 1875-86.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science 265(5176): 1237-40.
- Chevallier, A., F. Carrere, et al. (1994). "Silicon nephropathy and myeloperoxidase antibodies." Ann Rheum Dis 53(11): 781-2.
- Chevallier, A., G. Renier, et al. (1991). "[Anti-cytoplasm antibodies of neutrophil polynuclear antibodies and associated diseases]." Ann Med Interne (Paris) 142(7): 530-42.
- Chitnis, T., N. Najafian, et al. (2001). "Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest 108(5): 739-47.
- Chong, B. H. and S. J. Ho (2005). "Autoimmune thrombocytopenia." J Thromb Haemost 3(8): 1763-72.
- Christensson, M., E. Pettersson, et al. (2000). "T cell activation in patients with ANCA-associated vasculitis: inefficient immune suppression by therapy." Clin Nephrol 54(6): 435-42.
- Ciccocioppo, R., G. Ricci, et al. (2007). "Reduced number and function of peripheral dendritic cells in coeliac disease." Clin Exp Immunol 149(3): 487-96.
- Clayton, A. R. and C. O. Savage (2000). "What you should know about PR3-ANCA. Evidence for the role of T cells in the pathogenesis of systemic vasculitis." Arthritis Res 2(4): 260-2.

- Codarri, L., L. Vallotton, et al. (2007). "Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients." J Exp Med 204(7): 1533-41.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature 450(7169): 566-9.
- Cordier, J. F., D. Valeyre, et al. (1990). "Pulmonary Wegener's granulomatosis. A clinical and imaging study of 77 cases." Chest 97(4): 906-12.
- Cotch, M. F., A. S. Fauci, et al. (1995). "HLA typing in patients with Wegener granulomatosis." Ann Intern Med 122(8): 635.
- Coulomb-L'Hermine, A., F. Capron, et al. (2001). "Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis." Hum Pathol 32(3): 320-6.
- Crispin, J. C., A. Martinez, et al. (2003). "Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." J Autoimmun 21(3): 273-6.
- Criswell, L. A., K. A. Pfeiffer, et al. (2005). "Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes." Am J Hum Genet 76(4): 561-71.
- Croft, M., L. M. Bradley, et al. (1994). "Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells." J Immunol 152(6): 2675-85.
- Crozat, K., R. Guiton, et al. "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells." J Exp Med 207(6): 1283-92.
- Csernok, E., M. Ai, et al. (2006). "Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway." Blood 107(11): 4440-8.
- Csernok, E., A. Muller, et al. (1999). "Immunopathology of ANCA-associated vasculitis." Intern Med 38(10): 759-65.
- Csernok, E., C. H. Szymkowiak, et al. (1996). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis." Clin Exp Immunol 105(1): 104-11.
- Csernok, E., A. Trabandt, et al. (1999). "Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation." Arthritis Rheum 42(4): 742-50.
- Cua, D. J., J. Sherlock, et al. (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." Nature 421(6924): 744-8.
- Cunningham, M. A., X. R. Huang, et al. (1999). "Prominence of cell-mediated immunity effectors in "pauci-immune" glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 10(3): 499-506.
- D'Cruz, D. (2000). "Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors." Toxicol Lett 112-113: 421-32.
- Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, et al. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med 195(4): 517-28.
- Darrasse-Jeze, G., G. Marodon, et al. (2005). "Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses." Blood 105(12): 4715-21.

- Davies, D. J., J. E. Moran, et al. (1982). "Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology?" Br Med J (Clin Res Ed) 285(6342): 606.
- de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, et al. (2004). "CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis." J Immunol 172(10): 6435-43.
- de Lind van Wijngaarden, R. A., L. van Rijn, et al. (2008). "Hypotheses on the etiology of antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but the result is known." Clin J Am Soc Nephrol 3(1): 237-52.
- De Rosa, V., C. Procaccini, et al. (2007). "A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation." Immunity 26(2): 241-55.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med 204(6): 1257-65.
- Della Bella, S., L. Bierti, et al. (2007). "Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly." Clin Immunol 122(2): 220-8.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med 193(2): 233-8.
- Di Pucchio, T., B. Chatterjee, et al. (2008). "Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I." Nat Immunol 9(5): 551-7.
- Dieckmann, D., H. Plottner, et al. (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med 193(11): 1303-10.
- Dijstelbloem, H. M., R. H. Scheepers, et al. (1999). "Fcgamma receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse." Arthritis Rheum 42(9): 1823-7.
- Djuretic, I. M., D. Levanon, et al. (2007). "Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells." Nat Immunol 8(2): 145-53.
- Dreyer, W. B., Jr., H. Zegarra, et al. (1981). "Sympathetic ophthalmia." Am J Ophthalmol 92(6): 816-23.
- Dubois, B., C. Barthelemy, et al. (1999). "Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching." J Immunol 162(6): 3428-36.
- Dzionic, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol 165(11): 6037-46.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, et al. (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med 200(3): 277-85.
- Emamaullee, J. A., J. Davis, et al. (2009). "Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes 58(6): 1302-11.
- Eriksson, U., R. Ricci, et al. (2003). "Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity." Nat Med 9(12): 1484-90.

- Esnault, V. L., A. Testa, et al. (1993). "Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis." Kidney Int 43(6): 1329-32.
- Evans, V. A., P. U. Cameron, et al. (2008). "Human thymic dendritic cells: regulators of T cell development in health and HIV-1 infection." Clin Immunol 126(1): 1-12.
- Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, et al. (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." Am J Pathol 133(1): 15-21.
- Falk, R. J. and J. C. Jennette (1988). "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis." N Engl J Med 318(25): 1651-7.
- Falk, R. J. and J. C. Jennette (2010). "Rituximab in ANCA-associated disease." N Engl J Med 363(3): 285-6.
- Falk, R. J., R. S. Terrell, et al. (1990). "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 87(11): 4115-9.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol 4(12): 1206-12.
- Fanciulli, M., P. J. Norsworthy, et al. (2007). "FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity." Nat Genet 39(6): 721-3.
- Fanciulli, M., E. Petretto, et al. (2010). "Gene copy number variation and common human disease." Clin Genet 77(3): 201-13.
- Fasth, A. E., D. Cao, et al. (2004). "CD28nullCD4+ T cells--characterization of an effector memory T-cell population in patients with rheumatoid arthritis." Scand J Immunol 60(1-2): 199-208.
- Fathy, A., R. W. Mohamed, et al. (2005). "Diminished CD4+CD25+ T-lymphocytes in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus." Egypt J Immunol 12(1): 25-31.
- Fattorossi, A., A. Battaglia, et al. (2008). "Thymopoiesis, regulatory T cells, and TCRVbeta expression in thymoma with and without myasthenia gravis, and modulatory effects of steroid therapy." J Clin Immunol 28(2): 194-206.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (2003). "Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." Nat Med 9(10): 1245-50.
- Ferber, I. A., S. Brocke, et al. (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol 156(1): 5-7.
- Fink, P. J. and M. J. Bevan (1978). "H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity." J Exp Med 148(3): 766-75.
- Finkelstein, J. D., P. A. Merkel, et al. (2007). "Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis." Ann Intern Med 147(9): 611-9.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, et al. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Cell 81(6): 935-46.
- Fletcher, J. M., R. Lonergan, et al. (2009). "CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis." J Immunol 183(11): 7602-10.

- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell 99(1): 23-33.
- Fowell, D. and D. Mason (1993). "Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential." J Exp Med 177(3): 627-36.
- Fraticelli, P., M. Sironi, et al. (2001). "Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses." J Clin Invest 107(9): 1173-81.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med 192(7): 1027-34.
- Fritzsching, B., N. Oberle, et al. (2006). "Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death." Blood 108(10): 3371-8.
- Froude, J., A. Gibofsky, et al. (1989). "Cross-reactivity between streptococcus and human tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity." Curr Top Microbiol Immunol 145: 5-26.
- Fujino, S., A. Andoh, et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut 52(1): 65-70.
- Fukaura, H., S. C. Kent, et al. (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." J Clin Invest 98(1): 70-7.
- Furuno, K., T. Yuge, et al. (2004). "CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease." J Pediatr 145(3): 385-90.
- Gallucci, S., M. Lolkema, et al. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med 5(11): 1249-55.
- Galvin, J. E., M. E. Hemric, et al. (2000). "Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin." J Clin Invest 106(2): 217-24.
- Gan, P. Y., O. M. Steinmetz, et al. (2010). "Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 21(6): 925-31.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood 109(5): 2058-65.
- Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, et al. (2007). "Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation." Nature 445(7129): 771-5.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." J Exp Med 194(12): 1711-9.
- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." Cell 100(5): 575-85.
- Gencik, M., S. Borgmann, et al. (1999). "Immunogenetic risk factors for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis." Clin Exp Immunol 117(2): 412-7.
- Gencik, M., S. Meller, et al. (2000). "Proteinase 3 gene polymorphisms and Wegener's granulomatosis." Kidney Int 58(6): 2473-7.
- Gencik, M., S. Meller, et al. (2000). "The association of CD18 alleles with anti-myeloperoxidase subtypes of ANCA-associated systemic vasculitides." Clin Immunol 94(1): 9-12.

- Gerrits, J. H., P. Athanassopoulos, et al. (2007). "Peripheral blood manipulation significantly affects the result of dendritic cell monitoring." Transpl Immunol 17(3): 169-77.
- Ginn, L. R., J. P. Lin, et al. (1998). "Familial autoimmunity in pedigrees of idiopathic inflammatory myopathy patients suggests common genetic risk factors for many autoimmune diseases." Arthritis Rheum 41(3): 400-5.
- Girardi, M., J. Lewis, et al. (2002). "Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation." J Exp Med 195(7): 855-67.
- Giscombe, R., S. Nityanand, et al. (1998). "Expanded T cell populations in patients with Wegener's granulomatosis: characteristics and correlates with disease activity." J Clin Immunol 18(6): 404-13.
- Giscombe, R., X. Wang, et al. (2002). "Coding sequence 1 and promoter single nucleotide polymorphisms in the CTLA-4 gene in Wegener's granulomatosis." J Rheumatol 29(5): 950-3.
- Giscombe, R., X. B. Wang, et al. (2006). "Characterization of the expanded T-cell populations in patients with Wegener's granulomatosis." J Intern Med 260(3): 224-30.
- Gomez-Puerta, J. A. and X. Bosch (2009). "Anti-neutrophil cytoplasmic antibody pathogenesis in small-vessel vasculitis: an update." Am J Pathol 175(5): 1790-8.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol 174(4): 1783-6.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell 111(7): 927-30.
- Gotter, J., B. Brors, et al. (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." J Exp Med 199(2): 155-66.
- Green, E. A., L. Gorelik, et al. (2003). "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A 100(19): 10878-83.
- Gregersen, P. K., J. Silver, et al. (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 30(11): 1205-13.
- Griffith, M. E., A. Coulthart, et al. (1996). "T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis." Clin Exp Immunol 103(2): 253-8.
- Grinberg-Bleyer, Y., A. Baeyens, et al. (2010). "IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells." J Exp Med 207(9): 1871-8.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity 21(4): 589-601.
- Guida, G., A. Vallario, et al. (2008). "Clonal CD8+ TCR-Vbeta expanded populations with effector memory phenotype in Churg Strauss syndrome." Clin Immunol 128(1): 94-102.
- Guillevin, L., B. Durand-Gasselin, et al. (1999). "Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients." Arthritis Rheum 42(3): 421-30.

- Gunn, M. D. (2003). "Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function." Semin Immunol 15(5): 271-6.
- Hamann, A., K. Klugewitz, et al. (2000). "Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells." Eur J Immunol 30(11): 3207-18.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, et al. (1998). "alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10." J Exp Med 187(7): 1047-56.
- Hanahan, D. (1998). "Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity." Curr Opin Immunol 10(6): 656-62.
- Hansch, G. M., M. Radsak, et al. (1999). "Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis." Kidney Int 55(5): 1811-8.
- Happel, K. I., M. Zheng, et al. (2003). "Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection." J Immunol 170(9): 4432-6.
- Harper, L., P. Cockwell, et al. (2001). "Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis." Kidney Int 59(5): 1729-38.
- Harper, L., Y. Ren, et al. (2000). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce reactive oxygen-dependent dysregulation of primed neutrophil apoptosis and clearance by macrophages." Am J Pathol 157(1): 211-20.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol 6(11): 1123-32.
- Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood 90(9): 3245-87.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell 52(2): 269-79.
- Hattar, K., A. Bickenbach, et al. (2002). "Wegener's granulomatosis: antiproteinase 3 antibodies induce monocyte cytokine and prostanoid release-role of autocrine cell activation." J Leukoc Biol 71(6): 996-1004.
- Heckmann, M., J. U. Holle, et al. (2008). "The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping." Ann Rheum Dis 67(7): 972-9.
- Hellmich, B., E. Csernok, et al. (2005). "Proinflammatory cytokines and autoimmunity in Churg-Strauss syndrome." Ann N Y Acad Sci 1051: 121-31.
- Hirao, M., N. Onai, et al. (2000). "CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes." Cancer Res 60(8): 2209-17.
- Hoffman, G. S., G. S. Kerr, et al. (1992). "Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients." Ann Intern Med 116(6): 488-98.
- Hoffman, G. S. and U. Specks (1998). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies." Arthritis Rheum 41(9): 1521-37.
- Hogan, S. L., K. K. Satterly, et al. (2001). "Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis." J Am Soc Nephrol 12(1): 134-42.

- Hollox, E. J., J. C. Detering, et al. (2009). "An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus." Hum Mutat 30(3): 477-84.
- Homey, B., M. C. Dieu-Nosjean, et al. (2000). "Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis." J Immunol 164(12): 6621-32.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2003). "The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets." J Leukoc Biol 74(4): 471-8.
- Hoshino, A., T. Nagao, et al. (2008). "MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner." J Autoimmun 31(1): 79-89.
- Hoshino, H., M. Laan, et al. (2000). "Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo." J Allergy Clin Immunol 105(1 Pt 1): 143-9.
- Houot, R., I. Perrot, et al. (2006). "Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation." J Immunol 176(9): 5293-8.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, et al. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science 260(5107): 547-9.
- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity 21(4): 503-13.
- Huang, D., R. Giscombe, et al. (2000). "Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1beta genes are associated with Wegener's granulomatosis." J Rheumatol 27(2): 397-401.
- Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med 191(3): 435-44.
- Huang, Z. X., B. R. Zheng, et al. (2009). "[Study on expressions of CD25 and CD127 in CD4+ peripheral T lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi 89(35): 2476-80.
- Hubert, F. X., C. Voisine, et al. (2004). "Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG." J Immunol 172(12): 7485-94.
- Humblet, C., A. Rudensky, et al. (1994). "Presentation and intercellular transfer of self antigen within the thymic microenvironment: expression of the E alpha peptide-I-Ab complex by isolated thymic stromal cells." Int Immunol 6(12): 1949-58.
- Hunder, G. G., W. P. Arend, et al. (1990). "The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Introduction." Arthritis Rheum 33(8): 1065-7.
- Hunger, R. E., P. A. Sieling, et al. (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." J Clin Invest 113(5): 701-8.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." Nature 397(6716): 263-6.

- Huugen, D., J. W. Tervaert, et al. (2004). "Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and pathophysiology: new insights from animal models." Curr Opin Rheumatol 16(1): 4-8.
- Hwang, E. S., S. J. Szabo, et al. (2005). "T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3." Science 307(5708): 430-3.
- Hwang, S. Y. and H. Y. Kim (2005). "Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients." Mol Cells 19(2): 180-4.
- Ikeda, M., S. Tsuru, et al. (1992). "Reduced CD4-CD8 T cell ratios in patients with Wegener's granulomatosis." J Clin Lab Immunol 38(3): 103-9.
- Ikeda, M., Y. Watanabe, et al. (1993). "Distinctive increases in HLA-DR+ and CD8+57+ lymphocyte subsets in Wegener's granulomatosis." Int Arch Allergy Immunol 102(2): 205-8.
- Iking-Konert, C., T. Vogl, et al. (2009). "Expression of CD57 on CD8+ T lymphocytes of patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: evidence for continuous activation of CD8+ cells." Clin Exp Rheumatol 27(1 Suppl 52): S19-24.
- Iking-Konert, C., T. Vogl, et al. (2008). "T lymphocytes in patients with primary vasculitis: expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils." Rheumatology (Oxford) 47(5): 609-16.
- Iking-Konert, C., S. Vogt, et al. (2001). "Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells." Kidney Int 60(6): 2247-62.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, et al. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." J Exp Med 180(5): 1849-60.
- Ito-Ihara, T., T. Ono, et al. (2006). "Clinical efficacy of intravenous immunoglobulin for patients with MPO-ANCA-associated rapidly progressive glomerulonephritis." Nephron Clin Pract 102(1): c35-42.
- Ito, T., S. Hanabuchi, et al. (2008). "Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery." Immunity 28(6): 870-80.
- Jagiello, P., P. Aries, et al. (2005). "The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum 52(12): 4039-43.
- Jagiello, P., M. Gencik, et al. (2004). "New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes." Hum Genet 114(5): 468-77.
- Jameson, J., D. Witherden, et al. (2003). "T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets." Curr Opin Immunol 15(3): 349-53.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54 Pt 1: 1-13.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, et al. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol 31(11): 3388-93.
- Jayne, D. (2004). "The clinical features and pathology of vasculitis associated with anti-myeloperoxidase autoantibodies." Jpn J Infect Dis 57(5): S16-7.
- Jayne, D., N. Rasmussen, et al. (2003). "A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies." N Engl J Med 349(1): 36-44.

- Jayne, D. R., H. Chapel, et al. (2000). "Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity." Qjm 93(7): 433-9.
- Jennette, J. C. and R. J. Falk (1997). "Small-vessel vasculitis." N Engl J Med 337(21): 1512-23.
- Jennette, J. C., R. J. Falk, et al. (1994). "Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference." Arthritis Rheum 37(2): 187-92.
- Jennette, J. C., J. R. Hoidal, et al. (1990). "Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3." Blood 75(11): 2263-4.
- Jiang, B., E. Grage-Griebenow, et al. (2010). "The role of proteinase 3 (PR3) and the protease-activated receptor-2 (PAR-2) pathway in dendritic cell (DC) maturation of human-DC-like monocytes and murine DC." Clin Exp Rheumatol 28(1 Suppl 57): 56-61.
- Jiang, X., G. Khursigara, et al. (1994). "Transformation of lupus-inducing drugs to cytotoxic products by activated neutrophils." Science 266(5186): 810-3.
- Jones, R. B., J. W. Cohen Tervaert, et al. (2010). "Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis." N Engl J Med 363(3): 211-20.
- Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, et al. (2010). "Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens." J Exp Med 207(6): 1247-60.
- Jongbloed, S. L., M. C. Lebre, et al. (2006). "Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 8(1): R15.
- Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, et al. (1998). "IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages." J Immunol 160(7): 3513-21.
- Juedes, A. E., P. Hjelmstrom, et al. (2000). "Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol 164(1): 419-26.
- Kadowaki, N. (2007). "Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation." Allergol Int 56(3): 193-9.
- Kaech, S. M., S. Hemby, et al. (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." Cell 111(6): 837-51.
- Kain, R., M. Exner, et al. (2008). "Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis." Nat Med 14(10): 1088-96.
- Kain, R., K. Matsui, et al. (1995). "A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells." J Exp Med 181(2): 585-97.
- Kallenberg, C. G. (2008). "Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis." J Autoimmun 30(1-2): 29-36.
- Kallenberg, C. G., E. Brouwer, et al. (1994). "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential." Kidney Int 46(1): 1-15.

- Kallenberg, C. G., P. Heeringa, et al. (2006). "Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides." Nat Clin Pract Rheumatol 2(12): 661-70.
- Kamradt, T. and N. A. Mitchison (2001). "Tolerance and autoimmunity." N Engl J Med 344(9): 655-64.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol 3(12): 984-93.
- Karupiah, G., Q. W. Xie, et al. (1993). "Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase." Science 261(5127): 1445-8.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci 1143: 1-20.
- Keir, M. E., C. A. Stoddart, et al. (2002). "IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus." J Immunol 168(1): 325-31.
- Kekow, J., C. H. Szymkowiak, et al. (1993). "Pro- and anti-inflammatory cytokines in primary systemic vasculitis." Adv Exp Med Biol 336: 341-4.
- Keogh, K. A., M. E. Wylam, et al. (2005). "Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis." Arthritis Rheum 52(1): 262-8.
- Khoury, S. J. and M. H. Sayegh (2004). "The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity." Immunity 20(5): 529-38.
- Kiene, M., E. Csernok, et al. (2001). "Elevated interleukin-4 and interleukin-13 production by T cell lines from patients with Churg-Strauss syndrome." Arthritis Rheum 44(2): 469-73.
- Kikuchi, K., Y. Yanagawa, et al. (2005). "CCR7 ligand-enhanced phagocytosis of various antigens in mature dendritic cells-time course and antigen distribution different from phagocytosis in immature dendritic cells." Microbiol Immunol 49(6): 535-44.
- Kissenpfennig, A., S. Henri, et al. (2005). "Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells." Immunity 22(5): 643-54.
- Klapa, S., A. Mueller, et al. "Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of CD4+CD25high regulatory T cells from Wegener's granulomatosis." Clin Exp Rheumatol 28(1 Suppl 57): 72-80.
- Klapa, S., A. Mueller, et al. (2010). "Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of CD4+CD25high regulatory T cells from Wegener's granulomatosis." Clin Exp Rheumatol 28(1 Suppl 57): 72-80.
- Kleinewietfeld, M., F. Puentes, et al. (2005). "CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset." Blood 105(7): 2877-86.
- Knight, A., S. Sandin, et al. (2008). "Risks and relative risks of Wegener's granulomatosis among close relatives of patients with the disease." Arthritis Rheum 58(1): 302-7.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, et al. (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." J Immunol 177(10): 6780-6.
- Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity 21(4): 467-76.

- Komocsi, A., P. Lamprecht, et al. (2002). "Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis." Am J Pathol 160(5): 1717-24.
- Kouki, T., Y. Sawai, et al. (2000). "CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease." J Immunol 165(11): 6606-11.
- Kourilsky, P. and J. M. Claverie (1989). "MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see?" Adv Immunol 45: 107-93.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, et al. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol 6(12): 1219-27.
- Kriegel, M. A., T. Lohmann, et al. (2004). "Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II." J Exp Med 199(9): 1285-91.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (2006). "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells." J Immunol 177(1): 40-4.
- Kukreja, A. and N. K. Maclaren (1999). "Autoimmunity and diabetes." J Clin Endocrinol Metab 84(12): 4371-8.
- Kumagai, Y. and S. Akira (2010). "Identification and functions of pattern-recognition receptors." J Allergy Clin Immunol 125(5): 985-92.
- Kumpers, P., R. Horn, et al. (2008). "Serum leptin and ghrelin correlate with disease activity in ANCA-associated vasculitis." Rheumatology (Oxford) 47(4): 484-7.
- Kyewski, B. and J. Derbinski (2004). "Self-representation in the thymus: an extended view." Nat Rev Immunol 4(9): 688-98.
- Kyewski, B., J. Derbinski, et al. (2002). "Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye." Trends Immunol 23(7): 364-71.
- Lamprecht, P. (2005). "Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides." Clin Exp Immunol 141(2): 201-10.
- Lamprecht, P., H. Bruhl, et al. (2003). "Differences in CCR5 expression on peripheral blood CD4+CD28- T-cells and in granulomatous lesions between localized and generalized Wegener's granulomatosis." Clin Immunol 108(1): 1-7.
- Lamprecht, P., A. Erdmann, et al. (2003). "Heterogeneity of CD4 and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis." Arthritis Res Ther 5(1): R25-31.
- Lamprecht, P., F. Moosig, et al. (2001). "CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis." Thorax 56(10): 751-7.
- Laudien, M. (2010). "Nasal barrier dysfunction in Wegener's granulomatosis." Clin Exp Rheumatol 28(1 Suppl 57): 3-4.
- Laudien, M., S. D. Gadola, et al. (2010). "Nasal carriage of Staphylococcus aureus and endonasal activity in Wegener's granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic Rhinosinusitis with nasal polyps." Clin Exp Rheumatol 28(1 Suppl 57): 51-5.
- Lawson, C. A., A. K. Brown, et al. (2006). "Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood." Rheumatology (Oxford) 45(10): 1210-7.

- Leavitt, R. Y., A. S. Fauci, et al. (1990). "The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum 33(8): 1101-7.
- Lee, H. M. and C. S. Hsieh (2009). "Rare development of Foxp3+ thymocytes in the CD4+CD8+ subset." J Immunol 183(4): 2261-6.
- Lee, H. Y., Y. K. Hong, et al. (2008). "Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) 47(6): 789-94.
- Lee, J. H., L. C. Wang, et al. (2006). "Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus." Immunology 117(2): 280-6.
- Lehmann, J., J. Huehn, et al. (2002). "Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13031-6.
- Lehuen, A., O. Lantz, et al. (1998). "Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes." J Exp Med 188(10): 1831-9.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell 86(6): 973-83.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." J Exp Med 193(11): 1295-302.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2002). "Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells." J Exp Med 196(10): 1335-46.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, et al. (2005). "CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function." J Exp Med 202(11): 1549-61.
- Lhotta, K., W. Vogel, et al. (1994). "Alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis." Clin Sci (Lond) 87(6): 693-5.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol 180(9): 5916-26.
- Liao, L., R. Sindhvani, et al. (1995). "Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity." J Exp Med 181(3): 1123-31.
- Lidar, M., N. Lipschitz, et al. (2009). "Infectious serologies and autoantibodies in Wegener's granulomatosis and other vasculitides: novel associations disclosed using the Rad BioPlex 2200." Ann N Y Acad Sci 1173: 649-57.
- Lin, S. C., K. H. Chen, et al. (2007). "The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients." Eur J Clin Invest 37(12): 987-96.
- Lindley, S., C. M. Dayan, et al. (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." Diabetes 54(1): 92-9.
- Lindstedt, M., K. Lundberg, et al. (2005). "Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells." J Immunol 175(8): 4839-46.

- Liston, A., S. Lesage, et al. (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol 4(4): 350-4.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2010). "Development and homeostasis of dendritic cells." Eur J Immunol 40(8): 2099-102.
- Liu, M. F., C. R. Wang, et al. (2004). "Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus." Scand J Immunol 59(2): 198-202.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med 203(7): 1701-11.
- Liu, Y. J., V. Soumelis, et al. (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation." Annu Rev Immunol 25: 193-219.
- Ludviksson, B. R., M. C. Sneller, et al. (1998). "Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10." J Immunol 160(7): 3602-9.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol 23(9): 445-9.
- Lyssuk, E. Y., A. V. Torgashina, et al. (2007). "Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." Adv Exp Med Biol 601: 113-9.
- MacDonald, K. P., D. J. Munster, et al. (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." Blood 100(13): 4512-20.
- Mahnke, K., Y. Qian, et al. (2003). "Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells." Blood 101(12): 4862-9.
- Malkiel, S., L. Liao, et al. (2000). "T-Cell-dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetyl-glucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin." Infect Immun 68(10): 5803-8.
- Mamtani, M., B. Rovin, et al. (2008). "CCR5 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosis." Ann Rheum Dis 67(8): 1076-83.
- Mandapathil, M., S. Lang, et al. (2009). "Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression." J Immunol Methods 346(1-2): 55-63.
- Manel, N., D. Unutmaz, et al. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma." Nat Immunol 9(6): 641-9.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature 441(7090): 231-4.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, et al. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." J Exp Med 184(5): 1953-62.
- Maraskovsky, E., E. Daro, et al. (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." Blood 96(3): 878-84.
- Marinaki, S., I. Neumann, et al. (2005). "Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis." Clin Exp Immunol 140(1): 181-91.
- Markovic-Plese, S., I. Cortese, et al. (2001). "CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis." J Clin Invest 108(8): 1185-94.

- Martinon, F., A. Mayor, et al. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol 27: 229-65.
- Masutani, K., M. Tokumoto, et al. (2003). "Strong polarization toward Th1 immune response in ANCA-associated glomerulonephritis." Clin Nephrol 59(6): 395-405.
- Matsui, T., J. E. Connolly, et al. (2009). "CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions." J Immunol 182(11): 6815-23.
- Matteson, E. L., K. N. Gold, et al. (1996). "Long-term survival of patients with Wegener's granulomatosis from the American College of Rheumatology Wegener's Granulomatosis Classification Criteria Cohort." Am J Med 101(2): 129-34.
- Matusevicius, D., P. Kivisakk, et al. (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." Mult Scler 5(2): 101-4.
- Matzinger, P., R. Zamoyska, et al. (1984). "Self tolerance is H-2-restricted." Nature 308(5961): 738-41.
- Mazzucchelli, R. and S. K. Durum (2007). "Interleukin-7 receptor expression: intelligent design." Nat Rev Immunol 7(2): 144-54.
- McIlroy, D., C. Troadec, et al. (2001). "Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors." Blood 97(11): 3470-7.
- McKinney, C., M. E. Merriman, et al. (2008). "Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on susceptibility to rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 67(3): 409-13.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature 388(6640): 394-7.
- Meller, S., P. Jagiello, et al. (2001). "Novel SNPs in the CD18 gene validate the association with MPO-ANCA+ vasculitis." Genes Immun 2(5): 269-72.
- Mellor-Pita, S., M. J. Citores, et al. (2006). "Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis 65(4): 553-4.
- Mellor, A. L., B. Baban, et al. (2003). "Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion." J Immunol 171(4): 1652-5.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol 4(10): 762-74.
- Michel, L., L. Berthelot, et al. (2008). "Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis." J Clin Invest 118(10): 3411-9.
- Michou, L., S. Lasbleiz, et al. (2007). "Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene." Proc Natl Acad Sci U S A 104(5): 1649-54.
- Migita, K., T. Miyashita, et al. (2005). "Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus." Clin Exp Immunol 142(1): 84-91.
- Misra, N., J. Bayry, et al. (2004). "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol 172(8): 4676-80.

- Miyamoto, M., O. Prause, et al. (2003). "Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways." J Immunol 170(9): 4665-72.
- Miyara, M., Z. Amoura, et al. (2005). "Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus." J Immunol 175(12): 8392-400.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, et al. (2009). "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." Immunity 30(6): 899-911.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol 19: 683-765.
- Morgan, M. D., C. J. Day, et al. (2010). "Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells." Immunology.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol 136(7): 2348-57.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 7: 145-73.
- Mottonen, M., J. Heikkinen, et al. (2005). "CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." Clin Exp Immunol 140(2): 360-7.
- Mueller, A., K. Holl-Urich, et al. (2008). "Germinal centre-like structures in Wegener's granuloma: the morphological basis for autoimmunity?" Rheumatology (Oxford) 47(8): 1111-3.
- Mukhtyar, C., L. Guillevin, et al. (2009). "EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis." Ann Rheum Dis 68(3): 310-7.
- Mulder, A. H., P. Heeringa, et al. (1994). "Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process." Clin Exp Immunol 98(2): 270-8.
- Mullen, A. C., F. A. High, et al. (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science 292(5523): 1907-10.
- Muller, A., A. Trabandt, et al. (2000). "Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression." J Pathol 192(1): 113-20.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2004). "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells." J Immunol 172(7): 4100-10.
- Murakozy, G., K. I. Gaede, et al. (2001). "Gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines and angiotensin-converting enzyme in Wegener's granulomatosis." J Mol Med 79(11): 665-70.
- Nagamine, K., P. Peterson, et al. (1997). "Positional cloning of the APECED gene." Nat Genet 17(4): 393-8.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." J Exp Med 194(5): 629-44.

- Nascimbeni, M., L. Perie, et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression." Blood 113(24): 6112-9.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, et al. (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med 158(3): 670-89.
- Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." Nature 464(7293): 1367-70.
- Neyer, U., E. Woss, et al. (1994). "Wegener's granulomatosis associated with silicosis." Nephrol Dial Transplant 9(5): 559-61.
- Niederhorn, J. Y. (2006). "See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege." Nat Immunol 7(4): 354-9.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science 166(906): 753-5.
- Nogueira, E., S. Hamour, et al. (2010). "Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis." Nephrol Dial Transplant.
- Noronha, I. L., C. Kruger, et al. (1993). "In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis." Kidney Int 43(3): 682-92.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology 82(3): 487-93.
- Oderup, C., L. Cederbom, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." Immunology 118(2): 240-9.
- Oehler, L., O. Majdic, et al. (1998). "Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics." J Exp Med 187(7): 1019-28.
- Oldstone, M. B., M. Nerenberg, et al. (1991). "Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response." Cell 65(2): 319-31.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity 13(5): 715-25.
- Otsuki, T., M. Maeda, et al. (2007). "Immunological effects of silica and asbestos." Cell Mol Immunol 4(4): 261-8.
- Ouabed, A., F. X. Hubert, et al. (2008). "Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells." J Immunol 180(9): 5862-70.
- Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity 28(4): 454-67.
- Pack, M., C. Trumpfheller, et al. (2008). "DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp." Immunology 123(3): 438-46.
- Pandiyani, P., D. Gartner, et al. (2004). "CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function." J Exp Med 199(6): 831-42.

- Papiha, S. S., G. E. Murty, et al. (1992). "Association of Wegener's granulomatosis with HLA antigens and other genetic markers." Ann Rheum Dis 51(2): 246-8.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol 6(11): 1133-41.
- Paust, S., L. Lu, et al. (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A 101(28): 10398-403.
- Pendergraft, W. F., 3rd, G. A. Preston, et al. (2004). "Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3." Nat Med 10(1): 72-9.
- Penhale, W. J., W. J. Irvine, et al. (1976). "Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells." Clin Exp Immunol 25(1): 6-16.
- Penhale, W. J., P. A. Stumbles, et al. (1990). "Induction of diabetes in PVG/c strain rats by manipulation of the immune system." Autoimmunity 7(2-3): 169-79.
- Perez-Cabezas, B., M. Naranjo-Gomez, et al. (2007). "Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors." Exp Gerontol 42(10): 1033-8.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, et al. (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." Immunity 6(4): 411-7.
- Pernis, B. (2005). "Silica and the immune system." Acta Biomed 76 Suppl 2: 38-44.
- Peterson, D. A., R. J. DiPaolo, et al. (1999). "Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection." Immunity 11(4): 453-62.
- Peterson, J. N. and N. R. Alpert (1998). "Cross-bridge dynamics in the contracting heart." Adv Exp Med Biol 453: 117-23; discussion 123-4.
- Pettigrew, J. D. (1990). "Flying lemurs and other animals." Nature 346(6284): 520.
- Pfau, J. C., J. M. Brown, et al. (2004). "Silica-exposed mice generate autoantibodies to apoptotic cells." Toxicology 195(2-3): 167-76.
- Pfister, H., M. Ollert, et al. (2004). "Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo." Blood 104(5): 1411-8.
- Piccioli, D., S. Tavarini, et al. (2007). "Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets." Blood 109(12): 5371-9.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." J Exp Med 196(2): 237-46.
- Pinching, A. J., A. J. Rees, et al. (1980). "Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection." Br Med J 281(6244): 836-8.
- Popa, E. R., C. F. Franssen, et al. (2002). "In vitro cytokine production and proliferation of T cells from patients with anti-proteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis, in response to proteinase 3 and myeloperoxidase." Arthritis Rheum 46(7): 1894-904.
- Popa, E. R., C. A. Stegeman, et al. (2007). "Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis." Rheumatology (Oxford) 46(6): 1029-33.
- Popa, E. R., C. A. Stegeman, et al. (1999). "Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis." J Allergy Clin Immunol 103(5 Pt 1): 885-94.

- Popa, E. R., C. A. Stegeman, et al. (2003). "Staphylococcal superantigens and T cell expansions in Wegener's granulomatosis." Clin Exp Immunol 132(3): 496-504.
- Popa, E. R., C. A. Stegeman, et al. (2002). "Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis." Arthritis Res 4(2): 77-9.
- Poulin, L. F., M. Salio, et al. (2010). "Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells." J Exp Med 207(6): 1261-71.
- Powell, B. R., N. R. Buist, et al. (1982). "An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy." J Pediatr 100(5): 731-7.
- Puéchal, X. (2007). "Vascularites associées aux anticorps anticytoplasme des polynucléaires." Revue du Rhumatisme 74(9): 824-832.
- Pulendran, B., J. Banchereau, et al. (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol 165(1): 566-72.
- Rabinovich, G. A., A. Ariel, et al. (1999). "Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1." Immunology 97(1): 100-6.
- Radford, D. J., N. T. Luu, et al. (2001). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells." Arthritis Rheum 44(12): 2851-61.
- Rammensee, H. G. and M. J. Bevan (1984). "Evidence from in vitro studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted." Nature 308(5961): 741-4.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, et al. (1998). "Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking." Science 282(5388): 480-3.
- Rarok, A. A., C. A. Stegeman, et al. (2002). "Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis." J Am Soc Nephrol 13(9): 2232-8.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol 6(6): 476-83.
- Reynolds, W. F., C. A. Stegeman, et al. (2002). "-463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis." Clin Immunol 103(2): 154-60.
- Richter, W., T. Mertens, et al. (1994). "Sequence homology of the diabetes-associated autoantigen glutamate decarboxylase with coxsackie B4-2C protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies." J Exp Med 180(2): 721-6.
- Rioux, J. D. and A. K. Abbas (2005). "Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease." Nature 435(7042): 584-9.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science 283(5405): 1183-6.
- Robinson, D. S., Q. Hamid, et al. (1992). "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma." N Engl J Med 326(5): 298-304.
- Robinson, S. P., S. Patterson, et al. (1999). "Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells." Eur J Immunol 29(9): 2769-78.
- Romani, N., G. Ratzinger, et al. (2001). "Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance." Int Rev Cytol 207: 237-70.

- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." Immunol Rev 212: 28-50.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings, et al. (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." J Exp Med 193(2): F5-9.
- Ronnblom, L., M. L. Eloranta, et al. (2006). "The type I interferon system in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 54(2): 408-20.
- Ronnblom, L. and V. Pascual (2008). "The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells." Lupus 17(5): 394-9.
- Rudd, C. E. and H. Schneider (2003). "Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling." Nat Rev Immunol 3(7): 544-56.
- Ruth, A. J., A. R. Kitching, et al. (2006). "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 17(7): 1940-9.
- Sable-Fourtassou, R., P. Cohen, et al. (2005). "Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome." Ann Intern Med 143(9): 632-8.
- Saiga, K., K. Tokunaka, et al. (2006). "NK026680, a novel suppressant of dendritic cell function, prevents the development of rapidly progressive glomerulonephritis and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in SCG/Kj mice." Arthritis Rheum 54(11): 3707-15.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol 22: 531-62.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, et al. (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol 10(7): 490-500.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell 133(5): 775-87.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-12.
- Sanchez-Fueyo, A., S. Sandner, et al. (2006). "Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity." J Immunol 176(1): 329-34.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, et al. (2006). "The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells." J Immunol 176(9): 5153-9.
- Savage, C. O., B. E. Pottinger, et al. (1992). "Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells." Am J Pathol 141(2): 335-42.
- Savage, C. O., C. G. Winearls, et al. (1985). "Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis." Q J Med 56(220): 467-83.
- Savige, J. A., L. Chang, et al. (1995). "Alpha 1-antitrypsin deficiency and anti-proteinase 3 antibodies in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis." Clin Exp Immunol 100(2): 194-7.
- Schlesier, M., T. Kaspar, et al. (1995). "Activated CD4+ and CD8+ T-cell subsets in Wegener's granulomatosis." Rheumatol Int 14(5): 213-9.
- Schmitt, C., H. Fohrer, et al. (2000). "Identification of mature and immature human thymic dendritic cells that differentially express HLA-DR and interleukin-3 receptor in vivo." J Leukoc Biol 68(6): 836-44.
- Schmitt, W. H., E. C. Hagen, et al. (2004). "Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients." Kidney Int 65(4): 1440-8.

- Schmitt, W. H., C. Heesen, et al. (1992). "Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with Wegener's granulomatosis. Association with disease activity." Arthritis Rheum 35(9): 1088-96.
- Schmitt, W. H. and F. J. van der Woude (2004). "Clinical applications of antineutrophil cytoplasmic antibody testing." Curr Opin Rheumatol 16(1): 9-17.
- Schonermarck, U., E. Csernok, et al. (2000). "Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides." Clin Exp Rheumatol 18(4): 457-63.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol 21: 305-34.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life." Blood 107(7): 2830-8.
- Seiderer, J., I. Elben, et al. (2008). "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD." Inflamm Bowel Dis 14(4): 437-45.
- Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nat Immunol 7(3): 311-7.
- Serra, P., A. Amrani, et al. (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." Immunity 19(6): 877-89.
- Seta, N., M. Tajima, et al. (2008). "Autoreactive T-cell responses to myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and in healthy individuals." Mod Rheumatol 18(6): 593-600.
- Severa, M., M. E. Remoli, et al. (2007). "Sensitization to TLR7 agonist in IFN-beta-preactivated dendritic cells." J Immunol 178(10): 6208-16.
- Sharpe, A. H. and A. K. Abbas (2006). "T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges." N Engl J Med 355(10): 973-5.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol 2(2): 116-26.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol 2(6): 389-400.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol 2(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol 7(1): 19-30.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science 284(5421): 1835-7.
- Sigurdsson, S., G. Nordmark, et al. (2005). "Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus." Am J Hum Genet 76(3): 528-37.
- Sinico, R. A., L. Di Toma, et al. (2005). "Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome." Arthritis Rheum 52(9): 2926-35.
- Slot, M. C., T. P. Links, et al. (2005). "Occurrence of antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated vasculitis in patients with hyperthyroidism treated with antithyroid drugs: A long-term followup study." Arthritis Rheum 53(1): 108-13.

- Slot, M. C., M. G. Sokolowska, et al. (2008). "Immunoregulatory gene polymorphisms are associated with ANCA-related vasculitis." Clin Immunol 128(1): 39-45.
- Spencer, S. J., A. Burns, et al. (1992). "HLA class II specificities in vasculitis with antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens." Kidney Int 41(4): 1059-63.
- Sprent, J., D. Lo, et al. (1988). "T cell selection in the thymus." Immunol Rev 101: 173-90.
- Spriewald, B. M., O. Witzke, et al. (2005). "Distinct tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis." Ann Rheum Dis 64(3): 457-61.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, et al. (2003). "Positive and negative selection of T cells." Annu Rev Immunol 21: 139-76.
- Stassen, P. M., J. W. Cohen-Tervaert, et al. (2009). "HLA-DR4, DR13(6) and the ancestral haplotype A1B8DR3 are associated with ANCA-associated vasculitis and Wegener's granulomatosis." Rheumatology (Oxford) 48(6): 622-5.
- Stegeman, C. A., J. W. Tervaert, et al. (1996). "Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group." N Engl J Med 335(1): 16-20.
- Stegeman, C. A., J. W. Tervaert, et al. (1993). "Serum markers of T cell activation in relapses of Wegener's granulomatosis." Clin Exp Immunol 91(3): 415-20.
- Stegeman, C. A., J. W. Tervaert, et al. (1994). "Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis." Ann Intern Med 120(1): 12-7.
- Steiner, K., F. Moosig, et al. (2001). "Increased expression of CTLA-4 (CD152) by T and B lymphocytes in Wegener's granulomatosis." Clin Exp Immunol 126(1): 143-50.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol 9: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med 137(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci 987: 15-25.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 351-8.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med 191(3): 411-6.
- Stone, J. H., P. A. Merkel, et al. (2010). "Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis." N Engl J Med 363(3): 221-32.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2009). "Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis." J Immunol 182(3): 1469-80.
- Streiff, E. B. (1955). "[Experimental study on the role of auto-antibodies in the uvea in infected perforating wounds and in sympathetic ophthalmia]." Ophthalmologica 129(4-5): 346-8.

- Strunk, D., C. Egger, et al. (1997). "A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood." J Exp Med 185(6): 1131-6.
- Suarez, A., P. Lopez, et al. (2006). "Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids." Ann Rheum Dis 65(11): 1512-7.
- Suri-Payer, E. and H. Cantor (2001). "Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells." J Autoimmun 16(2): 115-23.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, et al. (1999). "B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha." Immunity 11(4): 423-32.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell 100(6): 655-69.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol 21: 713-58.
- Taams, L. S., M. Vukmanovic-Stejic, et al. (2002). "Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells." Eur J Immunol 32(6): 1621-30.
- Takasu, N., C. Oshiro, et al. (1997). "Thyroid-stimulating antibody and TSH-binding inhibitor immunoglobulin in 277 Graves' patients and in 686 normal subjects." J Endocrinol Invest 20(8): 452-61.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol 17(1): 1-14.
- Terness, P., T. M. Bauer, et al. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med 196(4): 447-57.
- Tervaert, J. W., M. G. Huitema, et al. (1990). "Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre." Lancet 336(8717): 709-11.
- Tervaert, J. W., F. J. van der Woude, et al. (1989). "Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies." Arch Intern Med 149(11): 2461-5.
- Tesar, V., Z. Masek, et al. (1998). "Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis." Nephrol Dial Transplant 13(7): 1662-7.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol 23: 307-36.
- Thewissen, M., V. Somers, et al. (2007). "CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation." J Immunol 179(10): 6514-23.
- Thomas, H. E. and T. W. Kay (2000). "Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse." Diabetes Metab Res Rev 16(4): 251-61.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med 188(2): 287-96.
- Tian, J., A. M. Avalos, et al. (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." Nat Immunol 8(5): 487-96.
- Tippling, P. G. and S. R. Holdsworth (2006). "T cells in crescentic glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 17(5): 1253-63.

- Tse, W. Y., S. Abadeh, et al. (2000). "Neutrophil FcγRIIIb allelic polymorphism in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive systemic vasculitis." Clin Exp Immunol 119(3): 574-7.
- Tsuchiya, N., S. Kobayashi, et al. (2006). "Association of HLA-DRB1\*0901-DQB1\*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese." Genes Immun 7(1): 81-4.
- Tuovinen, H., E. Kekalainen, et al. (2008). "Cutting edge: human CD4-CD8-thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR." J Immunol 180(6): 3651-4.
- Tuovinen, H., P. T. Pekkarinen, et al. (2008). "The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection." Immunol Cell Biol 86(6): 523-9.
- Uehara, A., A. Iwashiro, et al. (2007). "Antibodies to proteinase 3 prime human monocytic cells via protease-activated receptor-2 and NF-κB for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation." Mol Immunol 44(14): 3552-62.
- Ueno, H., E. Klechevsky, et al. (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." Immunol Rev 219: 118-42.
- Ullrich, S., H. Gustke, et al. (2009). "Severe impaired respiratory ciliary function in Wegener granulomatosis." Ann Rheum Dis 68(6): 1067-71.
- Vaglio, A., D. Martorana, et al. (2007). "HLA-DRB4 as a genetic risk factor for Churg-Strauss syndrome." Arthritis Rheum 56(9): 3159-66.
- Valencia, X., G. Stephens, et al. (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25<sup>hi</sup> T-regulatory cells." Blood 108(1): 253-61.
- Valencia, X., C. Yarboro, et al. (2007). "Deficient CD4+CD25<sup>high</sup> T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus." J Immunol 178(4): 2579-88.
- Valladeau, J., V. Duvert-Frances, et al. (1999). "The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface." Eur J Immunol 29(9): 2695-704.
- Valladeau, J., O. Ravel, et al. (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity 12(1): 71-81.
- Valmori, D., A. Merlo, et al. (2005). "A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs." J Clin Invest 115(7): 1953-62.
- van Amelsfort, J. M., K. M. Jacobs, et al. (2004). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid." Arthritis Rheum 50(9): 2775-85.
- van der Pol, W. and J. G. van de Winkel (1998). "IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease." Immunogenetics 48(3): 222-32.
- van der Woude, F. J., N. Rasmussen, et al. (1985). "Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis." Lancet 1(8426): 425-9.
- van Leeuwen, E. M., E. B. Remmerswaal, et al. (2004). "Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection." J Immunol 173(3): 1834-41.
- van Meerwijk, J. P., S. Marguerat, et al. (1997). "Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire." J Exp Med 185(3): 377-83.

- van Rossum, A. P., A. A. Rarok, et al. (2004). "Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies." J Leukoc Biol 76(6): 1162-70.
- Vandenabeele, S., H. Hochrein, et al. (2001). "Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations." Blood 97(6): 1733-41.
- Venigalla, R. K., T. Tretter, et al. (2008). "Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 58(7): 2120-30.
- Verdijk, P., R. Dijkman, et al. (2005). "A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene." J Invest Dermatol 124(4): 714-7.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol 8(7): 523-32.
- Villadangos, J. A. and W. R. Heath (2005). "Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm." Semin Immunol 17(4): 262-72.
- Volpe, E., N. Servant, et al. (2008). "A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses." Nat Immunol 9(6): 650-7.
- Vuckovic, S., G. Withers, et al. (2007). "Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children." Clin Immunol 123(3): 281-8.
- Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, et al. (2006). "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo." J Clin Invest 116(9): 2423-33.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, et al. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." Nat Rev Immunol 8(8): 607-18.
- Wang, G., M. Khattar, et al. (2010). "IL-2-deprivation and TGF-beta are two non-redundant suppressor mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cell which jointly restrain CD4+CD25- cell activation." Immunol Lett 132(1-2): 61-8.
- Wang, X. B., M. Kakoulidou, et al. (2002). "Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence." J Neuroimmunol 130(1-2): 224-32.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, et al. (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature 356(6367): 314-7.
- Watanabe, N., Y. H. Wang, et al. (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus." Nature 436(7054): 1181-5.
- Watts, R. A., A. Al-Taiar, et al. (2009). "Prevalence and incidence of Wegener's granulomatosis in the UK general practice research database." Arthritis Rheum 61(10): 1412-6.
- Watts, R. A. and D. G. I. Scott (2009). "Recent developments in the classification and assessment of vasculitis." Best Practice & Research Clinical Rheumatology 23(3): 429-443.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." Immunity 24(6): 677-88.
- Weidner, S., M. Carl, et al. (2004). "Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis:

- importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage." Arthritis Rheum 50(11): 3651-7.
- Wieczorek, S., B. Hellmich, et al. (2008). "Functionally relevant variations of the interleukin-10 gene associated with antineutrophil cytoplasmic antibody-negative Churg-Strauss syndrome, but not with Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum 58(6): 1839-48.
- Wieczorek, S., B. Hellmich, et al. (2008). "Associations of Churg-Strauss syndrome with the HLA-DRB1 locus, and relationship to the genetics of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: comment on the article by Vaglio et al." Arthritis Rheum 58(1): 329-30.
- Wilde, B., P. van Paassen, et al. (2009). "Dendritic cells in renal biopsies of patients with ANCA-associated vasculitis." Nephrol Dial Transplant 24(7): 2151-6.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, et al. (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." Nat Genet 27(1): 18-20.
- Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, et al. (2002). "Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome." J Med Genet 39(8): 537-45.
- Willcocks, L. C., P. A. Lyons, et al. (2008). "Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake." J Exp Med 205(7): 1573-82.
- Williams, J. M., A. Ben-Smith, et al. (2003). "Activation of the G(i) heterotrimeric G protein by ANCA IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments is necessary but not sufficient to stimulate the recruitment of those downstream mediators used by intact ANCA IgG." J Am Soc Nephrol 14(3): 661-9.
- Wilson, J. M., W. G. Ross, et al. (2009). "The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells." J Immunol 182(8): 4616-23.
- Winek, J., A. Mueller, et al. (2004). "Frequency of proteinase 3 (PR3)-specific autoreactive T cells determined by cytokine flow cytometry in Wegener's granulomatosis." J Autoimmun 22(1): 79-85.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function." Science 322(5899): 271-5.
- Witko-Sarsat, V., P. Lesavre, et al. (1999). "A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis." J Am Soc Nephrol 10(6): 1224-33.
- Wong, C. K., L. C. Lit, et al. (2008). "Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity." Clin Immunol 127(3): 385-93.
- Wu, L. and K. Shortman (2005). "Heterogeneity of thymic dendritic cells." Seminars in Immunology 17(4): 304-312.
- Xiao, H., P. Heeringa, et al. (2002). "Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice." J Clin Invest 110(7): 955-63.
- Xiao, H., P. Heeringa, et al. (2005). "The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies." Am J Pathol 167(1): 39-45.
- Yamaguchi, Y., H. Tsumura, et al. (1997). "Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow." Stem Cells 15(2): 144-53.

- Yamazaki, S., A. J. Bonito, et al. (2007). "Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors." Blood 110(13): 4293-302.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med 198(2): 235-47.
- Yamazaki, S. and R. M. Steinman (2009). "Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells." J Dermatol Sci 54(2): 69-75.
- Yang, J., D. J. Bautz, et al. (2008). "ANCA patients have T cells responsive to complementary PR-3 antigen." Kidney Int 74(9): 1159-69.
- Yang, J., Y. Chu, et al. (2009). "Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 60(5): 1472-83.
- Yang, L., D. E. Anderson, et al. (2008). "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." Nature 454(7202): 350-2.
- Yang, X. Y., X. Y. Lu, et al. (2005). "[Clinical significance of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients in systemic lupus erythematosus]." Zhonghua Nei Ke Za Zhi 44(8): 570-2.
- Yao, Y., L. Richman, et al. (2009). "Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 60(6): 1785-96.
- Yates, J., A. Whittington, et al. (2008). "Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis." Clin Exp Immunol 153(1): 44-55.
- Yoshida, M., M. Sasaki, et al. (2009). "Two types of myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with a high affinity and a low affinity in small vessel vasculitis." Clin Exp Rheumatol 27(1 Suppl 52): S28-32.
- Yoshimoto, T., K. Takeda, et al. (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." J Immunol 161(7): 3400-7.
- Yuki, N. (1999). "Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to Campylobacter jejuni enteritis." Jpn J Infect Dis 52(3): 99-105.
- Zarek, P. E., C. T. Huang, et al. (2008). "A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells." Blood 111(1): 251-9.
- Zarembek, K. A. and P. J. Godowski (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." J Immunol 168(2): 554-61.
- Zhan, H., J. Sinclair, et al. (2008). "Immune reconstitution and recovery of FOXP3 (forkhead box P3)-expressing T cells after transplantation for IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome." Pediatrics 121(4): e998-1002.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, et al. (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood 107(10): 3925-32.
- Zhao, M. H., M. Chen, et al. (2006). "Propylthiouracil-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis." Kidney Int 69(8): 1477-81.

- Zhao, S. S., X. M. Li, et al. (2008). "[Expression of CD4+ CD25+ CD127(low/-) T cells in patients with systemic lupus erythematosus]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi 88(7): 453-6.
- Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." Cell 89(4): 587-96.
- Zhou, Y., R. Giscombe, et al. (2002). "Novel genetic association of Wegener's granulomatosis with the interleukin 10 gene." J Rheumatol 29(2): 317-20.
- Zhou, Y., D. Huang, et al. (2004). "An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis." Arthritis Rheum 50(8): 2645-50.
- Zou, W. and N. P. Restifo (2010). "T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol 10(4): 248-56.

## ANNEXES

J'ai effectué une première partie de ma thèse sous la direction du P. Marc Bonneville. Pour des raisons d'orientation professionnelle (intégration du laboratoire d'immunologie dans le secteur « immunomonitorage »), j'ai demandé à M. Marc Bonneville s'il était possible que je change de sujet et donc de directeur de thèse. Celui-ci m'a gentiment laissée partir, je l'en remercie. Les travaux de cette première partie ont donné lieu à une publication (Trautmann L, **Rimbert M**, Echasserieau K, Saulquin X, Neveu B, Dechanet J, Cerundolo V, Bonneville M. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. **J Immunol.** 2005 Nov 1;175(9):6123-32). Je joins cette publication en annexe mais je ne l'ai pas intégré dans les travaux présentés plus haut. Je joins aussi en annexe mon parcours universitaire, ainsi que la liste des publications aux quelles j'ai été associée au cours de mes années de thèse.

### ***Formation universitaire :***

Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie 2000

Université de Nantes

Responsable : Dr Marianne COSTE

Mémoire : "Mise au point d'une technique de typage du virus d'Epstein-Barr et application dans une population d'immunodéprimés" Mention très honorable, félicitations du jury et attribution au prix de thèse

Diplôme d'Etudes Spécialisées en Biologie Médicale 2000

Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales 2000

Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Cellulaire spécialité Immunologie 2003

Université des Sciences et techniques, Nantes, France

Responsable : Pr Marc Bonneville

Mémoire : "Etude des réponses lymphocytaires T dirigées contre les constituants des plaques amyloïdes chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer"

Doctorat en Immunologie 2004-2010

INSERM U601 Université de Médecine, Nantes, France

2004

Responsable : Pr Marc Bonneville

INSERM U643 Université de Médecine, Nantes, France

2005-2010

responsable: Pr R. Josien

## ***Publications***

Martin J, Audrain M, Durant C, **Rimbert M**, Fromont P, Hamidou M. [Autoimmune neutropenia.]. **Rev Med Interne**. 2010 Jun 1.

Kovalchin J, Krieger J, Genova M, Collins K, Augustyniak M, Masci A, Hittinger T, Kuca B, Edan G, Braudeau C, **Rimbert M**, Patel U, Mascioli E, Zanelli E. Results of a phase I study in patients suffering from secondary-progressive multiple sclerosis demonstrating the safety of the amino acid copolymer PI-2301 and a possible induction of an anti-inflammatory cytokine response. **J Neuroimmunol**. 2010 May 11.

Hervier B, Latour S, Loussouarn D, **Rimbert M**, De-Saint-Basile G, Picard C, Hamidou M. An atypical case of X-linked lymphoproliferative disease revealed as a late cerebral lymphoma. **J Neuroimmunol**. 2010 Jan 25;218(1-2):125-8.

Hervier B, **Rimbert M**, Colonna F, Hamidou MA, Audrain M. Clinical significance of anti-Ro/SSA-52 kDa antibodies: a retrospective monocentric study. **Rheumatology** (Oxford). 2009 Aug;48(8):964-7.

Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galéa C, Salot S, Saiagh S, Audrain M, **Rimbert M**, Lafaye-de Micheaux S, Tiollier J, Négrier S. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**. 2008 Nov;57(11):1599-609.

Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, Lavainne F, Rémy S, Brion R, Hubert FX, Heslan M, **Rimbert M**, Berthelot L, Moffett JR, Josien R, Grégoire M, Anegon I. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. **Eur J Immunol**. 2007 Nov;37(11):3054-62.

Ballanger F, Allix ML, **Rimbert M**, Audrain M, Muller JY, Dreno B. [Autoimmunity induced by low doses of interferon in melanoma stage I]. **Ann Dermatol Veneréol**. 2006 Jun-Jul;133(6-7):543-8. French.

Trautmann L, **Rimbert M**, Echasserieau K, Saulquin X, Neveu B, Dechanet J, Cerundolo V, Bonneville M. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. **J Immunol**. 2005 Nov 1;175(9):6123-32.

## **Analyse quantitative des cellules dendritiques circulantes et fonction des cellules T régulatrices dans les vascularites à ANCA**

Les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles sont caractérisées par une atteinte inflammatoire et nécrosante des vaisseaux de petit calibre, dont la physiopathologie reste encore mal établie. Les cellules dendritiques (DC) et les cellules T régulatrices (Treg) jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunes adaptatives. Dans ce travail nous avons étudié les sous populations de DC circulantes et les Treg chez des patients ayant une vascularite à ANCA. Nous observons chez ces patients premièrement, une baisse des DC qui est plus importante et accompagnée d'une augmentation de l'expression de CD62L en phase aiguë de la maladie et deuxièmement, une diminution du nombre de Treg et de leur fonction suppressive, fonction qui est fortement diminuée chez les patients en phase aiguë. Ces résultats suggèrent que le déficit fonctionnel des Treg puisse jouer un rôle dans le caractère récidivant de la maladie et que les cellules dendritiques pourraient être impliquées dans cette modulation de la fonction des Treg .

*Mots-clés :vascularites à ANCA, cellules dendritiques, cellules T régulatrices*

*Quantitative analysis of circulating dendritic cells and regulatory T cell function in ANCA associated vasculitides*

Antineutrophil cytoplasmic antibodies-associated vasculitides are the most common primary systemic small-vessel vasculitis in adults. Dendritic cells and regulatory cells play pivotal roles in controlling both normal and autoimmune adaptive immune responses. In this study, we examine the frequency and phenotype of DC subsets, and the frequency and function of Treg from patients with ANCA-associated vasculitis. We observe in these patients firstly, a decrease numbers of DC which is more pronounced and associated with an increased expression of CD62L for patients in acute phase and secondly, a decrease numbers and suppressive function of Treg with a functional defect more pronounced during flares than remission. Taken together, these data point to a role for Treg functional deficiency in the pathogenesis of AAV and relapses, and suggest that DC might be involved in this modulation of Treg suppressive function.

**Keywords: ANCA-Vasculitis, Dendritic cells, Regulatory T cells**