

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Immunologie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie

Présentée par
Yves ALLENBACH

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Rôle des lymphocytes T régulateurs

dans un nouveau modèle murin de myopathie inflammatoire

et implications

dans la physiopathologie et la thérapie de la Myosite à Inclusions

Soutenue le 26 Septembre 2011 devant le jury composé de :

M. Bertrand FONTAINE:	Président
M. Olivier BENVENISTE :	Directeur de thèse
M. Olivier BOYER:	Rapporteur
M. Romain GHERARDI:	Rapporteur
M Bruno EYMARD :	Examineur

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Immunologie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie

Yves ALLENBACH

Rôle des lymphocytes T régulateurs

dans un nouveau modèle murin de myopathie inflammatoire

et implications

dans la physiopathologie et la thérapie de la Myosite à Inclusions

Thèse dirigée par M. Olivier BENVENISTE

Soutenu le 26 Septembre 2011

Jury :

M. Bertrand FONTAINE:

Président

M. Olivier BOYER:

Rapporteur

M. Romain GHERARDI:

Rapporteur

M Bruno EYMARD :

Examineur

Remerciements:

À mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Olivier Benveniste, dont la force tranquille me guide et m'accompagne depuis la fin de mon internat.

Je souhaite remercier aussi Monsieur le Professeur Serge Herson, qui m'a accueilli dans son service, pour sa présence bienveillante et pour son soutien.

Je remercie les membres du jury : le président Monsieur le Pr B. Fontaine, les rapporteurs Messieurs les Pr O. Boyer et le Pr R. Gherardi, et l'examineur Monsieur le Pr B. Eymard qui ont accepté de me consacrer une partie de leur temps précieux.

Je tiens aussi à remercier le Professeur David Klatzmann pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son énergie constructrice et ses conseils. Je remercie aussi les autres chefs, José et Gilles ainsi que tous ceux avec qui j'ai collaboré : le Professeur François Lemoine, le Docteur Michèle Rosenwagj et surtout le Dr Benoît Salomon dont la rigueur scientifique m'a guidé.

Merci aussi au Docteur Sylvie Grégoire et au Docteur Soukary, ainsi qu'au Dr Jean Yves Hogrel et au Dr C. Bloch Queyrat dont l'aide m'a été précieuse tout au long de ce travail.

Merci, à tous mes collègues du laboratoire, avec qui nous avons partagé de si bons moments.

Je remercie Nicolas Prevel qui a repris la suite ce travail et qui a réalisé les expériences avec la rapamycine. Je tiens aussi à remercier mes collègues médecins qui m'ont donné du temps pour rédiger cette thèse.

Merci aux patients qui ont participé à ce travail. Merci aux souris.

Enfin, merci à ma famille et à la famille Gros pour leur soutien et leur relecture. Merci à Hélène qui a supporté la rédaction de la thèse alors que Baptiste naissait et que Victor courait partout.

TABLE des MATIERES

Remerciements:	3
TABLE des MATIERES	4
Résumé :	9
Abstract	10
Liste des abréviations	11
Avant propos	12
INTRODUCTION.....	14
1 ^e PARTIE : LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES IDIOPATHIQUES	15
I. Les myopathies myopathies inflammatoires idiopathiques : aspects cliniques	15
A. Les myopathies généralités	15
B. Historique des myosites et classification.....	17
C. Épidémiologie et prédisposition génétique.....	20
1. Epidémiologie.....	20
2. Facteurs de prédisposition aux myosites	21
D. Description clinique	21
1. Les manifestations musculaires squelettiques extra cardiaques	21
2. Les manifestations cardiaques et vasculaires	22
3. Les manifestations extra-musculaires cutanées	22
4. Les manifestations extra-musculaires respiratoires.....	24
5. Les manifestations extra-musculaires: signes généraux et rhumatologiques .	25
E. Myosites et cancers	25
II. Les myopathies inflammatoires idiopathiques: Aspects paracliniques	26
A. Les examens complémentaires non invasifs	26
B. Imagerie musculaire	26
C. Les Anticorps associés aux myosites : le meilleur outils diagnostique non invasif	27
D. La biopsie musculaire l'examen indispensable au diagnostic nosologique	30
1. L'inflammation musculaire	30
2. Les atteintes de la fibre musculaire	31
3. La vascularisation et les dépôts endothéliaux de compléments	32
4. L'expression du CMH-I par les fibres musculaires.....	32
5. La présence d'inclusions aux courbes de la myosite à inclusions	33
6. Les limites de la biopsie	33
III. La physiopathologie des myopathies inflammatoires	33
A. L'implication de l'immunité innée et des cellules présentatrices d'antigènes...	34
1. Le rôle des macrophages	34
2. Le rôle des cellules dendritiques	34
B. L'implication de l'immunité cellulaire : la fibre musculaire comme CPA ?.....	35
1. Le rôle du CMH-I.....	35
2. Les molécules de co-stimulation et d'adhésion.....	36
3. Les TLR à la surface musculaire	36
C. Les chimiokines au cours myosites	37
D. Les molécules d'adhésion : l'entrée de la cellule immunitaire	37
E. La mort des fibres musculaires par cytotoxicité au cours des myosites.....	38
F. Les Cytokines au cours des myosites orientent la réponse inflammatoire.....	39
G. Le rôle de l'immunité humorale et des auto-anticorps.....	40
1. Les arguments cliniques	40

2.	Les arguments expérimentaux.....	41
3.	La DM et le complexe d'attaque membranaire	42
H.	Relation entre inflammation et dégénérescence	43
1.	La myosite à inclusion une maladie dégénérative.....	43
2.	Dégénérescence et inflammation	44
I.	Le facteur déclenchant	44
IV.	Les traitements des myopathies inflammatoires	45
A.	Les corticoïdes.....	45
B.	Les immunosupresseurs.....	46
C.	Les immuno-modulateurs et nouvelles biothérapies	47
2°	PARTIE : TOLERANCE et CELLULES REGULATRICES	49
I.	Immunité adaptative : la distinction soi et non soi.....	49
II.	La tolérance centrale	50
A.	La sélection thymique	50
B.	Le rôle central de AIRE	50
III.	La tolérance périphérique	51
A.	Les mécanismes « passifs ».....	52
1.	L'ignorance.....	52
2.	L'anergie.....	53
3.	La déplétion	54
4.	Les mécanismes passifs et la tolérance musculaire	54
B.	Les mécanismes actifs ou extrinsèques	55
1.	Les lymphocytes B régulateurs.....	55
2.	Les cellules NKT	55
3.	Les lymphocytes T conventionnels	56
4.	Les lymphocytes T CD8 ⁺ régulateurs.....	56
5.	Les lymphocytes T $\gamma\delta$	57
IV.	Les Treg, de leur découverte et leur caractérisation phénotypique.....	57
A.	La découverte des Treg	57
B.	CD25: le premier marqueur des Treg.....	58
1.	FoxP3.....	58
2.	Les limites de FoxP3 chez l'homme.....	58
3.	L'intérêt de FoxP3 chez la souris	59
C.	La reconnaissance des Treg chez l'homme	59
1.	Le CD127	59
2.	Intégrines et autres récepteurs aux chimiokines	60
3.	Molécules impliquées dans la survie et l'apoptose	60
4.	Marqueurs de fonctions suppressives	60
3°	PARTIE. LES LYMPHOCYTES TRÉGULATEURS : MECANISMES D'ACTION et	
	ONTOGENIE.....	62
I.	Treg : les mécanismes d'actions.....	62
A.	Les conditions d'action des Treg et l'« effet by stander »	62
1.	L'activation des Treg est indispensable à leur fonction régulatrice	62
2.	L'effet « by stander ».....	63
B.	L'importance des interactions entre Treg, Tconv, CPA.....	65
1.	Le rôle des CPA.....	65
2.	Le rôle des Tconv : l'effet « boost ».....	66
C.	La mort cellulaire des Tconv induites par les Treg.....	66
1.	La cytotoxicité des Treg sur les Tconv.....	66
2.	La mort cellulaire programmée des Tconv induite par les Treg.....	66

D.	Le blocage métabolique des Tconv induits par les Treg	67
1.	La privation d'IL-2	67
2.	Le CD39, CD73, l'AMPc	68
3.	IDO et tryptophane	68
E.	L'inhibition des Tconv par les Treg contact-dépendant.....	69
1.	Le CTLA-4 comme mécanisme d'inhibition.....	69
2.	TGFβ membranaire.....	69
F.	Les cytokines inhibitrices produites par les Treg.....	70
1.	Le TGFβ	70
2.	IL-10	70
3.	L'IL35.....	71
G.	La résistance des Tconv à l'effet des Treg.....	71
1.	Les signaux de dangers	71
2.	Les cytokines pro-inflammatoires	72
3.	Les voies de signalisation intracellulaire : TRAF-6	72
II.	L'ontogénie des Treg induits et Treg naturels	73
A.	Ontogénie des Treg en périphérie : les Treg induits	74
1.	L'importance de l'IL-10 et de l'IL-35 dans l'induction des Treg FoxP3 ⁻	74
2.	Treg induits FoxP3 ⁺ et le TGFβ	75
3.	L'importance des DC dans l'induction des Treg.....	76
B.	Ontogénie des Treg dans le compartiment central thymique : les Treg naturels	77
1.	L'origine thymique des Treg.....	78
2.	Les nTreg sont-ils issus du cortex ou de la médullaire thymique ?.....	78
3.	A quel stade débute la différenciation Treg ?.....	79
4.	Le rôle du TCR dans la différenciation Treg.....	81
5.	Molécules de co-timulation et STAT-5 au cours de l'ontogénie des Treg.....	81
4° PARTIE.	LES LYMPHOCYTES TREGULATEURS :.....	83
FONCTIONS et HOMEOSTASIE		83
I.	Les fonctions régulatrices des Treg.....	83
A.	Régulation de l'auto-immunité à l'état basal:	83
B.	Régulation de l'allo-immunité et la tolérance foeto maternelle	85
1.	Le contrôle de l'allo-réactivité	85
2.	Le contrôle de la semi-alloréactivité: la tolérance foeto-maternelle	85
C.	Régulation des réactions allergiques	86
D.	Régulation des réponses anti-infectieuses.....	86
1.	Le bénéfice des Treg au cours des réponses anti-infectieuses.....	87
2.	Le rôle néfaste des Treg au cours des réponses anti-infectieuses.....	87
E.	Régulation des réponses anti-tumorales	88
II.	Treg et homéostasie : « l'auto-immune surveillance ».....	89
A.	Treg à la sortie du thymus	89
B.	L'importance du CD62L et CCR7 pour l'entrée dans le ganglion.....	89
C.	L'anergique des Treg	91
D.	Prolifération des Treg ganglionnaires à l'homéostasie	91
E.	Treg naïfs et mémoires	92
F.	Le rôle des cellules dendritiques dans l'homéostasie des Treg.....	95
1.	L'influence des DC sur les Treg.....	95
2.	L'influence des Treg sur les DC.....	96
III.	Les molécules impliquées dans l'homéostasie et l'activité des Treg.....	96
A.	Les cytokines et l'homéostasie des Treg.....	96
1.	IL-2	97

2.	IL-15	98
3.	IL-7	99
B.	Les cytokines et inflammation	99
1.	Les cytokines Th1	99
2.	IL-6 et la réponse Th17	100
3.	IL-4 et la réponse TH2 et TH-9	101+00
4.	IL-1 le rôle de l'inflammation	101
C.	Les intégrines	101
D.	La famille CD28	102
2.	CTLA-4	103
3.	ICOS	104
4.	PD-1	104
E.	La famille TNF	105
1.	Le TNF et Treg	105
2.	Les autres membres de la famille du TNF et Treg	105
3.	La nicotinamide adénine dinucléotide et la survie des Treg	106
F.	Les voies de signalisation intracellulaires	106
1.	La voie JAK3/STAT-5 utile pour les Treg	106
2.	La voie Pi3Kinase/mTor	107
G.	L'instabilité de FOXP3 ou la plasticité des Treg	110
H.	Objectifs du travail de thèse	111
RESULTATS		112
Article 1		113
Complément article 1		125
Article 2		137
Article 3		172
DISCUSSION		194
1 ^E PARTIE : LES TREG ET LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES		
I. Les Treg et la physiopathologie des myopathies inflammatoires dans les modèles animaux		195
A.	Les modèles de myopathies inflammatoires	195
1.	Le rôle du CMH-I	195
2.	Rôle des auto-anticorps	196
3.	Les cibles auto-antigéniques et le déclenchement de la myosite	197
4.	La rupture de la tolérance et le rôle des Treg	198
B.	La MAE et la myosite à inclusions	200
II. Les Treg et myopathies inflammatoires humaines		201
A.	L'aspect quantitatif	201
B.	L'aspect qualitatif de la fonction des Treg	203
C.	La résistance des Tconv	203
D.	Myosite à Inclusions : Les Treg face à l'attaque autoimmune	204
2 ^E PARTIE : TRAITEMENT DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES VERS UNE THERAPIE CELLULAIRE TREG		
I. Le problème du nombre		207
A.	Des besoins importants	207
B.	Des difficultés de production	207
II. Le problème de la spécificité		208
A.	Les Treg polyclonaux	209
B.	Les Treg spécifiques	210

1.	L'efficacité des Treg spécifiques.....	210
2.	La production de Treg spécifiques	211
III.	Les problèmes <i>in vivo</i> après le transfert	213
A.	L'adressage.....	213
B.	La plasticité des Treg	213
C.	La survie des Treg transférés	214
D.	Les Treg une arme à double tranchant	215
IV.	La thérapie cellulaire par Treg au cours de la Myosite à inclusions.....	215
A.	La production de Treg à ce jour	215
B.	La production de Treg chez les patients souffrant de MI.....	216
3 ^E	PARTIE : La RAPAMYCINE au cours de la MI.....	218
I.	L'effet immunosuppresseur.....	218
A.	L'effet anti lymphoprolifératif de la rapamycine	218
B.	L'effet de la rapamycine sur l'état naïf/mémoire des T	219
C.	L'effet de la rapamycine sur le trafic cellulaire	219
1.	La rapamycine KLF2, CCR7 et CD62L.....	219
2.	La rapamycine et SIP1	220
D.	L'effet de la rapamycine sur les Treg.....	221
II.	L'effet de la rapamycine sur la dégénérescence.....	222
III.	La mise au point d'un essai thérapeutique	223
A.	La difficulté de l'inclusion: l'intérêt d'un test diagnostique précoce.....	223
B.	La difficulté de l'évaluation clinique	224
C.	La rapamycine au cours de la MI : un essai clinique aujourd'hui.....	224
	BIBLIOGRAPHIE :	225

Résumé :

Les myopathies inflammatoires sont un groupe de myopathies acquises caractérisées par une atteinte musculaire auto-immune. Une sous population lymphocytaire T, appelée les lymphocytes T régulateurs (Treg), joue un rôle déterminant dans la tolérance périphérique aux antigènes du soi. Dans ce travail, nous avons voulu étudier les Treg au cours des myosites afin de tenter d'en éclaircir la physiopathologie et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un modèle murin de myopathie inflammatoire auto-immune. Dans ce modèle nous avons pu observer que la déplétion des Treg aggravait la myosite et qu'à l'inverse le transfert de Treg en diminuait la sévérité.

D'autre nous avons pu observer l'effet bénéfique de la rapamycine sur la sévérité de la myosite en permettant en particulier d'augmenter le pourcentage de Treg.

Dans un second temps nous avons étudié les Treg aux cours d'une myosite dépourvue de traitement la myosite à inclusions (MI). Nous avons pu observer qu'il existait un déficit en Treg dans le compartiment sanguin alors même qu'il existait une activation Th1 du système immunitaire. L'ensemble de ces observations nous a conduit à envisager l'utilisation de la rapamycine au cours de la myosite à inclusions.

Dans cette optique, nous avons cherché à définir quel pouvait être le meilleur marqueur de suivi de la maladie afin d'évaluer l'efficacité du traitement. L'étude que nous avons menée a permis de montrer que la mesure de la force maximale isométrique des extenseurs du genou était un bon marqueur évolutif de la maladie.

Ainsi, ensemble ces données permet d'envisager la mise au point d'un essai thérapeutique avec la rapamycine au cours de la MI.

Mots-clés

Lymphocyte T régulateurs ; myopathie inflammatoire idiopathique ; auto-immunité ; rapamycine, myosite à inclusions.

I3 : Immunology, Immunopathology, Immunotherapy
CNRS/UMR 7211, INSERM U959
Bâtiment CERVI- Hôpital de la Pitié-Salpêtrière
83, bd de l'hôpital 75651 PARIS Cedex 13
(+33)1.42.17.74.43

Abstract

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) are severe inflammatory muscle disorders with life threatening complications. Treatments are partially efficacious and have many side effects. Thus new therapeutics approaches have to be developed. Because IIM involves auto-immune mechanisms and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T lymphocytes (Treg) play a major role in the regulation of immune responses, we examined the role of Treg in IIM.

First, we developed a reproducible and transferable model of auto-immune myopathy. This experimental autoimmune myositis (EAM) was aggravated by Treg depletion and improved by polyclonal Treg injection. Furthermore rapamycin decreases the severity of the myositis in EAM mice by increasing the percentage Treg in the draining lymph nodes.

We also analysed Treg in patients with inclusion body myositis (IBM), an IIM without validated treatment. In IBM patients we observed an activation of the immune system engaged in a Th1 response, with a decreased percentage of Treg in the periphery. Treg are present within muscular infiltrates where they seem unable to control inflammation.

Finally, in attempt to define reliable outcomes in IBM patients for clinical trials, we assessed muscle strength during a nine months period. We found that knee extension strength seems to be the most relevant marker of disease progression in IBM when measured with suitable dynamometry.

Together these data suggest that rapamycin could be tested as treatment for IBM patient using knee extension strength as outcome measure.

Keywords

Regulatory T cells; idiopathic inflammatory myopathy; inclusion body myositis, auto-immunity ; rapamycin

I3 : Immunology, Immunopathology, Immunotherapy
CNRS/UMR 7211, INSERM U959
Bâtiment CERVI- Hôpital de la Pitié-Salpêtrière
83, bd de l'hôpital 75651 PARIS Cedex 13
(+33)1.42.17.74.43

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

Ag: Antigène

Ac: Anticorps

AICD: *Activation-induced cell death*

AIRE: *Auto-immune regulator*

ARN: Acide ribonucléique

ASM: Anticorps spécifiques des myosites

AAM: Anticorps associés aux myosites

B: lymphocyte B

CD: *Cluster Differentiation*

CIM: *C Proteine Induced Myositis*

CFA: *Complete Freund adjuvant*

CMH: Complexe majeur
d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CPK: Créatine phosphokinase

CTLA-4: *Cytotoxic T lymphocyte-
associated protein-4*

CXCL: *Chemokine (motif C-X-C) ligand*

CXCR: *Chemokine (motif C-X-C)
récepteur*

DC: cellule dendritique

DM: Dermatomyosite

FoxP3: *Forkhead box Protein 3*

GITR: *Glucocorticoid-Induced Tumor
necrosis factor Receptor family-related
gene*

ICOS: *Inducible T-cell Co-stimulator*

IDO: *Indoleamine 2,3-DiOxygenase*

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

KO: *Knout out* pour déficient

LES: Lupus Erythémateux Systémique

MII: Myopathie inflammatoire idiopathique

MI: Myosite à Inclusions

MC: Myosite de chevauchement

MN: Myopathie nécrosante auto-immune

mTOR: *serine/thréonine protéine kinase
mammalian target of rapamycin*

NK: *Natural killer*

PD-1: *Programmed cell death*

PM: Polymyosite

PAMP : *Pathogen Associated Molecular
Pattern*

PKC: *Protéine Kinase C*

PRR: *Pattern Recognition Receptor*

RAG: *Recombination-Activating Gene*

STAT-5: *Signal Transducer and Activator of
Transcription 5*

SRP: *Signal Recognition Particule*

T: lymphocyte T

Tconv: lymphocyte T conventionnel CD4⁺

Treg: lymphocyte T régulateur

Th: *T helper cell pour lymphocyte T auxiliaire*

TNF α : *Tumor necrosis factor α*

TCR: *T cell receptor*

TGF: *Transforming Growth Factor*

TLR: *Toll-Like Receptor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

VIH: virus de l'immunodéficience Humaine

Avant propos

Les myopathies inflammatoires idiopathiques sont caractérisées par la présence d'une inflammation musculaire associée à un déficit moteur de sévérité variable. Ce groupe hétérogène est constitué de maladies aiguës, subaiguës et/ou chroniques. Les myopathies inflammatoires peuvent être secondaires à un agent infectieux de nature virale, bactérienne ou parasitaire ou alors se développer en l'absence d'agent causal identifiable: on parle alors de myopathies inflammatoires (ou myosites) idiopathiques (MI).

Les MI sont un groupe hétérogène de maladie musculaire responsables d'un handicap moteur parfois grave et peuvent engager le pronostic vital des patients en particulier en cas d'atteinte respiratoire associée. Ces observations justifient l'emploi de traitements immunosuppresseurs puissants afin de contrôler au mieux la maladie. Cependant les traitements ne sont pas toujours efficaces et ce particulièrement aux cours de la myosite à inclusions. De plus les traitements sont très souvent responsables d'effets secondaires. Ainsi la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques est nécessaire.

Les MI partagent un mécanisme physiopathologique commun: la rupture de la « tolérance » immunitaire vis-à-vis d'antigènes musculaires. Le système immunitaire a pour objectif majeur de protéger l'organisme contre les agressions extérieures. Du fait de leur pouvoir destructeur, les composants de ce système sont finement régulés. Les mécanismes de régulation sont nombreux et actifs lors des différentes étapes de la réponse immune. Les défauts de ces phénomènes de tolérance sont à l'origine de nombreuses pathologies inflammatoires et auto-immunes. Parmi ces mécanismes, les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des éléments phares de l'inhibition des réponses immunes en périphérie.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les Treg pourraient être impliqués dans la physiopathologie des MI et envisagé qu'ils pouvaient être un nouvel agent thérapeutique.

Pour répondre à ces questions nous décrivons les différentes MII et les mécanismes dysimmunitaires impliqués. Nous verrons ensuite les différents mécanismes passifs et actifs, régissant la tolérance immunitaire avant de décrire plus particulièrement les caractéristiques des Treg : leur(s) origine(s) ainsi que les mécanismes qu'ils emploient pour exercer leur fonction suppressive. Puis nous décrivons quelle place occupent les Treg au sein du système immunitaire et comment ils sont régulés (homéostasie).

Au moment où nous avons entrepris notre travail, aucune donnée n'était disponible sur les Treg au cours des MII.

Ainsi dans cet exposé, nous décrivons les différentes étapes ayant abouti au développement d'un modèle murin de myosite auto-immune afin d'analyser le rôle et le potentiel thérapeutique des Treg. Dans ce modèle nous montrerons comment l'utilisation de la rapamycine a permis de moduler l'action *in vivo* des Treg. Nous verrons ensuite quel est le rôle des Treg chez l'homme au cours de la myosite à inclusions (MI).

Enfin, nous montrerons que les résultats obtenus nous ont conduit à envisager de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier au cours de la myosite à inclusions, maladie pour laquelle aucun traitement n'est efficace à ce jour.

INTRODUCTION

1^e PARTIE : LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES IDIOPATHIQUES

I. Les myopathies myopathies inflammatoires idiopathiques : aspects cliniques

A. Les myopathies généralités

Le tissu musculaire strié a pour fonction essentielle de produire une force mécanique et ainsi un mouvement. Il permet aux mammifères d'interagir avec leur environnement, et ainsi d'assurer leur survie. Cependant dans certaines conditions pathologiques son fonctionnement peut être altéré on parle alors de myopathies. Chez l'homme, les myopathies peuvent être responsables d'un handicap moteur sévère, menaçant parfois le pronostic vital des patients.

A ce jour, on dénombre plus d'une centaine d'étiologies de myopathie chez l'homme. On distingue les myopathies héréditaires, des myopathies acquises.

Les myopathies héréditaires sont d'origine génétique. Depuis les premiers cas identifiés de myopathies héréditaires décrits par Duchenne au 19^{ème} siècle, il existe à ce jour plusieurs dizaines de gènes et mutations impliqués dans la survenue de myopathies héréditaires. Les tableaux cliniques sont très variables d'une mutation à l'autre et parfois même aussi pour une même mutation. Certaines de ces myopathies se déclarent dès la naissance ou dès les premières années de vie, on parle alors de myopathies congénitales, alors que d'autres se révèlent plus tardivement, voire à un âge avancé. Tous les modes de transmission peuvent être observés. Le tableau 1 résume les principales myopathies héréditaires.

A ces myopathies héréditaires, on oppose les myopathies acquises. Les étiologies de ces myopathies peuvent être regroupées en grands cadres nosologiques (Tableau 1). La toxicité de certains traitements peut être responsable de myopathies. Ces myopathies « toxiques » sont une des causes fréquentes de myopathies acquises. Un autre grand groupe est celui des myosites. Certaines sont des myopathies inflammatoires secondaires à un agent pathogène identifié (tableau 1), on parle alors de myosite infectieuse, si l'agent causal n'est

pas identifié, on parle alors de myosite idiopathique. Ce dernier groupe est l'objet de notre travail.

Tableau 1 : Principales affections musculaires

Anomalies de la jonction neuro-musculaire jonction

Myasthenie auto-immune
Syndrome de Lambert-Eaton
Myasthenies congenitales

Myopathies génétiques

Myopathies congénitales
Myopathies myofibrillaires
Dystrophies Musculaires
Dystrophinopathies
Sarcoglycanopathies
Dystrophies congénitales
Dystrophie Facio-scapulo-humerale
Dystrophie oculopharyngée
Calpaïnopathies
Dysferlinopathies
Caveolinopathies
Dystrophie Emery-Dreyfus
Laminopathies et autres nucléopathies
Dystrophies myotoniques et autres myotonies
Canalopathies
Myopathies métaboliques
Glycogénoses
Lipidoses
Myopathies mitochondriales

Myopathies endocriniennes et toxiques

Myopathies endocriniennes
Myopathies toxiques
Myofasciite à macrophages (aluminium)

Myopathies inflammatoires

Myopathies inflammatoires idiopathiques
Myopathies nécrosantes auto-immunes
Sarcoidose musculaire
Myopathies infectieuses (bactériennes, virales, parasitaires)

D'après R. Gherardi. Tableau non exhaustif des pathologies musculaires représentant les grands cadres nosologiques.

B. Historique des myosites et classification

La dénomination « myopathie inflammatoire idiopathique » n'est apparue qu'au cours des années 70 (Bohan and Peter, 1975a) (« The major inflammatory myopathies of unknown cause » (Carpenter and Karpati, 1981)), soit plus d'une centaine d'années après les premières descriptions de cas au XIX^{ème} siècle.

Les premiers cas probables de myopathie inflammatoire idiopathique ont été rapportés dans la littérature, tout d'abord par le docteur Wagner en 1863 (Wagner, 1863), puis par le Dr Potain en 1875 (Potain, 1875), au sujet d'un fermier de 17 ans hospitalisé à Necker. A cette époque, les deux médecins parlaient respectivement de « périostite » ou de « morve atypique ». Dans son article, le Dr Potain décrivait : « l'érythème des paupières », « la gêne dans les mouvements...telle qu'elle ne permettait point d'asseoir le malade dans son lit », « la distribution inaccoutumée de l'œdème et sa prédominance toute spéciale au niveau des masses musculaires », « les masses musculaires infiltrées de sérosités » ainsi « qu'une grande proportion de fibres granuleuses », symptomatologie évoquant fortement le diagnostic de dermatomyosite (DM).

Le décès consécutif à cette « morve atypique » semblait en fait être en rapport avec des complications infectieuses respiratoires de la DM.

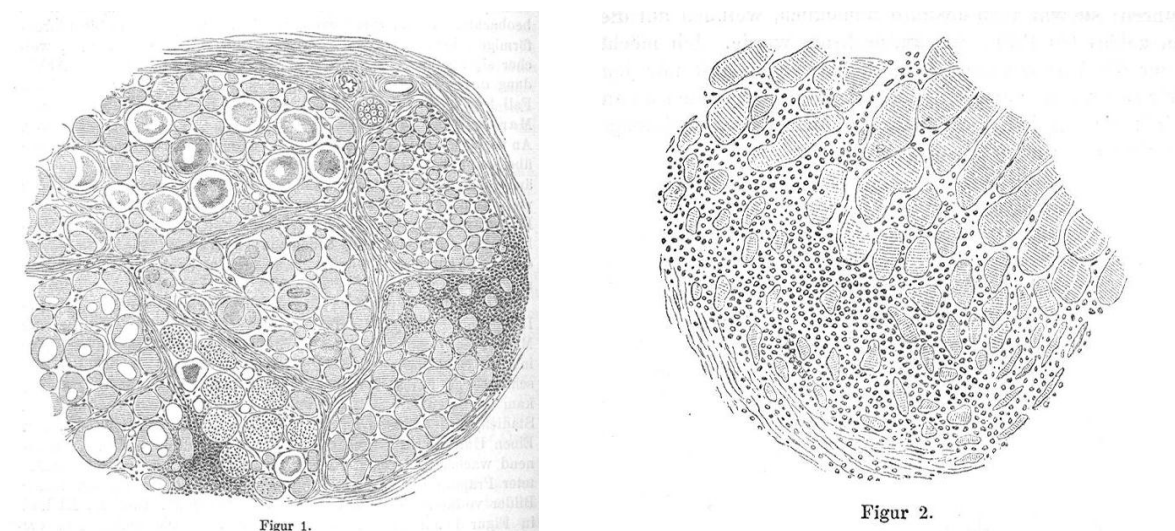
C'est finalement en 1886, que le Dr Wagner a identifié le premier cas de myopathie inflammatoire idiopathique, pour donner naissance au terme de Polymyosite (PM). Dans cet article intitulé : « Ein fall von acuter polymyositis » (Wagner, 1886-7), il décrivait le cas d'une femme de 34 ans, présentant un déficit moteur douloureux, des lésions cutanées à type d'érythème touchant les mains, ainsi que des arthralgies. Très rapidement, l'état clinique de cette patiente se dégradait, avec la survenue de signes respiratoires à type de dyspnée fébrile et toux productive, conduisant finalement à son décès. L'examen anatomopathologique post-mortem des muscles présenté en illustration dans l'article (Figure1) révélait la présence d'une atrophie musculaire associée à la présence d'un infiltrat inflammatoire diffus. Dans la discussion, le Dr Wagner rappelait les cas similaires rapportés précédemment, et en particulier la première description qu'il avait publiée 22 ans plus tôt dans « Fall einer seltenen Muskelkanheit » (Wagner, 1863), afin de souligner l'absence de cause identifiable, et d'attribuer à ce syndrome la désignation de : *Acutis polymyositis*.

Au début du XX^{ème} siècle, la première revue de la littérature au sujet de 28 cas a été publiée par Steinert (Steinert, 1903). Elle avait le mérite de distinguer les myosites secondaires des myosites idiopathiques. En effet, l’embarras des précédents auteurs était perceptible dans leur diagnostic de « pseudotrichinose » (Hepp, 1887).

Il est intéressant aussi de noter que l’association entre DM et cancer avait été rapportée dès 1916 (Stertz, 1916).

Une confusion persistera assez longtemps entre PM et de DM, puisque les deux termes seront employés indistinctement jusque dans les années 1950, alors même que certains auteurs décriront des cas de myosite sans lésion cutanée (Hepp, 1887). Il faudra attendre les années 1960 (Pearson, 1966) pour voir se détacher l’entité PM de l’entité DM d’une part, et des dystrophies musculaires d’autre part (Levison, 1937; Shy and McEachern, 1951).

Figure 1 : Illustration de l’examen anatomopathologique musculaire post mortem du patient du Dr Wagner en 1886. (Wagner, 1886-7)



C’est à cette période que les atteintes extra musculaires des PM commencent à être reconnues (Pearson, 1966). Bohan et Peter sont les premiers à définir des critères clairs de classification, fondés sur des éléments cliniques (déficit moteur symétrique, présence ou non d’exanthème), biologiques (élévation des enzymes musculaires), électromyographique (tracé myogène sur l’EMG) et histologiques (nécrose et régénération musculaire, inflammation), permettant de distinguer 5 entités : PM de l’adulte, DM de l’adulte, myosite associée à un cancer, DM et myosite intriquée à une autre connectivite. Cependant cette classification ne permet pas toujours de distinguer les myosites associées aux connectivites des PM, ni les MI ou les myopathies nécrosantes autoimmunes. C’est avec la découverte des anticorps (Ac) associés aux myosites idiopathiques (Love et al., 1991), que Troyanov et al. proposent finalement une

nouvelle classification (tableau 1) (Trojanov et al., 2005), remplaçant la notion de « myosites associées aux connectivites » par la notion de « myosites de chevauchement (MC) », définie par la présence d'Auto-Ac ou de manifestations extra musculaires.

Tableau 2 : Classification de Trojanov et al (Trojanov et al., 2005)

- 1** : Déficit musculaire proximal et symétrique.
- 2** : Elévation des enzymes musculaires.
- 3** : Tracé myogène à l'EMG.
- 4** : Anomalies sur la biopsie musculaire (nécrose, régénération, phagocytose, infiltrat mononucléé interstitiel.
- 5** : Rash typique de DM (exanthème héliotrope, signe et papules de Gottron).

PM	Polymyosite
DM	Dermatomyosite
MC	Myosite de chevauchement avec atteinte extramusculaire* et/ou auto-ac**
MAC	Myosite associée aux cancers, syndrome paranéoplasique # sans auto-ac**

Myosite définie : 4 critères, à l'exclusion du rash pour la PM, 3 ou 4 (plus rash) pour la DM.

Myosite probable : 3 critères, à l'exclusion du rash pour la PM, 2 (plus rash) pour la DM.

Myosite possible : 2 critères, à l'exclusion du rash pour la PM, 1 (plus rash) pour la DM.

***Atteintes extramusculaires** : Phénomène de Raynaud, sclérodactylie, calcinose, hypomobilité oesophagienne ou grêlique, DLCO<70%, syndrome interstitiel pulmonaire, lupus discoïde, Ac-anti-ADN natif, hypocomplémentémie, 4 ou plus des 11 critères de l'American College of Rheumatology pour le diagnostic de Lupus érythémateux systémique, syndrome des antiphospholipides.

#Syndrome paranéoplasique : Cancer dans les 3 ans avant ou après le diagnostic de myosite et disparition de la myosite en cas de guérison du cancer.

****Ac associés aux myosites** : Ac anti-synthétase (Jo-1, PL-7, PL-12, OJ, EJ, KS), Ac associés à la sclérodermie (Ac-anti-topo-isomérase I ou III, anti-centromère), Ac anti-URNP, Ac anti-PmScl, Ac anti-Ku et Ac anti-SRP.

Une autre classification est proposée en 2004 par Hoogendijk et al (Hoogendijk et al., 2004). Cette classification prend en compte de nombreux critères histologiques, et a comme principal intérêt d'introduire la notion de « myosite nécrosante auto-immune » (MN), caractérisée par la prédominance des lésions nécrotiques musculaires. Cette entité associée à la présence d'Ac anti-SRP a été décrite pour la première fois en 1986 (Reeves et al., 1986), la première série de malades a moins de 10 ans (Miller et al., 2002). Nous verrons après, que

récemment les MN ont été aussi associées à la présence d'Ac anti-HMGcoA (Christopher-Stine et al., 2010; Mannen et al. 2011). Enfin, il faut isoler le cas de la Myosite à Inclusions (MI) dont la première description remonte à la fin des années 1960 (Chou, 1968), avant d'être nommée comme telle en 1978 par Carpenter et al. (Carpenter et al., 1978). Cette myopathie est habituellement considérée comme une myopathie inflammatoire idiopathique même si certains auteurs, en raison de la primauté de phénomènes dégénératifs, proposent de l'exclure de ce groupe (Askanas et al, 2008).

C. Épidémiologie et prédisposition génétique

1. Epidémiologie

L'incidence et la prévalence des différentes myopathies inflammatoires ne sont pas précisément connues. En effet, la majorité des estimations a été réalisée à partir de la classification de Bohan et Peter (1975) (Bohan and Peter, 1975b), ne prenant pas en compte la MI. Or, on sait que la MI peut facilement être confondue avec une autre myosite : la polymyosite (PM) (Chahin and Engel, 2008).

Plusieurs auteurs sont pourtant parvenus à estimer la prévalence des myopathies inflammatoires, l'évaluant entre 0,6 et 1 pour 100 000 (Dalakas, 1991; Hilton-Jones, 2001; Mastaglia and Phillips, 2002; Medsger et al., 1970).

Une étude plus récente, menée au Canada, a permis d'estimer la prévalence des DM et PM à 21,5 pour 100.000, avec une prédominance chez les femmes, et les personnes habitant en zones urbaines (Bernatsky et al., 2009). La MI a une prévalence de 4,9 patients par million, touchant plus souvent les hommes que les femmes avec un sexe ratio à 3 pour 1 (Mastaglia, 2008). Chez l'enfant, la DM peut être observée alors que ni la PM, ni la MI, ne sont diagnostiquées à cette période de la vie.

Les travaux de Troyanov et al. ont montré que les MC étaient largement prédominantes puisqu'elles représentaient 68% des myosites dans leur série alors que PM et DM représentaient respectivement 20% et 10%, les MAC représentaient, elles, 2% des cas.

Ainsi la PM pure serait une entité beaucoup plus rare dont la prévalence a d'ailleurs probablement été surestimée (van der Meulen et al., 2003). Dans l'étude de van der Meulen (van der Meulen et al., 2003), la PM représentait 9% des cas de myosites au moment du diagnostic, selon les critères de Bohan et Peter. Au cours du suivi, la moitié de ces cas a été reclassée en MAI et tous les autres cas ont présenté des atypies qui ne permettaient plus de retenir ce diagnostic. Cependant l'existence de cette pathologie est bien réelle et ne doit pas

être remise en cause comme l'ont suggéré certains auteurs (van der Meulen et al., 2003). En effet, la PM dans sa forme pure est une myopathie inflammatoire idiopathique rare, mais représente pourtant jusqu'à 20 % des cas dans certaines cohortes (Benveniste et al., 2004b; Chahin et al, 2008).

Si la MC est la plus fréquente des myopathies inflammatoires avant l'âge de 50 ans, la MI est la myosite la plus fréquente après l'âge de 50 ans (Badrising et al., 2000).

Enfin il faut souligner qu'en plus des difficultés diagnostiques nosologiques entre MI et PM au moment du diagnostic (Chahin et al, 2008) l'épidémiologie des myosites n'a pas jusqu'à présent pris en compte l'entité myopathie nécrosante auto-immune (MN) décrite depuis peu et dont les frontières s'élargissent encore avec la découverte de nouveaux anticorps associés.

2. Facteurs de prédisposition aux myosites

Ont été associés à la survenue de la PM des facteurs génétiques comme le groupe HLA DRB1*0301 (Shamim et al., 2000) ou les haplotypes HLA-DRB1*03, DQA1*05 et DQB1*02 (Chinoy et al., 2006). Certains de ces haplotypes sont aussi retrouvés au cours de la MI en particulier l'haplotype HLA-DRβ1*0301 (Koffman et al., 1998b) ce qui suggère des mécanismes physiopathologiques communs à ces deux entités. A l'inverse, aux cours de la DM, les haplotypes généralement différents de ceux associés à la PM (Chinoy et al., 2006; Reed et al, 2002; Werth et al., 2002) soulignent ainsi sa différence sur le plan physiopathologique.

D. Description clinique

1. Les manifestations musculaires squelettiques extra cardiaques

Un déficit de la force musculaire est presque toujours observé au cours des myopathies inflammatoires. Le diagnostic est parfois posé avant son apparition lorsqu'il est retardé par rapport à la survenue des manifestations extra musculaires (respiratoires ou cutanées). Selon le type de myosite, le mode d'installation du déficit moteur est habituellement aigu ou subaigu (MC, DM, MN) ou plus insidieux (MI). Cependant le mode d'installation peut être trompeur en particulier pour les MN. Le dogme du caractère aigu a été remis en cause par des travaux récents (Benveniste and Leger, 2011) qui ont montré que certaines myopathies étiquetées

comme probable dystrophie musculaire évoluant parfois depuis plusieurs années se sont révélées être en fait d'authentique MN associées aux Ac-anti-SRP.

L'atteinte musculaire peut être douloureuse au cours des myosites en particulier au cours des MC avec syndromes des anti-synthétases, où 65% des patients sont myalgiques (R Stanciu, 2008). Les myalgies ne sont pour autant pas retenues comme critère diagnostique dans les différentes classifications (Bohan et al, 1975b; Troyanov et al., 2005).

L'intensité du déficit moteur est variable, de modérée à sévère. Le déficit touche les 4 membres de façon bilatérale, proximale et symétrique. On note aussi parfois une atteinte axiale qui peut être sévère. La face est généralement épargnée même si une atteinte faciale peut être observée au cours de la MI. Dans le cas de la MI, le déficit est à la fois proximal et distal et souvent asymétrique (Sekul and Dalakas, 1993).

Les atteintes du sphincter supérieur de l'œsophage peuvent être observées (de Merieux et al., 1983) et c'est un signe de gravité qu'il convient de rechercher systématiquement en raison des complications respiratoires graves. La dysphagie est rencontrée plus fréquemment (60%) au cours de la MI (Dalakas, 2006).

2. Les manifestations cardiaques et vasculaires

Des atteintes cardiaques spécifiques peuvent être observées au cours des myosites. Elles comportent des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, des troubles du rythme, ou des atteintes du myocarde de type myocardite (Haupt and Hutchins, 1982) et doivent donc être systématiquement recherchées en raison du risque vital qu'elles impliquent.

Les MN associées à des Ac anti-Signal Recognition Particle (SRP) sont certainement le groupe le plus souvent responsable d'atteinte cardiaque avec une fréquence de 20 à 30% des cas. (Bloch Queyrat 2008; Miller et al., 2002).

Au cours des autres myosites type DM ou MC, l'atteinte cardiaque est moins fréquente bien que moins bien évaluée, elle serait inférieure à 5% des cas. Au cours de la MI, il n'est pas rapporté d'atteinte cardiaque spécifique.

Il faut aussi souligner l'importance des complications cardiovasculaires des traitements (HTA, maladie athéromateuse), en particulier lors de corticothérapies prolongées qui peuvent conduire à des complications athérothrombotiques graves qu'il est nécessaire de prévenir.

3. Les manifestations extra-musculaires cutanées

Les atteintes cutanées sont fréquentes au cours des myopathies inflammatoires et sont un élément d'orientation important pour le diagnostic nosologique. Les manifestations cutanées

concernent presque exclusivement les MC et DM selon Troyanov (Troyanov et al., 2005), il n'existe jamais de signe dermatologique au cours de la PM pure. Certaines d'entre elles sont caractéristiques voire pathognomoniques.

C'est au cours de la DM que les manifestations sont les plus riches et spécifiques. Elles précèdent les manifestations musculaires plus d'une fois sur deux. Dans certains cas l'atteinte musculaire serait même absente, on parle alors de « DM amyopathique », cependant cette entité est discutée car elle dépend de l'expertise et de moyens mis en œuvre pour le diagnostic de l'atteinte musculaire (Dalakas, 2002). A l'inverse, il existe d'authentiques DM bien caractérisées sur le plan histologique, sans atteinte dermatologique. L'érythème du visage avec un rash héliotrope et un œdème lilacé des paupières est une manifestation fréquente (60-80%) et très évocatrice du diagnostic. L'atteinte des mains est elle aussi caractéristique avec un érythème en bande en regard de la tête des métatarses et du lit de l'ongle voire pathognomonique lorsqu'il existe des papules plates violines (papules de Gottron). On peut aussi observer des lésions poïkilodermiques, des lésions vésiculo-bulleuses, ulcérées ou nécrotiques, des panniculites, des atteintes bilatérales et symétriques des faces latérales des cuisses (holster sign pour le signe de « l'étui de revolver ») ou une érythrodermie. Les calcifications sous cutanées habituellement rencontrées dans la DM de l'enfant sont rares chez l'adulte. L'aspect histologique des lésions de DM n'est pas spécifique (Callen, 2000) en particulier la positivité de l'immunofluorescence directe en peau lésionnelle avec des dépôts de C3 ou d'immunoglobulines G le long de la jonction dermoépidermique peut être aussi rencontré au cours du lupus même si ces dépôts sont statistiquement moins fréquents au cours des DM (90% des cas de lupus aigu ou discoïde versus 10 à 20% au cours de la DM (C. Frances série personnelle)).

A ces lésions érythémateuses s'associent aussi des manifestations vasculaires avec en particulier un phénomène de Raynaud (Sontheimer, 2002; Santmyire-Rosenberger and Dugan, 2003). Le phénomène de Raynaud constitue également une des manifestations habituelles au cours des MC. En particulier il est un des éléments diagnostiques du syndrome des anti-synthétases avec les fissures digitales, associées à une hyperkératose (mains de mécaniciens). Les lésions dermatologiques spécifiques des connectivites associées aux MC peuvent être aussi observées (lupus et sclérodermies).

4. Les manifestations extra-musculaires respiratoires

Tous les types de myosite peuvent s'accompagner d'une atteinte respiratoire. Celle-ci peut être asymptomatique lorsqu'elle est dépistée précocement, mais peut être aussi responsable de détresse respiratoire aiguë engageant le pronostic vital. Ainsi, il convient de rechercher systématiquement une atteinte respiratoire car c'est elle qui en fait le pronostic.

Les manifestations respiratoires peuvent être secondaires à de nombreux mécanismes. Une atteinte mécanique de la musculature respiratoire ou pharyngée peut être responsable d'un trouble ventilatoire restrictif ou de pneumopathie d'inhalation. Ce type d'atteinte peut être observé au cours de toutes les myosites. Les troubles ventilatoires restrictifs sont rarement symptomatiques lorsqu'ils sont isolés même si des cas d'hypoventilation alvéolaire grave nécessitant une assistance respiratoire ont été observés au cours de MC en cas d'atteinte diaphragmatique grave (Herson, 2010).

Des atteintes parenchymateuses spécifiques peuvent être observées au cours de la MC, DM et MN. La prévalence des pneumopathies interstitielles au cours de la MC et DM varie de 5 à 64 % selon les séries (Frazier and Miller, 1974 ; Takizawa et al., 1987; Miller et al., 2002) et est estimée à 30% des cas au cours de MN (Bloch Queyrat 2008; Douglas et al., 2001). L'atteinte parenchymateuse spécifique est particulièrement fréquente au cours des MC au cours du syndrome des antisynthétases (70 à 90 %) (Stanciu, 2008; Richards et al., 2009). L'atteinte spécifique peut précéder (20-47% des cas) ou suivre le diagnostic de myosite (Marie et Dominique, 2006). Tous les types de manifestations ont été décrits : pneumopathie interstitielle non spécifique ou commune, pneumopathie organisée cryptogénique, dommage alvéolaire diffus ou fibrose pulmonaire idiopathique. L'atteinte la plus fréquente est la pneumopathie interstitielle non spécifique qui justifie une surveillance rapprochée et peut conduire dans certains cas à la greffe pulmonaire. Le dommage alvéolaire diffus reste une manifestation rare mais avec un pronostic sombre avec plus de 80% de mortalité. Il ne faut pas méconnaître des atteintes parenchymateuses non spécifiques secondaires aux traitements soit par toxicité directe (méthotrexate) soit en raison d'infections opportunistes (pneumocystose). Enfin il faut aussi citer des complications vasculaires respiratoires spécifiques (hypertension artérielle pulmonaire) ou non comme la maladie thromboembolique veineuse.

5. Les manifestations extra-musculaires: signes généraux et rhumatologiques

Un amaigrissement important peut être observé au cours de myosites en particulier dans les formes aiguës de MC et MN. La présence de fièvre ou d'un syndrome inflammatoire peut être rencontré principalement au cours du syndrome des antisynthétases, c'est alors un signe de mauvais pronostic (R Stanciu, 2008; Richards et al., 2009). Les arthralgies parfois associées à des synovites sont un signe important du syndrome des anti-synthétases. Les synovites sont alors non destructrices.

E. Myosites et cancers

Dans une méta-analyse incluant 1064 myosites idiopathiques, la prévalence du cancer apparaît 5 à 7 fois plus importante que dans la population générale (Zantos et al., 1994). La prévalence du cancer varie de 13% à 43 % (Yazici et Kagen, 2000). Les facteurs associés à la survenue d'un cancer sont l'âge avancé, les signes cutanés, l'absence de signe respiratoire et la résistance au traitement (Madan et al., 2009). Le risque est plus élevé au cours des DM qu'au cours des PM, 3,4% et 1,8% respectivement (Sigurgeirsson et al., 1992). Dans l'étude de Sigurgeirsson, l'association avec un cancer est rapportée au cours de 9 % des PM, et 15 % des DM. Une plus récente étude suggère que le cancer est seulement associé à la DM et non la PM (Madan et al., 2009). L'association du cancer avec les MN sans anticorps anti-SRP pourrait être aussi importante mais sa prévalence doit encore être précisée.

Le cancer est diagnostiqué le plus souvent au moment du diagnostic de la myosite +/- 2 ans. La répartition des types de cancers ne diffère pas de celle observée dans la population générale après appariement sur l'âge. Cependant, certains auteurs rapportent une fréquence plus élevée du cancer de l'ovaire au cours de la DM (Whitmore et al., 1994). Enfin, on observe un parallélisme entre l'évolution du cancer et celui de la myosite.

Ainsi la recherche d'un cancer occulte doit être exhaustive au moment du diagnostic de DM. Des travaux récents montre que la présence d'Ac-anti-TIF1 γ au cours de la DM est fortement prédictive de la présence de cancer (Trallero-Araguas et al., 2010). La détection de cet Ac n'est pas encore réalisable en pratique clinique mais devrait rapidement pouvoir l'être en raison de sa valeur prédictive négative de 95% (Selva-O'Callaghan et al., 2010).

II. Les myopathies inflammatoires idiopathiques: Aspects paracliniques

A. Les examens complémentaires non invasifs

L'atteinte musculaire est confirmée par l'élévation du taux sérique des enzymes musculaires (Créatine phosphokinase : CPK, Aldolase, Alanine AminoTransférase : ALAT, Lactico déshydrogénase : LDH) et par la présence d'un syndrome myogène à l'électromyogramme (EMG).

Parmi les dosages sériques, celui des CPK est l'examen le plus sensible pour le diagnostic (Dalakas and Hohlfeld, 2003), même si de rares cas de DM à taux sérique de CPK normal ont été rapportés. Des taux très élevés de CPK peuvent s'observer au cours des MN et sont à ce titre un élément d'orientation important utile pour le diagnostic (Miller et al., 2002). L'EMG, quand il confirme l'atteinte musculaire, ne permet pas de discriminer les différents types de myosites même s'il peut aider au diagnostic de myopathie cortisonique (Dalakas, 1991). Les progrès techniques en imagerie médicale ont permis d'envisager ces outils comme autres moyens diagnostiques pour les myosites.

B. Imagerie musculaire

L'échographie musculaire conventionnelle est un test de sensibilité inférieure à l'EMG pour le diagnostic de l'atteinte musculaire (Reimers et al., 1993). De plus, l'aspect échographique n'est pas suffisamment spécifique pour distinguer les différentes myopathies (Walker, 2008). Si l'utilisation d'un agent de contraste permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'examen, ces dernières restent inférieures à celle de l'IRM corps entier: 88 % et 100% respectivement (Weber et al., 2006).

En IRM, les anomalies sont mieux détectées en séquence pondérée T2 avec suppression du signal graisseux (soit *Short Tau Inversion-Recovery* : STIR ou *FATSAT Fat Saturation*). Si l'IRM semble être un examen sensible pour le diagnostic des myosites, cette technique n'est pas suffisante pour permettre de les classer (Dion et al., 2002; Tomasova Studynkova et al., 2007). Par ailleurs, certains auteurs ont rapporté que l'IRM permettrait de guider la biopsie et d'en accroître ainsi la sensibilité (Walker, 2008), mais il semble prématuré de recommander la pratique systématique de cet examen avant chaque biopsie étant donné qu'une étude récente a montré la présence d'infiltrats en dehors des zones considérées comme pathologiques en IRM (Tomasova Studynkova et al., 2007).

Enfin, de nombreuses autres techniques d'imagerie ont été testées avec des résultats moins intéressants. Parmi elles, on retiendra seulement, la **Tomographie par Emission de Positron (TEP)**, qui a montré sa capacité à détecter des anomalies de signal musculaire au cours des DM, mais surtout à mettre en évidence des cancers occultes associés (Liau et al., 2007; Munoz et al., 2007), ce qui semble être son principal intérêt. Dans l'enquête morphologique à la recherche d'un cancer occulte la TEP permet avec un examen un bilan comparable à l'association TDM thoraco-abdominal, mammographie et coloscopie, mais sa sensibilité ne semble pas pour autant supérieure.

C. Les Anticorps associés aux myosites : le meilleur outils diagnostic non invasif

Ces dernières années, ce sont les anticorps associés aux myosites (AAM) qui ont permis le plus de progrès dans la classification nosologique, comme c'était déjà le cas dans les années 80 en permettant d'introduire la notion de MC puis plus récemment les MN avec la découverte des Ac anti-SRP.

La recherche d'auto-anticorps sur cellules HEP-2 et la caractérisation de leur cible sont des éléments d'orientation capitaux au diagnostic nosologique. Ces anticorps sont tous détectables en immunofluorescence, avec une fluorescence soit nucléaire soit cytoplasmique.

Environ 50% des patients souffrant de myopathie inflammatoire (DM ou MC) ont des auto-anticorps (Brouwer et al., 2001). Certains anticorps (Ac) sont dits « spécifiques des myosites » (ASM) alors que d'autres sont dits « associés à la myosite » (AAM). Ces AAM peuvent donc aussi être retrouvés au cours d'autres maladies auto-immunes, et ce en l'absence de myosite.

La plupart des ASM sont cytoplasmiques et dirigés contre des enzymes impliquées dans la synthèse protéique (ARNt-synthétase), dans le transport protéique (Protéine SRP) ou bien contre des protéines de remodelage du nucléosome (MI-2). Certains de ces Ac sont des marqueurs très spécifiques des myosites (Jo-1, SRP) et leur présence signe leur appartenance à un groupe particulier.

Les Ac anti-synthétases sont les plus fréquemment retrouvés (plus de 20% des cas) (Targoff, 2002). Ils sont associés au syndrome des anti-synthétases (Marguerie et al., 1990). Parmi eux, l'Ac anti-Jo-1 est présent dans 80% des cas (Dalakas and Hohlfeld, 2003). Comme nous l'avons déjà dit, sa présence est associée à une atteinte pulmonaire dans 4 cas sur 5

(Marie et al., 2002; R Stanciu, 2008; Richards et al., 2009), atteinte qui conditionne le pronostic de la maladie. La maladie pulmonaire associée serait d'autant plus sévère que coexistent des Ac anti-Jo-1 et des Ac anti-SSa (Vancsa et al., 2009). Les autres Ac anti-synthétases sont moins représentés (tableau 2), mais de nouvelles cibles antigéniques sont régulièrement documentées; comme la phénylalanine t-RNA Zo (Betteridge et al., 2007). Le phénotype de la maladie a été particulièrement bien décrit chez les patients ayant des Ac anti-Jo-1. Une seule étude récente, incluant 31 patients, s'est intéressée aux patients ayant des Ac anti-PL-12 et a rapporté une atteinte respiratoire dans 59% des cas (Richards et al., 2009).

La découverte des anticorps anti SRP (Reeves et al., 1986) et plus récemment des Ac anti HMG-CoA (Christopher-Stine et al., 2010; Mammen et al. 2011) ont profondément modifié le classement nosologique en créant l'entité MN. Si ce groupe est caractérisé par une formule histologique particulière, la présence de ces Ac a renforcé l'identification de ce groupe particulier au cours de MII. En effet, avant l'identification de l'Ac anti SRP dans les années 1980 et sa détection en pratique courante dans les années 2000, l'entité MN n'était pas reconnue (C. Bloch Queyrat 2008; Miller et al., 2002). La présence des Ac anti SRP n'est retrouvée qu'au cours des MN. Pour autant le profil histologique des MN n'est pas toujours associé à la présence d'Ac anti SRP. Des travaux récents (Christopher-Stine et al., 2010) ont permis d'identifier une nouvelle cible antigénique aux cours des MN : l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA). Les MN associées à ces Ac surviennent le plus souvent (63%) chez des patients ayant pris des statines (Christopher-Stine et al., 2010). La cible thérapeutique des statines est justement l'HMG-CoA dont l'expression musculaire augmente en cours de traitement, faisant sans doute ainsi le lit de cette myopathie. A ce jour, la détection de cet Ac n'est pas encore réalisable en pratique courante.

À noter que d'autres ASM sont rapportés. Certains ont été associés à une atteinte respiratoire, en particulier au cours de la DM (Sato et al., 2005; Shimojima et al., 2003) (Betteridge et al., 2007). D'autres ASM peuvent orienter vers d'autres associations. C'est le cas des Ac anti-PM-Scl retrouvés en association avec la sclérodémie systémique.

La découverte récente des Ac anti-p155/140 dont la cible est TIF1 γ est comme nous l'avons vu fréquemment associés à la DM et sa présence est très fortement associée à celle d'un cancer (Targoff et al., 2006), cette découverte est certainement un élément qui modifiera

la prise en charge clinique. À noter que la présence d'Ac de type Mi-2 ne « reclasse » pas la DM en MC car ces Ac sont très spécifiques de la DM, et ils ne confèrent pas une évolution particulière à celle-ci. Récemment, un nouvel anticorps ayant pour cible la protéine SAE a été retrouvé spécifiquement chez 8,4% des DM (Betteridge et al., 2007).

Les autres auto-Ac associés aux myosites peuvent être associés à d'autres pathologies auto-immunes.

La spécificité et la fréquence des AAM, en fonction du type de myosite, sont décrites dans le tableau 2 (Rigolet, 2009; Ronnelid et al., 2009). Comme nous l'avons déjà vu, Troyanov et al. ont distingué les myosites associées à des Ac pour créer une nouvelle entité « Myosite de Chevauchement » (MC) (Troyanov et al., 2005). Le cas des anticorps anti-SRP doit être isolé.

Tableau 2 : Auto-anticorps au cours des myosites idiopathiques (Hirakata, 2005) (Ronnelid et al., 2009)

Auto-anticorps et myopathies inflammatoires	Antigène	Pourcentage selon le type de myopathies			Associations
		PM	DM	IBM	
Ac spécifiques des Myosites		38	41	18	Syndrome Anti S
<i>Anti-aminoacyl-ARNt Synthétase</i>	ARNt synthétase	33	33	0	Syndrome Anti S
<i>Anti-Jo-1</i>	Hisidine	18-55	12-16	0-5	Syndrome Anti S
<i>Anti-PL-7</i>	Thréonine	2	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-PL-12</i>	Alanine	1	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-EJ</i>	Glycine	1-3	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-OJ</i>	Isoleucine	1	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-KS</i>	Asparagine	<1	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-Zo</i>	Phénylalanine	-	-	-	Syndrome Anti S
<i>Anti-Yrs</i>	Tyrosine	-	-	-	
Autres					
<i>Anti-SRP</i>	Complexe SRP	0-11	0-3	0-3	
<i>Anti-MI-2</i>	Hélicase nucléaire NuRD complexe	0-9	10-33	0-8	
<i>Anti-p155/140</i>	p140	0	53	-	Cancer
<i>Anti-MJ</i>	NXP-2				Cancer
<i>Anti-SAE</i>	inconnue	-	10	-	Atteinte pulmonaire
Ac Associés aux Myosites		62	54	32	
<i>Anti-Polymyosite-Sci-100</i>	Ribosomes	7	6	0	SS
<i>Anti-Polymyosite-Sci-70</i>	Ribosomes	3	3	0	SS
<i>Anti-RO-52</i>	complexe Ubiquitine	12-30	11-24	11-50	LES, SS, GJS
<i>Anti-RO-60</i>	RNA cytoplasmique	3-37	4-15	0-8	LES, SS, GJS
<i>Anti-LA</i>	RNA cytoplasmique	5-20	3-6	0	LES, SS, GJS
<i>Anti-Sm</i>		0	1	0	LES, SS, GJS
<i>Anti-U1-SRNP</i>	protéines d'épissage	4-11	3-13	0-1	LES, SS, GJS
<i>Anti-KU</i>	protéines de réparation de l'ADN	0	0-2	0	LES, SS, GJS
<i>Anti-KL6</i>	Glycoprotéine mucine like (épithélium respiratoire)		-	-	Atteinte pulmonaire

Syndrome Anti S : Syndrome des Anti-Synthétases, SS : Sclérodémie Systémique, LES: Lupus Erythémateux Systémique, GJS: Syndrome de Gougerot Sjögren.

D. La biopsie musculaire l'examen indispensable au diagnostic nosologique

La biopsie musculaire est l'examen indispensable au diagnostic (Dalakas, 1991; Hilton-Jones, 2001; Mastaglia and Phillips, 2002), même si elle peut être source d'erreurs diagnostiques comme nous l'avons déjà dit (Chahin et al, 2008 ; Benveniste et al, 2011).

Les myopathies inflammatoires ont en commun la présence d'infiltrats inflammatoires, de zones de nécrose des fibres musculaires, de zones d'atrophie musculaire et de phénomènes de régénération.

1. L'inflammation musculaire

La présence d'une inflammation musculaire est le premier élément clef du diagnostic. Elle permet en effet d'affirmer la présence d'une myopathie et oriente vers le diagnostic de myosite. Il est important de préciser que la présence de cellules inflammatoires est aussi couramment observée au cours de dystrophies musculaires comme la dystrophie facio-scapulo-humérale, ou au cours des dysferlinopathies (Dalakas, 2002 ; Benveniste et Leger, 2011).

L'infiltrat est généralement distribué de façon éparse au sein des différents groupes musculaires. Au cours des PM, MC et MI, l'infiltrat prédomine dans l'endomysium autour de fibres d'aspect encore normal, ou autour de fibres en phase de nécrose (Dalakas, 1991). L'infiltrat est multifocal et diffus. Une caractéristique majeure de l'infiltrat est l'invasion de fibres musculaires non nécrotiques, dont certaines sont « tunellisées » par les cellules inflammatoires.

Au cours des DM, lorsqu'il est présent, l'infiltrat est à prédominance péri-vasculaire, inter-fasciculaire ou péri-fasciculaire (Mastaglia et al, 2002).

Il faut souligner que la présence d'Ac anti-synthétase est associée à des caractéristiques inflammatoires particulières (Mosier et al., 1988). On observe dans ce cas, une fragmentation du tissu conjonctif périmésial qui est le siège d'une inflammation, avec des fibres musculaires de voisinage pathologiques.

Au cours des myosites, l'infiltrat inflammatoire musculaire est composé principalement de cellules mononucléées. Au cours de la PM, de la MC et de la MI l'infiltrat est principalement constitué de lymphocytes T CD8⁺ et de macrophages. Il n'y a pas de

lymphocyte B dans l'infiltrat musculaire de ces entités, contrairement à la DM où la présence de lymphocytes B et de lymphocytes T CD4⁺ est typiquement observée (Dalakas, 2002).

Dans les DM, on observe des cellules présentatrices d'antigène de type cellules dendritiques plasmacytoides CD4⁺ au sein de l'infiltrat alors que les macrophages sont observés plus habituellement au cours de la PM et de la MI (Mastaglia, 2008). Il faut souligner qu'il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de l'infiltrat et la sévérité clinique de la myosite. Par ailleurs, les infiltrats peuvent être focaux, c'est-à-dire de répartition très inégale au sein même du muscle biopsié.

À la présence de cellules inflammatoires s'associent des anomalies des fibres musculaires. Bien que les MN appartiennent au groupe des myosites, « *stricito sensus* » ce ne sont pas des myopathies inflammatoires car il n'existe pas ou peu d'inflammation musculaire (Miller et al. 2008, Bloch et al. 2009) mais essentiellement de la nécrose myocytaire.

2. Les atteintes de la fibre musculaire

Au cours des myopathies inflammatoires, on peut observer des anomalies morphologiques des fibres musculaire à type de nécrose ou d'atrophie. La topographie et l'étendue de ces anomalies sont des éléments d'orientation pour le diagnostic nosologique.

Au cours de la PM, de la MC et de la MI, la nécrose musculaire est d'importance variable mais habituellement moins intense qu'au cours de la DM ou des MN où elle est l'élément diagnostique. Elle est répartie de façon éparse et s'associe à la présence de cellules inflammatoires. La nécrose n'a pas de répartition particulière au cours de la PM, de la MC et de la MI et n'est pas au premier plan. A l'inverse, la nécrose est la lésion histologique principale par définition au cours des MN. La topographie de l'atrophie des fibres musculaires voire de la nécrose peut-être aussi un élément déterminant au diagnostic au cours des DM.

L'atrophie observée se caractérise par une systématisation péri-fasciculaire. Cette répartition particulière est si évocatrice de DM qu'elle permet de poser le diagnostic, même en l'absence d'infiltrat (Dalakas, 1991, 2002). La nécrose peut aussi se présenter sous forme de micro-infarctus périfasciculaires au cours de la DM. A noter que cette atrophie prédomine souvent sur les fibres musculaires de type II (Gherardi, 2011).

3. La vascularisation et les dépôts endothéliaux de compléments

Comme nous venons de le voir au cours de la DM, la répartition des zones d'atrophie ou de nécrose prédomine dans la région périfasciculaire, zone de "pénombre" vasculaire. Cette topographie a donc suggéré l'existence d'une anomalie de la perfusion musculaire. Cette hypothèse est renforcée par l'observation des lésions cellulaires endothéliales détectables en microscopie électronique (Gherardi, 2011). De plus il existe un dépôt de complément sur les capillaires endomysiaux ce qui suggère une attaque par le système immunitaire de cette structure.

Ces dépôts constitués par la fraction C5b9 du complément peuvent aussi être observés au cours de la myosite lupique. Ces dépôts de complément témoignent d'une activation de la fraction C3 du complément provoquant la formation de C3b, C4b et du complexe d'attaque membranaire constitué par le C5-b9 (Chen et al., 2010). A noter que cependant des dépôts de complexes d'attaque membranaire peuvent aussi parfois être observés à la surface des fibres musculaires en particulier au cours des MN associées aux Ac anti-SRP (Dimitri et al., 2007).

4. L'expression du CMH-I par les fibres musculaires

À la différence de la grande majorité des cellules, les fibres musculaires n'expriment pas de niveau détectable de Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1 (CMH-I) (Singer et al, 1990). Le CMH-I n'est pas détectable à la surface des cellules musculaires chez un individu sain (Emslie-Smith et al., 1989; Hohlfeld et al, 1991b), et seules les fibres musculaires de régénération expriment transitoirement le CMH-I. En revanche, chez les patients souffrant de PM, MC ou MI, on observe une expression diffuse du CMH-I à la surface et au sein des fibres musculaires (van der Pas et al., 2004).

Au cours de ces maladies, les fibres musculaires non nécrotiques exprimant le CMH-I sont envahies par des T CD8⁺, élément majeur pour le diagnostic de ces myosites (Hoogendijk et al., 2004; Troyanov et al., 2005), qui permet aussi d'éliminer d'autres diagnostics comme les myosites toxiques, certaines dystrophies musculaires, les mitochondriopathies ou les myopathies métaboliques (Dalakas et al, 2003). L'expression du CMH-I peut aussi s'observer au cours de la DM, mais elle l'est alors de façon moins diffuse avec une topographie périfasciculaire et sans contact avec des T CD8⁺ (Mastaglia and Phillips, 2002). Au cours de MN le CMH-I n'est habituellement pas exprimé de façon diffuse mais peut être détecté focalement dans certains cas.

5. La présence d'inclusions aux cœurs de la myosite à inclusions

Une anomalie de la fibre musculaire caractéristique des MI est la présence de vacuoles bordées, de 3 à 30 µm de diamètre. Ces vacuoles, optiquement vides, contiennent des inclusions amyloïdes détectables après une coloration au rouge Congo. Elles sont aussi bien visualisées après coloration au rouge Texas ou au cristal violet (Mendell et al., 1991 ; Griggs et al., 1995).

L'examen en microscopie électronique révèle des inclusions tubulo-filamenteuses et des filaments cytoplasmiques de type amyloïde. Ces dépôts sont constitués de diverses protéines mais principalement de protéines β amyloïdes et τ phosphorylées (Arahata et al, 1986).

Au sein du groupe des myopathies inflammatoires, la présence d'inclusions est spécifique des MI, mais elle peut aussi se voir au cours d'autres myopathies comme les dysferlinopathies, les myopathies myofibrillaires, la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale, la dystrophie musculaire d'Eimery–Dreifus ou au cours de maladies neurologiques chroniques comme la poliomyélite (Dalakas, 2006).

6. Les limites de la biopsie

La biopsie musculaire peut être normale, ce qui n'élimine pas le diagnostic de myosite. En effet, certains muscles peuvent être atteints et d'autres indemnes.

Dans ces conditions, il ne faut pas hésiter à répéter la biopsie, en la guidant éventuellement à l'aide de l'EMG ou de l'IRM.

La distinction nosologique entre PM, MC et MI peut s'avérer très délicate, voire impossible. En effet, les critères diagnostiques de la MI ne sont pas toujours réunis lors de l'examen histologique et, dans cette situation, le diagnostic ne peut pas être affirmé. On parle alors de MI « probable » ou « possible » selon les cas. Une étude récente a montré que les résultats de la biopsie musculaire conduisaient à porter un diagnostic erroné de PM ou MC (au lieu du diagnostic de MI), et vice-versa, dans 15% des cas (Chahin et al, 2008).

III. La physiopathologie des myopathies inflammatoires

Nombreux sont les arguments en faveur de l'implication de mécanismes auto-immuns dans le développement des myopathies inflammatoires dites idiopathiques. Il peut s'agir, soit de mécanismes impliquant préférentiellement l'immunité cellulaire comme pour la PM, la MC et la MI, soit de mécanismes impliquant préférentiellement les lymphocytes B et le complément comme pour la DM ou les MN médiées par le système immunitaire. Dans tous

les cas, avant l'activation du système immunitaire adaptatif, la première ligne de défense immunitaire constituée par l'immunité innée est impliquée.

A. L'implication de l'immunité innée et des cellules présentatrices d'antigènes

Quelle que soit la nature de la myopathie, celle-ci provoque comme nous l'avons vu nécrose et régénération ce qui implique une stimulation de l'immunité innée pour la réparation des lésions. De plus l'immunité innée met en jeu des cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages ou les cellules dendritiques capables d'activer le système immunitaire adaptatif.

1. Le rôle des macrophages

Comme nous l'avons vu les macrophages sont abondamment présents dans les lésions des myosites (Page et al., 2004 ; Greenberg et al., 2005b). Ils jouent un rôle déterminant pour la réparation musculaire après toute agression musculaire qu'elle soit d'origine dysimmunitaire (au cours des MI) (Arnold et al., 2007), ou non (Gherardi, 2011).

L'origine de ces macrophages musculaires est double comme l'ont montré les travaux récents de l'équipe de Gherardi et al. (Gherardi, 2011). Les macrophages résidents $CD11c^{faible}$ épimisiaux se concentrent au site musculaire lésé et relarguent dans le compartiment systémique des chimiokines comme CCL-2 (MCP-1) permettant l'adressage musculaire de monocytes-macrophages circulants $CCR2^+$. Une fois sur place, il existe une activation de ces monocytes avec une différenciation en cellule présentatrice d'antigène (CPA) $CD11c^{moyen}$.

Ces nouvelles CPA sont capables de migrer dans le ganglion drainant pour présenter les antigènes musculaires en tant que CPA matures. De plus, l'attraction musculaire des macrophages peut être renforcée par les cellules satellites musculaires (Chazaud et al., 2003).

Ainsi les macrophages auraient un rôle déterminant dans la régénération musculaire mais aussi comme cellules présentatrices d'antigènes aux cours des MI.

2. Le rôle des cellules dendritiques

Les autres CPA du système immunitaire inné sont les cellules dendritiques (DC). Celles-ci sont retrouvées à l'état mature ou immature dans l'infiltrat musculaire des PM/MC et DM (Page et al., 2004). En particulier, un sous type de DC le type plasmacytoïde ($CD4^+$) est retrouvé de façon importante aux cours des MI. Au cours de la DM, elles sont particulièrement abondantes (Greenberg et al., 2005b). Elles sont aussi présentes au cours de

la PM/MC bien qu'en proportion moindre comparativement au DC myéloïdes (Greenberg et al., 2007). Au delà leur propriété de présentation antigénique les DC plasmacytoïdes sont la principale source de production d'IFN de type I de l'organisme. De fait, elles jouent un rôle déterminant sur le profil de la réponse.

Enfin, le rôle central de l'immunité innée dans l'inflammation musculaire est aussi suggéré par la persistance d'une myosite induite par des immunisations chez des souris dépourvues de système immunitaire adaptatif (Soejima et al., 2011).

B. L'implication de l'immunité cellulaire : la fibre musculaire comme CPA ?

1. Le rôle du CMH-I

Le premier élément de l'activation du système immunitaire adaptatif est la présentation de l'antigène aux lymphocytes. À l'instar des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), la fibre musculaire a la capacité, sous certaines conditions, de présenter des antigènes aux lymphocytes, tout en délivrant des signaux de co-stimulation nécessaires à leur activation.

L'expression du CMH-I (molécule « ubiquitaire » présentatrice d'antigènes) peut être induite à la surface des myoblastes par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires : IFN- γ , TNF α , IL-1 α IL-1 β , MIP1- α (Nagaraju et al., 1998; Marino et al., 2001; Pavlath 2002). À noter que, dans une moindre mesure, le CMH-II (molécule présentatrice d'antigènes présente exclusivement sur les CPA) peut aussi être exprimé à la surface des fibres musculaires au cours de myopathies telles que PM, MI, et MC (Englund et al., 2001).

Il faut d'ailleurs souligner que la présentation peptidique par le CMH-I nécessite l'activation de l'immuno-protéasome qui est régulé par l'IFN- γ (Kloetzel et Ossendorp, 2004). Ainsi, en conditions inflammatoires, la fibre musculaire est capable de présenter des antigènes restreints par le CMH-I ou par le CMH-II à des T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement. Cela a été observé *in vitro* et *in vivo* au cours des myopathies inflammatoires (Hohlfeld et al, 1991a; Inukai et al., 2000).

Il faut ici souligner la potentielle toxicité musculaire de l'expression du CMH-I. La surexpression musculaire du CMH-I chez la souris transgénique sous la dépendance d'un promoteur musculaire spécifique induit une myopathie. (Nagaraju et al., 2000). On observe d'ailleurs que plus la surexpression transgénique du CMHI est précoce (dans les premières semaines de vie) et plus la maladie est sévère (Li et al., 2009).

2. Les molécules de co-stimulation et d'adhésion

La présentation d'antigènes ne peut stimuler le système immunitaire qu'en présence d'un second signal et de molécules permettant les interactions avec des lymphocytes.

Des molécules d'adhésion, permettant l'interaction entre les lymphocytes et les fibres musculaires, telles qu'ICAM-1 (Marino et al., 2003) peuvent être exprimées par les myoblastes, *in vitro*, en conditions inflammatoires. Au cours des myopathies inflammatoires, l'expression d'ICAM-1 à la surface des fibres musculaires permet l'interaction avec LFA-1 qui est exprimé à la surface des T CD8+ (Figarella-Branger et al., 2003).

Les molécules classiques de co-stimulation (B7-1:CD80 et B7-2:CD-86) ne sont pas exprimées à la surface des fibres (Bernasconi et al., 1998). En revanche, la molécule de co-stimulation ICOS-ligand, normalement absente de la surface des fibres musculaires, est exprimée fortement *in vivo* (et *in vitro* en condition inflammatoire) au cours des PM (Schmidt et al., 2004). Une autre molécule de co-stimulation, PD-L1, est observée *in vivo* au cours des PM et ce, de façon corrélée à la présence des cellules inflammatoires (Wiendl et al., 2003).

A l'inverse d'ICOS ligand, PD-L1 exerce une forte activité anti-inflammatoire pour tenter de contrôler l'inflammation locorégionale. *In vitro*, la molécule de co-stimulation CD40 peut aussi s'exprimer en conditions inflammatoires (Sugiura et al., 2000).

Il faut ici rappeler qu'au sein de l'infiltrat musculaire, il existe aussi des CPA « professionnelles », comme les macrophages et les cellules dendritiques. Au cours de la PM, les cellules dendritiques sont plutôt de type myéloïde alors qu'au cours de la DM, il s'agit plutôt de cellules dendritiques de type plasmacytoïde (Greenberg et al., 2005a; Greenberg et al., 2005b; Greenberg et al., 2007).

3. Les TLR à la surface musculaire

L'équipe de Miossec et al. a montré que les fibres musculaires exprimaient à leur surface les TLR3 et 7 et ce uniquement en cas d'inflammation (Tournadre et al., 2010). Les TLR sont des récepteurs impliqués dans l'immunité innée et sont capables de reconnaître des antigènes infectieux. Les TLR sont principalement exprimés par les DC. Dans leur travaux, les auteurs montrent comment ces TLR musculaires participent à l'inflammation musculaire en induisant la production de cytokines en particulier l'IL-6.

C. Les chimiokines au cours myosites

Pour qu'il y ait une présentation antigénique par les CPA ou par les cellules musculaires, il faut qu'il y ait une rencontre avec les acteurs de l'immunité adaptative. Cette rencontre cellulaire est rendue possible par les chimiokines.

Les chimiokines sont de petites protéines impliquées dans le trafic des cellules inflammatoires. Elles attirent les cellules immunitaires dans la région où elles sont libérées. Une forte expression de chimiokines β (dont les récepteurs ne sont présents qu'à la surface des lymphocytes et monocytes) est observée au cours des myopathies inflammatoires au sein du compartiment musculaire (Tournadre et al, 2009).

Les chimiokines : CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES et leurs récepteurs CCR2, CCR1, CCR5 ont été décrites au cours des myopathies inflammatoires et de la PM en particulier (Civatte et al., 2005).

MCP-1 (CCL-2) semble jouer un rôle important étant donné l'importance de son expression au cours de la PM (Liprandi et al., 1999a). Cette chimiokine est principalement produite par les macrophages et les lymphocytes T mémoires qui en sont aussi la cible. Il est important de noter que les fibres musculaires, en produisant de l'IFN γ et du TNF α , induisent l'expression de MCP-1 (CCL-2) (Figarella-Branger et al., 2003). Enfin, il semble intéressant de noter aussi le rôle potentiellement « chimio-attractant » de l'antigène Jo-1 (Levine et al., 2003; Howar et al. 2002).

D. Les molécules d'adhésion : l'entrée de la cellule immunitaire

Les chimiokines permettent l'appel des cellules inflammatoires qui, pour parvenir à pénétrer dans le compartiment musculaire, doivent d'abord adhérer à l'endothélium vasculaire à l'aide de sélectines et d'intégrines. Les E et P sélectines ont été incriminées dans la domiciliation musculaire des myopathies, avec des résultats contradictoires (Figarella-Branger et al., 2003).

En revanche, l'intégrine VLA-4 est exprimée à la surface des leucocytes dans tous les sous-types de myopathies inflammatoires (Tews et al, 1995). Son ligand VCAM-1 est exprimé par les cellules endothéliales dans la PM, la DM et la MI (Liprandi et al., 1999b). De même LFA-1, le ligand d'ICAM, est normalement exprimé à la surface des cellules inflammatoires qui constituent les infiltrats (Tews et al, 1995). La progression des cellules

inflammatoires au sein du compartiment musculaire est facilitée par la sécrétion de métalloprotéases (MMP-2 et 9) au cours des PM et MI (Choi et al, 2000).

E. La mort des fibres musculaires par cytotoxicité au cours des myosites

Les lymphocytes ayant pénétré dans le compartiment musculaire pour rencontrer leur cible antigénique sont de phénotype activé mémoire. En effet, au cours de la PM et de la MI, les T CD4⁺ et T CD8⁺ sont de profil mémoire (CD45RO⁺) et les T CD8⁺ présentent des marqueurs d'activation (HLA-DR) (Engel et al 1984). Ces lymphocytes T CD8⁺ entretiennent des rapports très étroits avec les fibres musculaires non nécrotiques. Ils traversent la membrane basale et envahissent le sarcolemme (Engel et al, 1986).

De plus, ces T CD8⁺ cultivés *ex vivo* exercent des phénomènes de cytotoxicité directe sur des myotubes en culture (Hohlfeld et al, 1991a). Ces constatations *ex vivo* sont corroborées par l'observation *in vivo* d'une exocytose granulaire des lymphocytes T CD8⁺ situés au contact des fibres musculaires, qui libèrent différentes protéines lytiques (perforines) au cours de la PM (Goebels et al., 1996).

Ces éléments suggèrent très fortement la présence de clones T CD8⁺ auto-invasifs qui reconnaissent des antigènes musculaires présentés par le CMH-I à la surface de la fibre musculaire. Ce concept est renforcé par l'existence d'anomalies du répertoire lymphocytaire T CD8⁺ au sein des biopsies musculaires de patients atteints de PM et de MI (Benveniste et al., 2004a; Benveniste et al., 2004b; Nishio et al., 2001; Bender et al. 1995). Ces mêmes anomalies sont retrouvées au niveau du compartiment vasculaire systémique.

Le rôle de l'apoptose dans la mort des fibres musculaires reste débattu et serait probablement marginal. Cependant, Alger et al. ont récemment montré l'importance de TRAIL (Tumor necrosis factor α related apoptosis-inducing ligand) dans l'activation de NF κ -B et de l'autophagie des fibres musculaires (Alger et al. 2011) au cours PM/MC.

Ces phénomènes de cytotoxicité au cours de la PM/MC sont au cœur de la réponse auto-immune. En effet, dans un modèle animal il a été montré que l'absence de CMH-I dans un modèle murin de myosite chez de souris Beta(2)-microglobuline^{-/-}s'accompagne

d'une diminution très significative de la myosite, cependant il faut souligner que cette lignée est déficiente en T CD8⁺ (Sugihara et al., 2010).

F. Les Cytokines au cours des myosites orientent la réponse inflammatoire

Le profil d'expression cytokinique au cours d'une pathologie inflammatoire est le reflet de l'orchestration de la réponse immunitaire.

Aux deux grands profils classiquement décrits, Th1 (réponse cellulaire) et Th2 (réponse humorale) s'est ajouté, ces dernières années, un profil Th17 (réponse cellulaire impliquée dans la lutte contre les bactéries) et Thf pour T helper folliculaire (Réponse humorale) (cf ci après).

En accord avec l'inflammation musculaire, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) sont détectées au sein des muscles des patients ayant une myosite (Lepidi et al., 1998), et en particulier dans la PM. Il faut souligner que la fibre musculaire elle-même, en situation inflammatoire ou sous l'action du CD40 ligand, est capable de produire des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-1 (Nagaraju et al., 1998).

L'analyse du profil d'expression des cytokines Th1 (IL-2, IFN γ) ou Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) au sein du compartiment musculaire donne des résultats contradictoires selon les études (Figarella-Branger et al., 2003). Ces contradictions rendent compte de la difficulté technique à mettre en évidence ces molécules. Cependant, certaines études convergent et montrent l'implication de cytokines Th1 (IL-2, IFN γ) dans la PM (Adams et al., 1997; Cid et al., 1996; Tews and Goebel, 1996). Ces résultats, ainsi que l'implication des T CD8⁺ et la surexpression du CMH-I par les fibres musculaires, observées au cours de la PM, suggèrent fortement une orientation Th1 de la réponse immunitaire au cours de cette maladie. Des résultats comparables sont observés au cours de la MI (Tournadre et al, 2009).

A l'inverse, au cours de la DM, on observe une réponse prédominante de type Th2 comme le prouvent : la présence des cellules dendritiques plasmacytoïdes (caractérisées par leur capacité à sécréter de grandes quantités d'IFN de type 1), la présence d'IFN α au sein du compartiment musculaire et dans le sang (Walsh et al., 2007), et le profil d'expression génique (effectué sur biopsies musculaires et sur lymphocytes sanguin), avec une « signature » IFN α (Greenberg et al., 2005b) comparable à celle observée au cours de maladies auto-immunes Th2 comme le Lupus Erythémateux Systémique (LES) (Blanco et al., 2001).

La MC aurait un phénotype de réponse intermédiaire. Elle montre des caractéristiques histologiques commune avec la PM ainsi qu'un profil cytokinique plutôt Th1. Pour autant, il existe aussi des caractéristiques suggérant une signature IFN de type 1. En effet, il existe aussi des DC plasmacytoïdes dans le compartiment musculaire mais aussi une signature transcriptomique IFN de type 1 dans le sang circulant au cours des MC (Walsh et al., 2007; Eloranta et al., 2007).

Les données concernant la voie Th17 sont encore préliminaires, mais il faut noter que la présence de lymphocytes T CD4+IL-17⁺ a été rapportée au cours des DM et PM (Chevrel et al., 2003).

G. Le rôle de l'immunité humorale et des auto-anticorps

La présence d'auto-Ac au cours des myosites peut suggérer une participation de l'immunité humorale dans la physiopathologie des myosites en particulier pour les MC, DM et MN.

Nous avons vu que la DM principalement, et la MC dans une moindre mesure, étaient caractérisées par une signature IFN du type 1. L'IFN du type 1 est un activateur de la réponse humorale en particulier en induisant la production du facteur de survie lymphocytaire B BAFF (B cell activating factor). De fait, des niveaux élevés de BAFF ont été retrouvés au cours du syndrome des anti-synthétases ou de la DM (Krystufkova et al., 2009). Notamment les taux sérique de BAFF étaient corrélés aux taux de CPK.

1. Les arguments cliniques

Pour autant, si l'implication de la réponse Th2 au cours de certaines myosite semble bien définie, son rôle pathogène dans la progression du déficit musculaire doit encore être précisé. Néanmoins quelques observations cliniques suggèrent indirectement un rôle pathogène de la réponse humorale.

Premièrement, nous avons vu plus haut que ces ASM étaient associés à un phénotype clinique particulier, si spécifique que c'est sur l'identification des ASM que repose certaines classifications des myosites. En particulier les Ac anti-synthétase ou SRP ne sont pas présent chez les sujets sains ou au cours d'autres maladies auto-immunes. D'autre part, la réponse Ac anti Jo-1 est étroitement liée à l'activité de la maladie (Targoff et al, 2008 ; Stone et al., 2007). Une étude rétrospective récente menée auprès de 90 patients Ac anti-Jo-1⁺, montre

que le taux d'Ac est fortement corrélé à la CRP, ainsi qu'aux cytokines induites par l'IFN- γ (CXCL-9 et CXCL-10) (Richards et al., 2009).

Au cours des MN associées aux Ac anti-SRP, le taux de sérique des Ac anti-SRP est corrélé à l'activité de la maladie et en particulier des CPK (Benveniste et al., 2011). De plus les traitements déplaçant les Ac circulant comme les échanges plasmatique ou le rituximab améliorent sensiblement les patients (Arlet et al., 2006).

Il faut souligner que la raison pour laquelle apparaissent ces ASM n'est pas clairement élucidée, même si le rôle étiologique d'une infection virale (Walker and Jeffrey, 1988) ou l'implication de l'épitope « spreading » ont été évoqués (Hengstman et al., 2001) en particulier pour le Jo-1.

2. Les arguments expérimentaux

Pourquoi des antigènes à expression ubiquitaire seraient impliqués au cours de maladies impliquant principalement le tissu musculaire ? Et comment des antigènes cytoplasmiques peuvent-ils être impliqués dans la physiopathologie impliquant des Ac circulants ?

Ces questions restent sans réponse, mais il est intéressant de noter que certains de ces antigènes (Jo-1 et Mi-2) sont particulièrement fortement exprimés dans les lésions musculaires de ces myosites (Casciola-Rosen et al., 2005; Levine et al., 2007, Howard et al 2003). Il est aussi intéressant d'observer que certains de ces antigènes sont intensément présents, ou exprimés dans une conformation protéique particulière dans les organes extra musculaires habituellement atteints au cours des MC ou DM. En particulier l'antigène Jo-1 est exprimé dans une conformation particulière dans le poumon ce qui le rendrait particulièrement sensible aux Ac anti-Jo-1 (Levine et al., 2007; Katsumata et al., 2007). De plus des travaux chez la souris ont montré que MI-2 était fondamental pour la régénération de l'épiderme (Chandiramani et al., 2006; Burd et al., 2008). Ces observations ne sont que des éléments indirects de l'implication des ASM dans la physiopathologie des myosites.

Le rôle pathogène de ces Ac est mieux abordé au cours de modèle expérimentaux. En particulier l'immunisation de souris par l'antigène Jo-1 provoque une myosite même en l'absence d'adjuvant (Soejima et al., 2011) ce qui montre clairement que cette cible

antigénique ubiquitaire est déterminante pour la survenue de la myopathie. De plus, ces immunisations peuvent provoquer une atteinte pulmonaire chez l'animal (Katsumata et al., 2007). Chez l'homme, il existe une réponse antigène spécifique lymphocytaire T (lymphoprolifération *in vitro* à partir de lymphocytes de patients) en présence de l'antigène Jo-1 (Ascherman et al., 2002), soulignant encore son implication.

Cependant ces expériences ne montrent pas le rôle direct pathogène de ces Ac en particulier il n'a pas été montré à notre connaissance que le transfert d'Ac anti-Jo1 à des souris receveuse provoquait l'apparition d'une myopathie.

3. La DM et le complexe d'attaque membranaire

Comme nous l'avons vu, l'implication de la réponse humorale semble importante dans la DM, au cours de laquelle la myopathie résulterait d'une vasculopathie musculaire médiée par le complément. (Basta et al., 1994; Emslie-Smith et al., 1990; Kissel et al., 1991; Kissel et al., 1986; Dalakas et al., 2003; Mascaro et al., 1995).

Cependant, Greenberg, en 2004 (Greenberg et al., 2004) remet en cause ce concept.

Dans son travail il rappelle que si la présence de dépôt de complément est indiscutable et qu'il existe des lésions endothéliales, l'implication des Ac est moins claire.

En effet il n'a jamais pu être prouvé de façon formelle qu'il existait une fixation endothéliale des Ac, ni qu'il existait une activation du complément par les Ac. Pour autant, on observe d'authentiques nécroses musculaires.

L'équipe de Gherardi a pu observer que les lésions vasculaires étaient groupées, systématisées, selon un territoire artériolaire. En effet, d'une artériole musculaire terminale naissent un nombre limité de capillaires musculaires (6 à 8). Cette structure anatomique définit une unité microvasculaire musculaire. Ainsi les lésions musculaires seraient systématisées à ces unités suggérant une pathologie d'amont, artériolaire (Gherardi, 2011). Les auteurs évoquent que les anomalies capillaires observées pourraient être alors secondaires à des mécanismes d'ischémie/reperfusion secondaire à un obstacle vasculaire plus haut situé.

H. Relation entre inflammation et dégénérescence

1. La myosite à inclusion une maladie dégénérative

Comme nous l'avons vu, la MI est caractérisée par la présence de vacuoles bordées dont la composition suggère des mécanismes dégénératifs. Les vacuoles bordées de 3 à 30 microns de diamètre se situent au sein du cytoplasme des fibres musculaires normales ou atrophiées. L'examen en microscopie électronique des fibres musculaires montrent la présence d'inclusions tubulo-filamentaires, rectilignes ou curvilignes, de 15 à 18 nm de diamètre, dans le cytoplasme, ou plus rarement dans les vacuoles ou dans les noyaux. Ces anomalies permettent d'affirmer le diagnostic.

La composition de ces inclusions (communes aux MI et aux myopathies à inclusions héréditaires) est remarquablement analogue à celle des dépôts retrouvés dans le système nerveux central au cours de la maladie d'Alzheimer. Elles sont, en effet, constituées de protéines caractéristiques de cette maladie: β -amyloïde (Askanas et al, 2006), précurseurs β -amyloïde comme la protéine β -amyloïde-42 (Askanas et al, 2006), tau phosphorylée (Iqbal et al., 2009), préséniline-1 (élément du complexe γ secrétase intervenant dans la production des protéines β -amyloïde) (Shimura et al., 2001), α -synucléine, parkine (Askanas et al., 2002; Paciello et al., 2006). Les inclusions tubulo-filamentaires peuvent être mises en évidence en immunohistochimie avec l'anticorps SMI31, qui reconnaît la tau-hyperphosphorylée, constituant principal de ces inclusions (Askanas et al., 2006).

Ces accumulations protéiques sont associées à de profondes modifications du métabolisme de la fibre musculaire avec en particulier une inhibition du protéasome 26S (Lehman et al., 2009), la présence d'un stress du réticulum endoplasmique (Vattemi et al., 2004), un stress oxydatif (Askanas et al., 2005) et des altérations des capacités d'autophagie (Hamano et al., 2008; Nogalska et al., 2009).

L'ensemble de ces anomalies conduit à la formation d'agrégats (« inclusions ») intracytoplasmiques qui sont toxiques pour la fibre (Askanas et al., 2011). Ces accumulations protéiques ont un rôle toxique pour la fibre musculaire. En particulier, les précurseurs de A β -42 sont toxiques pour les fibres musculaires en culture (Nogalska et al., 2010a; Terracciano et al., 2010).

La raison de la survenue de ces anomalies reste imprécise, mais le vieillissement joue probablement un rôle favorisant (Ciechanover, 2006). De plus, les protéines dégénératives comme A β -42 et tau ont un effet en elles-mêmes délétère sur le fonctionnement du protéasome ou de l'autophagie (Nogalska et al., 2010b).

L'ensemble de ces données et la résistance de la MI aux traitements immunosuppresseurs ont conduit certains auteurs à considérer la MI plus comme une maladie dégénérative que comme une maladie auto-immune (Askanas et al., 2011).

2. Dégénérescence et inflammation

Quoiqu'il en soit aux cours de la MI coexistent des mécanismes dysimmunitaires et dégénératifs, même si à ce jour, la question sur le « primum movens physiopathologique » n'est pas résolue. Cependant, il faut souligner l'étroite relation de ces 2 mécanismes.

En effet, les fibres musculaires en culture sont capables de produire de l'IL-6, et ce d'autant plus qu'elles sont mises en présence de protéines amyloïdes (Baron et al., 2001). Au cours de la MI, on observe une co-localisation *in vivo* de l'IL-1 β (cytokine pro-inflammatoire) et de protéines précurseurs amyloïdes (Schmidt et al., 2008).

La culture de myoblastes en présence d'IL-1 β s'accompagne de la formation d'agrégats amyloïdes au sein de la fibre musculaire (Schmidt et al., 2008).

I. Le facteur déclenchant

Le facteur déclenchant des myopathies auto-immunes n'est pas identifié. Des infections rétrovirales ont été rapportées, en association à la PM et à la MI (Dalakas et al., 2003). Sur la base d'une homologie antigénique, a été avancée l'hypothèse que ces infections pourraient être des facteurs déclenchants, mais ces rétrovirus (HIV, HTLV) ne sont retrouvés qu'occasionnellement dans les macrophages musculaires et ils n'infectent pas les fibres musculaires (Illa et al., 1991).

Pour autant ces infections virales pourraient jouer un rôle de facteur déclenchant de la réponse auto-immune qui une fois amorcée évoluerait pour son propre compte. A ce titre il faut souligner que nous venons de rapporter dans une étude rétrospective non encore publiée

que 12% des PM/MC diagnostiquées étaient associées à l'infection par le VIH (Allenbach Y., 2011) soulignant ainsi l'importance du rôle de l'infection virale.

IV. Les traitements des myopathies inflammatoires

L'objectif principal du traitement est d'améliorer la force musculaire du patient tout en évitant au mieux les effets secondaires.

Au-delà des définitions consensuelles des cadres nosologiques, l'évaluation des traitements nécessite des outils de mesure standardisés qui n'ont été développés que ces dernières années (Isenberg et al., 2004; Jackson et al., 2008) et qui ne sont pas encore tous reconnus. De plus, rares sont les études randomisées, en double-aveugle. Il est donc difficile de définir une attitude thérapeutique, d'ailleurs aucune recommandation n'est publiée à ce jour.

A. Les corticoïdes

Le traitement par corticoïdes reste le traitement de première intention, même si son utilisation est empirique. Dans des séries rétrospectives, on observe une amélioration clinique sous corticoïdes dans 60 à 70% des cas (Bohan et al., 1977). La posologie efficace est de 1mg/Kg au cours des PM, MC et DM. Le traitement à pleines doses est maintenu 1 mois, puis suivi d'une décroissance progressive des doses jusqu'à l'arrêt. Cependant, en raison de la persistance d'un taux élevé de mortalité (Carpenter et al., 1977; Joffe et al., 1993), d'effets secondaires (myopathies cortisoniques) fréquents, et du risque de cortico-dépendance ou de cortico-résistance, d'autres traitements immunosuppresseurs ont été testés. Une revue des essais thérapeutiques réalisés dans le cadre de la prise en charge de la PM, a été publiée en 2005 dans la Cochrane data base (Choy EH, 2005) et soulignait le nombre limité d'essais randomisés, en double aveugle, de bonne qualité.

Au cours de la MI, les corticoïdes ne sont pas efficaces (Dalakas, 2006). Une étude récente rétrospective a analysé l'effet de la corticothérapie sur la MI. Dans ces travaux Benveniste et al. montrent non seulement que celle-ci est inefficace, mais pourrait au contraire être délétère. En effet les patients MI sous corticoïdes ont un déficit musculaire plus important que ceux qu'ils n'ont pas reçu de corticoïde. Ces résultats pourraient s'expliquer par la « toxicité » musculaire de la corticothérapie (Benveniste et al., 2011).

B. Les immunosupresseurs

Un des premiers essais réalisés chez des patients atteints de PM (Bunch et al., 1980), comparant Azathioprine (AZA) plus corticothérapie versus corticothérapie seule, a montré une amélioration non significative de la force musculaire, mais après 3 mois seulement de traitement. En association aux corticoïdes, l'AZA n'est pas supérieure au Méthotrexate (MTX) (Miller, 2002). En revanche l'association AZA et MTX tend à améliorer la force musculaire, les résultats étant non significatifs statistiquement (Villalba et al., 1998). Le MTX et la Ciclosporine, utilisés en association à la corticothérapie, sont d'efficacité comparables dans le traitement de la PM (critères de jugement sur score composite) (Vencovsky et al., 2000).

À ce jour, aucun autre essai randomisé en double-aveugle, utilisant ce type d'immunosuppresseur pour le traitement des myosites, n'a été publié. Ainsi, les cliniciens utilisent régulièrement ce type de traitements, en s'appuyant uniquement sur les nombreux essais ouverts publiés et sur les recommandations d'experts (Dalakas, 2003).

En pratique, l'AZA (3 mg/kg) ou le MTX (7,5-25 mg/s) sont utilisés en première ligne, en association à la corticothérapie.

La Ciclosporine est, elle, moins utilisée en raison de son plus faible index thérapeutique.

On peut mentionner l'intérêt du mycophénolate mofétil (2g/j) au cours des PM et MC (Chaudhry et al., 2001; Majithia and Harisdangkul, 2005; Schneider-Gold et al., 2006), en particulier dans les formes réfractaires (Pisoni et al., 2007).

Les autres immunosuppresseurs, comme le cyclophosphamide (Kameda et al., 2005; Yamasaki et al., 2007) ou le tacrolimus (Takada et al., 2005; Wilkes et al., 2005) n'ont été que peu testés (cas rapportés ou études ouvertes). Ils semblent intéressants lorsqu'une atteinte respiratoire est associée. Il faut préférer le cyclophosphamide en cas d'échec des traitements de première ligne, ou d'emblée lorsqu'une atteinte respiratoire est associée. Au cours de la MN SRP⁺ il n'existe que des cas rapportés soulignant l'intérêt du traitement d'épargne cortisonique, sans pour autant dégager une molécule à privilégier.

Au cours de la MI, le MTX et le cyclophosphamide sont inefficaces (Badrising et al., 2002; Joffe et al., 1993; Sayers et al., 1992).

C. Les immuno-modulateurs et nouvelles biothérapies

En ce qui concerne les biothérapies, il n'existe aucun essai randomisé contre placebo, excepté pour les Immunoglobulines intraveineuses. Un seul essai de ce type a été réalisé par Dalakas et al. pour le traitement des DM (Dalakas et al., 1993). En ce qui concerne les PM, il existe peu de données mais les Immunoglobulines semblent efficaces (Dalakas and Hohlfeld, 2003; Saito et al., 2008).

En revanche, au cours de la MI, les données publiées montrent une inefficacité de ce traitement sur la progression de la maladie (Needham and Mastaglia, 2007). Deux essais, dont un contrôlé contre placebo (Dalakas et al., 1997), suggèrent cependant que ce traitement puisse être efficace sur les troubles de la déglutition (Cherin et al., 2002). Les travaux rétrospectifs de Benveniste et al. réalisés récemment sur un cohorte de patients MI traités ou non par IgIV, ont montré que les IgIV n'apportaient pas de bénéfice (Benveniste and Hilton-Jones, 2011). Les anticorps monoclonaux ont été utilisés principalement au cours des PM et des MC réfractaires, et le plus souvent il s'agit de cas rapportés ou de petites séries.

Une quinzaine de cas de patients atteints de PM réfractaires, traitées par anticorps monoclonaux anti-Tumor necrosis factor α (TNF α), a été rapportée. On observe parfois une amélioration clinique (Hengstman et al., 2008; Wendling et al., 2007) avec ce traitement. Cependant, certains patients sous anti-TNF ont développé une myosite (Musial et al., 2003), et d'autres patients ont présenté des complications mortelles (Marie et al., 2005). Enfin, une étude ouverte récente ne montre pas d'amélioration clinique chez 13 patients traités par infliximab pour une myosite réfractaire (Dastmalchi et al., 2008). Ainsi, les anti-TNF α ne semblent pas avoir une place de choix dans l'arsenal thérapeutique des myosites.

En revanche, l'anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) semble intéressant pour le traitement des MC réfractaires, en particulier au cours des MC type « syndrome des anti-synthétases » (Brulhart et al., 2006; Chung et al., 2007; Frikha et al., 2009). Des études sont en cours en France et aux Etats-Unis (<http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT002998189>) afin de mieux définir sa place dans la prise en charge des myosites. Les Anti CD20 semblent aussi intéressants pour la prise en charge des MN SRP⁺ (Arlet et al., 2006).

Au cours de la MI (essais ouverts), la déplétion lymphocytaire T au moyen de sérum anti-lymphocytaire (Lindberg et al., 2003) ou d'anticorps monoclonal anti-CD52

(Alemtuzumab) (Dalakas et al., 2009) s'accompagne d'un arrêt de la progression de la maladie. Cependant, à ce jour, aucun traitement immuno-modulateur n'est encore recommandé dans cette indication. De plus, il faut souligner le risque important d'infections sévères chez des sujets âgés traités de façon prolongée par de puissants immunosuppresseurs.

2^e PARTIE : TOLERANCE et CELLULES REGULATRICES

La survenue de maladies auto-immunes et en particulier de myosite soulève la question suivante : comment le tissu musculaire d'un patient peut-il être reconnu comme étranger par le système immunitaire, pourquoi cette « tolérance » a-t-elle été rompue ?

Au cours de cette partie, ainsi que les suivantes, nous décrirons quels sont les mécanismes de tolérance immunitaire en général et les Treg en particulier. Plus spécifiquement, le rôle des Treg au cours des myosites sera abordé dans les parties résultats et discussion car au moment où nous avons entrepris notre travail, aucune donnée n'était disponible sur ce sujet.

I. Immunité adaptative : la distinction soi et non soi

L'immunologie peut être définie comme étant : « la science de la discrimination entre le soi et le non-soi » (Klein, 1982). Le concept « soi » et de « non soi » a été introduit pour la première fois en biologie par Frank M. Burnet (1899-1985) et F. Fenner (virologue) (Fenner, 1949) à partir d'expériences de transplantation d'organes. Le système immunitaire assure donc la protection d'un organisme contre les agressions extérieures reconnues comme non soi et ce au moyen de 2 grandes fonctions : l'immunité innée et adaptative.

L'immunité innée est un système de défense rapide reconnaissant un nombre restreint de motifs communs à plusieurs pathogènes (PAMPs, pour Pathogen Associated Molecular Patterns), reconnus par des récepteurs nommés PRR (Pattern Recognition Receptors). Ceux-ci sont exprimés à la surface des acteurs de l'immunité innée : les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes), les monocytes/macrophages, cellules dendritiques (DC) et cellules NK (pour Natural Killer).

Cette première ligne de défense est complétée par un système plus élaboré et complexe : le système immunitaire adaptatif. A la différence de l'immunité innée, le système immunitaire adaptatif a une très grande capacité de reconnaître spécifiquement une immense diversité d'antigènes étrangers. Cette reconnaissance spécifique est assurée par des récepteurs TCR ou BCR (pour B et T-Cell Receptor) exprimés à la surface des 2 acteurs principaux de l'immunité adaptatives les lymphocytes T (T, pour Thymus) et B (B, du latin Bursa). Le BCR reconnaît l'antigène sous sa forme native, alors que le TCR ne le reconnaît que sous forme peptidique (appelée épitope) présenté par des molécules de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

II. La tolérance centrale

La tolérance centrale a lieu dans l'organe de production des lymphocytes, dans le thymus pour les T et la moelle osseuse pour les B. Nous nous concentrerons dans cette partie sur les T.

A. La sélection thymique

Comme nous l'avons vu plus haut, le T doit reconnaître spécifiquement le complexe épitope CMH de la CPA via son TCR. Ainsi une sélection drastique des thymocytes a lieu pour que seuls les T répondant à ces exigences circulent en périphérie, tous les autres étant détruits au cours des étapes de sélection. Après le réarrangement de leur TCR, les thymocytes subissent une première sélection où seuls les thymocytes dont le TCR présentant une affinité modérée pour le complexe CMH-peptide présentés par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) pourront continuer leur différenciation (Cosgrove et al., 1992).

Ceux ayant une affinité trop faible mourront faute de signal de survie. On parle alors de la sélection positive et de mort par ignorance (Figure 2).

Pour autant, la sélection positive expose au risque de faire circuler des T ayant une trop forte affinité pour le soi et donc un risque d'autoimmunité. Les thymocytes dont le TCR a une trop forte affinité pour le complexe CMH-peptide sont alors éliminés dans la médullaire du thymus au cours de l'étape de sélection négative (Gallegos and Bevan, 2004).

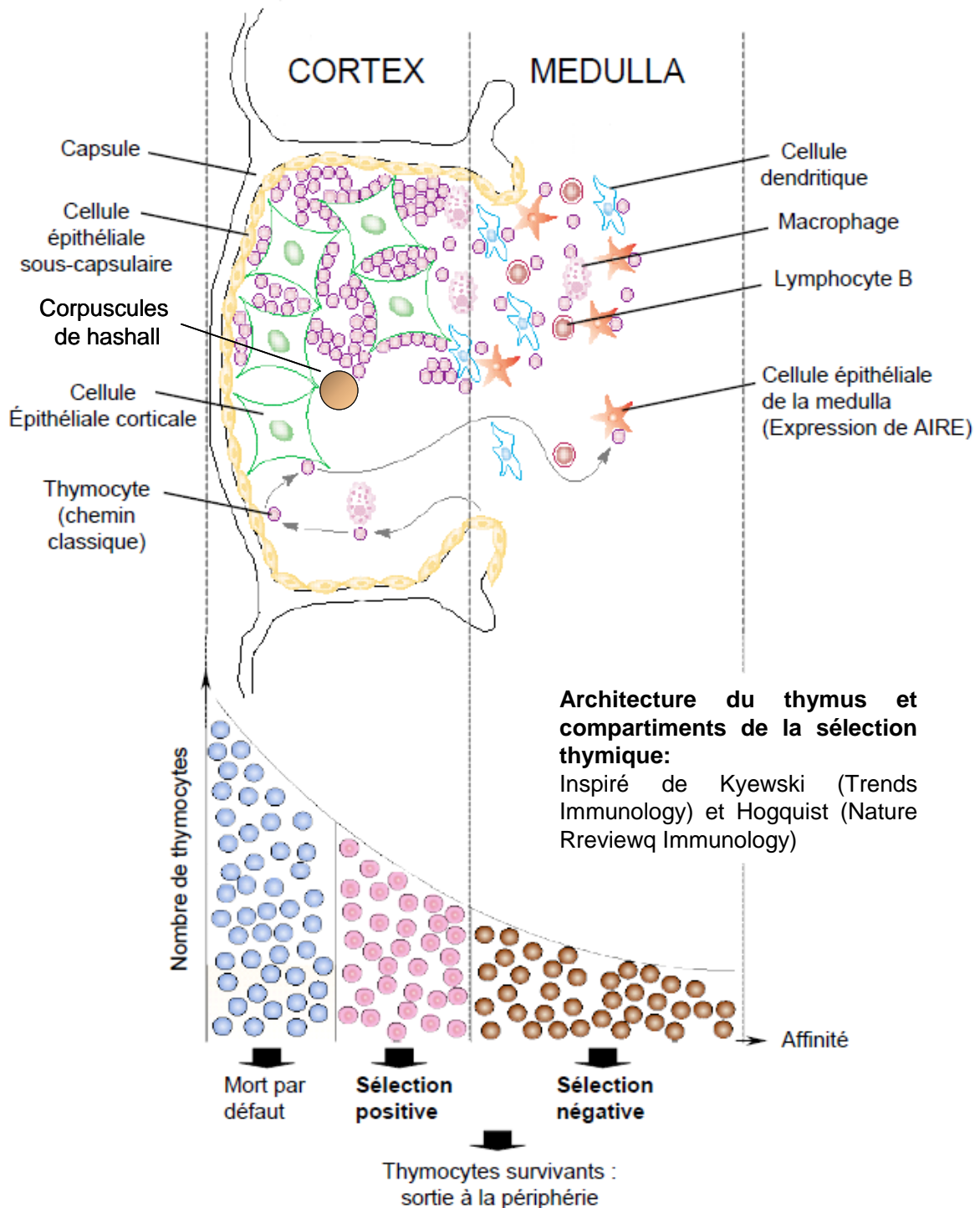
Cependant il existe des alternatives à l'élimination des T auto-réactifs. La cellule peut devenir anergique.

B. Le rôle central de AIRE

Comme nous l'avons vu la sélection négative permet d'éviter la sélection des thymocytes potentiellement auto-réactifs. Le thymus doit donc théoriquement pouvoir présenter aux thymocytes en cours de différenciation une large gamme d'antigènes présents dans l'ensemble de l'organisme et donc des antigènes extra-thymiques. Ces dernières années, il a pu être montré qu'il existe une expression ectopiques de antigènes tissulaires périphériques dans le thymus sous la dépendance d'AIRE: Auto-Immune REgulator (Mathis et al., 2009). AIRE est un facteur de transcription qui permet l'expression de milliers d'antigènes périphériques par les cellules médullaires du thymus (mTEC) (Klamp et al., 2006). Les souris AIRE^{-/-} développent un syndrome auto-immun (Anderson et al., 2002). De

même, chez l'homme une mutation ponctuelle sur le gène d'AIRE peut s'accompagner d'un syndrome auto-immun appelé APECED (Nagamine et al., 1997). Ces observations soulignent l'importance du rôle de AIRE dans la sélection négative et donc dans la tolérance.

Figure 2 : La Tolérance centrale



thymus à lui seul ne permet pas d'éviter leur production. Pour autant en situation

physiologique par définition il n'existe de pathologie auto-immune. Ainsi l'organisme contrôle en périphérie ces lymphocytes auto réactifs.

A. Les mécanismes « passifs »

1. L'ignorance

Comme nous l'avons vu la première étape déterminante pour l'activation du système immunitaire est la présentation de l'antigène aux T. Cependant certains tissus sont peu accessibles aux cellules immunitaires. Ces sites dits « immunoprivilégiés » sont des sites où l'antigène peut-être séquestré et donc être peu ou pas présenté par les CPA des organes lymphoïdes secondaires drainant le tissu concerné. On parle alors d'ignorance.

Il faut souligner ici que les cellules musculaires n'expriment pas, à un niveau détectable, le CMH-I (Pavlath et al., 2002; Singer et al., 1997). De fait le tissu musculaire qui à l'état physiologique n'expose pas d'antigène musculaire aux cellules immunitaires pourrait être ignoré. Cependant, nous avons vu plus haut que sous certaines conditions, inflammatoires en particulier le CMH-I pouvait être induit.

Dans certaines circonstances, l'antigène peut être effectivement présenté par les CPA mais pour autant les T spécifiques de l'antigène n'atteignent pas leur cible en raison d'un défaut de migration.

Les expériences menées par Bianchi et al. ont pu montrer qu'il existait bien une prolifération de T CD4⁺ spécifiques de l'antigène OVA (lignée OT-II) dans les ganglions drainants cutanés où était exprimé OVA spécifiquement sous la dépendance d'un promoteur cutané dans une souris transgénique. Cependant, dans de ce modèle expérimental, les T CD4⁺ spécifiques étaient incapables de migrer dans le tissu cutané en raison du manque d'expression de protéines d'adhésion. En revanche, lorsqu'une inflammation mécanique était provoquée au niveau cutané, alors on pouvait observer une migration des T spécifiques dans la peau (Bianchi et al., 2009).

Cette expérience introduit une notion capitale en immunologie. La réponse immune est effective s'il existe des conditions inflammatoires (signaux de danger favorables). De fait, certains auteurs ont remis en cause le concept de site immunoprivilégié. Ils estiment plutôt que chaque antigène est bien présenté dans le ganglion drainant mais, qu'en absence de signaux de danger (inflammation, infection...), les CPA ne sont pas matures et n'expriment

pas suffisamment de molécules de co-stimulation pour activer efficacement les lymphocytes T (Matzinger, 1994).

Ainsi la reconnaissance spécifique du complexe CMH-I antigène par le TCR ne suffit pas il faut un second signal pour induire une réponse immunitaire efficace.

En l'absence de ce second signal, on peut observer une absence de prolifération et de production d'IL-2, on parle alors d'anergie.

2. L'anergie

En effet, l'expression transgénique par la cellule pancréatique endocrine (îlots β) à la fois d'un antigène viral et de la molécule de costimulation B7 s'accompagne d'une destruction des îlots pancréatiques et donc d'un diabète en cas de transfert de Tconv TCR transgénique spécifique pour la protéine virale. En revanche, le même transfert n'induit aucune destruction pancréatique chez les souris simple transgénique B7 ou pour la protéine virale (Harlan et al., 1994).

Effectivement, sans l'activation d'un second signal, on observe une anergie. A ce titre les signaux de danger comme les PAMPS jouent un rôle déterminant. Les TLR (pour Toll Like Receptors), au nombre de 13 chez la souris, qui font partie de la grande famille des PRR, sont des piliers de la défense contre les pathogènes. Leur reconnaissance de PAMPs permet d'induire une réponse immunitaire innée et adaptative contre ces pathogènes (van Maren et al., 2008). En activant les CD via leur TLR, les PAMPS induisent la surexpression du CMH-II et CD80/86, et permettent de créer les conditions minimum indispensables à l'activation complète des T (Garza et al., 2000).

Les défauts d'activation induisant l'anergie suggèrent que ce phénomène soit passif. Cependant l'anergie implique des molécules spécialisées qui activement régulent les signaux intracellulaires comme l'interaction du CTLA4 avec la molécule B7 (Frauwirth et al., 2000). Ce mécanisme actif est sous la dépendance d'un facteur de transcription appelée Erg 2 et 3 qui conduit à la régulation négative du TCR et de la production d'IL-2 (Safford et al., 2005). Il faut souligner que l'anergie est un état cellulaire réversible qui peut être vaincu par exemple *in vitro* par de fortes doses d'IL-2 et des molécules de costimulation (Schwartz et al. 1990). Les mécanismes de tolérance périphérique sont redondants car les agents pathogènes sont capables d'élaborer des mécanismes d'échappement. Par exemples les infections virales peuvent conduire à la levée de l'ignorance et/ou de l'anergie, et conduire à une auto-immunité (Borrow et al., 1991).

3. La déplétion

L'ignorance et l'anergie permettent, certes, de garder sous contrôle les lymphocytes T auto-réactifs, mais ces deux mécanismes permettent la persistance physique de ces cellules potentiellement dangereuses. De plus, si l'anergie bloque la sécrétion d'IL-2 par les T auto-réactifs, ils peuvent toujours sécréter de l'IL-4 et de l'IFN- γ , cytokines potentiellement dangereuses (Mueller and Jenkins, 1995). Un autre mécanisme de tolérance périphérique, conduit à l'élimination des T auto-réactifs : c'est la délétion.

La délétion est le plus souvent provoquée par l'interaction Fas/FasL entre les T et les CPA (Kurts et al., 1998), respectivement (Suda et al., 1993). L'activation de Fas à la surface des lymphocytes T induit l'apoptose via la surexpression du facteur pro-apoptotique Bim (Davey et al., 2002). Les T peuvent également exprimer à la fois Fas et FasL suite à leur activation, ce qui permet un rétrocontrôle de la réponse immunitaire grâce à une contraction du nombre des cellules activées par mort cellulaire : AICD (Activation Induced Cell Death) (Brunner et al., 1995).

Enfin, notons que FasL est exprimé dans certains sites immuno-privilegiés mentionnés plus haut, comme la chambre antérieure de l'œil. Cette expression permet l'élimination des lymphocytes T qui auraient réussi à passer la barrière protégeant l'accès au site (Griffith et al., 1995).

4. Les mécanismes passifs et la tolérance musculaire:

Très peu de travaux ont été consacrés spécifiquement à la tolérance musculaire. Les travaux de Boyer et al. apportent des informations déterminantes à ce sujet (Calbo et al., 2008). Les auteurs ont mis au point une souris double transgénique exprimant, de façon spécifique dans le tissu musculaire, l'antigène de l'ovalbumine (OVA) grâce à un promoteur musculaire. Ces souris SM-OVA sont croisées avec des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique d'OVA (OTI/II). Les souris doubles transgéniques OT-SM-OVA ainsi générées ne développent pas de myosite. Dans ces travaux les auteurs montrent que la tolérance musculaire des T CD4⁺ spécifiques d'OVA est secondaire à un mécanisme d'ignorance. En effet ces cellules restent détectables en périphérie et sont en particulier capables de proliférer *in vitro* en présence d'OVA. En revanche, la tolérance des T CD8⁺ est sous la dépendance d'un mécanisme différent encore inconnu et qui pourrait impliquer la surexpression à leur surface de PD-1 une molécule inhibitrice de la fonction cytotoxique. Nous réaborderons ultérieurement l'importance de PD-1 dans la tolérance.

B. Les mécanismes actifs ou extrinsèques

En plus des mécanismes « passifs » de tolérance, il existe des mécanismes actifs. Cette dénomination initiale est de plus en plus remise en cause par une meilleure compréhension des mécanismes dits « passifs » qui en fait comme nous l'avons vu plus haut mettent en jeu activement des signaux de régulation négative. Cependant, ces mécanismes impliquent principalement un « défaut » (pas de présentation antigénique, absence de signal de danger, absence de maturation dendritique, absence de second signal) d'activation lymphocytaire ne faisant qu'intervenir le couple CPA/lymphocyte. On les oppose alors aux mécanismes « actifs » qui font intervenir un troisième acteur spécialisé, régulant l'amplitude de la réponse immune. L'intervention d'un troisième acteur amène à considérer ces mécanismes de tolérance comme des phénomènes extrinsèques de régulation.

Si à ce jour les T CD4⁺ régulateurs (Treg) sont les principaux acteurs de la tolérance périphérique, il existe cependant d'autres cellules qui peuvent être impliquées dans les réponses régulatrices.

1. Les lymphocytes B régulateurs

Au sein du compartiment lymphocytaire B, il existe de nombreux arguments expérimentaux soulignant l'existence de lymphocytes B (B) ayant des propriétés immunorégulatrices. Il faut ici rappeler l'importance du compartiment B qui intervient non seulement dans la réponse humorale mais aussi interagit avec le T en particulier en tant que CPA. Dans des modèles animaux comme l'arthrite à collagène (Evans et al., 2007; Lampropoulou et al., 2008), il a été montré l'existence de population B régulatrice diminuant la sévérité de la maladie. Il faut souligner l'hétérogénéité phénotypique des différents « Breg » identifiés et la diversité de leur mode d'action, même si la production d'IL-10 semble être un élément déterminant de leur action (Iwaki et al., 2011). Les capacités régulatrices de ces cellules sont le plus souvent acquises.

2. Les cellules NKT

Au sein du compartiment lymphocytaire, d'autres cellules ont montré des propriétés immunorégulatrices. Les NKT (Natural Killer T cells) forment une population mineure de lymphocytes T caractérisés par l'expression d'une chaîne α invariante V α 14, reconnaissant des motifs glycolipidiques présentés par la molécule « class I-like » CD1d (Nowak et al.,

2007). En plus de leur un rôle effecteur dans les réponses anti-virales ou anti-tumorales, ils semblent avoir une fonction régulatrice dans certaines situations pathologiques comme le diabète (Wang et al., 2001).

3. Les lymphocytes Tconventionnels

Les T à fonction « effectrice » que nous dénommerons Tconv pour lymphocytes Tconventionnels pourraient paradoxalement exercer des fonctions régulatrices en particulier grâce à l'antagonisme qui existe entre les différentes orientations Th1 et Th2 de la réponse immunitaire. En effet, les sous populations de T CD4⁺ auxiliaires ont des profils de sécrétions cytokiniques différents selon qu'ils orientent la différenciation des T naïfs vers l'une ou l'autre de ces voies. Par exemple, l'IL-4 produit par les T Th2 inhibe la différenciation Th1. Ainsi, au cours d'une réponse auto-immune Th1 comme dans le modèle de diabète des souris NOD, l'expression transgéniques d'IL-4 oriente la réponse Tconv dans une différenciation Th2 et empêche l'apparition du diabète (Gallichan et al., 1999).

Les agents pathogènes peuvent aussi utiliser cette propriété pour échapper à sa destruction par le système immunitaire comme par exemple le parasite *Leishmania major*, (Launois et al., 1997).

4. Les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs

Au sein du compartiment lymphocytaire T, il existe aussi des cellules régulatrices, décrites la première fois dans les années 1970 (Gershon et Kondo, 1970). Nous appellerons les lymphocytes T régulateurs CD4⁺: Treg et lymphocytes T régulateurs CD8⁺: Treg CD8⁺.

Si l'existence de Treg CD8⁺ naturels a été décrite (Cosmi et al., 2003; Bienvenu et al., 2005) le plus souvent ces cellules acquièrent leur propriétés immunorégulatrices. Les Treg CD8⁺ peuvent être induits par une stimulation allogénique spécifique dans un environnement cytokinique particulier (Lu et al., 2009) ou en l'absence de stimulation antigénique spécifique par des monocytes (Filaci et al., 2005). A ce jour, il n'y a pas de marqueur spécifique des Treg CD8⁺. Là encore les populations sont phénotypiquement hétérogènes. Si certains Treg CD8⁺ peuvent partager des marqueurs avec les Treg CD4⁺ comme le CD25 ou FoxP3 (Billerbeck et al., 2007), ils ne peuvent pas être définis seulement par l'expression de ces marqueurs. Certains ont proposé que l'absence de la molécule CD28 puissent être un marqueur spécifique (Filaci et al., 2004), mais d'authentique Treg CD8⁺ sont CD28⁺ (Singh et al., 2007). Les mécanismes d'action des Treg CD8⁺ sont multiples. Ils sont capables de

produire des cytokines inhibitrices comme IL-10 (Rifa'i et al., 2004) ou de modifier l'état d'activation des CPA (Chang et al., 2002).

5. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les T expriment un TCR le plus souvent composé du dimère $\alpha\beta$ (97% des cas), cependant une population de T est caractérisée par l'expression d'un TCR $\gamma\delta$. La plupart des T $\gamma\delta$ mis en évidence expriment le CD8 (Peng et al., 2007) et semblent participer à la réponse immune contre certaines infections et tumeurs (Kapp et al., 2004).

Les T $\gamma\delta$ peuvent aussi avoir des propriétés suppressives concernant la prolifération des Tconv autologues (Kuhl et al., 2009; Peng et al., 2007). Mais leur rôle dans l'auto-immunité reste débattu.

IV. Les Treg, de leur découverte et leur caractérisation phénotypique

A. La découverte des Treg

La première expérience montrant l'existence de cellules immunorégulatrices thymiques remonte à 1969. Dans cette expérience les souris sont thymectomisées à 3 jours de vie, ils développent alors de nombreuses manifestations auto-immunes qui peuvent être prévenues par le transfert de T CD4⁺ de souris normales (Nishizuka et al., 1969 ; Gershon et al., 1970).

Dans les années 80, S. Sakaguchi sera le premier à identifier un marqueur membranaire CD5. Dans ces expériences, il montre que des souris immunodéficientes (athymique : Nude) reconstituées avec des lymphocytes T CD5^{faible} présentent des manifestations auto-immunes graves alors que le transfert T CD5^{fort} ne s'accompagne d'aucune manifestation pathologique. Cette expérience confirme d'une part l'existence à l'état physiologique de T auto-réactifs circulants et d'autre part l'existence d'une sous-population lymphocytaire contrôlant cette population auto-réactive (Sakaguchi et al., 1985). Ces travaux suggèrent donc l'existence de cellules T CD5^{fort} régulatrices.

B. CD25: le premier marqueur des Treg

C'est à nouveau Sakaguchi qui en 1995 découvrira le premier marqueur pertinent des Treg le CD25, la sous-unité α du récepteur de haute affinité à l'IL-2. En utilisant le même protocole expérimental qu'en 1985, il montrera que ces cellules immunorégulatrices sont CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi et al., 1995). Pour autant le CD25 n'est pas un marqueur spécifique des Treg car il est aussi exprimé à la surface des Tconv activés. Cependant le niveau d'expression du CD25 par les Treg est plus élevé (CD25^{fort}) que les Tconv activés (Kuniyasu et al., 2000) et qu'à la différence des Tconv activés, les Treg maintiennent un niveau élevé de CD25 au cours des divisions cellulaires successives (Fisson et al., 2003).

1. FoxP3

Le rôle du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead Box Protein 3) dans l'importance du maintien de la tolérance périphérique a tout d'abord été montré par des observations chez les souris *scurfy* (Godfrey et al., 1991) et chez l'homme souffrant du syndrome IPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome). Dans ces 2 cas, il existe un déficit en FoxP3 consécutif à une anomalie génétique dans le gène FoxP3 (Bennett et al., 2001). Ce déficit s'accompagne de manifestations autoimmunes et allergiques graves proches de celles observées après déplétion en T CD4⁺CD25⁺ (Bennett et al., 2001).

Secondairement, il sera montré que FoxP3 est exprimé par les Treg (Yagi et al., 2004) et que son expression ectopique dans des Tconv leur confère des propriétés immunorégulatrices (Hori et al., 2003). L'ensemble de ces données montrent le rôle central du facteur FoxP3 pour la différenciation et la fonction des Treg (Buckner et al., 2008). Cependant il faut souligner dans ce travail que l'expression de FoxP3 doit être prolongée et à un niveau important pour conférer des propriétés immunorégulatrices.

2. Les limites de FoxP3 chez l'homme

Cependant FoxP3 n'est pas un marqueur spécifique des Treg chez l'homme. A l'opposé des Treg naturels exprimant constitutivement FoxP3, les Tconv activés par stimulation TCR peuvent eux aussi exprimer de façon transitoire Foxp3 sans pour autant acquérir des propriétés immunosuppressives (Tran et al., 2007; Walker et al 2003). D'autre part, il existe d'authentiques Treg FoxP3⁻ comme nous le verrons ultérieurement.

3. L'intérêt de FoxP3 chez la souris

A l'inverse, chez les souris on n'observe pas ce type de phénomène, ce qui permet d'utiliser FoxP3 pour l'identification des Treg avec une bonne spécificité. Cependant il faut souligner que la détection de ce facteur de transcription impose la perméabilisation du noyau et donc la mort cellulaire. Chez la souris, il est aussi possible de se contenter d'identifier les Treg grâce au marqueur membranaire CD25, en sélectionnant les T CD4⁺CD25^{fort} pour identifier les Treg. Enfin ces dernières années ont vu apparaître le développement de souris *Knock'in* FoxP3-GFP permettant de sélectionner et de suivre les Treg grâce à l'expression d'une protéine de fluorescence verte (GFP) associée au facteur de transcription Foxp3. Les difficultés d'identification des Treg chez l'homme ont conduit à la recherche d'autres marqueurs membranaires.

C. La reconnaissance des Treg chez l'homme

1. Le CD127

Comme nous l'avons vu précédemment, le CD25, bien qu'exprimé de façon soutenue par les Treg au cours des divisions, ne permet pas toujours la distinction avec les Tconv activés. De plus, le niveau d'expression de FoxP3 est corrélé à celui du CD25. Ainsi, seule la sélection des T CD4⁺CD25^{fort} permet l'obtention de cellules fonctionnellement immunosuppressives (Jonuleit et al., 2001). Cependant ce type d'approche comme nous le verrons plus tard exclu les Treg CD25^{moy}FoxP3^{faible} correspondant au Treg naïfs (CD45RA⁺). De plus, comment définir de façon reproductible la population T CD25^{forte} en particulier en situation inflammatoire ?

A ce titre l'utilisation du marqueur CD127, le récepteur membranaire à l'IL-7, pourrait être une alternative. En effet, il a pu être montré que la population CD4⁺CD127⁻ était une population cellulaire exprimant fortement FOXP3 et ayant des propriétés immunosuppressives (Seddiki et al., 2006a; Liu et al., 2006). Cependant, il a été également montré que les Tconv activés pouvaient aussi diminuer leur niveau d'expression du CD127 limitant ainsi son intérêt pour l'identification des Treg. (Mazzucchelli et al. 2007; Aerts et al., 2008).

2. Integrines et autres récepteurs au chimiokines

Ainsi, l'utilisation complémentaire du CD62L (L sélectine) pourrait être une approche intéressante. Il a pu en effet être montré que la sélection des cellules $CD4^+CD25^{++}CD127^-CD62L^+$ permettait de distinguer les Treg des Tconv récemment activés $CD62^{\text{faible}}$ (Hamann et al., 2000). De nombreuses autres protéines membranaires impliquées dans la migration cellulaire (intégrine et récepteur au chimiokines) ont été observées sur les Treg (tableau 1 : liste non exhaustive). Néanmoins, aucun de ces marqueurs n'est spécifique des Treg. Cependant, la diversité de ces marqueurs introduit la notion, déjà suggérée précédemment, qu'il existe une très grande hétérogénéité phénotypique dans la population T régulatrice. Nous aborderons dans les paragraphes suivant la description et la signification de cette hétérogénéité phénotypique.

3. Molécules impliquées dans la survie et l'apoptose

Le GITR est lui aussi fortement exprimé de façon constitutionnelle à la surface des Treg et comme pour CTLA-4 son niveau d'expression est corrélé à celui de FoxP3 (Yagi et al., 2004). Mais là encore le GITR ne permet pas de discriminer les Treg des Tconv activés (Fontenot et al., 2003). La molécule membranaire GARP, récemment identifiée, pourrait être un bon marqueur de Treg activés chez l'homme (Wang et al., 2009) en la distinguant des Tconv activés.

4. Marqueurs de fonctions suppressives

Les marqueurs comme le CTLA4 et ICOS sont retrouvés à la surface de certains Treg, pour autant ils sont aussi retrouvés à la surface des Tconv activés et à ce titre ne permettent pas la distinction Treg/Tconv. Cependant il faut souligner qu'ICOS permettrait de distinguer des sous populations régulatrices. Les Treg $ICOS^+$ et $ICOS^-$ produisent soit IL-10 soit du $TGF\beta$ respectivement (Ito et al., 2008).

Tableau III: Marqueurs des Treg

Facteur de transcription	Marqueurs d'activation et de phénotype mémoire	Intégrines	Molécules impliquées dans les fonctions suppressive et effectrice	Molécules impliquées dans l'apoptose et la survie
FOXP3	absence de CD127	CD62L	CTLA4	GARP
	CD45RA	CCR4	ICOS	GITR
	CD45RO	CCR6	CD39–CD73	CD27
	CD25	CCR9	LAP	OX40
	HLA-DR	CD103	Granzyme B	CD95
	CD69	CD304	Galectine 1	PD-1
		CD31	Galectine 10	Galectine 3
		absence de CD49d	TRANCE	MS4A4B
			CD80 et CD86	IL-1R
			IL-10	CD6
			IL-17	
			CD2	
			absence d'IL-2	

D'après Sakagushi.

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; PD-1, programmed cell death 1; R, receptor; TRANCE, TNF-related activation-induced cytokine;

3^e PARTIE. LES LYMPHOCYTES TREGULATEURS : MECANISMES D’ACTION et ONTOGENIE

Dans la précédente partie nous avons décrit les mécanismes de tolérance périphérique et introduit la notion que les Treg en étaient un acteur principal en contrôlant les réponses auto-immunes. Ainsi, après avoir décrit le phénotype Treg, nous allons voir quels sont les mécanismes d’action mise en place par ceux-ci pour contrôler la réponse immunitaire. Nous verrons que la diversité de ces mécanismes d’action reflète une grande hétérogénéité cellulaire des Treg. Cette hétérogénéité cellulaire étant elle-même le reflet de l’ontogénie des Treg.

I. Treg : les mécanismes d’actions

Les mécanismes d’action des Treg expliquant leurs fonctions immunosuppressives sont nombreux et très variés. A ce jour ils ne sont certainement pas tous élucidés. De plus, nous ne savons toujours pas si un mécanisme prédomine. Il est probable que la redondance des mécanismes d’actions s’explique par la grande diversité des situations physiopathologiques auxquels sont confrontés les Treg.

A. Les conditions d’action des Treg et l’ « effet by stander »

1. L’activation des Treg est indispensable à leur fonction régulatrice

La première propriété régulatrice des Treg mise en évidence *in vitro* a été l’inhibition de la prolifération des Tconv. Dans les années 1995 à 2000, le test de suppression *in vitro* montrant que l’ajout de Treg à des Tconv en culture inhibaient leur prolifération était l’expérience de choix pour démontrer que l’on avait affaire à des cellules immunosuppressives (Thornton and Shevach, 1998). Ultérieurement, il sera montré que cette inhibition de prolifération n’est possible qu’une fois les Treg activés via leur TCR. Sans cette activation préalable *in vitro* ou *in vivo* les Treg n’exercent pas de propriétés immunorégulatrices (Levings et al., 2001a ; Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001 ; Baecher-Allan et al., 2001).

Ce phénomène a été décrit dans un modèle expérimental murin de sclérose en plaque : l’encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) où les souris sont immunisées contre un

antigène constituant la gaine de myéline des neurones comme PLP1 ou MOG. Au cours de l'EAE, les Treg spécifiques de PLP1 ne protègent pas des manifestations cliniques induites par l'immunisation par un autre peptide comme MOG. En effet, des Treg spécifiques de l'antigène A ne peuvent contrôler une réponse inflammatoire impliquant un antigène B que s'ils ne sont pas activés par leur antigène cognitif A. En revanche, si l'EAE est provoquée par une immunisation à l'aide du peptide PLP-1, les Treg spécifiques de ce même peptide pourront alors être activés et contrôler la maladie (Yu et al., 2005a). C'est seulement l'activation préalable *in vitro* des Treg anti-PLP1 par PLP-1 qui permet la protection de l'EAE induite par MOG soulignant l'importance de l'activation pour la protection des Treg. Cette expérience introduit une seconde notion, une fois activés par leur antigène cognitif les Treg peuvent contrôler des réponses immunes impliquant d'autres antigènes.

Il est important de souligner dans ce paragraphe dédié à l'activation des Treg que la concentration peptidique nécessaire à l'activation TCR était 10 à 100 fois moindre pour les Treg que pour les Tconv (Takahashi et al., 1998) ce qui confère aux Treg un avantage certain dans la compétition contre les Tconv pour l'activation contre les antigènes du soi.

2. L'effet « by stander »

L'effet « by stander » peut se traduire par un effet de « proximité », ou « collatéral » de l'inhibition exercée par les Treg. Il se caractérise par le fait que des Treg anti-A sont capables d'inhiber des Tconv anti-B, sous réserve qu'ils aient d'abord été stimulés par A. Autrement dit, une fois que les Treg ont été activés de façon spécifique, ils peuvent inhiber n'importe quelle autre réaction des Tconv.

Ce phénomène a été démontré tout d'abord *in vitro* (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 2000). Depuis, d'autres études ont confirmé son existence, *in vitro* (Larkin et al., 2007) comme *in vivo*. L'étude de Habib Zaghouani montre que des Treg spécifiques de l'antigène, PLP1, utilisé pour provoquer l'EAE protègent de la maladie, alors que les Treg spécifiques de MOG (un autre antigène de la gaine de myéline) ne protègent pas. Par contre, il est possible d'avoir une protection de l'EAE induite par injection de MOG si les Treg anti-PLP1 sont au préalable activés en culture avec PLP1 (Yu et al., 2005a). On retrouve ce type de résultat dans des modèles de diabète (Tarbell et al., 2004).

Il faut noter que l'effet bystander présente des côtés positifs en terme d'immuno-régulation. Lors de l'établissement d'une maladie auto-immune, la dégradation des tissus

révèle des auto-antigènes cryptiques, dont la présentation par les DC active des Tconv de spécificités variées. On peut penser qu'il serait impossible pour les Treg de réguler cette population très hétérogène de Tconv s'ils se bornaient à ne réguler qu'une spécificité donnée. L'effet bystander doit leur conférer un large spectre d'action, et ainsi leur permettre de réguler des auto-réactivités diverses, susceptibles de déclencher à terme une maladie auto-immune.

3. Les Treg doivent être en nombre suffisant pour être efficaces

Nous l'avons vu pour être efficace un Treg doit être activé mais il doit aussi être en nombre suffisant. C'est le rapport entre le nombre de Treg activés et le nombre de Tconv auto-réactifs qui est déterminant pour faire pencher la « balance » soit du côté de l'autoréactivité soit du côté de la régulation.

Les expériences menées par l'équipe de Bluestone ont montré qu'il est nécessaire d'utiliser un très grand nombre de Treg polyclonaux (10 à $20 \cdot 10^6$ Treg) pour observer inconstamment la prévention du développement du diabète chez la souris Non Obese Diabetic (NOD) (Masteller et al., 2005).

De plus, cette même équipe a montré que le diabète peut être prévenu, et même guéri, beaucoup plus efficacement par des quantités moindres de Treg spécifiques des antigènes du pancréas (Tang et al., 2004). Ils montrent en effet que l'inefficacité relative des Treg polyclonaux s'explique par la faible proportion de Treg spécifiques du pancréas détectés parmi eux. En effet, le marquage à la carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) des Treg polyclonaux a permis de montrer que moins de 1% de la population injectée se divise dans le ganglion drainant pancréatique (présentant les auto-antigènes pancréatiques) et que cette prolifération n'est pas différente de celle observée dans des ganglions non drainants (ne présentant pas les auto-antigènes pancréatiques). A l'inverse, les Treg spécifiques du pancréas se divisent activement et seulement dans le ganglion pancréatique car ils sont activés par les antigènes pancréatiques.

Ainsi, l'absence de spécificité sous-tend l'absence d'activation et donc un rapport de force défavorable pour les Treg polyclonaux. Toujours dans le modèle de souris NOD il a pu être estimé grâce à des expériences de co-transfert de Treg spécifiques du pancréas et de cellules diabétogènes qu'un ratio 1:9 (Treg:Tconv) était suffisant pour protéger de la survenue du diabète (Tang et al., 2004).

B. L'importance des interactions entre Treg, Tconv, CPA

Les mécanismes d'actions des Treg peuvent ne faire intervenir que ces 2 acteurs (Treg et Tconv) soit directement par des mécanismes contact dépendant soit indirectement par l'intermédiaire de molécules inhibitrices. Ils peuvent aussi faire intervenir un 3ème acteur de la réponse immune : la CPA.

1. Le rôle des CPA

Les Treg diminuent l'état de maturation des CPA. Le rôle des CPA dans les mécanismes immunosuppresseurs des Treg a été suggéré par l'importance des interactions physiques entre CPA et Treg lors d'expérimentations d'imagerie cellulaire *in vivo*. Au cours de ces travaux chez la souris, il a été montré qu'en l'absence de Treg, les contacts entre les CPA et les T étaient plus prolongés alors que le temps de transit des Tconv était augmenté (Tang et al., 2006; Tadokoro et al., 2006).

L'interaction CPA/Treg conduit à une diminution du niveau d'expression par les CPA des molécules de co-stimulation CD80 and CD86. Comme nous l'avons vu précédemment cela a pour conséquence d'empêcher une activation efficace du Tconv. Cette observation a été faite *in vitro* (Cederbom et al., 2000), mais aussi *in vivo* chez l'homme et la souris (Lewkowich et al., 2005). L'inhibition de l'activation des Tconv par les DC induite par les Treg est abrogée par l'inhibition du CTLA-4 (au moyen d'un Ac monoclonal anti CTLA-4). Ceci souligne le rôle capital du CTLA-4 dans ce phénomène (Oderup et al., 2006; Oderup et al., 2006).

LAG 3 (Lymphocyte Activation Gene 3) pourrait aussi jouer un rôle dans l'inhibition de la maturation des CPA. LAG 3 est un homologue de CD4 exprimé par les Treg et indispensable à leur fonction (Huang et al., 2004). LAG 3 se fixerait aux molécules de CMH II pour inhiber l'expression de CD86 par les DC.

En plus de diminuer le niveau d'activation des DC, les Treg sont capables d'induire la sécrétion de molécules immunosuppressives par les DC. En effet, il a été montré que les Treg sont capables d'induire l'expression par la CPA de indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Une fois IDO sécrétée dans le milieu extracellulaire, elle capte le tryptophane, acide aminé essentiel à la prolifération T. Il en résulte une inhibition des Tconv dépendante de mécanismes faisant intervenir des interactions entre le CTLA4 et CD80 et/ou CD86 (Fallarino et al., 2003a). Nous aborderons plus en détail ultérieurement le rôle d'IDO (Mellor et al., 2004).

2. Le rôle des Tconv : l'effet « boost »

La plupart des interactions cellulaires du système immunitaire sont bi-directionnelles. Or, jusqu'à il y a peu on pensait que les Treg contrôlaient les Tconv sans que les Tconv aient un rôle déterminant sur les Treg. Des premiers travaux ont suggéré l'existence d'un dialogue Treg/Tconv en montrant que la signature moléculaire des Treg était significativement modifiée par le co-transfert de Tconv auto-réactifs. Mais c'est en 2010 qu'il sera clairement montré l'importance de ce dialogue.

Dans un modèle transgénique de souris diabétique, il a pu être montré que le co-transfert de Treg spécifiques pour le peptide viral HA et de Tconv spécifiques de ce même peptide, dans une souris exprimant HA spécifiquement sous la dépendance d'un promoteur pancréatique, permettait une expansion significativement plus importante des Treg HA spécifiques que si les Treg étaient transférés seuls. C'est effet « boost » est non seulement quantitatif, mais aussi s'accompagne d'une augmentation des capacités immunosuppressives des Treg (Grinberg-Bleyer et al., 2010).

C. La mort cellulaire des Tconv induites par les Treg

1. La cytotoxicité des Treg sur les Tconv

La cytolyse secondaire à des phénomènes de cytotoxicité a été initialement décrites pour les fonctions effectrices des T CD8⁺ cytotoxiques ou les cellules NK. De tels mécanismes ont été aussi décrits pour les T CD4⁺ et pour les Treg. En effet il a pu être montré que les Treg exerçaient eux aussi des mécanismes de cytotoxicité cellulaire par l'intermédiaire du granzyme A ou des perforines par l'intermédiaire de la molécule d'adhésion CD18 (Grossman et al., 2004). En particulier les Treg sont capables d'utiliser les propres armes des cellules cytotoxiques pour les détruire. Au cours de cancers les Treg tumoraux détruisent les T CD8⁺ et les cellules NK par cytolyse grâce aux granzymes et perforines pour faciliter la croissance tumorale (Cao et al., 2007).

2. La mort cellulaire programmée des Tconv induite par les Treg

D'autres travaux suggèrent qu'en plus des phénomènes de cytotoxicité, la mort cellulaire pouvait être induite par la voie TRAIL-DR5 (tumour-necrosis-factor-related apoptosis-

inducing ligand–death receptor 5) (Ren et al., 2007). De plus l'apoptose des Tconv peut être induite par les Treg grâce à la Galectine 1 (Garin et al., 2007).

D. Le blocage métabolique des Tconv induits par les Treg

En plus d'être capable de donner directement la mort aux Tconv, les Treg sont capables d'inhiber leur activation en interférant avec leur métabolisme et indirectement d'induire aussi la mort cellulaire.

1. La privation d'IL-2

Comme nous le verrons ultérieurement, l'IL-2 est une cytokine fondamentale pour l'ontogénie, l'homéostasie et la survie des Treg, comme le suggère l'importance du niveau d'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2: le CD 25. L'IL-2 est aussi une cytokine capitale pour la prolifération des Tconv.

Ces données suggèrent qu'il pourrait exister une compétition entre les Treg et les Tconv concernant l'utilisation de l'IL-2. Compétition pour laquelle les Treg ont l'avantage d'un plus fort niveau d'expression du CD25 ce qui provoquerait une consommation de l'IL-2 par les Treg au dépend des Tconv.

Effectivement *in vitro*, l'adjonction d'IL-2 lors de la co-culture de Treg et de Tconv inhibe l'effet anti-proliférant des Treg sur les Tconv (Thornton et al., 1998). De plus, les Treg inhibent la transcription du gène codant pour l'IL-2 par les Tconv, *in vitro* (Thornton et al., 1998) et *in vivo* (Sarween et al., 2004). L'ensemble de ces 2 mécanismes conduit à une privation d'IL-2 responsable de l'apoptose des Tconv (Pandiyan et al., 2007). Cependant des données chez l'homme suggèrent que ce mécanisme de privation en IL-2 n'est pas suffisant pour expliquer l'effet immunosupresseur des Treg (Oberle et al., 2007).

De plus, la coexpression simultanée des ectoenzymes CD39 et CD75 à la surface des Treg s'accompagne de la production péri-cellulaire d'adénosine qui en se fixant sur le récepteur 2 de l'adénosine (A2AR) des Tconv inhibe leur fonction (Deaglio et al., 2007; Borsellino et al., 2007).

2. Le CD39, CD73, l'AMPc

En plus de la privation en IL-2, les Treg utilisent l'adénosine, dont les propriétés immunosuppressives sont établies (Sitkovsky et al., 2004). Le CD39 dégrade l'ATP en AMP (Adenosine Mono-Phosphate) dans le milieu extra-cellulaire et le CD73 dégrade l'AMP en adénosine. Ces 2 ectoenzymes CD39 et CD73 ont récemment été mise en évidence à la surface des Treg chez la souris (Deaglio et al., 2007) et chez l'homme (Borsellino et al., 2007).

En se liant au récepteur A2A des Tconv, l'adénosine supprime leur prolifération *in vitro* et *in vivo*. De plus, le transfert de Treg CD39^{-/-}, contrairement aux Treg CD39^{+/+}, n'inhibe pas le rejet d'une greffe de peau allogénique (Deaglio et al., 2007).

L'adénosine peut être aussi directement transférée à l'intérieur des Tconv par les Treg au moyen de GAP jonction. L'accroissement de la concentration intra-plasmatique d'AMPc s'accompagne d'une inhibition de prolifération (Kobie et al., 2006).

3. IDO et tryptophane

Comme nous l'avons vu IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase), une enzyme qui catabolise le tryptophane (acide aminé essentiel à la croissance des cellules) est impliquée dans les mécanismes d'inhibition des Treg par l'intermédiaire des DC. IDO est exprimée dans de nombreux tissus, notamment par les CPA du système immunitaire (Fallarino et al., 2003b). La dégradation du tryptophane par IDO aboutit à la production de kynurénines qui participent à l'inhibition de la réponse immunitaire Th1 et Th2 (Xu et al. 2008).

L'activation d'IDO est déclenchée par le CTLA-4 et potentialisée par la voie de transduction dépendante de l'IFN- γ (Grohmann et al., 2002), stoppe l'expansion (mais pas l'activation) des Tconv par privation de tryptophane (Munn et al., 1998). Ainsi les Treg exprimant de façon constitutive le CTLA-4 sont capables de l'activer (Fallarino et al., 2003a).

La voie IDO a été mise en jeu dans des modèles de prévention du diabète (par injection d'une protéine de fusion CTLA-4-Ig) (Fallarino et al., 2003a), dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire (car on peut générer une réponse anti-tumorale efficace grâce à l'injection d'un inhibiteur de l'IDO) (Muller et al., 2005), ou encore dans l'inhibition des réactions allogéniques (Munn et al., 2005), et surtout dans la tolérance fœto-maternelle (IDO est exprimée par le trophoblaste) (Munn et al., 1998).

E. L'inhibition des Tconv par les Treg contact-dépendant

Il existe des interactions directes physiques entre Tconv et Treg qui conduisent à l'inhibition de la prolifération des Tconv. Les expériences menées *in vitro* ont montré que l'inhibition du contact entre Treg et Tconv par une membrane s'accompagnait d'une inhibition de l'effet immunosupresseurs, suggérant que le contact était déterminant pour l'action des Treg. (Takahashi et al., 1998; Thornton et al., 1998). Cependant, comme nous l'avons vu, de nombreux autres mécanismes de régulations indépendants du contact ont été décrits depuis, remettant ainsi en cause le caractère unique de ce mécanisme.

1. Le CTLA-4 comme mécanisme d'inhibition

Le CTLA-4 est fortement exprimé à l'état basal par les Treg. Si son rôle *in vitro* est discuté puisqu'un anticorps bloquant ne lève pas la suppression exercée par les Treg (Thornton and Shevach, 1998), il semble en revanche que son expression soit indispensable dans certains modèles d'auto-immunité. L'ablation spécifique de CTLA-4 dans les Treg (souris FoxP3^{cre} X CTLA-4^{fl/fl}) induit même une auto-immunité létale, et les Treg de ces souris perdent leur fonction suppressive (Wing et al., 2008). CTLA-4 se fixe aux molécules CD80 et CD86 des DC et comme nous l'avons vu ci-dessus l'interaction de CTLA-4 avec les DC s'accompagne d'une inhibition de maturation de la DC.

D'autre part, le CTLA-4 pourrait induire la production de la cytokine immunosuppressive TGF- β par les DC (Travis et al., 2007) ou augmenter l'activité d'IDO (Fallarino et al., 2003a). Tous les effets de CTLA-4 ne passeraient pas nécessairement par l'intermédiaire des DC car il existe aussi des interactions directes entre Treg et Tconv par l'intermédiaire du CD80/86 (Paust et al., 2004).

2. TGF β membranaire

Un autre mécanisme d'interaction et de contact a été décrit avec le TGF β membranaire. Il existe une forme membranaire du TGF β qui est exprimé à la surface des Treg. Cette forme de TGF β exerce une immunosuppression par contact direct avec les Tconv. En particulier, ce mécanisme d'action a été montré au cours du diabète dans un modèle murin chez la souris NOD (Green et al., 2003).

F. Les cytokines inhibitrices produites par les Treg

En plus de contact cellulaire (Tconv ou DC), les Treg peuvent produire des molécules inhibitrices comme des cytokines.

1. Le TGF β

Comme nous l'avons vu le TGF β peut non seulement inhiber la prolifération Tconv par contact cellulaire direct mais aussi à distance lorsqu'il est sécrété dans l'espace péricellulaire. Le TGF β est une cytokine anti-inflammatoire ayant un rôle central dans le contrôle de l'auto-immunité. Les souris TGF $\beta^{-/-}$ succombent des complications de manifestations auto-immunes dans les 4 à 8 semaines suivant leur naissance. (Shull et al., 1992 ; Kulkarni et al., 1993). Comme l'IL-10 une autre cytokine anti-inflammatoire que nous aborderons dans le paragraphe suivant, le TGF β n'est pas exclusivement produit par les Treg mais joue un rôle important dans les fonctions immunomodulatrices des Treg. Le TGF β est impliqué dans les fonctions régulatrices des Treg au cours de modèles expérimentaux de diabète de type 1 ou de colite inflammatoire (Tonkin et al., 2009; Fahlen et al., 2005). *In vitro* chez l'homme l'inhibition du TGF β au moyen d'Ac neutralisant diminue les fonctions inhibitrices de Treg intratumoraux (Strauss et al., 2007) et diminue *in vivo* chez la souris les fonctions T régulatrices dans un modèle de colite inflammatoire (Fahlen et al., 2005).

Cependant, les fonctions immuno-suppressives des Treg peuvent être maintenues en l'absence de TGF β soulignant ainsi qu'il existe d'autres mécanismes de régulation (Piccirillo et al., 2002). Enfin nous verrons ultérieurement qu'au de là de ces propriétés anti-inflammatoires le TGF β est impliqué dans l'induction de Treg.

2. IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont le principal mode d'action est d'empêcher la maturation des DC. L'IL-10 peut être produite par les monocytes macrophage, B et les T (Mosser and Zhang, 2008). Au sein du compartiment T, les Treg sont l'une des principales sources d'IL-10 aux côtés des T Th2.

L'IL-10 joue un rôle crucial dans le contrôle de la colite inflammatoire induite chez la souris (Asseman et al., 1999). Cependant à l'inverse du TGF β , les souris IL-10 $^{-/-}$ ou IL-10R $^{-/-}$ ne développent pas spontanément de maladies auto-immunes franches (hormis une colite) sinon à la faveur d'agressions inflammatoires (Kuhn et al., 1993). Dans un modèle de sclérose en plaque (EAE) l'augmentation de la production d'IL-10 par les Treg

s'accompagne d'une diminution de la sévérité de la maladie (McGeachy et al., 2005). Les souris ayant des Treg IL-10^{-/-} présentent des défauts de tolérance vis à vis de la flore commensale digestive (Uhlir et al., 2006) et sont susceptibles de développer une colite induite par cette flore (Rubtsov et al., 2008). Pour autant l'IL-10 n'est pas indispensable à la fonction des Treg (Bettini and Vignali, 2009).

Comme le TGFβ, l'IL-10 joue un rôle déterminant dans l'induction de Treg que nous aborderons ultérieurement. Nous verrons aussi qu'elle caractérise aussi une sous population T régulatrice induite: les Tr1.

3. L'IL35

L'IL-35 a récemment été découverte comme une cytokine impliquée dans la fonction des Treg (Collison et al., 2007). L'IL-35 est un hétérodimère composé de deux molécules de la famille de l'IL-12, p35 (IL-12α) et Ebi3 (pour Epstein-Barr-virus-Induced gene 3).

Dans ces travaux Vignali découvre que cette cytokine est fortement exprimée par les Treg FoxP3⁺ alors qu'elle ne l'est pas par les Tconv au repos. L'inactivation des gènes impliqués dans la production de l'IL-35 s'accompagne *in vitro* d'une diminution importante des propriétés immunorégulatrices des Treg et *in vivo* le transfert de Treg IL35^{-/-} ne permet pas de contrôler la colite inflammatoire dans un modèle murin. Enfin, l'expression ectopique d'IL35 dans Tconv leur confère des propriétés immunosuppressives en permettant une inhibition, IL-35 dépendante, de la prolifération des T. Comme pour l'IL-10 et le TGFβ il a été récemment montré que l'IL-35 pouvait induire des Treg appelé iTR35.

G. La résistance des Tconv à l'effet des Treg

Nous avons vu comment les Treg pouvaient inhiber les Tconv mais les Tconv peuvent sous certaines conditions résister à l'action des Treg.

1. Les signaux de dangers

En particulier une forte intensité de stimulation des Tconv peut les rendre résistants aux Treg et leur permettre de proliférer même en présence de Treg activés (Baecher-Allan et al., 2001). Cet effet est dépendant *in vitro* des voies médiées par les TLR à la surface des DC comme le TLR4 par l'intermédiaire du LPS (Pasare and Medzhitov, 2003) mais aussi directement grâce au TLR9 ou la stimulation de l'adaptateur MyD88 (LaRosa et al., 2007).

2. Les cytokines pro-inflammatoires

En plus d'une forte stimulation des TLR des DC, de fortes concentrations de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-21 confèrent une résistance des Tconv au Treg (Korn et al., 2007a). L'IL-2, cytokine clef dans l'homéostasie des Treg, abroge aussi, *in vitro* et à forte concentration l'effet inhibiteur des Treg. Les fonctions d'absorption d'IL-2 par les Treg étant dépassées par l'importance de la concentration, ceux-ci ne pourraient plus jouer leur fonction métabolique de privation d'IL-2. Ainsi cela profiterait aux Tconv en permettant leur prolifération non régulée (Thornton and Shevach, 1998).

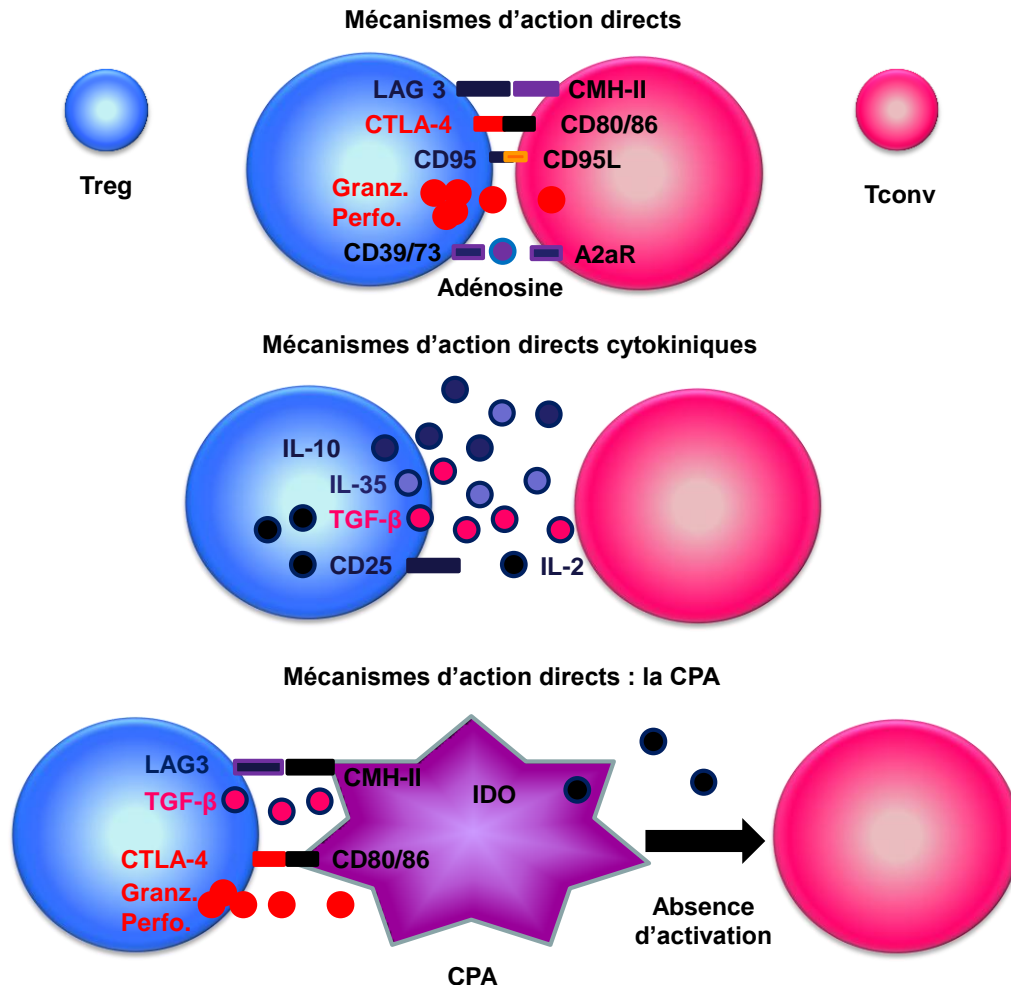
De plus, l'activation de plusieurs membres de la famille des récepteurs au TNF rend les Tconv insensibles à la suppression par les Treg. En effet, le GITR participe à la résistance des Tconv (Shimizu et al., 2002) comme en témoigne l'abolition de la suppression en présence d'un agoniste du GITR. En dehors de GITR, l'hypothèse d'une résistance à la suppression par l'activation des voies OX-40 et 4-1BB a été suggérée, mais sans confirmation définitive (Walker, 2009).

3. Les voies de signalisation intracellulaire : TRAF-6

Les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans cette résistance semblent converger vers Cbl-b et TRAF6 puisque les Treg issus de souris Cbl-b^{-/-} et TRAF6^{-/-} sont résistants à la suppression, et cela conduit à l'apparition d'un syndrome auto-immun (King et al., 2006). La caractéristique commune de ces deux souris est une suractivation de la voie PI3K/Akt (Wohlfert and Clark, 2007).

L'ensemble de ces données converge pour montrer qu'en situation inflammatoire en présence d'un pathogène il existe une activation TLR forte accompagnée d'une production de cytokines proinflammatoires induisant des modifications de l'expression des signaux de co-stimulation et de récepteur membranaire de la famille du TNF (4-1BB, GITR, OX 40) favorisant la réponse Tconv en mettant en échec l'action des Treg (Walker, 2009).

Figure 3: mode d'action des Treg



Shéma représentant les principaux modes d'action des Treg. Les mécanismes directs impliquent l'inhibition des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 par CTLA-4 ou l'inhibition du CMH-II par LAG-3. Les CD73 et CD39 métabolisent l'ATP extra-cellulaire en adénosine qui inhibe la prolifération Tconv. La mort des Tconv peut être induite par le CD95 et leur lyse peut être provoquée par le granzyme et la perforine. Les mécanismes indirects impliquent la production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL-35 ou le TGFβ, qui en plus peuvent induire la conversion Tconv en iTreg. De plus, le CD25 provoque une déplétion en IL-2 en la « consommant ». Les mécanismes indirects impliquent aussi la CPA. L'activation de celle-ci peut être inhibée par le CTLA-4, LAG-3 ou le TGFβ. De plus, la CPA peut être détruite par les enzymes cytotoxiques. Enfin le CTLA-4 peut induire la production d'IDO, elle-même responsable d'une baisse du tryptophane indispensable au métabolisme des Tconv.

Jusqu'à présent nous avons décrit le phénotype et les mécanismes d'actions Treg. En abordant les mécanismes d'action des Treg nous avons vu que l'environnement cytokinique pouvait induire des Treg. Dans cette partie, nous allons donc décrire l'ontogénie des Treg et ainsi distinguer 2 grands types de Treg: les Treg induits ou iTreg issus de la conversion

périphérique de Tconv et les Treg naturels (nTreg) issus du thymus fonctionnellement matures et suppresseurs.

A. Ontogénie des Treg en périphérie : les Treg induits

La génération périphérique de Treg a été suggérée pour la première fois par Waldmann en (Qin et al., 1993). Dans ces travaux, les animaux de fond génétique A, rendus tolérants à une greffe B (par un traitement avec des anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 non déplétants, suite à la mise en place de la greffe B) sont capables d'accepter une greffe issue d'animaux de fond génétique B x C. Ces animaux sont même capables, à terme, d'accepter une greffe issue d'animaux de fond génétique C exclusivement.

Ces travaux montrent que les cellules tolérantes pour la greffe B (chez l'animal de fond génétique A) ont rendu l'animal également tolérant à la greffe C, par un mécanisme supposé de transfert de tolérance. Ce phénomène de tolérance induite par le transfert cellulaire est appelé tolérance infectieuse, une population lymphocytaire transfère la tolérance à une autre.

1. L'importance de l'IL-10 et de l'IL-35 dans l'induction des Treg FoxP3

Comme nous l'avons vu précédemment *in vitro* l'IL-10 permet d'induire une population cellulaire immuno-suppressive à partir de T naïfs humains ou murins ayant la capacité d'inhiber la prolifération des Tconv. *In vivo*, chez la souris, cette population, caractérisée par la sécrétion de quantités importantes d'IL-10, est capable de prévenir la survenue d'une colite (Groux et al., 1997). Cette population présente des caractéristiques phénotypiques communes avec les nTreg mais n'exprime pas le FoxP3 (Vieira et al., 2004). Cette population a été nommée population Tr1.

Très récemment, Vignali et al. ont identifié une autre sous population de iTreg qu'il appelle iTreg35. En effet, ils montrent que l'IL-35 induit à la fois chez l'homme et la souris la conversion périphérique de Tconv en Treg et que ces iTreg inhibent la prolifération cellulaire grâce à l'IL-35 et ce indépendamment de l'IL-10 ou du TGF- β . De plus, ces iTreg35 n'expriment pas FoxP3 (Collison et al., 2010).

2. Treg induits FoxP3⁺ et le TGFβ

L'induction de Treg FoxP3⁺ a été montrée par l'apparition de cellules T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, chez un receveur lymphopénique ayant reçu des cellules T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ (Curotto de Lafaille et al., 2004). *In vivo*, l'induction de Treg FoxP3⁺ est observée dans différentes conditions expérimentales comme l'administration orale (Coombes et al., 2007) ou des situations inflammatoires chroniques (Curotto de Lafaille et al., 2008). Ces conditions expérimentales ont en commun la faible intensité de niveau de stimulation du signal TCR et/ou l'absence de signal de costimulation.

Les travaux expérimentaux menés *in vitro* et *in vivo* ont montré le rôle indispensable de la stimulation antigénique TCR, de la co-stimulation par le CD28 et la présence du TGFβ pour l'induction de Treg FoxP3⁺ (Chen et al., 2003). L'importance de TGF-β dans l'induction des Treg et dans leur production cytokinique a conduit à isoler cette population comme une population régulatrice distincte Th-3. Pour autant, d'authentiques Treg FoxP3⁺ peuvent être induits indépendamment du TGF-β (Schallenberg et al., 2010) ce pourquoi nous préférons nommer la population lymphocytaire T régulatrice induite FoxP3⁺ : iTreg FoxP3⁺.

Une fois induits, les iTreg FOXP3⁺ ne peuvent survivre en l'absence d'IL-2 (Curotto de Lafaille et al., 2004). Les iTreg FoxP3⁺ et nTreg sont donc très proches phénotypiquement même si le profil transcriptionnel de ces cellules est différent (Hill et al., 2007). Cette distinction pourrait être facilitée par l'identification récente d'Helios, un facteur de transcription de la famille Ikaros, qui serait exprimé exclusivement par les nTreg et non par les Treg induits *in vitro* (Thornton et al., 2010). En plus de leur phénotype iTreg FoxP3⁺ et nTreg différent par leur propriétés.

A la différence des nTreg les iTreg FoxP3⁺ seraient moins immunosuppresseurs et auraient un répertoire moins autoréactifs (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). En particulier l'expression de FoxP3 est instable chez les Treg induits du fait d'une démethylation incomplète de la région TSDR (Treg-cell specific Demethylated Region) du gène *foxp3*. Ceci conduit à une perte de l'expression de Foxp3 en cas de re-stimulation de ces cellules en absence de TGF-β ou de transfert de ces cellules à des souris lymphopéniques (Baron et al., 2007). Enfin des travaux récents suggèrent que les nTreg à la différence des iTreg sont dépendant du TNF-α pour leur fonction suppressive *in vivo* (Housley et al., 2011). Il existe des relations étroites entre nTreg et iTreg FoxP3⁺ puisque ces derniers peuvent être induits par les nTreg (Andersson et al., 2008) selon le principe de tolérance infectieuse décrit précédemment.

Pour conclure ce paragraphe il faut souligner, comme nous l'avons vu plus haut, la « plasticité » des iTreg qui peuvent à tout moment, selon leur environnement, retourner à l'état Tconv rendant leurs propriétés immunosuppressives *in vivo* moins évidente qu'*in vitro*. Ainsi les nTreg restent à ce jour les « spécialistes » du maintien de la tolérance périphérique car ils ont été conçus pour en être les gardiens.

3. L'importance des DC dans l'induction des Treg

Les DC jouent un rôle clef dans l'induction des Treg outre le fait que les DC soient capables de migrer dans le thymus et de participer à la maturation des nTreg (Bonasio et al., 2006)(cf ci après).

Les DC pour activer les Tconv doivent être matures. Le passage à la maturation implique des signaux de « danger » comme les PAMPS ou DAMBS reconnu par les TLR ou NLR (NOD like receptor). Cette maturation permet à la DC de sur-exprimer le CMH-II mais aussi les molécules de co-stimulation comme CD40, CD80, CD86, OX40L et ICOSL (inducible T cell co-stimulator ligand) et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 et IL-18 (Banchereau et al., 2000). L'ensemble de cette maturation conduit aux 3 signaux indispensables à l'activation des Tconv : (1) Activation TCR (CMH II + peptide) ; (2) signaux de costimulation ; (3) les cytokines. C'est le défaut du 2^{ème} ou 3^{ème} signal qui induirait les Treg.

Le récepteur DEC 205 est un récepteur spécifique des DC. Le couplage d'un antigène à un Ac monoclonal anti DEC 205 permet *in vivo* le ciblage spécifique des DC et la présentation de l'antigène couplé sans activer la DC. Ces expériences ont été menées avec de l'antigène ovalbumine et ont montré une induction de la tolérance pour cette antigène secondaire à l'induction de iTreg (Bonifaz et al., 2002).

La tolérance peut être aussi induite comme nous l'avons vu *in vivo* par l'administration orale d'antigène qui induit des iTreg dans la lamina propria du tube digestif (Siddiqui and Powrie, 2008). Du tube digestif ces iTreg sont capables de migrer dans les ganglions mésentériques grâce à l'intégrine CCR7. De la même façon que le tube digestif, d'autres tissus exposés aux antigènes environnementaux sont le siège de l'induction d'iTreg comme le poumon (Bakocevic et al., 2010) ou la peau (Guilliams et al., 2010). A l'état physiologique, l'acide rétinoïque (peau, tube digestif) (Rimoldi et al., 2005), la vitamine D3 (peau) (Mora et al., 2008), et le TGF β (poumon) (Li et al., 2008a) ont un rôle déterminant dans l'induction des iTreg.

Dans des situations pathologiques comme les infections ou le cancer, l'agent pathogène ou la tumeur sont capables d'induire des iTreg grâce à l'intermédiaire des DC (pour revue (Maldonado et al., 2010)).

L'ensemble de ces données montre l'importance des DC dans la formation des iTreg et nous allons voir quels mécanismes sont impliqués.

Nous avons vu l'importance de l'IL-10 dans l'induction des iTreg et dans les propriétés immunosuppressives des Treg. Les DC tolérogènes produisent de l'IL-10 (Akbari et al., 2001). IL-10 qui elle-même peut être produite par les iTreg jouant ainsi une réelle boucle d'amplification (Scott-Browne et al., 2007).

L'importance de la production du TGF β par les DC dans l'induction des iTreg reste débattue (Travis et al., 2007).

D'autres molécules impliquées dans l'induction des iTreg sont exprimées par les DC. L'immunoglobulin-like transcript receptors (ILT), exprimés à la surface des DC sont impliqués dans la genèse de iTreg (Gregori et al., 2010). PD-L1 et 2 (programmed death ligand) sont exprimés à la surface des DC et contribuent à la formation des iTreg (Keir et al., 2007).

Enfin les DC produisent IDO une enzyme régulant l'abondance du tryptophane et du monoxyde de carbone (CO) dans l'environnement cellulaire. La production d'IDO diminue la concentration de ces 2 paramètres compromet la survie des Tconv et favorise l'induction des Treg (Curti et al., 2009).

B. Ontogénie des Treg dans le compartiment central thymique : les Treg naturels

A l'opposé des Treg induits se trouvent les Treg naturels qui naissent dans le thymus en sortant pleinement fonctionnels.

1. L'origine thymique des Treg

Comme nous l'avons vu, la thymectomie dans les 3 premiers jours de la vie s'accompagne de manifestations auto-immunes létales, ce qui suggère l'origine thymique des cellules T régulatrices (Nishizuka and Sakakura, 1969). Des preuves plus directes de l'origine thymique des Treg et de leur persistance en périphérie ont été apportées par les expériences de transfert de cellules thymiques ou T périphériques dépourvues de $CD4^+CD25^+$ à ces souris immunodéficientes. Dans ces expériences les souris receveuses présentent des manifestations auto-immunes létales, alors que le transfert des ces cellules T de $CD4^+CD25^+$ les préviennent (Itoh et al., 1999; Sakaguchi et al., 1995). Effectivement, il sera montré ultérieurement que les cellules T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ sont détectables en périphérie à partir du 3^{ème} jour de vie (Fontenot et al., 2005a; Lahl et al., 2007) en accord avec les résultats expérimentaux de thymectomie dans les 3 premiers jours de vie.

2. Les nTreg sont-ils issus du cortex ou de la médullaire thymique ?

En 2005, l'équipe de Rudensky développe un modèle murin de souris Knock in FoxP3 GFP, permettant de suivre l'apparition des Treg FoxP3 dans les tissus grâce la signalisation des cellules FoxP3⁺ par une protéine à la fluorescence verte (Fontenot et al., 2005a). Ce modèle va permettre de montrer que l'apparition de FoxP3 a principalement lieu du compartiments des thymocytes $CD4^+$ simple positif par opposition aux cellules plus immatures double positives $CD4^+CD8^+$. Ce type d'approche va permettre de mieux apprécier le lieu de naissance dans le thymus des nTreg, même si comme nous allons le voir la question n'est pas encore à ce jour résolue.

Plusieurs travaux suggèrent que c'est dans la médullaire thymique que l'ontogénie des nTreg a lieu (Jordan et al., 2001). En particulier un travail récent souligne l'importance de AIRE dans la genèse des nTreg dans la médullaire thymique. Dans ces travaux, les auteurs observent une diminution significative des nTreg au contact des cellules médullaire thymique CMH-II négative alors qu'à l'inverse, un grand nombre de nTreg est présent au contact des cellules CMH-II positive (Aschenbrenner et al., 2007).

De plus, il a récemment été montré que TSLP (*thymic stromal-derived lymphopoietin*) produit dans la région médullaire thymique est déterminant pour le développement des nTreg (Jiang et al., 2006).

Cependant, des travaux montrent que la médullaire thymique n'est pas indispensable au développement des nTreg. Dans ses travaux Rudensky et al. montrent en effet que

l'expression du CMH-II restreinte uniquement aux cellules épithéliales thymiques corticales ou le blocage des signaux pour la migration des thymocytes corticaux vers la médullaire ne s'accompagne pas d'une baisse de la production de nTreg.

A cet égard, il faut souligner que chez l'homme, il existe dans le cortex thymique une structure anatomique particulière nommée : les corpuscules de Hassall. Ceux-ci ont en particulier un rôle dans l'élimination des thymocytes apoptotiques. Récemment, il a été montré que ces structures étaient aussi capables de produire TSLP et de fait induisaient la différenciation des nTreg en activant les DC thymiques (Watanabe et al., 2005). Cependant, si le cortex thymique peut à lui seul générer des nTreg, comment est-il capable de présenter l'immense diversité antigénique dépendante de AIRE indispensable à la génération des nTreg puisque AIRE est principalement exprimé par les cellules épithéliales médullaires ?

Cette question a été en partie résolue par l'observation de DC thymiques circulantes de la médullaire thymique, où règne un renouvellement cellulaire très important. La mobilité de ces DC thymiques leur permet de présenter des antigènes « médullaires » (sous la dépendance d'AIRE) dans le cortex thymique (Gray et al., 2007).

Ainsi, à la fois la médullaire lieu de sélection négative (élimination des lymphocytes autoréactifs) et le cortex thymique (lieu de la sélection positive) semblent capables isolément de donner naissance aux nTreg. Le rôle de chacun reste donc encore à définir.

3. A quel stade débute la différenciation Treg ?

La question concernant le moment de l'engagement dans la voie de différenciation nTreg reste encore sans réponse. La différenciation est-elle déjà engagée avant toute stimulation du TCR ou est-elle sous la dépendance de l'intensité et/ou de la qualité du signal TCR ?

En tant que T, le développement des nTreg comme celui des Tconv est soumis à la reconnaissance du complexe CMH-peptide, par le TCR. A ce titre Caton et al. ont montré que les Treg sont sélectionnés selon leur forte affinité vis-à-vis de leur antigène cognitif (Simons et al., 2010). La fenêtre de sélection des Treg se trouverait entre la sélection positive en Tconv, et la délétion clonale (Jordan et al., 2001). Les travaux menés chez les souris double transgéniques: TCR spécifique de l'antigène A dont l'expression transgénique de l'antigène A est ubiquitaire ou sous la dépendance d'un promoteur tissu spécifique (souris appelée TCR-A x A) ont renforcé cette hypothèse. En effet, la présence spécifique de l'antigène A dans le

thymus, chez une souris transgénique exprimant un TCR spécifique de A, entraîne une apparition accrue de Treg CD25⁺ anti-A (D'Cruz and Klein, 2005). De même l'injection intrathymique de lentivirus codant pour HA dans des souris TCR-HA augmente la sélection des Treg (Marodon et al., 2006).

Si la forte affinité TCR-CMH-peptide est déterminante pour la différenciation nTreg, alors le répertoire nTreg doit être particulièrement orienté vers une gamme d'antigènes du soi. Ceci a été suggéré par l'expérience suivante. Des Tconv sont transduits avec différentes chaînes α de TCR provenant de Treg ou de Tconv. Si le TCR provient d'un Treg, la cellule transduite prolifère fortement *in vivo* et induit une auto-immunité, ce qui n'est pas le cas si le nouveau TCR provient d'un Tconv (Hsieh et al., 2006). Cependant, le biais auto-réactif du répertoire nTreg est remise en cause. Des travaux réalisés chez la souris où la chaîne β du TCR était fixée, alors que la chaîne α pouvait être librement réarrangée, ont montré qu'il n'existait pas de différence de répertoire entre nTreg et Tconv (Pacholczyk et al., 2006). De même l'analyse de la spécificité antigénique d'une centaine de TCR différents de nTreg et Tconv ne montre pas de différence notable et en particulier de biais autoréactif du répertoire nTreg (Pacholczyk et al., 2007). Effectivement, il a pu être montré que les Treg étaient capables de reconnaître un large répertoire d'antigènes infectieux (Pacholczyk et al., 2007).

Si à ce jour les différences précises de répertoire entre nTreg et Tconv restent encore à préciser les données récentes sus-citées remettent en cause le répertoire auto-réactif des nTreg et donc indirectement leur ontogénie « TCR induite ».

Effectivement, en montrant, dans un modèle double transgénique, qu'en nombre absolu, il n'y a pas plus de Treg générés en présence de leur antigène spécifique qu'en absence de celui-ci, Diane Mattis suggère que la sélection positive ne serait pas augmentée par la reconnaissance spécifique de l'antigène cognitif dans le thymus. Elle pense plutôt que les Treg échapperaient à la sélection négative, contrairement aux Tconv (van Santen et al., 2004). Dans ce sens, des données montrent que les nTreg sont résistants aux signaux apoptotiques en particulier grâce à l'expression du GITR (Tuovinen et al., 2008) ou à l'expression de Bc-12. Dans le même ordre d'idée, d'autres travaux montrent une diminution de facteur pro-apoptotique comme Bim dans les Treg thymiques (Pandiyan et Lenardo, 2008). Ainsi, ces résultats suggèrent que la différenciation nTreg existerait en amont du signal TCR. Ce postulat est renforcé par des travaux récents suggérant que la différenciation nTreg est engagée en amont de l'activation du signal TCR et qu'une stimulation faible du TCR suffit pour la survie des nTreg dans le thymus (Pennington et al., 2006; van Santen et al., 2004). L'ensemble de ces données plaide pour un engagement dans la différenciation nTreg en

amont du signal TCR. Pour autant, ce signal reste indispensable à la différenciation TCR. (Pennington et al., 2006).

4. Le rôle du TCR dans la différenciation Treg

Que l'induction de signaux TCR soit déterminante ou non pour la décision d'engagement dans la voie de différenciation en nTreg, il n'en reste pas moins que cette voie de signalisation est indispensable à la genèse des nTreg. En effet, le TCR est composé de 2 polypeptides (chaînes α et β) exprimés dès le stade double positif. Seul, le TCR est incapable de transmettre des signaux intracellulaires après son activation extracellulaire. C'est le complexe CD3 qui a cette fonction. Ce complexe CD3 est composé de 4 chaînes ($\epsilon, \gamma, \delta, \zeta$) ayant chacune des motifs ITAM (immunotyrosine activation motifs) capables d'être phosphorylés afin de recruter des molécules nécessaires à la signalisation d'aval. Sans ces motifs ITAM, on observe une perte de la sélection négative des T autoréactifs. Pour autant, le rôle des domaines ITAM dans l'ontogénie des nTreg reste à préciser (Holst et al., 2008). En plus l'importance de la signalisation par le CD3 et les domaines ITAM des différentes chaînes du complexe d'autres molécules de signalisation d'aval comme LAT, ZAP 70, sont impliquées dans l'ontogénie (Zhang et al., 1998; Koonpaew et al., 2006) puisque leur inhibition abroge la production de Treg.

5. Molécules de co-stimulation et STAT-5 au cours de l'ontogénie des Treg

Les signaux de co-stimulation jouent aussi un rôle déterminant dans le développement des nTreg. En particulier la délétion du CD28 et/ou de son ligand CD80/86 s'accompagne d'une diminution drastique du nombre de nTreg (Salomon et al., 2000; Tang et al., 2003).

Comme nous le verrons ultérieurement, l'IL-2 est déterminante pour la survie des Treg. Dans le thymus, l'absence d'IL-2 ou la délétion de son récepteur s'accompagne d'une réduction du nombre de nTreg soulignant ainsi l'importance de l'IL-2 et de la voie de signalisation d'aval STAT-5 dans l'ontogénie (Burchill et al., 2007; D'Cruz and Klein, 2005).

Cependant, dans ces travaux la production de nTreg n'est diminuée que de 50%. Ce déficit est modéré car il existe une redondance du signal induit par une autre cytokine dite « γ c», l'IL-15, qui se fixe, comme l'IL-2, au dimère CD122-CD132 (respectivement les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2) (Pandiyani and Lenardo, 2008). Chez les souris invalidées pour le gène de la chaîne β du récepteur à l'IL-2 (CD122^{-/-}), on ne retrouve que très peu de Treg dans le thymus (Malek et al., 2002). De plus, les souris déficientes à la fois pour l'IL-2 et l'IL-15 ont un déficit complet en Treg (Vang et al., 2008). L'activation de la voie induite

par la signalisation par CD122-CD132 induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT-5. De fait, les souris STAT-5b^{-/-} présentent un déficit complet en Treg à la périphérie (Yao et al., 2007), alors que l'expression forcée de STAT-5 dans les souris CD122^{-/-} restaure l'expression de FoxP3 et un nombre normal de Treg (Burchill et al., 2007). En effet, la fixation de STAT-5 sur le promoteur du gène *foxp3* est indispensable à sa transcription.

En se fondant sur ces travaux, il a été proposé une théorie où le développement des Treg aurait lieu en 2 étapes, la reconnaissance de peptide de haute affinité par le TCR induirait une augmentation de l'expression du CD25 permettant le sauvetage de ces cellules par l'intermédiaire de l'activation de STAT5. En se fixant, l'IL-2 induit la phosphorylation de STAT-5 permettant ainsi la poursuite de la différenciation nTreg en activant FoxP3 (Lio and Hsieh, 2008).

En plus de l'IL-2 et l'IL-15, le TGFβ semble jouer aussi un rôle déterminant dans l'ontogénie nTreg. En effet la délétion du TGFβ récepteur 1 s'accompagne d'une réduction importante des nTreg thymiques entre le 3 et 5^{ème} jour de vie. Cependant, cette diminution n'est que transitoire car elle est rapidement compensée par une augmentation de l'IL-2. Mais l'absence combinée d'IL-2 et de TGFβ s'accompagne d'une absence de nTreg (Liu et al., 2008).

4^e PARTIE. LES LYMPHOCYTES TREGULATEURS :

FONCTIONS et HOMEOSTASIE

Dans la précédente partie nous avons défini ce qu'étaient les Treg (nTreg et iTreg), leurs caractéristiques, leur ontogénie et leurs modes d'action. Dans cette partie nous allons aborder leurs fonctions physiologiques et comment celles-ci se mettent en place dans le système immunitaire.

I. Les fonctions régulatrices des Treg

Les lymphocytes T régulateurs tirent leur nom de leur fonction. Ils régulent les réponses immunitaires adaptatives.

A. Régulation de l'auto-immunité à l'état basal:

La première expérience à réaliser pour définir l'importance d'un élément dans un organisme à l'état d'équilibre est d'observer l'effet de son ablation. Comme nous l'avons vu précédemment, l'absence de Treg chez la souris *scurfy* (présentant une mutation invalidante pour *FoxP3*) ou thymectomisée en période néonatale, s'accompagne d'un syndrome auto-immun léthal touchant plusieurs organes (Brunkow et al., 2001). De même, chez l'enfant souffrant d'un déficit congénital en Treg secondaire à une mutation sur le gène FOXP3, il apparaît là encore des manifestations auto-immunes létales associant une colite, une dermatite, un diabète insulino-dépendant, une thyroïdite, et une anémie hémolytique (Bennett et al., 2001).

Il faut souligner que dans ces "modèles" tous les organes ne sont pas la cible d'attaques auto-immunes. Cependant le transfert de Tconv de souris *scurfy* à des souris immunodéprimées RAG^{-/-} s'accompagne d'un plus grand nombre d'atteinte tissulaires notamment musculaire (Sharma et al., 2007). Ce résultat montre que les Treg contrôlent un très large répertoire de T auto-réactifs et que les différences observées dans les expériences précédentes sont liées aux conditions expérimentales.

Ces modèles ont comme limite un déficit congénital en Treg dans un système immunitaire “immature”. Il a notamment été proposé que l’auto-immunité de ces souris était plutôt due à la prolifération homéostatique des Tconv qu’ un défaut de régulation à l’homéostasie (Chang et al., 2008).

La déplétion complète des Treg à l’âge adulte ne peut être observée qu’au cours de modèles expérimentaux animaux. Chez la souris FoxP3^{DTR} (Diphtheria Toxin Receptor, pour récepteur de la toxine diphtérique) toutes les cellules FoxP3⁺, donc toutes les cellules à potentiel régulateur, expriment le récepteur à la toxine diphtérique. Ainsi l’injection de cette drogue provoque une déplétion spécifique et complète des Treg (Kim et al., 2007). Dès 48h après le traitement, on constate déjà une suractivation des Tconv. Les manifestations auto-immunes sont mêmes plus graves chez la souris adulte. L’hypothèse proposée par les auteurs est que le compartiment T est plus développé à l’âge adulte que chez le souriceau nouveau-né, ce qui implique plus de lymphocytes T auto-réactifs. Cet effet est bien dû à un défaut de régulation par les Treg naturels et non à une toxicité tissulaire de la toxine diphtérique puisque l’injection de Treg de souris WT prévient l’apparition du syndrome auto-immun (Kim et al., 2009).

Etant donné que les Treg dépendent de l’IL-2 pour leur survie, la neutralisation de l’IL-2 par un anticorps neutralisant réduit spécifiquement le nombre de Treg chez des souris sauvages. Ces expériences menées chez la souris ont pour conséquence l’apparition de symptômes d’auto-immunité dans les trois mois suivant le traitement (Setoguchi et al., 2005).

Dans des situations expérimentales « plus physiologiques » de modèles spontanés (modèle de diabète : Souris NOD, modèle de lupus : Souris NZW) ou provoquées de maladies auto-immunes (Modèles de sclérose en plaques : Encéphalite expérimentale auto-immune ou de modèle de polyarthrite rhumatoïde d’arthrite à collagène), il a aussi été montré le rôle central des Treg. Dans ces modèles la déplétion en Treg aggrave la maladie auto-immune et le transfert en Treg en diminue la sévérité (Sakaguchi et al., 1995; Frey et al., 2005 ; Szanya et al., 2002; Salomon et al., 2000). De même chez l’homme, il a pu être montré qu’un déficit quantitatif Treg ou qualitatif en Treg était observé dans de nombreuses pathologies auto-immunes comme le Lupus (Zhang et al., 2008), le syndrome de Guillain Barré (Chi et al., 2007) ou la sclérose en plaque (Viglietta et al., 2004).

B. Régulation de l'allo-immunité et la tolérance foeto maternelle

1. Le contrôle de l'allo-réactivité

En plus de contrôler les réponses auto-immunes, les Treg jouent un rôle majeur dans la tolérance aux allo-antigènes. Cette notion a déjà été abordée précédemment au cours de la description du concept de la tolérance infectieuse. Nous rappelons que la tolérance induite des animaux de fond génétique A, pour une greffe B permet aussi d'accepter une greffe issue d'animaux de fond génétique B x C (Qin et al., 1993). Ces mécanismes de tolérance impliquent les Treg.

En effet *in vitro*, les Treg alloréactifs, obtenus par culture avec des CPA allogéniques ou présentant des allo-antigènes, sont capables d'inhiber la prolifération de Tconv allogéniques (Taylor et al., 2001; Trenado et al., 2003). De plus le transfert de Treg allo-spécifiques permet de prévenir la maladie du greffon contre l'hôte induite par la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques.

En pratique clinique, ces observations ont permis d'envisager l'utilisation de Treg pour prévenir la GVH (maladie du greffon contre l'hôte) dans les protocoles d'allogreffe de moelle osseuse de patients leucémiques. Le premier essai de thérapie cellulaire avec des Treg (NCT00602693) vient d'être réalisé permettant effectivement de réduire l'incidence de la GVH (Brunstein et al., 2011). Ce type d'approche est aussi envisagé en transplantation d'organe solide afin de prévenir le rejet.

2. Le contrôle de la semi-alloréactivité: la tolérance foeto-maternelle

La grossesse est aussi une situation où le système immunitaire de l'hôte, la mère, est amené à tolérer des antigènes du non soi. Si à la différence d'une allogreffe certains antigènes maternels sont présents dans le fœtus, les autres antigènes fœtaux sont étrangers (paternels) créant une situation de « greffe semi-allogénique » comme en témoigne la présence de lymphocytes T « anti-fœtus » (Aluvihare et al., 2004). Il était de fait légitime pour les immunologistes de s'intéresser au rôle des Treg dans cette situation particulière.

L'importance du rôle des Treg a été montrée chez la souris gestante où l'on observe que l'élimination des Treg s'accompagne d'un taux anormalement élevé d'avortement de fœtus semi-allogéniques (Darrasse-Jeze et al., 2006). Effectivement chez l'homme et la souris, les Treg sont retrouvés en nombre croissant dans la membrane utérine (déciduale), pendant les deux premiers trimestres de grossesse (Heikkinen et al., 2004) et leur nombre

dans le sang décroît rapidement après l'accouchement (Darrasse-Jeze et al., 2006; Somerset et al., 2004). Il est intéressant de souligner que chez l'homme, on note un faible nombre de Treg dans les tissus foetaux avortés de façon spontanée, par rapport au nombre retrouvé dans les tissus avortés de façon provoquée (Sasaki et al., 2004). Pour autant, il existe d'autres mécanismes de tolérance materno-foetale que les Treg puisque leur déplétion ne s'accompagne pas de stérilité. La tolérance s'établit aussi (Tafari et al., 1995), grâce à une variété de défenses non spécifiques présentes à la surface du trophoblaste (comme Fas-L, HLA-G, etc... (Kanellopoulos-Langevin et al., 2003).

C. Régulation des réactions allergiques

L'étude du phénotype IPEX a non seulement montré des manifestations auto-immunes mais aussi allergiques soulignant ainsi leur rôle dans le contrôle des mécanismes allergiques. Les mécanismes allergiques et en particulier la maladie asthmatique sont une réaction hypersensibilité de Type 1 impliquant un engagement Th2 mais aussi Th-9 (Veldhoen et al., 2008; Vock et al., 2010). Au cours de l'allergie, il existe une production anormale d'IgE spécifiques se fixant sur les polynucléaires basophiles et les mastocytaires responsable des manifestations cliniques allergiques par l'intermédiaire de médiateurs de l'inflammation (Histamine, prostaglandine, leucotriènes).

Dans des modèles expérimentaux d'asthme, il a pu être montré que la maladie était contrôlée par le transfert de Treg (Kearley et al., 2008; McGee et al., 2009). Les Treg contrôlent les manifestations allergiques notamment en inhibant la synthèse d'IgE spécifiques (Curotto de Lafaille et al., 2001). L'ensemble de ces données souligne le rôle des Treg dans les manifestations allergiques.

D. Régulation des réponses anti-infectieuses

Les Treg contrôlent la réponse immunitaire et à ce titre ils peuvent participer à la fin ou l'entretien d'une réponse immunitaire anti-infectieuse. On perçoit donc immédiatement que cette arme à « double tranchant » peut être bénéfique ou néfaste selon les conditions physiopathologiques.

1. Le bénéfice des Treg au cours des réponses anti-infectieuses

En effet l'inflammation, bien que nécessaire à l'élimination de l'agent pathogène, peut être à elle seule délétère si elle n'est pas contrôlée et ce particulièrement dans des sites « fragiles ». C'est alors que les Treg peuvent jouer un rôle déterminant.

Des travaux expérimentaux chez la souris ont montré que les infections oculaires virales par le virus HSV-1 s'accompagnaient de lésions d'autant plus sévères que les Treg étaient éliminés et qu'à l'inverse l'injection de Treg en limitait le nombre (Suvas et al., 2004). De même la déplétion en Treg au cours d'infections vaginales par le virus HSV-1 est responsable de la mort de l'animal (Lund et al., 2008). Chez la souris, l'infection léthale par *Toxoplasma gondii* est associée une forte diminution IL-2 dépendante du nombre de Treg dans le ganglion drainant (Oldenhove et al., 2009). L'injection d'IL-2 exogène rétablit un nombre normal de Treg, diminue l'inflammation et prévient de la mort de l'animal. Enfin, les Treg seraient bénéfiques dans le maintien de la mémoire immunitaire anti-infectieuse en empêchant notamment l'élimination totale du parasite *Leishmania Major*, permettant ainsi la persistance de l'antigène à la périphérie et l'entretien d'une mémoire spécifique, protégeant ainsi contre une éventuelle réinfection (Belkaid et al., 2002).

2. Le rôle néfaste des Treg au cours des réponses anti-infectieuses

Dans d'autres cas, les Treg favorisent la sévérité de l'infection ou empêchent l'élimination du pathogène.

Ce type d'effet délétère peut être observé au cours de l'infection par le plasmodium ou les Treg, en diminuant la réponse Th1 antiparasitaire, limitent son élimination (Walther et al., 2005). Chez la souris, l'élimination préventive des Treg s'accompagne d'une baisse drastique du nombre de colonies de *Mycobacterium tuberculosis* après inhalation d'un inoculum bactérien (Scott-Browne et al., 2007). De même, les Treg peuvent favoriser le passage à la chronicité des infections virales de l'hépatite B ou C (Belkaid and Tarbell, 2009; Dolganiuc and Szabo, 2008).

Ainsi, les effets des Treg au cours des infections sont ambigus et comme cela est bien illustré au cours de l'infection par le VIH. Les Treg inhibent les réponses anti-HIV, ce qui favorise l'expansion du virus (Aandahl et al., 2004; Eggena et al., 2005). Mais en limitant cette activation, ils évitent l'épuisement du système immunitaire et l'exacerbation de l'inflammation (Kinter et al., 2004).

Dans ce chapitre, il est nécessaire d'aborder les implications de ces phénomènes sur la réponse immunitaire contre les particules virales utilisées dans les stratégies vaccinales. Les effets délétères peuvent aussi être observés au cours de la vaccination. Un travail récent étudiant la réponse post-vaccinale contre le Human Papilloma Virus (Gardasil) à montré que l'élévation du taux de Treg était significativement corrélée au taux d'échec (Welters et al., 2010).

E. Régulation des réponses anti-tumorales

La cellule tumorale maligne est issue d'une cellule du soi qui acquiert à la faveur d'évènements oncogènes des propriétés cancéreuses (immortalité, absence de régulation de prolifération, perte d'inhibition de contact...). Ces nouvelles propriétés tumorales reposent sur un arsenal des protéines variantes (antigènes tumoraux) n'appartenant plus au soi. Comment concevoir alors la propagation d'un cancer sans évoquer la "complicité" des mécanismes de tolérance périphérique et donc des Treg ?

Effectivement, la déplétion des Treg juste avant l'implantation de cellules tumorales, permet d'en limiter la croissance et même d'induire leur rejet (Onizuka et al., 1999). A l'inverse, l'injection de Treg spécifiques d'antigènes tumoraux accélère la croissance des tumeurs et l'apparition de métastases (Nishikawa et al., 2005).

En effet, la croissance tumorale s'accompagne d'une accumulation intra-tumorale de Treg, et dans les ganglions drainants et le sang, chez la souris (Darrasse-Jeze et al., 2009a) et l'homme (Wolf et al., 2003). Cette accumulation de Treg limite ainsi l'élimination par les T anti-tumoraux des cellules cancéreuses. De plus, il existe une corrélation négative entre le pourcentage de Treg intra tumoraux et la survie des patients (Hiraoka et al., 2006). Les Treg seraient attirés par la tumeur sous la dépendance de chimiokine telles que CCL22 (Curiel et al., 2004) et CCL5 (Tan et al., 2009) où ils exerceraient des mécanismes d'inhibition via l'IL-10, le TGF- β (Erdman et al., 2005; Yu et al., 2005b) ou IDO (Witkiewicz et al., 2008).

Cependant pourquoi les Tconv anti-tumoraux sont ils incapables d'éradiquer la tumeur avant même que des mécanismes de tolérance ne se mettent en place ?

Des travaux récents proposent que la compétition de la tolérance versus l'élimination tumorale se jouerait dans les tous premiers jours du développement tumoral. Dans cette course, les Treg auraient l'avantage de leur biais de répertoire auto-réactifs. En effet, l'important partage antigénique entre les antigènes tumoraux et du soi favoriserait la division et l'activation précoce des Treg « activés-mémoires » pour permettre l'établissement de

l'immunité anti-tumorale avant que la réponse effectrice mettant en jeu des Tconv au répertoire moins auto-réactif ne puisse se monter (Darrasse-Jeze et al., 2009a). Pour autant, l'effet de déplétion en Treg sur la croissance tumorale est variable selon la lignée murine et tumorale avec des résultats souvent partiels. Ces données soulignent que si les Treg jouent un rôle important dans la croissance tumorale, il existe aussi de nombreux autres mécanismes immuns impliqués dans la tolérance tumorale (pour revue (Du and Wang, 2011)).

II. Treg et homéostasie : « l'auto-immune surveillance »

Après avoir décrit les grandes fonctions des Treg et leurs implications en situation pathologique, nous allons décrire les Treg dans un organisme à l'état physiologique et montrer comment ceux-ci exercent en permanence une veille immunitaire pour prévenir la survenue de manifestations auto-immunes en particulier. Pour cela nous allons aborder, pas à pas, le devenir d'un Treg à sa sortie du thymus jusque dans les tissus périphériques.

A. Treg à la sortie du thymus

Les Treg humains issus de sang de cordon sont remarquablement homogènes dans leur phénotype. Ils expriment de façon très majoritaire les marqueurs des T naïfs ($CD45RA^+CD62L^+CCR7^+$) (Fritzsching et al., 2006a; Seddiki et al., 2006b). Comme nous le verrons ultérieurement cette population est le reflet de la grande homogénéité phénotypique des Treg émergents du thymus. Cette observation contraste avec la très grande diversité phénotypique des Treg observée dans un organisme immunologiquement mature (Miyara et al., 2009). Ce contraste est le reflet des différents événements impliqués dans la « veille immunologique » que les Treg exercent en permanence. Nous allons voir comment la reconnaissance spécifique d'Ag par les Treg (activation TCR) au cours de immunosurveillance des nTreg à l'état physiologique conduit à la genèse d'une très grande variété de sous populations Treg ayant des fonctions, des phénotypes et des sites de résidence très différents.

B. L'importance du CD62L et CCR7 pour l'entrée dans le ganglion

Comme n'importe quels T, les Treg exercent leur fonction après la reconnaissance spécifique de leur antigène cognitif par leur TCR. Cette reconnaissance a lieu initialement dans les ganglions. A ce titre, les intégrines permettant l'adressage ganglionnaire ont un rôle

capital comme en témoigne la forte expression de ces molécules sur le Treg fraîchement sortis du thymus.

L'intégrine CD62L (L-Selectine) est une molécule cruciale pour la migration lymphocytaire T dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle permet leur entrée dans les ganglions lymphatiques. Les souris L-Sélectine KO ($CD62L^{-/-}$) ont effectivement une diminution drastique du nombre de nTreg comparée aux souris sauvages (Venturi et al., 2007) ce qui témoigne de l'importance de l'adressage et donc indirectement de l'activation ganglionnaire pour la survie des Treg. De plus, le transfert adoptif de nTreg $CD62L^{fort}$ est plus efficace pour prévenir la survenue d'une réaction allogénique comme la GVH (Szanya et al., 2002) ou autoimmune comme le diabète que le transfert d'une population Treg $CD62L^{faible}$ (Ermann et al., 2005). De même, le CCR7 récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, permettant aussi l'adressage ganglionnaire est aussi déterminant pour les fonctions régulatrices. Sans ce récepteur, les nTreg sont incapables de prévenir la survenue d'une colite (Schneider et al., 2007) ou le rejet d'un greffon d'îlots pancréatiques (Zhang et al., 2009).

Après activation, certains Treg perdent l'expression de CCR7 et acquièrent celle de CXCR5, ce qui leur permet de migrer vers les follicules B et d'inhiber l'initiation du *help* des Tconv sur les B dans les centres germinatifs (Lim et al., 2004). Cette inhibition de la réponse immune à l'endroit même où elle se déclenche est indispensable dans plusieurs modèles d'auto-immunité, et notamment le diabète (Tang et al., 2006) ou l'EAE (Korn et al., 2007b). Si ces expériences soulignent le rôle des intégrines et récepteurs aux chimiokines dans l'adressage ganglionnaire des Treg, elles introduisent aussi une notion que nous aborderons plus tard qui est l'importance de la colocalisation des Treg avec les Tconv, qu'ils sont supposés inhiber.

Nous verrons ultérieurement l'importance des intégrines dans les fonctions Treg. Dans le cas d'une maladie autoimmune évolutive, les Treg doivent exprimer les intégrines permettant leur migration dans le tissu cible de l'attaque autoimmune où ils exercent leur régulation. A l'inverse, au moment de l'initiation de la maladie auto-immune ce sont les Treg $CD62L^{Fort}$ qui préviennent sa progression en inhibant dans le ganglion la prolifération des Tconv auto réactifs.

C. L' anergique des Treg

Une fois dans le ganglion les Treg peuvent être amenés à rencontrer leurs antigènes cognitifs présentés par une CPA et donc à s'activer comme n'importe quel T. Cependant les conditions d'activation des Treg diffèrent de celles des Tconv.

Les premières études sur le comportement des Treg ont été faites *in vitro*, et ont toutes démontré que ces cellules étaient anergiques, c'est-à-dire qu'elles ne proliféraient pas suite à une stimulation de leur TCR, à la différence des Tconv. Le plus souvent, cette stimulation était faite par un anticorps anti-CD3. L'équipe de Shimon Sakaguchi est la première à mettre en évidence que les Treg étaient anergiques (Takahashi et al., 1998), observation confirmée ensuite dans de nombreuses autres études (Thornton et al. 1998; Kuniyasu et al., 2000; Nakamura et al., 2001). Pour autant, cette anergie peut être levée *in vitro* par l'ajout d'IL-2 que les Treg sont incapables de produire (Takahashi et al., 1998; Bensinger et al., 2001).

De même l'adjonction de signaux de costimulations est aussi capable de provoquer la division des Treg. Ceci peut être réalisé au moyen anticorps anti-CD28 et d'anti-CD3 agoniste (Nakamura et al., 2001; Takahashi et al., 1998) ou plus physiologiquement grâce à l'ajout de DC au milieu de culture (Yamazaki et al., 2003). Ces observations soulignent l'importance de l'IL-2, qu'elle soit ajoutée aux cultures ou produite par d'autres cellules, pour permettre la levée d'anergie des Treg. Nous reviendrons ultérieurement sur l'importance de l'IL-2 dans l'homéostasie des Treg.

En fait nous allons voir que les observations *in vivo* montrant une activation des Treg intense contraste avec l'anergie observée *in vitro*.

D. Prolifération des Treg ganglionnaires à l'homéostasie *in vivo*

A l'état basal, on observe dans les ganglions qu'il existe au moins 2 populations de Treg. L'une activée, présentant à leur membrane des marqueurs activation comme le CD44^{fort} suggérant qu'ils ont déjà rencontré leur antigène cognitif (Lee et al., 2007; Huehn et al., 2004), l'autre présentant un phénotype naïf. De plus, cette distinction est corrélée à des propriétés homéostatiques différentes. Les Treg activés ont un niveau de prolifération supérieure (Min et al., 2007) aux Treg naïfs.

Les expériences menées chez les animaux double transgéniques exprimant un TCR transgénique spécifique ainsi que l'antigène cognitif a permis d'éclairer ce phénomène. Les

Treg anti-HA ou anti-OVA transférés dans des souris exprimant HA ou OVA dans le pancréas, prolifèrent préférentiellement dans les ganglions pancréatiques, sans qu'il n'y ait d'inflammation. Cette prolifération est comparable à celle des Tconv (Fisson et al., 2003; Walker et al., 2003). Les mêmes observations ont été faites au cours d'expériences de transfert de Treg dans des souris immunisées avec leur antigène cognitif en présence de CFA ou avec des DC matures (Billiard et al., 2006; Klein et al., 2003; Yamazaki et al., 2003). La prolifération des Treg est encore plus forte dans ces conditions, mais ceci est probablement dû à la forte inflammation causée par l'immunisation.

Dans une situation plus physiologique chez la souris sauvage, des observations soulignent l'activation des Treg ganglionnaires à l'état basal. En effet, l'incorporation de BrdU (un agent intercalant de l'ADN) chez des souris BALB/c non manipulées montre qu'une fraction des Treg est en perpétuelle division et que cette fraction est caractérisée par la forte expression du marqueur d'activation CD44 (Fisson et al., 2003). Ces Treg, dits « Treg activés-mémoires » sont en division permanente du fait de leur auto-réactivité supposée (Darrasse-Jeze et al., 2009a).

La prolifération d'une population Treg à l'état homéostatique et donc l'activation du TCR des Treg a des conséquences fonctionnelles capitales car, comme nous l'avons vu, sans activation TCR, il n'existe pas de fonction suppressive.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent qu'une population de Treg auto-réactifs, à l'état basal, reconnaissent spécifiquement des antigènes du soi et de fait contrôlent de potentielles réponses auto-immunes orchestrées par leur homologues Tconv auto-réactifs. La démonstration de cette hypothèse a été faite dans le chapitre précédent en montrant les conséquences auto-immunes de la déplétion de Treg qui ne contrôlent plus les Tconv autoréactifs présents à l'état physiologique.

E. Treg naïfs et mémoires

Les observations faites chez la souris de l'activation permanente d'une population Treg a conduit à la distinction de plusieurs sous populations Treg chez l'homme.

1. Les Treg naïfs ou « au repos »

A l'état basal, on observe chez l'homme, une population Treg $CD4^+CD25^+CD45RA^+FOXP3^{faible}$ qui, parce qu'elle exprime le RA, a été décrite comme

naïve (Miyara et al., 2009) par opposition à l'expression mutuellement exclusive du CD45RO caractéristique du phénotype mémoire (figure 4). Cependant, le marqueur CD45RA peut être réexprimé par des cellules activées (Brod et al., 1989). Pour autant, ces Treg expriment le CD31, un marqueur témoignant d'une origine thymique récente (Baecher-Allan et al., 2006; Ito et al., 2008). De plus, toutes les cellules T CD4⁺FoxP3⁺ sont CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺FoxP3^{faible} dans le sang de cordon maternel humain (Fritzsching et al., 2006b) soulignant que les nTreg émergeant du thymus sont aussi CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺FoxP3^{faible}. L'absence de Ki67, un marqueur de prolifération, suggère que ces cellules sont au repos (Miyara et al., 2009). *In vitro* après stimulation TCR, ces cellules activées prolifèrent et sont résistantes à l'apoptose (Miyara et al., 2009). De plus *in vivo*, le transfert de ces cellules humaines dans des souris humanisées NOD/Shi-scid IL-2rg^{-/-} (NOG) s'accompagne d'une prolifération et de leur conversion en cellules TReg CD45RO⁺CD25^{fort}FoxP3^{fort}.

2. Treg effecteurs : CD45RO⁺CD25^{fort}FoxP3^{fort}

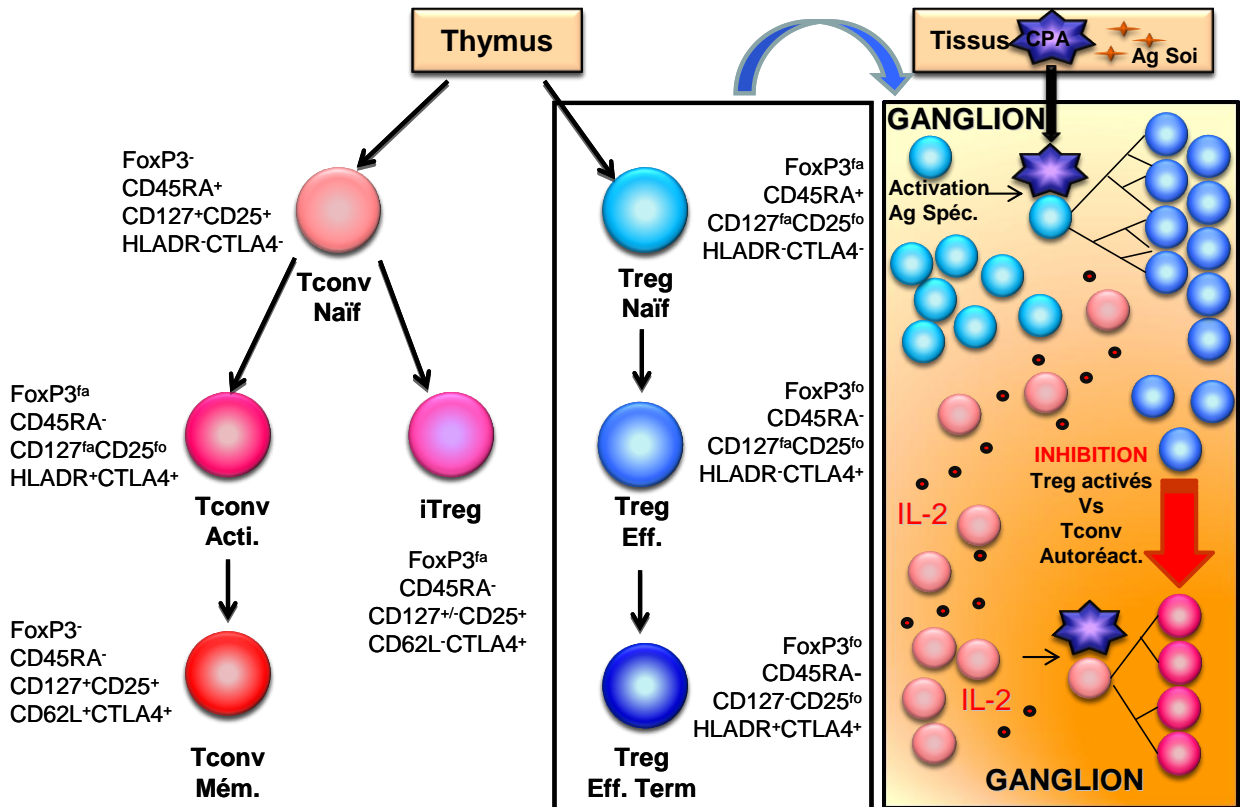
Une autre population a été identifiée à l'état de repos, les Treg CD45RO⁺CD25^{fort}FoxP3^{fort} qui semblent dériver de la précédente population naïve CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺FoxP3^{faible}. Ces cellules *in vitro* sont inhibitrices mais prolifèrent peu ou pas après stimulation TCR rendant compte du caractère anergique des Treg, initialement rapporté (Levings et al., 2001b; Jonuleit et al., 2001). De plus, *in vitro*, ces cellules après leur activation s'engagent dans l'apoptose (Fritzsching et al., 2005; Ashley and Baecher-Allan, 2009).

En plus de présenter des marqueurs d'activation comme le CD95 *in vivo*, ces cellules prolifèrent à fort niveau comme en témoigne l'importance du taux d'incorporation de glucose marqué (Vukmanovic-Stejić et al., 2006) ou l'importance du niveau d'expression du Ki67 (Miyara et al., 2009). Bien que ces cellules doivent être stimulées pour être activées, se diviser et être suppressives, l'ensemble de ces données suggèrent qu'à l'opposé des Treg naïfs, ces Treg sont effecteurs (Baecher-Allan et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001b). Effectivement, à l'opposé des Treg naïfs présents in utéro et dans le sang de cordon (Darrasse-Jeze et al., 2005), les Treg effecteurs sont principalement retrouvés à un taux important chez les personnes âgés (Miyara et al., 2009). Bien qu'elles expriment le CD45RO, un marqueur de T mémoire, la demi-vie de ces Treg ne semble pas particulièrement longue avec un renouvellement important suggérant qu'au terme de « Treg mémoire », le terme Treg

effecteur semble préférable. Au sein de cette population on distingue des sous populations témoignant de l'hétérogénéité de la population Treg effectrice.

Il existe des Treg effecteurs ICOS⁺ ayant la capacité de produire de l'IL-10 et de cibler les DC et des Treg ICOS⁻ qui produisent du TGFβ (Ito et al., 2008). De même, on distingue des Treg HLA-DR⁺ un marqueur d'activation qui représente un tiers des Treg effecteurs circulant dans le sang (Baecher-Allan et al., 2001) et qu'*ex vivo* ces cellules prolifèrent plus et ont des propriétés immunosuppressives supérieures aux Treg HLA-DR⁻ (Baecher-Allan et al., 2006). De plus *in vitro* l'activation des Treg DR⁻ permet la conversion en HLA-DR⁺ et confère les mêmes propriétés que les Treg effecteur HLA-DR⁺ obtenu *ex vivo*.

Figure 4 : Homéostasie des Treg



Les Tconv et nTreg sortent immatures du thymus et acquièrent un phénotype mémoire à la faveur après un statut effecteur du à l'activation de leur TCR. Sous certaines conditions les Tconv peuvent être converti en Treg induits iTreg. Les caractéristiques phénotypiques des différentes populations sont représentées. Le trafic cellulaire des Treg en périphérie est représenté dans le tissu périphérique dans le cadre à fond orange. On voit comment les Treg spécifiques peuvent s'activer et proliférer dans le ganglion, sous la dépendance de l'IL-2, après la rencontre avec leur antigène cognitif présenté par une CPA issu d'un tissu périphérique. Une fois activés ces Treg sont contôle l'activation et la prolifération de leurs homologues Tconv auto-réactifs.

F. Le rôle des cellules dendritiques dans l'homéostasie des Treg

1. L'influence des DC sur les Treg

Comme nous l'avons vu *in vitro*, l'anergie des Treg peut être levée par les DC en présence d'IL-2 exogène. Cependant, il faut souligner que celle si peut être levée seule par les DC (Yamazaki et al., 2003) en l'absence d'IL-2 exogène car les DC en produiraient

suffisamment, bien qu'en faible quantité (Granucci et al., 2001). *In vitro*, il a pu aussi être montré que la production de Treg allospécifiques au moyen de DC allogéniques permettait la protection de la GVH par le transfert de Treg allospécifiques (Cohen et al. 2004). *In vivo*, l'absence constitutive de DC s'accompagne du développement d'une auto-immunité léthale, due à une infiltration lymphocytaire massive des organes non lymphoïdes (Ohnmacht et al., 2009). Dans un autre modèle, la déplétion conditionnelle des DC par la toxine diphtérique, chez des souris adultes dont les DC expriment le récepteur à cette toxine (CD11c-DTR), conduit à une forte baisse du nombre et de la proportion de Treg (Darrasse-Jeze et al., 2009b).

Dans un modèle double transgénique où les Treg sont déplétés à l'âge adulte, au moyen de toxine diphtérique, de façon contemporaine aux DC, on observe que le transfert de Treg issus de souris sauvages n'est pas associé à une prolifération lymphocytaire T telle qu'elle est observée chez les animaux témoins (Suffner et al., 2010). D'autres données expérimentales montrent que la prolifération des Treg impliquant les DC est CMH-II dépendante (Gavin et al., 2002). Ces travaux montrent clairement que l'homéostasie des Treg dépend de la taille du compartiment Treg et ce dépendamment des DC.

Mais qu'en est-il de l'influence des Treg sur les DC ?

2. L'influence des Treg sur les DC

Nous avons vu précédemment comment les Treg pouvaient modifier l'état d'activation des DC. Des travaux expérimentaux montrent aussi que la déplétion en Treg augmente significativement le nombre des DC (Liu et al., 2009). Cependant ce dialogue « homéostatique » bidirectionnel reste encore à préciser puisque les travaux de Suffner ne montrent aucune modification du nombre des DC après la déplétion des Treg.

Nous rappelons ici l'importance des DC dans la genèse des Treg et dans leur mécanisme d'action.

III. Les molécules impliquées dans l'homéostasie et l'activité des Treg

A. Les cytokines et l'homéostasie des Treg

Les cytokines ayant en commun la chaîne γ ont un rôle déterminant dans l'homéostasie des Treg.

1. IL-2

L'IL-2 est connue depuis longtemps comme un facteur de croissance des T. Ajoutée au milieu culture, cette cytokine stimule leur croissance et leur expansion (Smith, 1988). Il était donc initialement inattendu d'envisager un rôle déterminant de l'IL-2 dans l'homéostasie des cellules immunorégulatrices.

Ce rôle a été d'emblée suggéré par le fait que les Treg étaient caractérisées par une forte expression du CD25 de la sous-unité α du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 et que l'anergie *in vitro* des Treg pouvait être levée par l'ajout d'IL-2 exogène (Thornton and Shevach, 1998). Plus tard, son rôle a été démontré par le phénotype des souris IL-2^{-/-} ou déficiente pour l'un de ces récepteur CD25 (chaîne α), ou CD122 (chaîne β) (Schorle et al., 1991 ; Willerford et al., 1995; Suzuki et al., 1995). Celui-ci est caractérisé par une lymphoprolifération associée à une colite. Tout d'abord, il a été suggéré que la pathologie observée chez ces animaux était due à une absence d'AICD (Activation-Induced Cell Death) des T auto-réactifs. L'AICD est une mort apoptotique induite sur les T activés, qui permet la contraction de la réponse immunitaire et le retour à l'état d'équilibre. Ce phénomène serait dépendant de l'IL-2 (Lenardo, 1991).

Cependant, les travaux ultérieurs vont permettre de montrer que la lymphoprolifération est principalement secondaire à un défaut de régulation impliquant les Treg puisque le transfert de Treg à ces souris suffit à prévenir l'apparition de la maladie (Wolf et al., 2001). En particulier, plus directement son effet sur les Treg a été montré par Sakaguchi dans un modèle murin où il a étudié l'effet sur les Treg du blocage de l'IL-2 par un anticorps monoclonal (Setoguchi et al., 2005). Il a pu alors observer une baisse significative du nombre de Treg ainsi qu'un déficit fonctionnel. Les travaux de Jason Fontenot démontrent aussi l'importance de l'IL-2 pour le maintien du renouvellement cellulaire et de la fonctionnalité des Treg en périphérie, en maintenant l'expression de FoxP3 et du CD25 (Fontenot et al., 2005b).

De plus Tang et J. Bluestone ont observé une corrélation entre l'IL-2, la survie et la proportion des Treg en périphérie chez des souris sauvages. A l'inverse de la déplétion, les travaux de J. Sprent ont montré que l'injection d'une IL-2 stabilisée par sa complexation avec un anticorps anti-IL-2 spécifique (clone JES1.6), permettant d'augmenter substantiellement sa durée de vie, induit une forte prolifération des Treg en périphérie (Boyman et al., 2006; Webster et al., 2009).

Ces observations ont conduit à construire un modèle dans lequel les Tconv produiraient l'IL-2 qui aurait un effet paracrine trophique sur les Treg. En effet, les Treg sont incapables de produire de l'IL-2 (Takahashi et al., 1998; Thornton et al., 1998). Une hypothèse pour expliquer cela est que FoxP3 bloque la sécrétion de cytokines, dont l'IL-2, en inhibant NFAT et NFκB, des molécules essentielles à l'activation des gènes de cytokines (Bettelli et al., 2005), ou en se fixant sur des sites type « forkhead » sur l'ADN, au niveau de séquences régulatrices proches des promoteurs des gènes de cytokines (Schubert et al., 2001).

A l'inverse, l'IL-2 entraîne la phosphorylation de STAT-5, facteur de transcription qui se fixe notamment sur le promoteur du gène *foxp3* et contrôle directement sa transcription.

Cependant, si l'IL-2 a un rôle fondamental, certaines observations font douter qu'elle soit la seule à contrôler l'homéostasie. Les souris IL-2 ou CD25^{-/-} ont un nombre de Treg normal en périphérie (Burchill et al., 2007). Cette donnée remet donc en cause le schéma initialement pensé. Il faut cependant rappeler ici que les Treg activés CD44^{fort} ont une diminution de l'expression du CD25 alors même qu'ils expriment les autres marqueurs de d'activation tels que CD103, CD69 ou ICOS (Min et al., 2007). A ce titre, il faut souligner que dans les modèles IL-2^{-/-} et CD25^{-/-} les Treg présents sont essentiellement CD44^{fort} et CD25^{moyen}, ce qui amène à penser que dans ces modèles l'IL-2 serait particulièrement cruciale pour les Treg naïfs.

D'autre part, l'abondance des Treg activés dans ces modèles KO suggère soit que l'homéostasie de ces Treg est IL-2 indépendante ou qu'il existe des cytokines capables de compenser ce déficit.

2. IL-15

Les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 ont tous deux en commun la chaîne γ (CD132) et le CD122. De plus les signaux intracellulaires délivrés sont très proches en induisant la phosphorylation de STAT-5.

Le déficit isolé en IL-2, en IL-15 ou en CD25 ne s'accompagne pas de modification de la production de Treg thymique. Mais la production est profondément altérée comme nous l'avons déjà vu si le CD122 est déficient ou s'il existe un déficit combiné en IL-2 et IL-15 (Burchill et al., 2007; Soper et al., 2007). Dans ce cas on observe un déficit quasi-total en périphérie en Treg. Le rôle de l'IL-15 seul dans l'homéostasie est moins établi puisque les souris IL-15^{-/-} et IL-15Ra^{-/-} présentent un nombre normal de Treg et ne développent pas d'auto-immunité (Burchill et al., 2007).

3. IL-7

L'IL-7 a aussi une signalisation intracellulaire impliquant STAT-5, mais paradoxalement les Treg ont une expression très limitée de son récepteur le CD127 (Liu et al., 2006). L'IL-7 induit *in vitro* l'expression de FoxP3 dans les précurseurs thymiques des Treg (CD4⁺CD8⁻CD25⁺) (Bayer et al., 2008). *In vivo* et en périphérie, le rôle de l'IL-7 est moins évident. Les souris déficientes pour cette cytokine ou son récepteur présentent un déficit quantitatif en Treg, mais ceci est accompagné d'une très forte lymphopénie (Mazzucchelli and Durum, 2007). En termes de proportion, le pourcentage de cellules FoxP3⁺ parmi les T CD4⁺ est même en forte augmentation. Ces conclusions sont étayées par des travaux ultérieurs montrant que l'IL-7 ne semble pas permettre le maintien préférentiel des Treg en périphérie (Bayer et al., 2008).

On notera enfin que les modèles utilisés pour mettre en évidence les rôles de l'IL-15 ou de l'IL-7 comprennent presque toujours une déficience pour l'IL-2 ou CD25, mettant ainsi de côté le rôle central de l'IL-2. Cela semble indiquer que la régulation de l'homéostasie des Treg en périphérie est avant tout dominée par l'IL-2.

B. Les cytokines et inflammation

Après l'infection par un agent pathogène, les DC produisent des cytokines inflammatoires secondaires à l'activation de leur TLR. A ce titre ces cytokines interagissent avec les Treg dans la mesure où ceux-ci participent au contrôle de la réponse immune.

1. Les cytokines Th1

C'est le profil de sécrétion cytokinique qui détermine le profil de la réponse immunitaire. Aux descriptions Th1 et Th2 se sont ajoutées ces dernières années la voie Th17 et plus récemment Th-9. Ces voies ont des fonctions effectrices distinctes justifiant leur caractérisation. La voie Th1 est impliquée dans l'élimination des pathogène intra-cellulaire et elle est aussi impliquée dans la survenue de réponse auto-immune telle que la sclérose en plaques. Elle pourrait jouer un rôle déterminant au cours des myopathies inflammatoires de type PM/MC et MI, comme nous l'avons vu.

Au cours d'une réponse anti-infectieuse virale, il paraît donc logique de concevoir que les cytokines Th1 inhibent la conversion périphérique des Tconv-Treg afin de réunir les conditions optimales à l'élimination du pathogène. De fait, l'IFN γ inhibe cette conversion *in vitro* (Caretto et al., 2010). Cependant, en activant la voie intracellulaire STAT-1, l'IFN γ induit peut aussi modifier les propriétés des nTreg. En l'effet, l'exposition des nTreg à l'IFN γ induit l'expression du facteur de transcription t-bet permettant la surexpression de CXCR-3, favorisant ainsi leur migration aux sites inflammatoires et facilitant le contrôle de la réaction inflammatoire Th1 (Koch et al., 2009). Concernant l'IL-12 une autre cytokine Th1, il a pu être montré dans un modèle animal d'infection par *leishmania major* qu'il existait un déficit relatif en IL-2 induisant une sensibilité accrue des Treg à l'IL-12. En se fixant sur les Treg, l'IL-12 active t-bet et induit la production d'IFN γ (rendant compte de la plasticité des Treg) ce qui contribue à l'aggravation de l'infection qui devient fatale (Oldenhove et al., 2009). Ainsi ces données montrent l'effet paradoxal de ces cytokines Th1 tantôt pro-inflammatoires tantôt anti-inflammatoires en fonction du contexte pathologique.

2. IL-6 et la réponse Th17

L'IL-6 est aussi une cytokine proinflammatoire ayant une action sur les Treg. L'IL-6 inhibe la conversion périphérique TGF β dépendante des Tconv en iTreg. Au contraire, conjointement au TGF β , l'IL-6 induit l'engagement des CD4⁺ dans la voie de différenciation Th17 avec une perte du FoxP3 dans les iTreg (Bettelli et al., 2006). De plus, l'IL-6 influence aussi les nTreg dans leur développement et leur fonction. En effet dans un modèle animal, les Treg FoxP3⁺GFP⁺ sont capables d'induire des cellules Th17 de part leur capacité à produire du TGF β si on ajoute au milieu de culture de l'IL-6. Dans cette étude le plus remarquable a été la conversion des Treg FOXP3⁺GFP⁺ en cellules Th17 en présence d'IL-6 sans adjonction exogène de TGF β (Xu et al., 2007).

De plus, l'IL-6 modifie les fonctions inhibitrices des Treg. En effet, la stimulation des TLR par les agents bactériens bloque les propriétés immunosuppressives des Treg, de façon IL-6 dépendante et sans impliquer les molécules de co-stimulation (Pasare and Medzhitov, 2003). L'IL-6 active la voie de signalisation STAT-3. Il est donc intéressant de savoir si l'activation de cette voie dans les Treg les engagerait à orienter spécifiquement leur fonction pour optimiser le contrôle de la réponse Th17 à l'instar de ce qui a été montré pour STAT-5 et les cytokines Th1.

3. IL-4 et la réponse TH2 et TH-9

L'IL-4 est cytokine clef de la réponse effective Th2 impliquée dans la réponse humorale. Comme l'IL-6, l'IL-4 inhibe la conversion Tconv/iTreg en périphérie d'une part et d'autre part conjointement au TGF β elle oriente la différenciation T dans la voie Th-9 caractérisée par la production d'IL-9 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). De plus l'IL-4 rendrait résistantes les cellules Th2 à l'action des Treg alors qu'à l'inverse, *in vitro* l'IL-4 augmenterait significativement les fonctions des Treg (Pillemer et al., 2009). Ainsi le rôle précis de l'IL-4 reste encore à préciser.

4. IL-1 le rôle de l'inflammation

Les cytokines TNF α et IL-1 sont des acteurs importants dans l'établissement d'une réponse inflammatoire. Cependant des données récentes concernant le TNF α montre aussi qu'il a des propriétés immuno-modulatrices que nous aborderons dans un chapitre suivant (Valencia et al., 2006).

Concernant l'interaction de l'IL-1 avec les Treg celle-ci est à ce jour moins établie. Il a pu être montré que son adjonction conjointe au milieu de culture avec l'IL-2 convertissait les Treg en cellules Th17 (Deknuydt et al., 2009).

C. Les intégrines

Comme nous l'avons vu dans la description initiale du phénotype, les Treg sont caractérisés par une grande variabilité du type et du nombre de récepteurs aux chimiokines et d'intégrines. Ces différences rendent compte de la répartition des Treg qui doivent à la fois, comme nous l'avons vu, se trouver dans les ganglions mais aussi dans les tissus pour exercer leurs effets.

En effet, même à l'état de basal, on retrouve de nombreux Treg dans de nombreux tissus et ce en l'absence de toute inflammation tissulaire (Sather et al., 2007). A l'état pathologique, dans des modèles murins d'EAE ou de diabète, on trouve aussi un grand nombre de Treg dans les tissus cibles (Kleinewietfeld et al., 2005; Korn et al., 2007b; Tang et al., 2006).

Il existe un large panel d'intégrines et de récepteurs aux chimiokines différents dont la spécificité détermine l'adressage tissulaire comme un véritable code postal. Par exemple le CD103 (chaîne α de l'intégrine E) et le récepteur à la chimiokine CCR4 sont impliqués dans

la migration et la rétention des Treg dans le tissu cutané. Le déficit de l'une de ces 2 molécules s'accompagne de manifestations cutanées auto-immunes (Sather et al., 2007; Dudda et al., 2008).

En situation pathologique, l'inhibition de la migration des Treg dans le tissu cible a des conséquences sur la régulation de la réponse. Par exemple, les souris CCR6^{-/-} développent une EAE plus sévère que les animaux témoins, du fait d'un défaut de recrutement des Treg dans le cerveau. D'ailleurs le transfert de Treg CCR6^{+/+} à ces souris réduit la sévérité de la maladie (Villares et al., 2009). De plus, au cours de l'EAE, l'IL-17 produite par les cellules auto-immunes Th17 induit l'expression du CCR-6 à la surface des Treg favorisant ainsi leur migration dans le tissu cérébral inflammatoire (Yamazaki et al., 2008). Le même type d'observation est fait avec le recrutement de Treg CXCR3 dans un environnement chémokinique Th1 (CXCL-9, CXCL-10 et 11) (Santodomingo-Garzon et al., 2009).

Le site d'action des Treg est aussi déterminant pour le contrôle de la maladie. Comme nous l'avons vu plus les Treg CD62L⁺ ayant la capacité de migrer dans les ganglions sont les plus aptes à contrôler l'établissement d'une maladie auto-immune. En revanche, dans un modèle murin de colite après que celle-ci se soit développée, les Treg ayant la capacité de migrer dans le colon sont plus efficaces que les Treg CD62L⁻. L'ensemble de ces observations soulignent l'importance des molécules d'adressage pour que les Treg soient fonctionnels. Elle leur permet d'être sur le site où se joue la réponse inflammatoire au bon moment. Ainsi, la grande diversité de réponse immunitaire est reflétée par la diversité des molécules d'adressage exprimées par les Treg et leur fonction.

D. La famille CD28

Le CD28 et CTLA4 sont des molécules exprimées constitutivement de façon préférentielle sur les T. Bien que ces 2 molécules membranaires partagent une homologie de structure et des ligands communs à la fois le CD80 et CD86, elles ont des propriétés opposées.

1. CD28

La molécule de costimulation CD28 permet après activation du TCR une prolifération et une survie durable des Tconv en évitant l'anergie (Appleman and Boussiotis, 2003). Effectivement l'inactivation du CD28 chez les souris CD28^{-/-} s'accompagne d'une immunodépression impliquant particulièrement un déficit de la fonction auxiliaire T pour la coopération T-B et la réponse humorale (Shahinian et al., 1993). Cependant le CD28 est aussi

déterminant pour la fonction Treg comme cela a été suggéré par l'importance de la stimulation CD28 pour permettre la prolifération Treg *in vitro* chez l'homme et la souris (Earle et al., 2005). *In vivo* il est maintenant bien établi que l'absence de CD28 (Salomon et al., 2000) ou de ses ligands (Lohr et al., 2003) s'accompagnent d'un profond déficit en Treg. En effet, comme nous l'avons vu le CD28 joue un rôle déterminant dans l'ontogénie des Treg thymiques en permettant leur survie et leur différenciation (Zheng et al., 2004). Le CD28 est aussi déterminant pour l'homéostasie des Treg à la périphérie. En effet, l'injection d'une molécule de fusion CTLA-4-Ig, qui, en se fixant sur CD80/86, inhibe la signalisation par CD28, induit une rapide et profonde déplétion des Treg en périphérie (Salomon et al., 2000).

De même l'injection d'anticorps monoclonaux anti-CD80 et anti-CD86, induit une disparition similaire des Treg dans les souris thymectomisées et les témoins (Tang et al., 2003). Ces résultats montrent que le signal CD28 contrôle directement l'homéostasie périphérique des Treg.

2. CTLA-4

Le CTLA-4 est exprimé à la surface des Tconv et exerce une fonction immunorégulatrice négative sur le compartiment T CD4⁺ activé. Si le CTLA-4 partage avec le CD28 les mêmes ligands, l'affinité est très différente. L'affinité CTLA-4 pour ces ligands est supérieure au CD28 ce qui conduit à une compétition d'affinité en faveur du CTLA-4. Ainsi, cette situation conduit à un défaut d'activation des Tconv et donc de la réponse immunitaire (Takahashi et al., 2005). Le CTLA-4 délivre activement aussi des signaux intra-cellulaires de régulation négative (Waterhouse et al., 1995; Walunas et al., 1996). Ces fonctions rendent compte de la lymphoprolifération léthale à l'âge de 3-4 semaines observée chez les souris CTLA-4^{-/-} (Tivol et al., 1995). Dans ce modèle en plus de la lymphoprolifération on observe des manifestations auto-immunes. Comme les Treg expriment constitutivement le CTLA-4, l'ensemble de ces données suggère l'importance de cette molécule dans ces fonctions. L'importance du CTLA-4 dans l'ontogénie des Treg thymique reste à préciser car les études montrent des résultats contradictoires, avec soit aucun effet sur l'ontogénie (Chambers et al., 1997) soit une diminution des Treg en périphérie (Takahashi et al., 2005).

Concernant l'homéostasie en périphérie, le CTLA-4 a un rôle de régulation négative sur la prolifération des Treg. En effet, chez les souris FoxP3^{cre} X CTLA-4^{fl/fl} où les Treg sont spécifiquement déficients en CTLA-4 à la différence des autres cellules, on observe une proportion de Treg très élevée par rapport aux souris contrôles (jusqu'à 50% de cellules FoxP3⁺ parmi les T CD4⁺) (Wing et al., 2008). De même, l'injection d'anticorps bloquant

anti-CTLA-4 à des souris sauvages induit une forte prolifération des Treg (Tang et al., 2008). Il faut souligner que le modèle de déplétion sélective du CTLA-4 spécifique des Treg a permis de montrer (souris FoxP3^{cre} X CTLA-4^{fl/fl}) que l'auto-immunité léthale induite est en partie due à une fonction suppressive altérée des Treg, notamment car ils ne peuvent plus inhiber la maturation des DC (Wing et al., 2008).

3. ICOS

La molécule ICOS (pour Inducible CO-Stimulator) est un récepteur de la famille CD28 (Hutloff et al., 1999). Elle est exprimée par les T CD4⁺ et CD8⁺ après activation, et seulement 20% des Treg l'expriment à l'état basal (Ito et al., 2008). Son ligand, ICOS-L est principalement exprimé par les CPA (DC, macrophages, B; Yoshinaga et al., 1999).

Les souris ICOS^{-/-}, la production thymique de Treg est normale alors que la proportion de Treg est réduite d'environ 30% en périphérie (Burmeister et al., 2008). Chez l'homme, environ 30% des Treg expriment fortement ICOS et dépendraient de ce signal pour leur survie, alors que les Treg ICOS⁻ dépendraient plutôt de CD28 (Ito et al., 2008). Ces données montrent l'importance d'ICOS dans l'homéostasie des une sous-population de Treg en périphérie.

Enfin l'expression d'ICOS dans les Treg semble être corrélée à une fonction suppressive augmentée. Les Treg de souris ICOS^{-/-} ont *in vitro* une fonction d'inhibition de la prolifération des Tconv altérée par rapport à leurs homologues WT (Prevot et al., 2010).

4. PD-1

PD-1 appartient aussi à la famille CD28. En interagissant avec ses ligand PD-L1 et PDL-2, il délivre un signal qui inhibe les fonctions cellulaires T en diminuant la prolifération ou la synthèse d'IFN- γ (Freeman et al., 2000). Son rôle dans la tolérance a montré chez les souris PD-1^{-/-} où on observe la survenue d'une myocardite auto-immune (Nishimura et al., 1999). L'inhibition de PD-1, soit génétiquement, soit à l'aide d'ac monoclonaux, aggrave les manifestations auto-immunes dans de nombreux modèles murins spontanés ou provoqués de maladies auto-immunes (Ansari et al., 2003; Salama et al., 2003; Nishimura et al., 2001). Le rôle de la voie PD-1 dans l'homéostasie des Treg reste encore à préciser mais l'injection d'un anticorps bloquant anti-PD-L1 diminue la proportion de Treg en périphérie et empêche la prise d'une allogreffe de peau (Nishimura et al., 2001).

En revanche, l'importance de la voie PD-1 est bien établie dans les fonctions suppressives des Treg. En particulier, elle joue un rôle déterminant dans la tolérance foeto

maternelle (Francisco et al., 2009). Il faut ici aborder l'importance de PD-1 dans la tolérance musculaire. Les travaux de Boyer et al. sur la tolérance musculaire dans le modèle double transgénique que nous avons décrits dans le chapitre sur la tolérance périphérique montre le rôle capital de PD-1. En effet la tolérance T CD8⁺ spécifiques du muscle est dépendante de PD-1 qui pourrait inhiber les propriétés cytotoxiques de ces cellules auto-réactives (Calbo et al., 2008).

E. La famille TNF

La superfamille des récepteurs au TNF comprend un grand nombre de récepteurs qui peuvent être exprimés à la surface des lymphocytes T. Si ces récepteurs sont bien connus pour leur rôle dans la réponse inflammatoire leur importance est moins bien connue dans les phénomènes de régulation qu'ils peuvent mettre en jeu.

1. Le TNF et Treg

Le TNF est une cytokine centrale de l'inflammation en provoquant notamment la maturation des cellules dendritiques et en induisant l'apoptose des cellules cibles (Aggarwal, 2003). Le TNF regroupe 2 molécules le TNF- α et le TNF- β . Il existe 2 récepteurs le récepteur TNFR1, exprimé sur la plupart des cellules et induisant classiquement un programme de mort cellulaire (Aggarwal, 2003), et TNFR2 (p75), exprimé notamment des Treg (30%) à l'état basal (Chen et al., 2007). En plus de son effet inflammatoire, le TNF a des propriétés immunorégulatrices. L'action du TNF sur les Treg est complexe et varie selon les modèles étudiés (Kassiotis and Kollias, 2001; Chen and Oppenheim, 2010; Chen et al., 2007; Valencia et al., 2006). On peut souligner ici le lien étroit entre les Treg et les Tconv, en rappelant que les Tconv ont la capacité « paradoxale » d'augmenter *in vivo* significativement l'effet des Treg en les faisant proliférer et en accroissant leur fonction et ce de façon TNF dépendante (Grinberg-Bleyer et al., 2010).

2. Les autres membres de la famille du TNF et Treg

Le GITR, OX40 sont exprimés à la surface des Treg (Stephens et al., 2004). Ils semblent jouer un rôle mineur dans l'homéostasie des Treg (Griseri et al., 2010). Leur

activation inhibe l'induction de Treg en périphérie (Ito et al., 2006; Valzasina et al., 2005) et altèrent leur fonction (Griseri et al., 2010; Shimizu et al., 2002; Takeda et al., 2004).

Les rôles de 4-1BB (CD137, TNFRSF9) et (CD95)/FAS-L(CD95L) eux aussi exprimés à la surface des Treg (Sugimoto et al., 2006), reste sujet à discussion (Fritzsching et al., 2006b; Krammer, 2000; Singh et al., 2010).

3. La nicotinamide adénine dinucléotide et la survie des Treg

La nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), libérée par les cellules lysées ou au cours de l'inflammation (Bruzzone et al., 2006; Bruzzone et al., 2001), active le récepteur P2X7 et induit la mort cellulaire T (Seman et al., 2003; Scheuplein et al., 2009). Les travaux de Adriouch et al. ont montré le rôle déterminant de cette voie pour la survie des Treg. En effet, les Treg expriment le récepteur P2X7 à des niveaux supérieurs à ceux observés sur les Tconv. De plus, l'injection de NAD⁺ induit leur mort et altère leur fonction. Ces données montrent ainsi le rôle déterminant de cette voie dans la survie et l'homéostasie des Treg (Hubert et al., 2010).

F. Les voies de signalisation intracellulaires

1. La voie JAK3/STAT-5 utile pour les Treg

La liaison des cytokines à leur récepteur conduit à l'activation de tyrosines kinases de la famille Janus : les JAK. Une fois activées les JAK phosphorylent à leur tour des facteurs de transcription cytoplasmiques appelés STAT pour Signal Transducers and Activators of Transcription, induisant ainsi leur dimérisation, leur migration intranucléaire et la fixation sur l'ADN. Ainsi les STAT contrôlent la prolifération, la différenciation, le développement et la survie cellulaire (Levy and Darnell, 2002). A ce jour, 6 grandes familles de STATS sont décrites allant de STAT-1 à STAT-6.

Comme nous l'avons vu, l'IL-2 joue un rôle déterminant dans l'ontogénie des Treg. L'IL-2 induit des signaux de transcription intra-cellulaire par l'intermédiaire de son récepteur qui est lui-même associé à JAK3 (Russell et al., 1995). Effectivement, l'inactivation de JAK3 induit une diminution significative de Treg dans le thymus et en périphérie (Fontenot et al., 2005b; Mayack and Berg, 2006; Murawski et al., 2006).

La voie STAT5a/b est, elle aussi, activée par la signalisation de l'IL-2. Comme nous l'avons vu cette voie est déterminante pour l'homéostasie de Treg. De fait, la greffe de

cellules souches hématopoïétique STAT5a/b^{-/-} dans des souris receveuses Rag^{-/-} s'accompagne d'un profond déficit en Treg en périphérie (Yao et al., 2007). Chez l'homme et la souris, STAT5 interagit directement en se fixant sur le gène FoxP3 (Zorn et al., 2006; Yao et al., 2007) et permet dans l'expression du CD25 (Cohen et al., 2006; Murawski et al., 2006; Nakajima et al., 1997).

2. La voie Pi3Kinase/mTor

La signalisation déclenchée par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur, comme nous l'avons vu, peut engager plusieurs voies de signalisation dans les T. En plus de la voies JAK1-3/STAT5 il existe la voie PI3K/Akt/mTOR (Zeiser et al., 2008). Nous avons vu l'importance de la première mais qu'elle est le rôle de la voie PI3K/Akt/mTOR dans l'homéostasie des Treg ?

Les T une fois stimulés par leur TCR s'activent, produisent des cytokines, se divisent et prolifèrent. L'activation cellulaire implique donc pour la synthèse protéique d'importants besoins d'énergie et de métabolites qui nécessitent de passer d'un métabolisme de repos oxydatif à un métabolisme impliquant la glycolyse (Buttgereit et al., 1992). Ce changement métabolique implique la voie mTOR.

Les besoins énergétiques cellulaires sont détectées par le complexe mTORC1 (Laplante and Sabatini, 2009; Sancak et al., 2008; Sancak et al., 2010). De plus, la voie PI3K/Akt/mTOR est capable de répondre aux besoins énergétiques en augmentant l'expression des transporteurs membranaire du glucose (Glut-1) (Maciver et al., 2008; Wieman et al., 2007) ou des acides aminés (Edinger et al., 2002).

En jouant un rôle central dans le métabolisme cellulaire, la voie mTOR participe de fait à l'orientation de la réponse immunitaire. Des travaux récents ont montré que les Tconv mTOR^{-/-} étaient incapables de s'engager dans la Th1 (Lee et al., 2010), Th2 (Delgoffe et al., 2009) ou Th17 (Kopf et al., 2007). A l'inverse, les Tconv mTOR^{-/-} peuvent se différencier en Treg (Lee et al., 2010; Delgoffe et al., 2009) soulignant ainsi l'importance de la régulation de cette voie pour la différenciation Treg. L'activation de la voie Pi3K/AKT/mTOR permet en effet d'inhiber l'expression de FoxP3 et cet effet peut être inhibé par l'ajout d'un inhibiteur de mTOR. (Haxhinasto et al., 2008; Sauer et al., 2008).

La rapamycine est un inhibiteur de mTOR. Il a pu être montré qu'*in vitro* chez l'homme ou la souris l'ajout de rapamycine au milieu de culture cellulaire lymphocytaire T permettait l'expansion préférentielle des Treg aux dépends des Tconv (Guillot-Delost et al., 2008; Basu et al., 2008; Battaglia et al., 2006). Ces données sont en accord avec l'utilisation

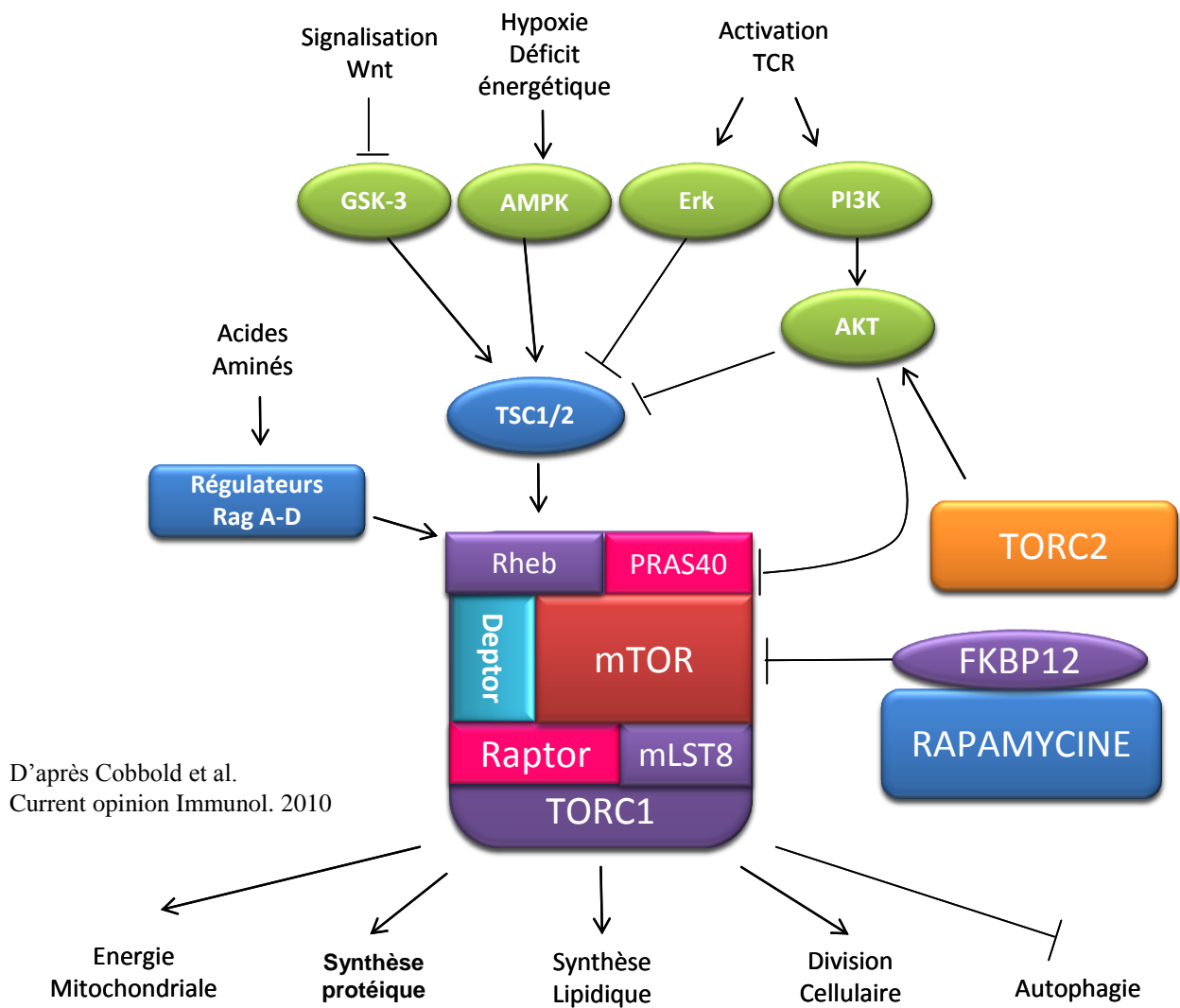
de la voie PI3K/Akt/mTOR par les Tconv et la voie JAK3/STAT5 par les Treg. Effectivement contrairement aux Tconv, les Treg activeraient peu la voie PI3K/Akt/mTOR en présence d'IL-2, comme en témoigne la faible phosphorylation d'Akt dans les Treg après contact avec de l'IL-2 *in vitro* (Bensinger et al., 2004). Une des explications réside dans le fait que PTEN (pour Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10), inhibiteur de PI3K/Akt, est plus fortement exprimé par les Treg que par les Tconv (Walsh et al., 2006) Contrairement aux Tconv, les Treg ne diminuent pas leur expression de PTEN après activation, ce qui va dans le sens de l'utilisation de voies de signalisation différentes dans les Treg et dans les Tconv (Zeiser et al., 2008).

Ainsi les Tconv utiliseraient la voie PI3K/Akt/mTor lors de leur activation et les Treg JAK3/STAT-5. Cependant des données récentes montrent que cette ségrégation n'est pas si simple et que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTor serait aussi déterminante pour le fonctionnement des Treg.

En effet, les Treg humains *ex vivo* ont une activité métabolique de mTOR supérieure à celle des Tconv bien que ces Treg soient anergiques *in vitro* (Procaccini et al., 2010). Cependant un prétraitement (avant la stimulation TCR) par la rapamycine permet de lever l'anergie et ce en l'absence d'IL-2.

De même *in vivo*, une seule injection de rapamycine permet d'augmenter significativement le nombre de Treg chez la souris, mais aussi de diminuer la sévérité de l'inflammation dans le modèle murin de sclérose en plaque l'EAE. Cependant, l'effet de la rapamycine sur les Treg est dynamique et complexe. *In vitro*, l'inhibition de mTOR permet de lever l'anergie des Treg, mais, une fois l'anergie levée, les Treg ont besoin de mTOR pour maintenir leur prolifération. En effet *in vivo*, l'invalidation permanente de mTOR par un siRNA ou par un traitement chronique avec de la rapamycine s'accompagne de l'absence de prolifération Treg activés. Enfin, ces auteurs montrent que l'activation de mTOR dans les Treg serait sous la dépendance de la leptine une hormone dont la production par les adipocytes est régulée par les apports alimentaires et les besoins énergétiques.

Figure 5 : Voie mTOR



Voie de signalisation mTOR. Cette voie implique 2 structures fonctionnellement distinctes les complexes TORC1 et TORC2. L'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine implique TORC1. En se liant à FKBP12 (cible de la rapamycine) la rapamycine interagit avec le complexe TORC1 composé par Raptor, FKBP12 et 3 autres sous-unités mLST8, PRAS40 et Deptor. L'activité de TORC1 est régulée par la GTPase, Rheb, elle-même inhibée par TSC2 associé à TSC-1. Ainsi, l'inactivation de TSC1/2 par la voie Pi3K/Akt et Erk (Signal TCR) active mTOR. De nombreuses autres molécules comme des facteurs de croissance via PI3K/Akt et Erk peuvent aussi activer mTOR. A noter qu'AKT peut activer TORC1 en phosphorylant PRAS40, un facteur inhibiteur de mTOR. De plus, TORC1 peut être activé par la voie Wnt via GSK3. Les déficits énergétiques tels que la baisse du niveau en oxygène s'accompagnent d'une activation de AMPK qui lui-même active TSC1/2 et donc inhibe TORC1. L'activité de TORC1 est dépendante du niveau d'acides aminés « mesuré » grâce aux protéines Rag A-D et le complexe régulateur. TORC1 contrôle une grande variété de processus cellulaires comme de l'autophagie, la synthèse lipidique, le cycle de division cellulaire, la biogénèse mitochondriale ou la synthèse protéique. Cette dernière est en particulier sous la dépendance des signaux d'aval 4E-BP1 et S6K1.

Abbréviations: mTOR, mammalian target of Rapamycin; TORC, mTOR complex; Raptor, regulatory-associated companion of mTOR; FKBP12, FK506 binding protein 12; mLST8, mammalian lethal with Sec13 protein 8; PRAS40, prolin-rich Akt substrate 40kDa; Deptor, DEP-domain-containing mTOR-interacting protein; Rheb, Ras homologue enriched in brain; TSC, tuberous sclerosis protein; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, AKT8 virus oncogene cellular homolog; Erk, Extracellular signal-regulated kinase; GSK3, Glycogen synthase kinase 3; AMPK, AMP-activated protein kinase; Rag A-D, Ras-related GTP-binding-proteins A-D; (EIF)4E-BP1, Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; S6K1, (ribosomal) S6 kinase 1

G. L'instabilité de FOXP3 ou la plasticité des Treg

Comme nous l'avons vu, nombreuses sont les cytokines capables de convertir un iTreg en une s effectrices montrant la plasticité de ces cellules. Les Treg induits *in vitro* par le TGF- β et l'IL-2, chez l'homme et la souris, peuvent ensuite, grâce à l'IL-6, être partiellement converties en cellules productrices d'IL-17 (Koenen et al., 2008; Xu et al., 2007). Cette conversion est augmentée en présence de cytokines inflammatoires, comme l'IL-1 ou l'IL-23 (Yang et al., 2008). Cette transformation relativement aisée est en partie expliquée par la faible intensité de la méthylation de FOXP3 des iTreg rendant son expression plus instable que dans les nTreg où il est fortement méthylé (Floess et al., 2007).

Pour autant, les nTreg issus du thymus peuvent aussi être "convertis" en Tconv *in vivo* après leur transfert dans des hôtes lymphopéniques T (Tsuji et al., 2009). Cependant, ces expériences sont limitées dans leur interprétation en raison du taux systémique d'IL-2 trop faible pour permettre le maintien du phénotype normal des Treg. En effet, ils reposent sur l'utilisation d'hôtes lymphopéniques et ne reflètent peut-être pas la physiologie naturelle des Treg. *In vitro*, la conversion peut aussi être observée quand la culture est réalisée dans des conditions fortement inflammatoires (Deknuydt et al., 2009).

D'autres travaux, menés *in vivo*, reposent sur la mise au point de modèles sophistiqués : des souris FoxP3^{gfp-cre} sont croisées avec des souris ROSA26^{fllox-yfp}. De cette manière, l'expression de FoxP3 conduit à l'expression irréversible de la YFP (Yellow Fluorescent Protein). Par ailleurs, l'expression de la GFP est, elle, strictement corrélée à celle de FoxP3. Ainsi Bluestone montre que 15% des cellules YFP⁺ (qui ont exprimé FoxP3 à un moment donné de leur ontogénie) n'expriment plus FoxP3 (la GFP) dans les ganglions et la rate. Cette proportion est augmentée dans le cas d'un déficit en IL-2. Ces cellules nommées ex-Treg sécrètent une grande quantité d'IFN- γ et, croisées dans un fond TCR-BDC2.5, induisent le diabète chez des souris lymphopéniques (Zhou et al., 2009).

Cette plasticité est en accord avec les observations que les gènes, codant pour les facteurs de transcription et cytokines Th1, Th2 et Th17, ne sont pas complètement réprimés dans les Treg (Wei et al., 2009). Ce travail affirme donc qu'à l'état basal, une partie des Treg est susceptible de perdre l'expression de FoxP3 et de devenir pathogène. Cependant la plasticité décrite ci avant n'est pas retrouvée par l'équipe de Rudensky utilisant un système expérimental proche (Rubtsov et al., 2010). On note pour autant que les conditions de suivi des ex Treg étaient un peu différentes dans les travaux de A. Rudensky. L'expression inductible de la recombinaise Cre était sous la dépendance du tamoxifène, ce qui évite aux

cellules n'ayant exprimé FoxP3 que faiblement ou très temporairement d'être marquées par la YFP (Rubtsov et al., 2010). Aucun de ces résultats contradictoires n'a été pour l'instant confirmé ou infirmé et le débat reste ouvert en ce qui concerne une supposée conversion des Treg en Tconv.

H. Objectifs du travail de thèse

Pour conclure cette introduction, nous avons décrit la physiopathologie des myosites en soulignant leur caractère auto-immun. Comme nous l'avons vu les Treg jouent un rôle déterminant dans la tolérance périphérique vis-à-vis des antigènes du soi, mais peu de données existent sur les mécanismes impliqués dans la rupture de la tolérance musculaire. En particulier, au moment où nous avons entrepris ce travail de thèse, il n'existait aucune donnée concernant les Treg au cours des myosites, que ce soit chez l'animal ou chez l'homme. Ainsi nous avons posé deux questions :

- Quel est le rôle des Treg au cours des myosites idiopathiques ?
- Les Treg peuvent-ils être un outil thérapeutique pour ces myosites ?

Pour répondre à ces questions nous avons voulu dans un premier temps chez l'animal:

1. Mettre au point un modèle murin de myosite auto-immune afin de pouvoir étudier le rôle des Treg au cours d'expériences de déplétion ou de transfert.
2. Tester des approches pharmacologiques afin d'augmenter *in vivo*, le nombre de Treg dans notre modèle.

Dans un second temps nous avons étudié les Treg au cours d'une myosite humaine la MI. En effet, cette myopathie est la plus fréquente après 50 ans et reste dépourvue de traitement. Au cours de la MII nous avons donc :

1. Étudié le phénotype de la réponse inflammatoire
2. Étudié le rôle des Treg
3. Étudié des marqueurs d'évolutivité de la maladie, dans l'optique d'un essai thérapeutique

L'objectif final de ce travail translationnel est de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients souffrants de myosite, en particulier pour la MI en manipulant les Treg.

RESULTATS

Article 1

« Role of Regulatory T Cells in a New Mouse Model of Experimental Autoimmune Myositis »

Afin d'étudier le rôle de Treg aux cours de myopathies inflammatoires il nous fallait disposer d'un modèle permettant de réaliser les expérimentations de déplétion et de transfert en Treg indispensables à l'étude de leur rôle. Ainsi nous avons cherché à développer un modèle animal murin de myopathie auto-immune ayant les mêmes caractéristiques dysimmunitaires que celles observées chez l'homme souffrant de myopathies inflammatoires type myosite de chevauchement ou myosite à inclusion.

Dans ce travail intitulé "Role of Regulatory T Cells in a New Mouse Model of Experimental Autoimmune Myositis", nous avons rompu la tolérance immunitaire à des protéines musculaires du soi en suivant la même démarche que celle qui a été développée pour les modèles de sclérose en plaque ou de polyarthrite rhumatoïde. Le principe est d'immuniser les animaux avec des antigènes du soi issu du tissu dont on souhaite qu'il soit la cible d'une réaction auto-immune. Ainsi nous avons extrait d'un lysat musculaire autologue, une préparation enrichie en myosine, que nous avons administrée par voie sous cutanée aux souris à 3 reprises à une semaine d'intervalle. Les immunisations ont été réalisées avec un adjuvant vaccinal libérant des signaux de danger créant de fortes conditions inflammatoires. Celles-ci conduisent les Tconv autoréactifs vis à vis d'antigènes musculaires à proliférer et s'activer. Enfin, le protocole expérimental d'immunisation est complété par l'injection de toxine pertussique, comme cela a été réalisé au cours des travaux expérimentaux antérieurs de myopathie expérimentale auto-immune menés chez le rat. L'ensemble de ces observations nous ont donc conduit à utiliser aussi la toxine pertussique.

Les animaux ainsi immunisés ont tous développé des manifestations cliniques avec déficit moteur. L'étude histologique des muscles a permis de montrer que 100% des animaux présentaient une myosite constituée comme chez l'homme de macrophages, de T CD4+ et CD8+. De même, on observe une expression de le CMH-I à la surface des fibres non nécrotiques même si celle-ci est moins diffuse que celle observée sur les biopsies humaines. Le caractère auto-immun de la myopathie dans notre modèle est suggéré par des phénomènes de tunnelisation centromyocytaire par les lymphocytes endomysiaux. Chez l'homme, cette caractéristique correspond à infiltrat T CD8+ cytotoxique. Le caractère auto-immun est affirmé par les expériences de transfert. En effet, le transfert de gangliocytes issu de ganglions

drainant de souris MAE s'accompagne d'une myosite chez la souris receveuse. L'incidence de la myosite ainsi transférée, augmente si les cellules sont préalablement stimulées avec de la myosine.

Après avoir mis au point un modèle fiable et reproductible de myopathie auto-immune expérimentale ayant des caractéristiques proches de celles observées au cours des PM/MC, nous avons cherché à étudier le rôle des Treg. Dans un premier temps, nous avons détruit *in vivo* les Treg au moyen d'un Ac monoclonal anti-CD25 et nous avons pu observer que la myosite était significativement plus sévère en l'absence de Treg. De plus, nous avons constaté que la déplétion en Treg s'accompagnait en outre de l'apparition de « xéno-Ac » anti-ARN-t-synthétase chez environ 20% des animaux. A l'inverse, nous avons transféré des Treg polyclonaux syngéniques la veille de chaque immunisation, ce qui s'est accompagné d'une diminution significative de la sévérité de la myosite.

Pour conclure, ce modèle que nous avons mis au point est un modèle fiable et reproductible de myopathie auto-immune ayant des caractéristiques proches de celles observées en pathologie humaine au cours de la PM/MC ou des phénomènes dysimmunitaires de la MI. Dans ce modèle, nous avons montré l'implication du rôle des Treg dans la survenue de la maladie, mais aussi leur potentiel thérapeutique.

Complément article 1

L'effet de la rapamycine au cours de la MAE

Etant donné d'une part, l'effet bénéfique des Treg sur la MAE, et la lourdeur de la mise au point de protocole de thérapie cellulaire d'autre part, nous avons cherché à développer des moyens « pharmacologiques » alternatifs pour augmenter *in vivo* le nombre de Treg. La rapamycine est un immunosuppresseur qui nous a paru être une molécule intéressante à plusieurs égards. En particulier, cette molécule en inhibitant spécifiquement la voie mTOR inhibe la prolifération des Tconv activés. En revanche, cette voie de signalisation intracellulaire semble moins déterminante en ce qui concerne prolifération des Treg, puisque la croissance des Treg en culture n'est pas compromise par l'ajout de rapamycine au milieu de culture. Au contraire, la rapamycine *in vitro* améliore la pureté en Treg de la culture en inhibitant la prolifération de contaminant Tconv.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de l'administration préventive de la rapamycine, en administrant oralement la rapamycine pendant toute la durée du protocole d'imministration des animaux jusqu'à l'euthanasie. Les animaux traités présentent une amélioration significative de la force musculaire en comparaison avec les animaux contrôles traités par placebo. Cette amélioration clinique est corrélée aux résultats histologiques musculaires montrant une baisse significative de l'infiltrat inflammatoire musculaire chez les animaux traités par la rapamycine. Afin d'analyser les mécanismes d'action de la rapamycine, nous avons analysé en cytométrie le phénotype des lymphocytes issus des ganglions drainants musculaires. Ces explorations ont permis de montrer que la rapamycine diminuait significativement le nombre et le pourcentage de T comparativement aux souris témoins en épargnant les B. Au sein du compartiment T la baisse concernait à la fois les CD4⁺ et CD8⁺. A l'inverse, le pourcentage de Treg au sein du compartiment lymphocytaire T était significativement augmenté dans le groupe traité par rapamycine. Dans le compartiment T activé, la rapamycine a permis d'augmenter la proportion de Treg passant d'environ 30% chez les animaux témoins à plus des 50%. De plus, l'analyse des marqueurs d'adressage ganglionnaires (CCR7) montrent une augmentation de leur niveau d'expression à la surface des Tconv dans le groupe rapamycine. Enfin, l'analyse des molécules impliquées dans la production des agents régulant le trafic ganglionnaire comme KLF2, montre que la rapamycine induit leur augmentation.

Par ailleurs l'administration curative de la rapamycine permet aussi de diminuer significativement la sévérité de la myosite en augmentant le pourcentage des Treg.

L'ensemble de ces observations suggère que la rapamycine permet une diminution de la prolifération des Tconv auto-réactifs, en épargnant les Treg, permettant ainsi une amélioration du rapport Tconv : Treg à la faveur des Treg, comme en témoigne l'enrichissement en Treg dans le compartiment T activés. En plus de son effet anti-proliférant nos données suggèrent que la rapamycine intervient aussi dans le trafic cellulaire en séquestrant les Tconv activés dans le compartiment ganglionnaire, les empêchant ainsi de migrer vers le compartiment musculaire.

Méthodologie :

Le protocole expérimental d'immunisation pour la provocation de la MAE a été décrit dans l'article 1. Pour le traitement, les souris reçoivent de la rapamycine (Sirolimus, Wyeth) à la concentration de 1mg/kg ou 3mg/kg diluée dans de l'eau, à l'aide de canules de gavage (Per os) tous les jours pendant 24 jours (J0 à J24 : traitement préventif) ou pendant 10 jours au décours des immunisations (J14 –J24 traitement curatif). Les souris témoins sont gavées avec de l'eau. L'analyse de l'effet du traitement est réalisée au moyen des scores cliniques et histologiques décrits dans l'article 1.

Pour les analyses quantitative de KLF2, les extractions d'ARN ont été réalisées sur colonne QIAGEN (kit RNeasy plus) à partir de populations lymphocytaires triées en cytométrie en flux (Aria). Après quantification de l'ARN celui-ci est conservé en échantillon de 50-100 ng à -80°C. Pour la quantification une RT PCR est réalisée (amorce up et down + SYBR Green master mix) avec ABI Prism 7700.

I. Traitement préventif

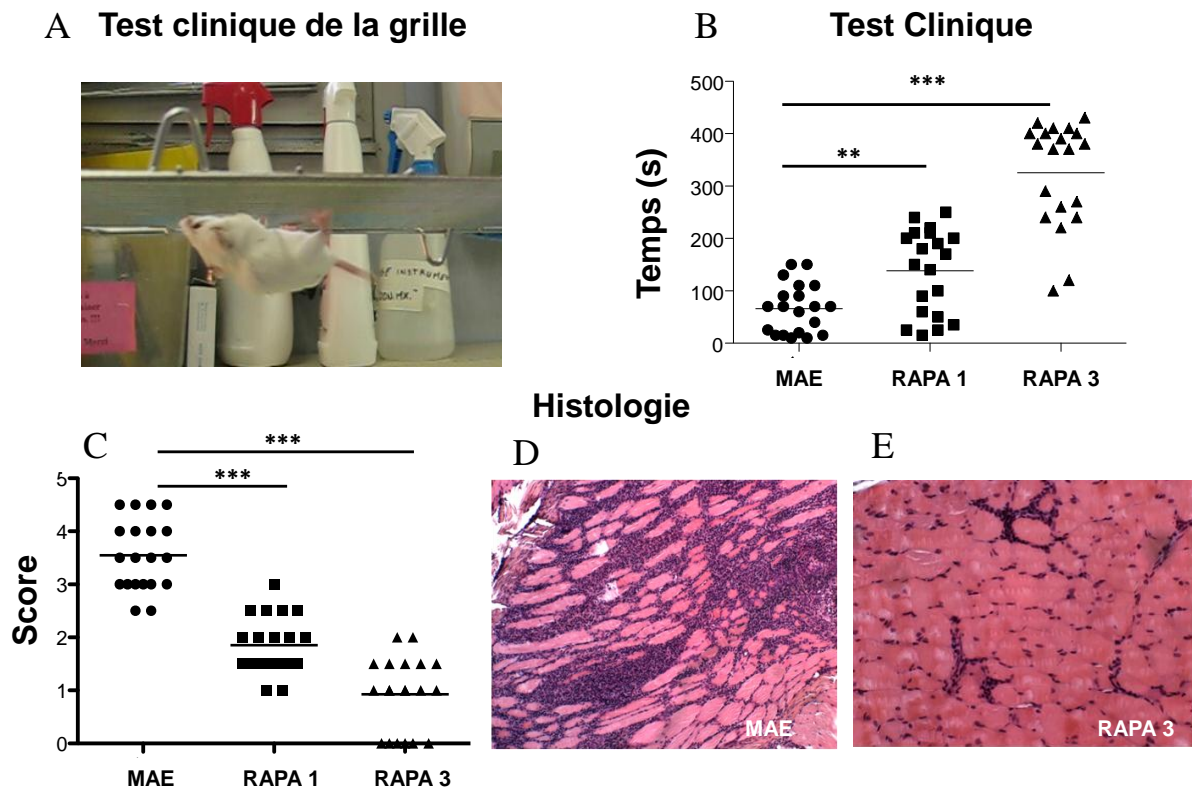
Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la rapamycine administrée depuis le début de l'immunisation (de J-1) jusqu'au sacrifice des souris sur la sévérité de la myosite (à J+25, soit 10 j après la dernière immunisation).

1 Effet clinique et histologique des traitements

Pour étudier l'évolution clinique des souris, des tests de force musculaire des différents groupes de souris sont effectués avec le test de la grille 7 jours après la dernière immunisation (J21). La force musculaire est significativement augmentée quand les souris sont traitées par la rapamycine à la posologie de 1mg/kg ($158 \pm 94s$, $n=5$) (figure 1), comparativement aux souris MAE traitées par PBS, ($72 \pm 14s$, $n=8$, $p= 0,05$) contrôlées. Cet effet est majoré par l'augmentation de la posologie de la rapamycine à 3 mg/kg ($285 \pm 152 s$, $p=0,01$). Pour les groupes contrôlés, nous montrons que les souris non immunisées, tiennent $600 \pm 61s$, alors que le groupe de souris immunisées seulement avec du CFA et du PBS reste sur la grille $160 \pm 22 s$.

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par l'analyse histologique. Pour les souris MAE traitées par de la rapamycine 1mg/kg, le score est significativement plus faible ($1,4 \pm 0,22$ $p=0.004$) (figure 1), comparativement aux souris MAE où l'infiltrat est important, avec un grade de $3,25 \pm 0,7$. Comme observé au cours des tests cliniques, le traitement par 3mg/kg de rapamycine permet une diminution encore plus importante de la sévérité de la myosite ($0,8 \pm 0,75$; $p=0,68$) (figure 1). L'ensemble de ces résultats montre que le traitement préventif par la rapamycine permet une diminution significative de la sévérité de la MAE et ce, avec un effet dose.

Figure 1 : Effet bénéfique du traitement préventif par rapamycine sur la MAE



(A) Représentation du test de la grille décrit dans l'article 1. (B) Evaluation clinique au moyen du test de la grille représentant le groupe de souris MAE, le groupe MAE traité par 1 mg/Kg (RAPA 1) et le groupe traité par 3 mg/Kg (RAPA 3). (C) Représentation des scores histologiques pour chacun des 3 groupes. (D) Photographie d'une biopsie musculaire d'une coupe musculaire d'un Gastrocnémien d'une souris MAE avec un score à 4 et (E) d'une souris RAPA 3 avec un score à 1,5. ** p<0,05 *** p<0,01

2. La rapamycine s'accompagne de modifications quantitatives avec une lymphopénie relative T sans modification fonctionnelle qualitative

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes impliqués dans l'amélioration observée grâce au traitement par rapamycine. La première étape a été d'analyser l'effet de la rapamycine sur la cellularité des organes lymphoïdes secondaires. On peut constater que les ganglions drainants (ganglions poplités) contiennent deux fois plus de lymphocytes chez les souris MAE ($51,3 \pm 11,3 \times 10^6$) (figure 2) en comparaison avec les souris MAE traitées par rapamycine à la posologie de 1mg/kg ($26,6 \pm 9,6 \times 10^6$; p=0,006). Nous ne voyons pas d'effet dose associé à l'augmentation de la posologie de la rapamycine (3mg/kg), $26,1 \pm 7 \times 10^6$ lymphocytes (n=4) (figure 2). Ces résultats sont comparables à ceux constatés dans la rate : les souris MAE ont significativement plus de lymphocytes ($262 \pm 80 \times 10^6$ lymphocytes) que

les souris traitées par la rapamycine à 1mg/kg ($135 \times 10^6 \pm 35$, $p=0,003$). Aucune différence significative n'est observée si la posologie de la rapamycine est augmentée ($141 \pm 32 \times 10^6$ lymphocytes).

Dans un second temps, nous avons analysé la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires dans le compartiment ganglionnaire.

On peut constater dans les ganglions drainants, une forte diminution du pourcentage de lymphocytes T ($CD3^+$) parmi les lymphocytes totaux (de $72 \pm 4,5\%$ pour les souris MAE à $32 \pm 12\%$ ($p=0,0007$) pour les souris traitées par rapamycine (1mg/kg)). Cette baisse est encore plus marquée quand on compare les valeurs absolues de lymphocytes T $CD3^+$. Celles-ci diminuent de $2,3 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^6$ à $8 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^6$ cellules ($p=0,003$) (figure 2). Les résultats sont similaires quand les souris sont traitées avec une posologie plus forte de rapamycine, 3mg/kg ($9,7 \cdot 10^6 \pm 3,4 \cdot 10^6$ cellules T $CD3^+$) (figure 2). La répartition T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans les ganglions drainants n'est pas modifiée par la rapamycine. Au cours de la MAE, les ganglions drainants contiennent $72 \pm 3\%$ de T $CD4^+$ et $25 \pm 2\%$ de T $CD8^+$ parmi les T. Ces valeurs ne sont pas modifiées par le traitement par rapamycine seule (1 et 3mg/kg).

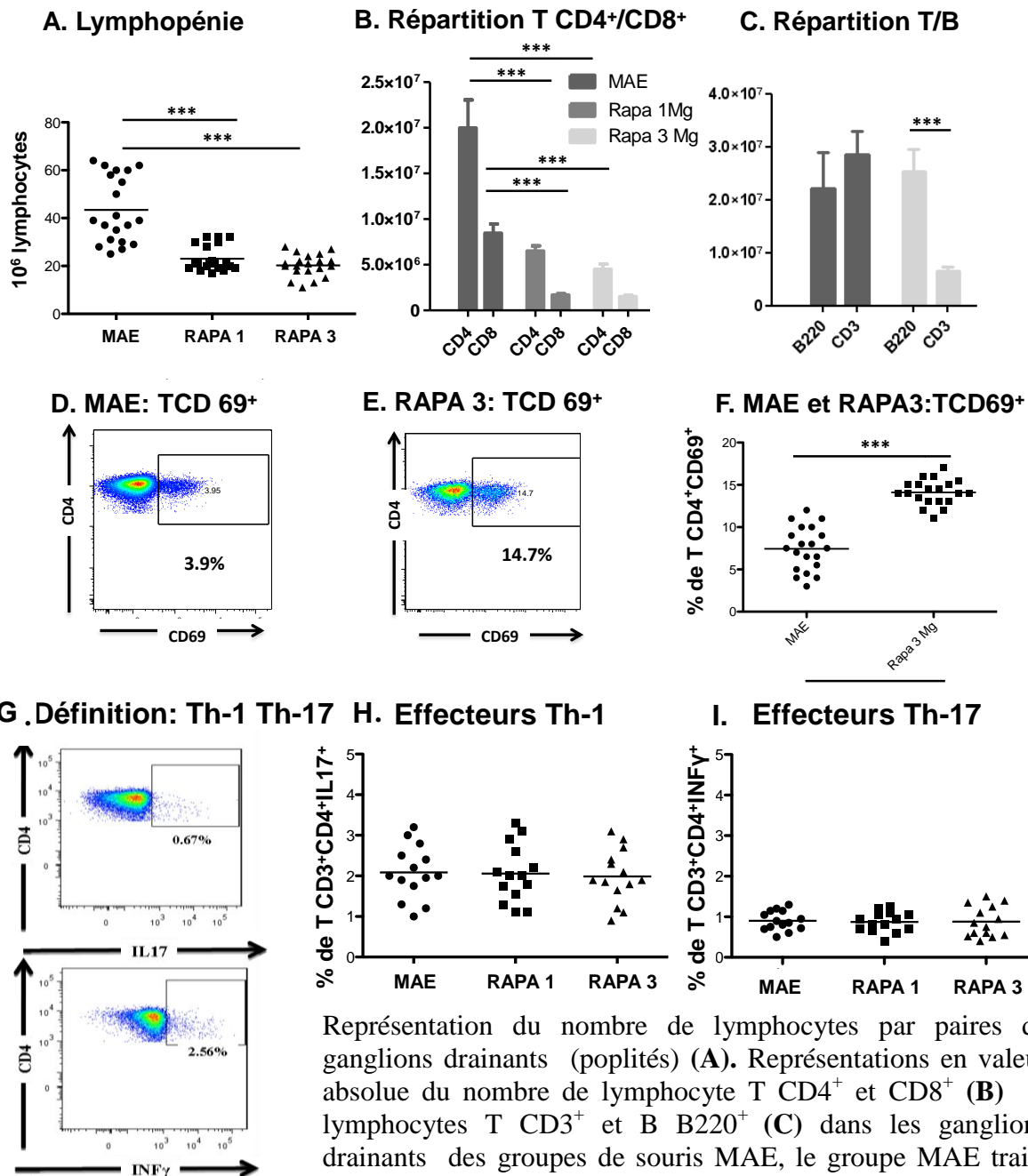
A l'inverse, on observe une forte augmentation du pourcentage des lymphocytes B en présence de rapamycine avec $33 \pm 14\%$ de cellules $B220^+$ parmi les lymphocytes totaux dans le groupe MAE à $61 \pm 6\%$, chez les souris ayant reçue de la rapamycine. Cependant, cette augmentation en pourcentage ne se traduit pas par une augmentation du nombre de lymphocytes B en valeur absolue ($1,6 \cdot 10^7 \pm 8,8 \cdot 10^6$ dans le groupe MAE versus $1,5 \cdot 10^7 \pm 4,7 \cdot 10^6$ dans le groupe MAE rapamycine 1mg/kg (figure 2).

L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'un effet lymphopéniant de la rapamycine uniquement sur le compartiment lymphocytaire T.

De plus, nous avons étudié le phénotype d'activation des T en analysant les marqueurs d'activation $CD69$ (figure 2). Contrairement à nos attentes, nous observons une augmentation significative du pourcentage de T activés $CD69^+$ ($CD3^+CD69^+$) dans le groupe MAE rapamycine 3mg/kg ($11,3 \pm 2,8\%$) comparativement au groupe MAE ($4,59 \pm 0,7\%$, $p=0,0006$). En plus des modifications quantitatives, nous avons cherché à déterminer l'effet de la rapamycine sur les fonctions effectrices des Tconv. La même observation a été faite avec les T activés $CD44^+$ (MAE $14 \pm 5,07$ vs MAE rapamycine $16,1 \pm 4,45$; $p=0,5$). Pour étudier l'effet sur la fonction effectrice lymphocytaire du traitement, nous avons mesuré la production

cytokinique lymphocytaire. La rapamycine ne modifie pas significativement le pourcentage de T CD4+IL-17⁺ à 1mg/kg (0,41% ±0,27), ou 3mg/kg (0,81 ±0,52). De même, aucune diminution significative de la sécrétion d'IFN- γ par les CD4⁺ (figure 2) et les CD8⁺ (figure 2) n'est observée avec les différents traitements.

Figure 2 : Rapamycine et répartition T



Représentation du nombre de lymphocytes par paires de ganglions drainants (poplités) (A). Représentations en valeur absolue du nombre de lymphocyte T CD4⁺ et CD8⁺ (B) et lymphocytes T CD3⁺ et B B220⁺ (C) dans les ganglions drainants des groupes de souris MAE, le groupe MAE traité par 1 mg/Kg et le groupe traité par 3 mg/Kg (RAPA 3) p<0,01, p<0,05**. Définition en cytométrie en flux des T activés CD69⁺ à partir de lymphocytes issus de ganglions drainant (CD3⁺CD4⁺) d'une souris MAE (D) et RAPA 3 (E); représentations groupées (F). Définition des cellules effectrices Th-1 (CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺) et Th-17 (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺) (G) à partir de lymphocytes issus de ganglions drainant stimulés 4 heures in vitro par PMA-Ionomycine. Représentation du pourcentage de T effecteurs Th-1 (H) et Th-17 (I) parmi les T(CD3⁺CD4⁺) dans les ganglions drainants. Analyses réalisées 10 jours après la dernière immunisation.

2. Effet de la rapamycine sur Treg:

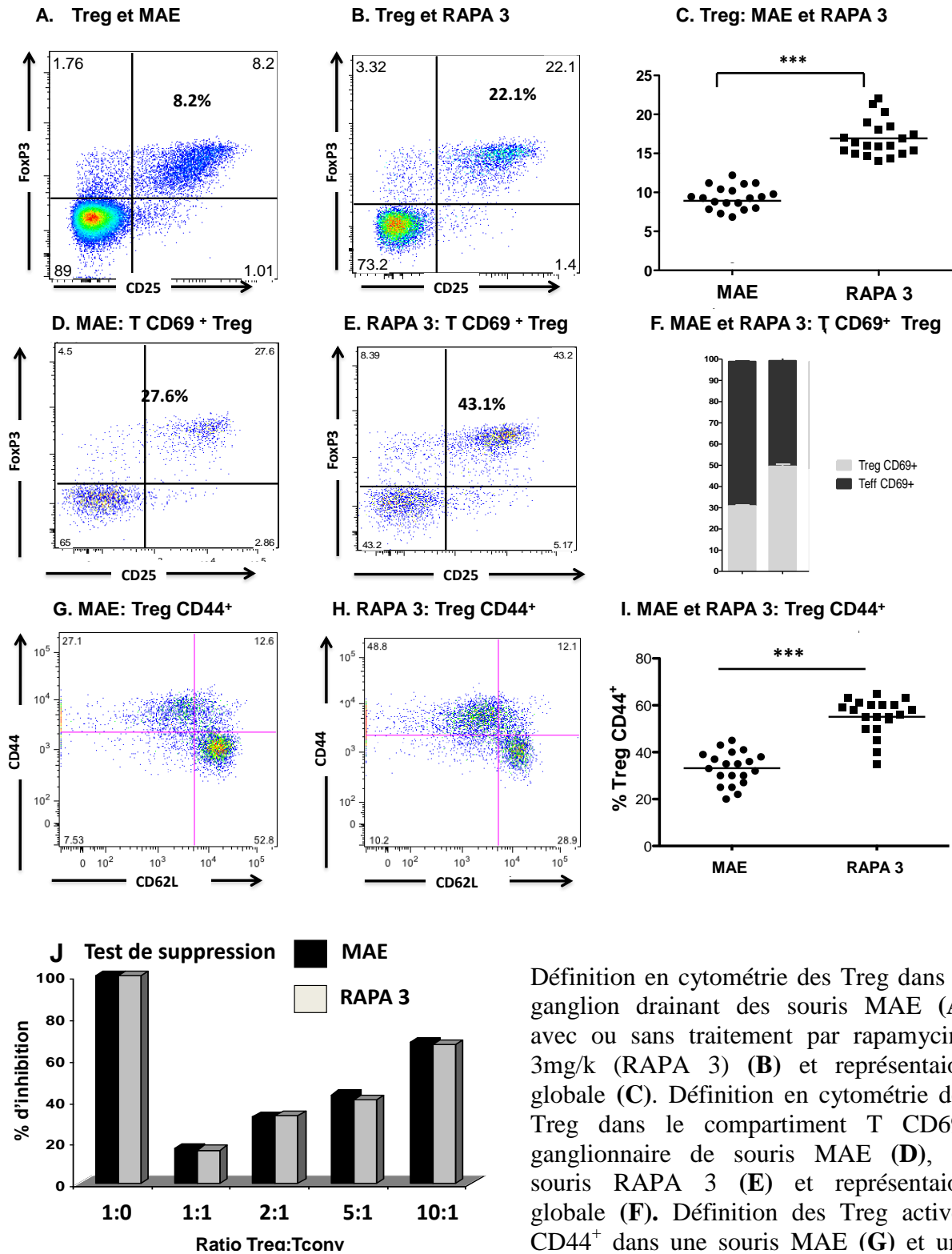
Aucune différence de pourcentage de Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$) parmi les lymphocytes T $CD3^+CD4^+$ n'est observée entre les groupes MAE ($11\pm 1,3\%$) et MAE traités par rapamycine 1mg/kg ($9,4\% \pm 1,8$) (figure 3). Contrairement au groupe recevant de la rapamycine à 1mg/kg , le groupe à 3mg/kg présente une élévation significative du pourcentage de Treg ($14,9\pm 1,2\%$, $p=0,004$) (figure 3). Ces résultats sont observés uniquement dans les ganglions drainants. Le pourcentage de Treg dans la rate est sensiblement le même quelque soit le traitement administré. Les valeurs absolues du nombre de Treg ne sont pas modifiées par les traitements dans les ganglions drainants. Ainsi les traitements par fortes doses de rapamycine (3mg/kg) permettent une augmentation significative de la fréquence des Tregs uniquement dans les ganglions drainants.

Spécifiquement dans le compartiment T activés $CD69^+$, on observe une augmentation de la proportion de Treg. Ce compartiment représente 24% de ce compartiment chez la souris MAE et augmente à 52% dans le groupe MAE traité à la posologie de 3 mg/kg . Ces modifications suggèrent une modification de l'équilibre de la balance Treg : Tconv activés. De plus, nous avons observé que les Treg étaient plus activés avec le traitement par rapamycine comparativement au groupe MAE ($58\pm 12\%$ vs $35\pm 7\%$ de Treg $CD44^+$) (figure 3).

Nous avons analysé l'effet de la rapamycine dans le muscle des souris traitées dans l'hypothèse d'un enrichissement en Treg dans le compartiment cellulaire. Cependant, étant donné la faible importance de l'infiltrat inflammatoire chez les souris MAE traitées par rapamycine il n'a pas été possible d'évaluer le pourcentage de Treg dans ces infiltrats. Il est à noter que l'infiltrat inflammatoire lymphocytaire T des souris MAE est constitué à 20% de cellules $FoxP3^+$.

Nous avons aussi testé la fonction Treg et pu observer que les Treg issus des organes lymphoïdes secondaires des souris MAE traitées par rapamycine à 3 mg/kg , n'avaient d'altération de fonction comparativement à ceux des souris MAE comme l'atteste le résultat des tests de suppression.

Figure 3 : Treg et rapamycine au cours de la MAE



Définition en cytométrie des Treg dans le ganglion drainant des souris MAE (A) avec ou sans traitement par rapamycine 3mg/k (RAPA 3) (B) et représentation globale (C). Définition en cytométrie des Treg dans le compartiment T CD69⁺ ganglionnaire de souris MAE (D), d' souris RAPA 3 (E) et représentation globale (F). Définition des Treg activés CD44⁺ dans une souris MAE (G) et une

Test de suppression (J) mesurant le pourcentage d'inhibition de prolifération de Tconv stimulés in vitro en présence ou de Treg. La prolifération est mesurée par incorporation de thymidine tritiée. La valeur 100% correspond à la prolifération des Tconv en l'absence de Treg. Le pourcentage d'inhibition représente la décroissance de prolifération des Tconv en présence de Treg comparativement à la valeur de référence. Les ratio Treg :Tconv sont rapportés en abscisse.

3. Effet de la rapamycine sur le trafic ganglionnaire des T :

Nous avons analysé enfin, l'effet de la rapamycine sur le trafic ganglionnaire lymphocytaire T. En effet, nous avons été surpris d'observer une élévation du pourcentage de T activés dans le ganglion drainant des souris MAE traitées par la rapamycine alors que cette molécule est supposée inhiber leur division. Nous avons donc analysé l'intensité d'expression membranaire du récepteur au chimiokine CCR7 permettant l'adressage ganglionnaire lymphocytaire T dans la sous population T activée définie par l'expression forte de CD44.

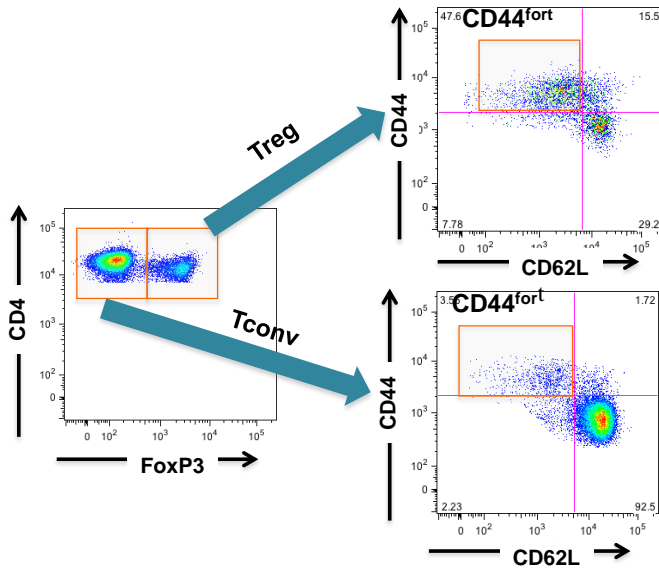
Dans cette population T CD44⁺ du ganglion drainant, nous avons distingué les Treg des Tconv. L'intensité de l'expression de CCR7 est significativement plus forte que ce soit à la surface des Tconv activés ou des Treg dans le groupe de souris MAE rapamycine comparativement au groupe MAE (Figure 4).

Puisque le niveau d'expression de CCR7 est régulé par le facteur de transcription KLF2, nous avons mesuré par RT-PCR son niveau d'expression intra-cellulaire. Ces analyses ont permis de montrer qu'il existait une augmentation du niveau d'expression de KLF2 dans les Tconv CD44⁺ ganglionnaires issus de souris MAE rapamycine comparativement au groupe MAE. Il est à noter que ce résultat n'a pas été observé dans la sous population Treg. Cependant il faut souligner que cette expérience analysant le niveau d'expression de KLF2, n'a été réalisée qu'une fois. Il s'agit de données préliminaires qui sont en cours de confirmation.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la rapamycine induit une augmentation de l'expression de CCR7 à la surface des T et ainsi leur adressage ganglionnaire, augmentation qui serait dépendante de la voie KLF2. Ces modifications de molécules d'adressage peuvent suggérer que la rapamycine modifierait le trafic lymphocytaire des T activés en les bloquant dans les ganglions drainants, les empêchant ainsi de migrer vers le tissu cible musculaire.

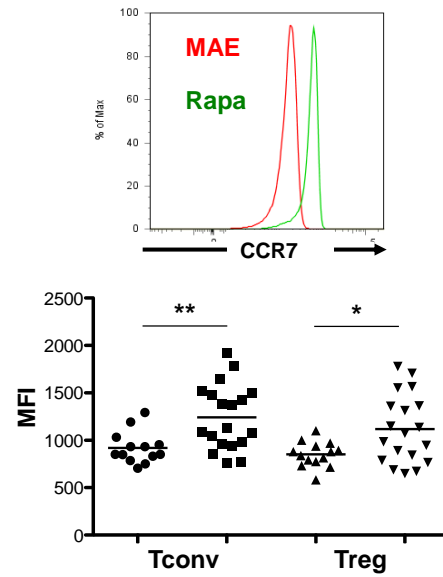
Figure 4: Rapamycine et adressage ganglionnaire

A. Sélection Tconv/Treg dans le compartiment T activé



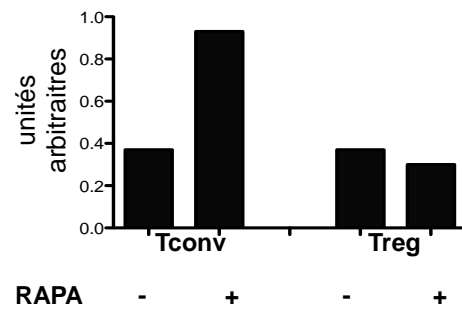
Représentation de la méthode de sélection en cytométrie pour définir les Treg et les Tconv au sein de la population T activée CD44^{fort} (A) issue des ganglions drainants de souris MAE. Au sein de ces 2 populations le niveau d'expression de CCR7 est analysé en cytométrie en flux. Les données obtenues sont représentées en (B) pour les groupes traités ou non par 3 mg/kg de rapamycine (RAPA). De la même façon en (C) est représenté le niveau d'expression de KLF2 mesuré par RT-Q-PCR.

B. Niveau d'expression de CCR7



RAPA - + - +

C. Expression de KLF2



RAPA - + - +

II.Traitement curatif

Après avoir montré l'efficacité de la rapamycine en traitement préventif nous avons testé l'effet de la rapamycine en traitement curatif.

1.Effet clinique et histologique des traitements

Le traitement curatif commence le lendemain de la dernière immunisation (J+15) et dure 10 jours. Les souris reçoivent chaque jour par gavage 1mg ou 3mg de rapamycine dans 200 μ L d'eau, les souris témoins reçoivent 200 μ L d'eau.

La force musculaire dans le groupe rapamycine 1 mg/kg ($58 \pm 57s$, n=20) n'est pas différente comparativement au groupe MAE ($44.29 \pm 42s$, n=7). Le traitement par rapamycine 3mg ($92,5 \pm 85s$, n=20 ; $p < 0,01$) augmentent la force musculaire de façon significative.

Ces résultats sont concordants avec les résultats histologiques. Le score du groupe rapamycine 1mg (score de $2,9 \pm 0,7$, n=8) n'est pas différent de celui du groupe MAE ($3,3 \pm 1,0$; n=20). En revanche l'augmentation de la rapamycine à 3mg (score de $1,8 \pm 0,5$; n=20; $p < 0,05$) s'accompagne d'une amélioration significative des scores.

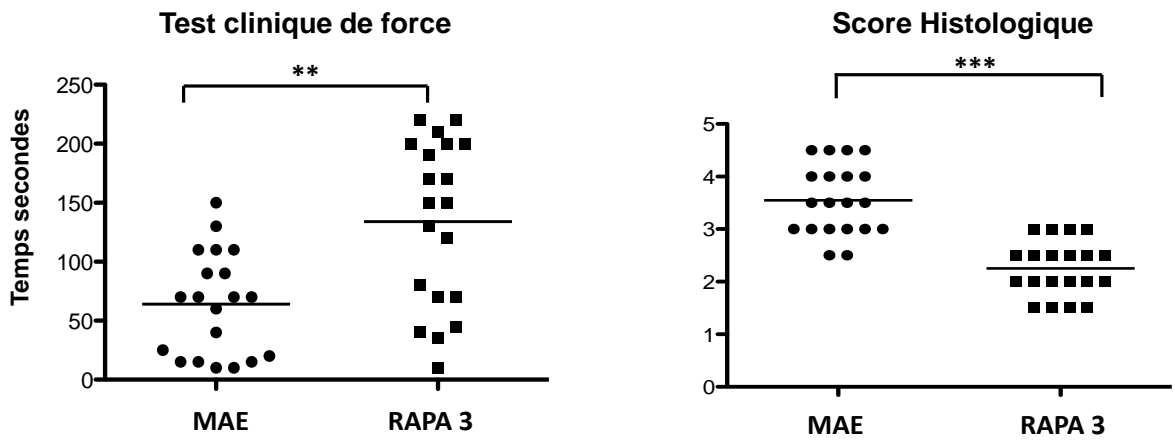
L'ensemble de ces résultats, montre que le traitement curatif par la rapamycine permet une diminution significative de la sévérité de la MAE qu'à la posologie de 3mg.

2.Immunomodulation et bénéfice sur les lymphocytes T régulateurs

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes impliqués dans l'amélioration observée afin de les comparer aux résultats préventifs.

La baisse du nombre de lymphocytes dans les ganglions drainants des groupes rapamycine 3mg/Kg ($16 \pm 6,8.10^6$; n=20) comparée au groupe MAE ($20 \pm 4,9$; n=20; $p < 0,05$) est significative. On observe aussi une augmentation modeste augmentation non significative des Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) dans le groupe rapamycine 3mg/Kg ($13 \pm 1,4\%$; n=20) comparé au groupe MAE ($10,3\% \pm 1,4$; n=20 ; $p < 0,05$)

Figure 5 : Effet Curatif de la rapamycine



Article 2

Systemic Treg deficiency with a Th1 and not Th17 signature in Inclusion Body Myositis soumis (brain)

Après avoir étudié le rôle des Treg dans un modèle murin de myopathie auto-immune et leur potentiel thérapeutique, nous nous sommes attachés à étudier leur rôle en pathologie humaine. Nous avons choisi en particulier d'étudier leur rôle au cours de la MI pour plusieurs raisons.

Comme nous l'avons vu, la MI partage avec la PM/MC les mêmes caractéristiques « dysimmunitaires » que nous avons reproduites au cours de la MAE. Pour autant la participation du système immunitaire dans la progression de la maladie reste controversée, même si des observations cliniques suggèrent qu'une forte immunosuppression pourrait arrêter la progression de la maladie. Ainsi, il nous a paru important de mieux décrire les caractéristiques de la réponse inflammatoire et en particulier du rôle des Treg au cours de la MI afin de proposer d'éventuelles thérapeutiques immuno-modulatrices ciblées pour une pathologie qui reste aujourd'hui sans traitement. Ces nouvelles approches thérapeutiques pourraient impliquer les Treg comme l'ont suggéré les travaux que nous avons menés chez l'animal.

Nous avons donc étudié la réponse immunitaire systémique chez 22 patients présentant une MI définie en analysant le phénotype lymphocytaire en cytométrie en flux et le profil de sécrétion sérique cytokinique par dosage Luminex®. Ces données ont été comparées à celles obtenues chez 22 patients contrôles appariés sur l'âge et le sexe. Cette étude a été complétée par une analyse histologique des biopsies musculaire des patients MII.

L'analyse des résultats a permis de montrer une augmentation du pourcentage de lymphocytes T mémoires à différenciation terminale dans les compartiments CD4⁺ et CD8⁺ au cours de la MI. Cette modification de répartition lymphocytaire est associée à une activation du système immunitaire en particulier dans le compartiment T CD4⁺.

L'analyse du profil cytokinique nous a permis de déterminer une orientation Th1 de la réponse, comme en témoigne en particulier l'élévation de l'IL-12 et des chimiokines Th1. Cette orientation est en accord avec l'observation de la forte augmentation de T CD8⁺IFN γ ⁺ chez les patients MI. Il faut souligner que cette population est principalement constituée par

les T CD8⁺ mémoire à différenciation terminale caractérisés par la perte de l'expression du CD28.

A l'inverse, l'analyse en cytométrie en flux et l'analyse cytokinique ne suggère pas une orientation de la réponse vers une différenciation Th2 ou Th17.

Dans un second temps, nous avons analysé quel était l'état du compartiment Treg. L'analyse a permis de montrer qu'il existait une diminution du pourcentage systémique de Treg chez les patients MI. Nous avons pu observer que cette diminution portait principalement sur la sous-population Treg activés. Cependant avant de conclure à déficit en Treg, nous avons analysé les Treg dans le compartiment musculaire. Nous avons alors constaté que les Treg étaient présents dans le muscle des patients et qu'ils représentaient presque 20% des T musculaires. Ces analyses quantitatives ont été complétées par des analyses qualitatives des Treg dont l'activité a été mesurée *in vitro* par des tests de suppression. Ces tests ont pu montrer que les Treg sanguins de MI fonctionnaient de la même manière que les Treg sanguins des contrôles. .

Enfin, nous avons analysé l'ensemble de ces données au moyen d'outils statistiques permettant des analyses groupées et permettant de dégager une « signature » immunologique.

Les résultats ont montré qu'il existait une signature Th1 au cours de la MI. De plus, ces analyses ont permis de montrer qu'un nombre restreint de paramètres (n=7) pouvait discriminer les malades des contrôles. Cette signature composée principalement de paramètres Th1 permet d'envisager ce type d'approche comme test diagnostique non invasif pour le diagnostic de la MI.

Systemic Treg Deficiency with a Th1 Signature in Inclusion Body Myositis;

No Evidence of a Th17 Involvement

Running title:

Tregs in Inclusion Body Myositis

Allenbach Y. ^{*1-4}, Rosenzweig M. ^{*1-3}, Six A. ^{1†}, Choura W. ^{1-3†}, Prevel N. ¹⁻³, Wanschitz J. ², Musset L. ⁵, Eymard B. ⁶, Salomon B. ¹⁻³, Herson S. ³, Klatzmann D. ¹ and Benveniste O. ¹⁻⁴

*. †These two authors contributed equally to this work

¹UPMC Univ Paris 06, UMR 7211, F-75013 Paris, France;

²Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, UMR 7211, F-75013 Paris, France

³INSERM, UMRS959, F-75013 Paris, France

⁴Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Internal Medicine Department

⁵Department of immunochemistry, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France.

⁶Department of neurology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France.

Correspondence to Yves Allenbach, Service de Médecine Interne 1, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. Phone: + (33) 1 42 16 00 88. Fax: + (33) 1 42 16 10 58. E-mail: yves.allenbach@psl.aphp.fr

Running title: Treg in sIBM patients

Keywords: Cytokine signature, sporadic inclusion body myositis, regulatory T cells, Th17, Th1.

Word count: 280 words (abstract), 4290 words (manuscript), 34 pages, 40 references, 6 figures

Conflict of interest: none

Abstract:

Introduction: Sporadic inclusion body myositis (sIBM) is an inflammatory myopathy characterized by CD8⁺ cytotoxic T cell infiltrates and amyloid deposits. Regulatory T cells (Treg) are key regulators of immune responses. We analysed Treg numbers and functionality, and 54 immunological parameters, in sIBM patients and age-matched healthy controls.

Method: We studied 22 patients with definite sIBM (mean age 70.1 y) and 22 controls matched for age and sex. None of the patients or controls was receiving immunosuppressants. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were analyzed by flow cytometry, and concentrations of 25 cytokines and chemokines were determined by multiplex assay. Muscle biopsies of 8 patients were examined by immunohistochemistry for the presence of Tregs.

Results: Relative to the controls, the blood of sIBM patients contained higher mean percentages of activated CD4⁺ T cells (16.2±13% vs 8.7±4.6%; p=0.03) and terminally differentiated CD8⁺CD28⁻ T cells (61±23.9% vs 44±20%, p=0.023). The mean percentage of CD3⁺CD8⁺IFN γ ⁺ cells was also higher in sIBM patients (60.8±18% vs 45.8±16%; p=0.01), while the mean percentage of CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ cells was not significantly different between the groups. Relative to the controls, sIBM patients had higher serum concentrations of IL-12 (301.36±142.08 pg/ml vs 154.25±28.41 pg/ml, p=0.0002) and of the Th-1 chemokines CXCL-9 (186±12 pg/ml vs 13±7 pg/ml, p<0.0001) and CXCL-10 (187±62 pg/ml vs 13±6 pg/ml, p<0.0001). Average linkage hierarchical clustering analysis showed that the subjects segregated into two groups on the basis of a selected Th-1 signature. Leave-one-out cross-validation correctly classified the patient/control origin of 38 (87%) of the 44 samples.

Conclusion: SIBM is associated with Th-1-type immune activation and with a reduced percentage of Tregs in the peripheral compartment. Tregs are also present in muscle infiltrates but seem unable to control local inflammation.

Introduction:

Sporadic inclusion body myositis (sIBM) is a slowly disabling disease (Benveniste et al. 2011), and the most common acquired inflammatory myopathy in subjects over 50 years old (Griggs et al., 1995).

The pathophysiology of sIBM is unclear. Histological analysis of muscle suggests that two distinct phenomena co-exist, namely inflammation (myositis), and muscle degeneration with fiber vacuolization, and accumulation of intramuscular-fiber multiprotein aggregates (inclusion bodies) mainly composed of amyloid- β and p-tau (Askanas et al, 2008). The relative pathophysiological importance of the two phenomena is controversial (Greenberg, 2009).

Conventional immunosuppressive drugs are rarely effective in sIBM (Benveniste et al. 2011). Nevertheless, major T cell depletion induced by anti-T-lymphocyte globulin (Lindberg et al., 2003) or alemtuzumab (Dalakas et al., 2009) can slow the disease course, and reconstitution of the T cell compartment has been linked to disease flares (Dalakas et al., 2009), showing the involvement of adaptive immune responses in disease progression. There is also evidence of an autoimmune process: sIBM is associated with certain human leukocyte antigen (HLA) gene profiles (Lampe et al, 2003). and one-third of sIBM patients have associated autoimmune diseases (Badrising et al, 2004) and/or autoantibodies (Koffman et al, 1998). Upregulation of class I major histocompatibility complex (MHC) molecules on the surface of sIBM muscle fibres, and muscle infiltration by oligoclonal cytotoxic CD8⁺ T cells (Dimitri et al, 2006), which can release perforin and granzyme A (Orimo et al, 1994), strongly suggest a role of muscle autoimmune attack in the pathogenesis of sIBM.

Adaptive immune responses are modulated by several subsets of CD4⁺ T cells (Th1, Th2 and Th17), which produce distinct sets of cytokines. Data obtained with animal models of

autoimmune disease, and confirmed in humans, support the involvement of Th1 and/or Th17 cells in the induction of auto-immune diseases (Bettelli et al., 2008).

Natural regulatory T cells (Treg) play a key role in autoimmunity. For example, the absence of Tregs due to mutations in the *Foxp3* gene, which codes for a key transcription factor governing Treg differentiation, causes multiorgan autoimmune disease in Scurfy mice and in humans with the IPEX syndrome (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome). Furthermore, Treg depletion at any time in life rapidly causes autoimmunity in mice (Lahl et al., 2007). Finally, many autoimmune diseases have been linked to quantitative or functional Treg defects (Sakaguchi et al., 2008), but such defects have not yet been investigated in sIBM. We therefore analysed T helper and Treg subsets in the peripheral blood and muscle infiltrates of sIBM patients who were not receiving immunosuppressive or immunomodulatory drugs, by comparison with age-matched healthy controls.

Patients and Methods

Patients

We studied patients with definite sIBM based on pathological criteria (Griggset al., 1995), including inflammatory infiltrates with rimmed vacuoles and amyloid deposits shown by TDP43 (ProteinTech Group) and P62 (clone: 3/P62 LCK ligand, BD Bioscience) immunostaining (Askanas et al., 2011). None had received immunosuppressive or immunomodulatory drugs during the 6 months before inclusion in the study. As physiological modifications of the immune system occur with age (immunosenescence), control subjects were matched for sex and age. The controls were free of inflammatory/autoimmune diseases, bacterial, viral (HVC, HBV, HIV) and fungal infections, had no past history of cancer or active cancer, and were not receiving immunosuppressive or immunomodulatory drugs.

Blood samples were obtained from all the patients and controls, and available frozen diagnostic biopsies were also studied. The institutional review board approved the study protocol, and all the patients were enrolled after giving their written informed consent (NCT00898989).

Flow cytometry

Numbers (cells/ μ l) of total lymphocytes, CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocytes, CD19+ B cells and CD3-CD56+ NK cells were determined in fresh blood, using CYTO-STAT tetraCHROME kits with Flowcount fluorescent beads as internal standards. A FC500 cytometer and Tetra CXP software were used according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. PBMCs were washed twice in PBS containing 2% fetal calf serum and counted before labelling. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations used a panel of monoclonal antibodies (see below). Briefly, cells were incubated in PBS containing 2% FCS and the appropriate antibodies at 4°C for 20 min, washed in PBS containing 2% FCS, then fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde before analysis. Monoclonal antibodies (mAbs) directly conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin-Texas Red (ECD), allophycocyanin (APC) or phycoerythrin-cyanin 7 (PE-Cya7) were used to label the following cell-surface proteins: CD3, CD4, CD16, CD8, CD19, CD20, CD45RA, CD45RO, CD56 (all from Beckman Coulter, Villepinte, France), CD4, CD25, CD28, CD62L, HLA-DR (BD Biosciences, Le Pont De Claix, France), and CCR6 (eBiosciences, Paris, France). Irrelevant antibodies of the respective isotypes were used as negative controls. Intranuclear FOXP3 labelling was performed after CD3, CD4, CD127 and CD25 membrane staining, using the APC anti-human FoxP3 kit (clone PCH101,

eBiosciences) according to the manufacturer's instructions. Rat IgG2a APC was used as isotype control (eBiosciences,).

For the detection of intracellular cytokine production, PBMC were stimulated with 50 ng/ml PMA and 1 mM ionomycin in the presence of Golgi-Stop (BD Biosciences) for 4 h, then stained with anti-IFN- γ -FITC (eBioscience) or anti-IL-17-Alexa Fluor 647 (e-Bioscience) after fixation and permeabilization, as recommended by the manufacturer.

Cell acquisition and analysis by flow cytometry were performed with an FC500 cytometer (Beckman Coulter). Instrument settings (gains, compensations, and threshold) were set with the assistance of the device software (CXP Software; Beckman Coulter), and calibration beads were acquired simultaneously (Flow-set beads, Cytocomp kit, and CYTO-TROL Control Cells). Reproducibility was verified with standardized beads (Flow-check). Data were analyzed with CXP software (Beckman Coulter).

T cell suppression assays

T cell suppression assays were performed as previously described (Guillot-Delost et al., 2008). Briefly, PBMC were stained with appropriate combinations of mAbs in order to isolate CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} cells (FACS-sorted Tregs) on a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences). To measure their suppressive activity, Tregs were placed in round-bottomed 96-well tissue culture plates at various ratios (1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16) with 5x10⁴ autologous CD4⁺CD25⁻ responder cells in the presence of 10⁴ irradiated (15 Grays) allogeneic PBMC as stimulator cells in 200 μ L of complete culture medium. The latter consisted of RPMI 1640 medium (Invitrogen Corporation) supplemented with 10% human AB serum (hSAB purchased from Etablissement Français du Sang, Paris, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen Corporation).

Autologous CD4⁺CD25⁻ cells were obtained by negative selection of FACS-sorted cells. After 4 days, cell proliferation was determined in terms of tritiated thymidine incorporation (1 μ Ci 3H-Tdr, Amersham, Buckinghamshire, UK) for an additional 16 h, as measured with a β -counter (Counter-WALLAC). Results were expressed in counts per minute, and inhibition of proliferation was determined as follows: proliferation of effector cells without Tregs/proliferation of effector cells with Tregs.

Cytokine and chemokine assays

Concentrations of 25 cytokines and chemokines (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1RA, IL1 β , IL-2, IL-2r, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CXCL-10, CCL-2, CXCL-9, CCL-3, CCL-4, CCL-5 and TNF- α) were measured in serum and culture supernatants by using the Human Cytokine 25-Plex assay (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) as recommended by the manufacturer. All assays were done twice in two independent experiments, with equivalent results.

Histology and immunohistochemistry

CD4⁺, FOXP3⁺ and IL-17⁺ cells were detected in muscle biopsy samples by immunohistochemistry on frozen sections. Serial sections 10 μ m thick were fixed in acetone at -20°C for 10 minutes, washed with phosphate buffered saline (PBS), blocked with 10% normal goat serum (G9023; Sigma) in antibody diluent (S3022; Dako) for 30 minutes to minimize non specific binding, and then incubated with anti-CD3 (Dako clone 4B12), CD4 (Dako clone MT-310), FoxP3 (eBioscience, clone 236A/E7) or IL-17 (R&D system Clone AF-317-NA) antibodies overnight at 4°C. Immunostaining was revealed by adding enhanced horseradish peroxidase-conjugated streptavidin and a chromogenic substrate. Each serial section was fully examined and all positive cells were counted.

Double immunofluorescence was used to analyze FoxP3⁺ and CD4⁺ cell co-localisation. Frozen acetone-fixed sections were blocked with avidin/biotin blocking reagent (SP-2001, Vector Laboratories) for 15 minutes, followed by 10% goat serum (30 minutes), and were then incubated with mouse monoclonal anti-FoxP3 (1:50) and rabbit polyclonal anti-CD4 (1:100, Abcam[®]) antibodies overnight at 4°C. Sections were then incubated with Alexa Fluor (AF) 555 goat anti-mouse IgG (L + H) and AF 488 goat anti-rabbit IgG (L + H) secondary antibodies (both diluted 1:400, Invitrogen) for 60 minutes at room temperature. Nuclei were counterstained in blue with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The sections were mounted on slides and observed with a Leica TCS-SP (UV) confocal microscope at the MSSM-Microscopy Shared Resource Facility.

Statistical analysis

Lymphocyte subpopulations were measured by flow cytometry and serum cytokine levels were quantified with the Human Cytokine 25-Plex kit (Invitrogen) in 22 sIBM patients and 22 controls.

Missing data were imputed, within each group, by the k-nearest neighbour method. For normalization, Luminex data were first log₁₀ transformed, and then all data were standardized by subtracting the mean and dividing by the standard deviation. Student's test was used to identify biomarkers differentially expressed between the two groups, with a cutoff of $p < 0.05$. This test was combined with the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate method ($q\text{-values} \leq 0.05$). Selected datasets, composed of differentially expressed factors as determined above, were analyzed by hierarchical clustering using the Euclidean distance and complete linkage method, and by principal components analysis (PCA). Based on the statistically significant cytokine vectors (i.e. signature) obtained above, we built a model to predict the membership of a test sample to the patient or control group. For this purpose, a

stepwise procedure against each response variable (clinical groups) was used to statistically assess the predictive power of our signature. As our intention was to evaluate how well a linear combination of variables explained the difference between the classes of our data, linear discriminant analysis (LDA) models seemed best suited. Leave-One-Out cross-validation was used to estimate the accuracy of the predictive model. Using LDA, we estimated the coefficients associated with each factor composing the signature, each coefficient describing the size of the predictor contribution to the classification. These coefficients were then used to generate a multivariate score summarizing the expression pattern of the signature. All data-processing steps and statistical and multivariate analyses used R software (<http://www.r-project.org/>).

Results

Increased frequencies of circulating late effector memory T cells in sIBM patients

Twenty-two sIBM patients and 22 controls were included in the study (12 males, 32 females; mean age 71 ± 9 years).

The average total blood lymphocyte count did not differ between the sIBM patients and controls (1660 ± 518 vs 1703 ± 595 cells/ μ l, respectively). Likewise, the two groups had similar proportions of $CD3^+$ T cells ($75.59 \pm 10.0\%$ vs $76.15 \pm 9\%$), $CD19^+$ B cells ($4.3 \pm 10.4\%$ vs $9.45 \pm 3.9\%$), $CD3^-CD56^+$ NK cells ($10.3 \pm 6.4\%$ vs $10.5 \pm 6.0\%$), and CD4/CD8 T cell ratios. Absolute numbers of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, B cells and NK cells were also similar in the two groups (data not shown).

In the T cell compartment, the percentage of naive $CD4^+$ T cells ($CD3^+CD4^+CD45RA^+CD62L^+$) was similar in the patients and controls ($26.05 \pm 18.1\%$ and $28.5 \pm 15.3\%$, respectively; $p=0.4$) (Figure 1). The percentages of central memory $CD4^+$ T cells ($CD3^+CD4^+CD45RA^-CD62L^+$) and early effector memory T cells ($CD3^+CD4^+CD45RA^-CD62L^-$) were also similar (respectively $45.7 \pm 9.6\%$ and $19.5 \pm 9.2\%$ in sIBM patients vs $47.4 \pm 14.3\%$ and $20.5 \pm 9.1\%$ in controls; $p=0.5$ and $p=0.7$, Figure 1), whereas the percentage of late effector memory $CD4^+$ T cells ($CD3^+CD4^+CD45RA^+CD62L^-$) was higher in the sIBM patients ($4.6 \pm 4.6\%$ vs $1.5 \pm 1.3\%$; $p=0.05$, Figure 1).

In the $CD8^+$ T cell compartment (Figure 1), sIBM patients had a lower percentage of early effector memory $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD8^+CD45RA^-CD62L^-$) and a higher percentage of late effector memory $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^-$) than the controls ($17.7 \pm 11\%$ vs $28.7 \pm 12.4\%$, $p=0.003$; and $52.2 \pm 20.7\%$ vs $29.2 \pm 17.5\%$, $p=0.0005$, respectively). The percentages of central memory $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD8^+CD45RA^-CD62L^+$) and naive $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^+$) were similar in the sIBM patients and controls ($12.2 \pm 7.8\%$ vs $15.1 \pm 9.4\%$; $p=0.3$; $19.3 \pm 11.2\%$ vs $19.9 \pm 8.9\%$; $p=0.5$) (Figure 1).

Expression of the activation marker HLA-DR was more frequent on CD4⁺ T cells from sIBMs patients than controls (16.2±13% vs 8.7±4.6%; p=0.034). HLA-DR expression on CD8⁺ T cells was similar in the patients and controls (data not show) but a higher percentage of CD3⁺CD8⁺CD28⁻ T cells was found in the patients than in the controls (63.2±12.5% vs 43.5±23.5%; p =0.001). Conversely, CD28 expression on CD4 T cells was not significantly different between the patients and controls (5.9±7.8% vs 6.1±7.8%; p=0.4).

Elevated serum levels of Th1 cytokines and chemokines in sIBM patients

Serum levels of cytokines involved in inflammation, such as IL-1 β , IL-6, TNF α and IL2-RA were similar in sIBM patients and controls (data not shown). IL1-RA levels were higher in sIBM patients than in controls (323±187 vs 87±28 pg/ml; p<0.0001). Likewise, levels of the proinflammatory chemokine CCL-2 were higher in sIBM patients (649±149 vs 452±170 pg/ml; p=0.025), whereas levels of CCL-3 (28±65 vs 8.9±14 pg/ml; p=0.01), CCL4 (74±57 vs 48±29 pg/ml; p=0.003) and IL-8 (131±179 vs 17±42 pg/ml; p<0.001) were significantly lower (Figure 3).

We then investigated the lineage engagement of the immune response according to chemokine and cytokine production.

We first assayed chemokines involved in lymphocyte homing to inflammatory tissues. The patients had higher levels of the Th1 chemokines CXCL-9 (186±12 pg/ml vs 13±7 pg/ml; p<0.0001) and CXCL-10 (187±62 pg/ml vs 13±6 pg/ml; p<0.0001) (Figure 3). Significantly higher levels of IL-12 (figure 3), a Th1 cytokine, were also found in the serum of sIBM patients (261±138 pg/ml vs 88±19 pg/ml; p<0.0001). Furthermore, serum levels of IL-12 correlated strongly with those of CXCL-9 ($r^2=0.87$; p<0.001) and CXCL-10 ($r^2=0.87$; p<0.001). A strong correlation between IL-12 and IL-RA levels was also observed ($r^2=0.92$; p<0.001).

Th1 polarization and lack of Th17 deviation in sIBM

After *ex vivo* stimulation of CD4⁺ T cells with PMA-ionomycin, the percentage of CD4⁺INF γ ⁺ T cells was not different between the patients and controls (12.9 \pm 6% vs 10.8 \pm 5.8%), whereas the percentage of CD3⁺CD8⁺INF γ ⁺ T cells was higher in the patients than in the controls (60.8 \pm 18% vs 45.8 \pm 16%; p=0.01) (Figure 2).

Because of this marked increase in the CD28⁻CD3⁺CD8⁺ T cell percentage, we investigated whether these cells were prone to produce IFN- γ upon stimulation. Indeed, CD8⁺INF γ ⁺ T cells in sIBM patients were composed of 45.6 \pm 18.5% CD28⁻ cells and 13.5 \pm 9.9% CD28⁺ cells (p<0.0001, figure 2).

We observed no difference in the levels of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, either in serum or after *ex vivo* stimulation (data not shown).

Serum levels of IL-17 (40 \pm 6 pg/ml vs 39 \pm 8 pg/ml) and the percentage of CD4⁺CCR6⁺IL-17⁺ cells among stimulated CD4 T cells (0.26 \pm 0.14% vs 0.29 \pm 0.17%) did not differ between the sIBM patients and controls (Figure 4). IL-17⁺ cells were detected within muscle infiltrates in only 5 of the 12 sIBM patients tested. Among these 5 patients, 2.5 \pm 1.6% of CD4⁺ cells were positive for IL-17.

Decreased frequency of circulating Treg in sIBM, but with normal suppressive function

We then examined the role of Tregs in the immune response in sIBM patients. We observed a lower percentage of natural Tregs (defined as the CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺ subpopulation of the CD4⁺ T cell compartment) in sIBM patients than in controls (5.2 \pm 1.1% vs 6.9 \pm 1.7%; p=0.01, figure 5). Because FoxP3 can be transiently expressed by activated CD4⁺ T cells (Chi et al., 2007), we also analysed Tregs for CD45RA and CD25 expression (figure 5). Using this strategy, it is possible to distinguish activated conventional T cells (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD45RA⁻) from Tregs (CD3⁺CD4⁺CD25^{high}) and also to distinguish activated Tregs

(aTreg: $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD45RA^-$) from resting Tregs (rTreg: $CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD45RA^+$) (Miyara et al., 2009). We observed a lower percentage of aTregs among $CD4^+$ T cells in sIBM patients than in controls ($0.9\pm0.3\%$ vs $1.4\pm0.4\%$; $p=0.0003$, Figure 4), whereas no difference in rTregs was found ($1.3\pm0.6\%$ vs $1.4\pm0.6\%$).

Foxp3⁺ Treg deficiency in the peripheral $CD4^+$ T cell compartment may be due to migration to inflamed tissue (in this case, muscle). We therefore examined the presence of Foxp3⁺ cells within muscle (figure 5). FoxP3⁺ cells were present in muscle infiltrates in all 8 sIBM patients tested, where they represented $18.7\pm7.4\%$ of all $CD4^+$ cells. To confirm the co-expression of FoxP3 and CD4 by cells infiltrating muscle, we used double immunofluorescent staining (figure 5) and found that FoxP3⁺ cells co-expressed CD4.

Treg functionality was then tested in a suppression test. The suppressive effect of Tregs from sIBM patients on the proliferation of autologous $CD25^-CD4^+$ T cells was similar to that observed in controls (Figure 5; $n=4$). Interestingly, the percentage inhibition of proliferation was slightly higher in sIBM patients than in controls at T_{reg}/T_{eff} ratios of 1/4 and 1/8 ($93.7\pm2.9\%$ and $77.9\pm7.1\%$ vs $76.3\pm13\%$ and $62.6\pm15.4\%$, respectively), suggesting that Tregs are more activated in sIBM patients than in controls.

Highlighting of the Th 1 signature in sIBM by clustering methods

Values of 17 of the study parameters were significantly different between the patients and controls (Figure 6). As mentioned above, most of these parameters we studied are involved in Th-1-type immune responses. Average linkage hierarchical clustering analysis showed that the subjects segregated into two groups on the basis of the selected Th-1 signature (Figure 6). Leave-one-out cross-validation correctly classified 38 of the 44 samples (82.6% accuracy) as deriving from sIBM patients or healthy controls.

After Benjamini-Hochberg correction, 7 cytokines or chemokines remained significantly different, comprising increased CXCL-9, CXCL-10, IL-12, CCL-3 and IL-1RA levels and decreased CCL-3 and IL-8 levels. Interestingly, 3 of the 5 elevated soluble factors were Th-1 cytokines and chemokines. These 7 cytokines and chemokines improved the segregation of the two groups (Figure 6): leave-one-out cross-validation correctly classified 39 of the 44 samples (88.6% accuracy) as deriving from the sIBM patients or healthy controls.

Unsupervised principal components analysis of the 7 cytokines and chemokines in each individual in the two groups showed that sIBM patients could be segregated from the controls on the basis of the selected signature (Figure 6), with only 2 misclassified subjects (1 sIBM patient and 1 control).

Discussion

This study shows that sIBM patients have elevated numbers of late memory T cells exhibiting increased HLA-DR expression in the peripheral CD4⁺ T cell compartment, and a loss of CD28 expression in the peripheral CD8⁺ T cell compartment. In addition, CD4⁺ cells showed Th1 commitment. Polarization towards a Th17 immune response was not observed. Moreover, Tregs were found within sIBM muscle infiltrates, and the percentage of peripheral Tregs was lower than in age-matched controls. The latter cells were functional and remained able to suppress effector T cells.

The naïve/memory distribution of T cells has previously been reported in sIBM patients (Dalakas et al, 2009) but had never been compared with that of age-matched healthy controls. The most important difference between the patients and controls concerned CD8⁺ T cell subpopulations, with an increased percentage of late effector memory CD8⁺ T cells. Late effector memory T cells are characterized by loss of CD28 (Appay et al., 2008). Accordingly,

we observed a higher frequency of CD8⁺CD28⁻ T cells in sIBM patients than in controls, whereas CD4⁺CD28⁻ T cell numbers were similar. An increased frequency of CD8⁺CD28⁻T cells was recently described in sIBM patients by Pandya et al (Pandya et al. 2010), but we failed to confirm the increase in CD4⁺CD28⁻ T cells observed by these authors. One possible explanation is that the controls were younger than the sIBM patients in Pandya's study (54 vs 76 years). We used age-matched controls, as aging is known to be associated with a loss of CD28 on CD4⁺ cells (Posnett et al., 1994). Furthermore, we found that CD8⁺CD28⁻ T cells were more prone to produce INF- γ than CD8⁺CD28⁺ T cells. Together, these results point to a pathogenic role of CD8⁺CD28⁻T cells in sIBM, in keeping with the reported predominance of CD8⁺CD28⁻ T cells within sIBM muscle infiltrates (Pandya et al., 2010). This loss of CD28 expression in sIBM could be due to chronic antigenic stimulation, as observed in chronic viral infections due to HIV (Vingerhoets et al., 1995) and CMV (Khan et al., 2002). Alternatively, it could be secondary to a viral infection triggering an autoimmune response, or to chronic immune stimulation by muscle autoantigens or degenerative proteins.

CXCR3-mediated CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell migration to inflamed tissues is under the control of CXCL-9 and CXCL-10, two INF- γ -inducible chemokines involved in Th1 immune responses (Lacotte et al., 2009). Increased CXCL-9 and CXCL-10 expression has been observed in autoimmune settings such as systemic lupus erythematosus (Wenzel et al., 2005) and rheumatoid arthritis (Ruth et al., 2001). We also observed increased CXCL-9 and CXCL-10 levels in the serum of sIBM patients. Other authors have reported increased CXCL-9 and CXCL-10 expression, associated with strong CXCR3 expression, on the majority of muscle-infiltrating T cells in sIBM patients (De Paepe et al., 2007; Baird et al., 2008; De Paepe et al., 2005). We also observed elevated IL-12 levels in the serum of sIBM patients, as previously reported in the muscle compartment of sIBM patients (Baird et al., 2008). Together, these data point to the involvement of these chemokines in muscle homing of lymphocytes engaged

in a Th1 immune response. Indeed, cluster analysis showed that the Th-1 signature segregated our sIBM patients from the controls. Targeting these chemokines with monoclonal antibodies might have therapeutic potential.

We did not observe Th17 polarization in the blood of sIBM patients, and only 5/12 patients had a few IL-17⁺ cells in inflamed muscle specimens. These findings argue against an important pathophysiological role of Th17 cells in sIBM. A few IL-17⁺ cells were also observed in muscle biopsies from some but not all dermatomyositis and polymyositis patients (Page et al., 2004). By comparison, IL-17 immunoreactivity has been reported in 79% of T cells in acute lesions and 73% chronic active lesions in patients with multiple sclerosis (John S. Tzartos et al 2008).

We also observed signs of innate immune system activation. First, we found significantly elevated levels of CCL-2, which has a role in monocyte homing. This is in line with the presence of macrophages and significantly increased CCL-2 expression in sIBM muscle specimens (Liprandi et al., 1999). We observed no elevation of serum levels of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α , which are both strongly expressed in sIBM muscle (Dastmalchi et al., 2008; Schmidt et al., 2008). The normal circulating levels of IL-1 and TNF- α found here, contrasting with the reportedly high expression of these cytokines in sIBM muscle, may be due to weak release from muscle to the bloodstream. Nevertheless, we observed increased serum levels of CCL-2 and IL1-RA, in keeping with the reported over-expression of these soluble factors in sIBM muscle (Baird et al., 2008). IL-1RA is a physiological inhibitor of IL-1, and an increase in IL-1RA may reflect an ongoing process aimed at limiting innate immune system activation.

Finally, we studied the role of Tregs, which play a key role in the control of immune responses and especially in peripheral immune tolerance.

We observed for the first time a significantly lower percentage of Tregs in the blood of sIBM patients compared to healthy controls. A decrease in FoxP3⁺ cells has also been observed in other forms of myositis, including dermatomyositis and polymyositis (Banica et al., 2009; Antiga et al., 2010), as well as in other autoimmune diseases such as Guillain Barré syndrome (Chi et al., 2007), systemic lupus erythematosus (Zhang et al., 2008) or myasthenia gravis (Li, et al., 2008). Nevertheless, Foxp3 expression alone is not sufficient to identify human Tregs, especially in inflammatory conditions, as Foxp3 can be expressed by, activated T cells that do not display suppressive functions (Wang et al., 2000). Human Foxp3⁺CD4⁺ T cells are composed of phenotypically and functionally distinct subpopulations, namely CD45RA⁺CD25⁺ cells (resting Tregs, corresponding to CD45RA⁺Foxp3⁺ cells) and CD45RA⁻CD25⁺⁺ cells (activated Tregs corresponding to CD45RA⁻Foxp3⁺⁺), which both have suppressive activity *in vitro*. In contrast, CD45RA⁻CD25⁺ cells (corresponding to CD45RA⁻Foxp3⁺) are non suppressive T cells (Miyara et al., 2009). We observed significantly lower numbers of activated Tregs in sIBM patients than in controls, suggesting a systemic Treg deficiency. This could be due to a global quantitative Treg deficiency or to Treg migration from the periphery to inflamed muscle. Indeed, we detected Foxp3⁺ cells in muscle biopsies from all the sIBM patients tested. These Foxp3⁺ cells were also recently observed in muscle infiltrates of sIBM patients (Waschbisch et al., 2010), as well as in dermatomyositis and polymyositis. As stated above, some Foxp3⁺ cells may correspond to activated T cells, but in this case Foxp3 expression is below the detection limit of immunohistological methods (Miyara et al., 2009). Therefore, Foxp3 detection in fixed tissues would mainly identify Foxp3⁺⁺ cells corresponding to Tregs. On the other hand, muscle-infiltrating Tregs may not come from the bloodstream but correspond to induced Tregs, as activated T cells can be converted into Tregs in specific conditions (Chen et al., 2003).

Tregs present within muscle infiltrates do not seem able to control the local autoimmune reaction. We therefore examined Treg functionality in sIBM patients, as quantitative and/or qualitative Treg defects have been observed in other autoimmune diseases. Low blood Treg counts have been observed in acute Guillain Barré syndrome, but with no loss of function (Chi et al., 2007), whereas impaired function has been observed in patients with multiple sclerosis, who have no systemic Treg deficiency (Viglietta et al., 2004). We observed no functional deficit of blood Tregs in sIBM patients, as shown in suppression tests. A functional deficit of muscle-infiltrating Tregs cannot be excluded, but their numbers are too low for ex vivo analysis.

Together, these data suggest that the systemic Treg deficit observed in sIBM may be due, at least in part, to muscle homing.

In conclusion, we observed systemic immune activation with Th1 polarization in sIBM patients. This immune activation is associated with peripheral Treg deficiency, but Treg function appears to be normal and Tregs are present in muscle. Therapeutic approaches targeting effector Th-1 T cells and/or sparing or increasing Treg numbers might be of interest.

BIBLIOGRAPHY

- Antiga E, Kretz C, Klemmt, Massi D, Caproni, M, Kuhn A, et al. c Characterization of regulatory T cells in patients with dermatomyositis. *J Autoimmun* 2010, 35:342-50.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008; 73: 975-83.
- D'Agostino C, Nogalska A, Engel WK, Askanas V. In sporadic inclusion body myositis muscle fibres TDP-43-positive inclusions are less frequent and robust than p62 inclusions, and are not associated with paired helical filaments. *Neuropathol.Appl.Neurobiol* 2011, 37:315-20.

- Chi L, Wang H, Zhang Y, Wang W. Abnormality of circulating CD4(+)CD25(+) regulatory T cell in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2007; 192:206-14.
- Badrising UA, Schreuder GM, Giphart MJ, Geleijns K, Verschuuren JJ, Wintzen AR, et al. Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology* 2004; 63: 2396-8.
- Baird GS, Montine TJ. Multiplex immunoassay analysis of cytokines in idiopathic inflammatory myopathy. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 232-8.
- Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea AM, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity* 2009; 42: 41-9.
- Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, Dubourg O, Allenbach Y, Hilton Jonce D et al. Long term observational study of sporadic inclusion body myositis in 136 patients. *Brain* 2011; in press.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453: 1051-7.
- Chi LJ, Wang HB, Zhang Y, Wang WZ. Abnormality of circulating CD4(+)CD25(+) regulatory T cell in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2007; 192: 206-14.
- Dalakas MC, Rakocevic G, Schmidt J, Salajegheh M, McElroy B, Harris-Love MO, et al. Effect of Alemtuzumab (CAMPATH 1-H) in patients with inclusion-body myositis. *Brain* 2009; 132: 1536-44
- Dastmalchi M, Grundtman C, Alexanderson H, Mavragani CP, Einarsdottir H, Helmers SB, et al. A high incidence of disease flares in an open pilot study of infliximab in patients with refractory inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1670-7.

- De Paepe B, Creus KK, De Bleecker JL. Chemokine profile of different inflammatory myopathies reflects humoral versus cytotoxic immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109: 441-53.
- De Paepe B, De Keyser K, Martin JJ, De Bleecker JL. Alpha-chemokine receptors CXCR1-3 and their ligands in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 576-82.
- Dimitri D, Benveniste O, Dubourg O, Maisonobe T, Eymard B, Amoura Z, et al. Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain* 2006; 129: 986-95.
- Greenberg SA. Inclusion body myositis: review of recent literature. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009; 9: 83-9.
- Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, et al. Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 1995; 38: 705-13.
- Guillot-Delost M, Cherai M, Hamel Y, Rosenzweig M, Baillou C, Simonin G, et al. Clinical-grade preparation of human natural regulatory T-cells encoding the thymidine kinase suicide gene as a safety gene. *J Gene Med* 2008; 10: 834-46.
- Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002; 169: 1984-92.
- Koffman BM, Rugiero M, Dalakas MC. Immune-mediated conditions and antibodies associated with sporadic inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 1998a; 21: 115-7.
- Koffman BM, Sivakumar K, Simonis T, Stroncek D, Dalakas MC. HLA allele distribution distinguishes sporadic inclusion body myositis from hereditary inclusion body myopathies. *J Neuroimmunol* 1998b; 84: 139-42.

- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 310-7.
- Lampe JB, Gossrau G, Kempe A, Fussel M, Schwurack K, Schroder R, et al. Analysis of HLA class I and II alleles in sporadic inclusion-body myositis. *J Neurol* 2003; 250: 1313-7.
- Li X, Xiao B, Xi J, Lu C, Lu J. Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol* 2008; 126, 80-8.
- Lindberg C, Trysberg E, Tarkowski A, Oldfors A. Anti-T-lymphocyte globulin treatment in inclusion body myositis: a randomized pilot study. *Neurology* 2003; 61: 260-2.
- Liprandi A, Bartoli C, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Lepidi H. Local expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 642-8.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899-911.
- Orimo S, Koga R, Goto K, Nakamura K, Arai M, Tamaki M, et al. Immunohistochemical analysis of perforin and granzyme A in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 1994; 4: 219-26.
- Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 199-208.
- Pandya JM, Fasth AE, Zong M, Arnardottir S, Dani L, Lindroos E, et al. Expanded TCR-Vbeta restricted T cells from sporadic inclusion body myositis patients are

proinflammatory and cytotoxic CD28(null) T cells: cD28null T Cells in Sporadic Inclusion Body Myositis. *Arthritis Rheum*.

Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 1994; 179: 609-18.

Ruth JH, Rottman JB, Katschke KJ, Jr., Qin S, Wu L, LaRosa G, et al. Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2750-60.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-87.

Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bahr M, Dalakas MC. Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 2008; 131: 1228-40.

Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache JM, Altare F, et al. FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol* 2009; 174: 497-508.

Tzartos J, Friese M, Craner M, Palace J, Newcombe J, Fugger L, Interleukin 17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2008; 172: 146-55.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner H, Hafler D. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199, 971-9.

Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL, Penne GG, Colebunders RL, Vandenbruaene MJ, et al. Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are

- associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 425-33.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 129-38.
- Waschbisch A, Schwab N, Ruck T, Stenner MP, Wiendl H. FOXP3+ T regulatory cells in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 2010, 255 137-42.
- Wenzel J, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tueting T. Enhanced type I interferon signaling and recruitment of chemokine receptor CXCR3-expressing lymphocytes into the skin following treatment with the TLR7-agonist imiquimod. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 257-62.
- Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*; 2008: 153, 82-7.

Figure 1: Increase in late memory T cells in sIBM patients, with CD4 T cell activation:

Representative flow cytometric analysis showing the gating strategy used to define naive T cells (CD45RA⁺CD62L⁺), central memory T cells (CD45RA⁻CD62L⁺), early activated memory T cells (CD45RA⁻CD62L⁻) and late activated memory T cells (CD45RA⁺CD62L⁻) among CD3⁺CD4⁺T cells, in one control (A) and one sIBM patient (B). The percentage of each subpopulation among CD3⁺CD4⁺ T cells is represented in the upper right quadrant. Pooled data showing naive and memory CD4⁺ T cell subpopulations from IBM patients and controls (C). The same strategy was used for the CD3⁺CD8⁺T cell compartment. Representative flow cytometric analysis of CD8⁺ T cells showing the gating strategy in one representative control (D) and one representative sIBM patient (E). Pooled data showing naive and memory subpopulations of CD4⁺ T cells from IBM patients and controls (F). Representative flow cytometry analysis showing activated T cell subpopulations (HLADR⁺CD3⁺CD4⁺) in one control (G) and one sIBM patient (H). Pooled data showing the percentage of activated? among CD3⁺CD4⁺ T cells from IBM patients and controls (I).

Horizontal lines indicate means. *p<0.05, **p<0.0001.

Figure 2: Increased percentage of CD28⁻CD8⁺ cells, which are prone to produce

interferon γ , in sIBM patients. Representative flow cytometry analysis showing CD28⁻ and CD28⁺CD3⁺CD8⁺ T cell subpopulations in one control (A) and one sIBM patient (B). Pooled data showing CD28⁻ CD8⁺ T cells from IBM patients and controls (C). Representative flow cytometry analysis showing IFN- γ production among CD28⁻ and CD28⁺ CD3⁺CD8⁺ T cells in one control (D) and one sIBM patient (E). The percentages of each subpopulation are represented in the upper right corner. Pooled data showing IFN- γ ⁺CD3⁺CD8⁺ T cells from sIBM patients and controls (left side). Pooled data showing IFN γ ⁺ cells among CD28⁺ and

CD28⁻CD3⁺CD8⁺ T cells, represented in percentage terms (right side) (**F**). Horizontal lines indicate means. *p<0.05, **p<0.0001.

Figure 3: Th1 profile of cytokine and chemokine production in sIBM patients, associated with increase CCL-2 levels.

Pooled data showing serum cytokine and chemokine levels in sIBM patients and controls. Black and white boxes, respectively, represent cytokine and chemokines significantly increased or decreased in sIBM patients compared to controls, while grey boxes represent no significant difference (**A**).

Pooled data showing serum levels (pg/ml) of CXCL-9, CXCL-10 and IL-12 in sIBM patients (open circles) and controls (full circles) (**B**). Pooled data showing serum levels (pg/ml) of CCL-2, CCL-3, CCL-4 and IL-8 in sIBM patients and controls. Horizontal lines indicate means (**C**). Correlations (linear regression) between serum level of IL-12 and serum levels of CXCL-9 (**D**), CXCL-10 (**E**) and IL-1RA (**F**). *p<0.05, **p<0.0001.

Figure 4: Normal percentage of IL-17⁺ CD4⁺ T cells in sIBM.

Pooled data showing serum levels (pg/ml) of IL-17 in sIBM patients (open circles) and controls (full circles) (**A**). Representative flow cytometry analysis showing the gating strategy used to define IL-17⁺CCR6⁺CD4⁺ T cells in one sIBM patient (**B**). Pooled data showing the percentage of IL-17⁺CCR6⁺ cells among CD4⁺ T cells from sIBM patients and controls in the systemic compartment (**C**). The percentages of each subpopulation are represented in the upper right corner. Immunostaining of a representative muscle section from an sIBM patient, showing no IL-17-positive cells (**E**) in an infiltrate containing CD4⁺ T cells (**D**). Immunostaining of a muscle section from an sIBM patient, showing an IL-17⁺ cell (**E**).

Figure 5: Tregs in sIBM patients.

Representative flow cytometry analysis of CD25⁺CD127⁻ subpopulations among CD4⁺CD3⁺ T lymphocytes in a control subject (A). Tregs were defined as Foxp3⁺ cells among the previously gated CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ subpopulation (B). Non specific staining (isotype control) was used to define Foxp3⁺ cells (C). Pooled data showing the percentage of Tregs among CD4⁺ CD3⁺ T cells from sIBM patients and controls in the systemic compartment (D). Horizontal lines indicate means. Suppressive activity of sorted CD3⁺CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻ T cells (Tregs) on the proliferation of autologous CD4⁺CD25⁻ T cells (responders) stimulated with irradiated (15 Gy) allogeneic mononuclear cells (Allogeneic MNCs/Responder ratio = 1/10). Responder + allogeneic MNCs were used as positive control. Proliferation of responder cells was measured in terms of 3H-Tdr incorporation (counts per minute, cpm). Results are percentage inhibition (\pm SD; n=4): proliferation of responder cells in the presence of Treg divided by positive control proliferation. Different responder cell/Treg ratios were tested (E). Representative flow cytometry analysis showing resting Tregs (rTreg: CD45RA⁺CD25⁺) and activated Tregs (aTreg: CD45RA⁻CD25^{high}) among CD4⁺CD3⁺ T lymphocytes in a control subject (F). Pooled data showing rTregs and aTregs from sIBM patients and controls (G). Immunostaining of a muscle section from an sIBM patient, showing Foxp3⁺ cells (H) in the infiltrate. Immunofluorescence staining showing Foxp3⁺ cells (red) within the muscle infiltrate in an sIBM patient (I). The upper right corner shows CD4⁺ cells (green fluorescence), and the lower left corner shows nuclear staining (dapi) of inflammatory infiltrates. Coexpression of CD4 and Foxp3 is shown by merged fluorescence (J).

Figure 6: TH-1 signature

Hierarchical clustering of 17 factors identified by Student's t test ($p \leq 0.05$) as differing between the 22 sIBM patients and 22 controls. Transformed expression levels are indicated on a colour scale (A). Hierarchical clustering of 7 factors identified in Student's t test (p value

after Benjami correction) as differing between the 22 sIBM patients and 22 controls. Transformed expression levels are indicated on a colour scale **(B)**. Unsupervised principal components analysis of cytokine expression for each individual in each groups revealed that sIBM patients could be segregated from controls on the basis of the selected Th-1 signature (7 parameters) **(C)**.

FIGURE 1: Increase of late memory T cells in sIBM patients :

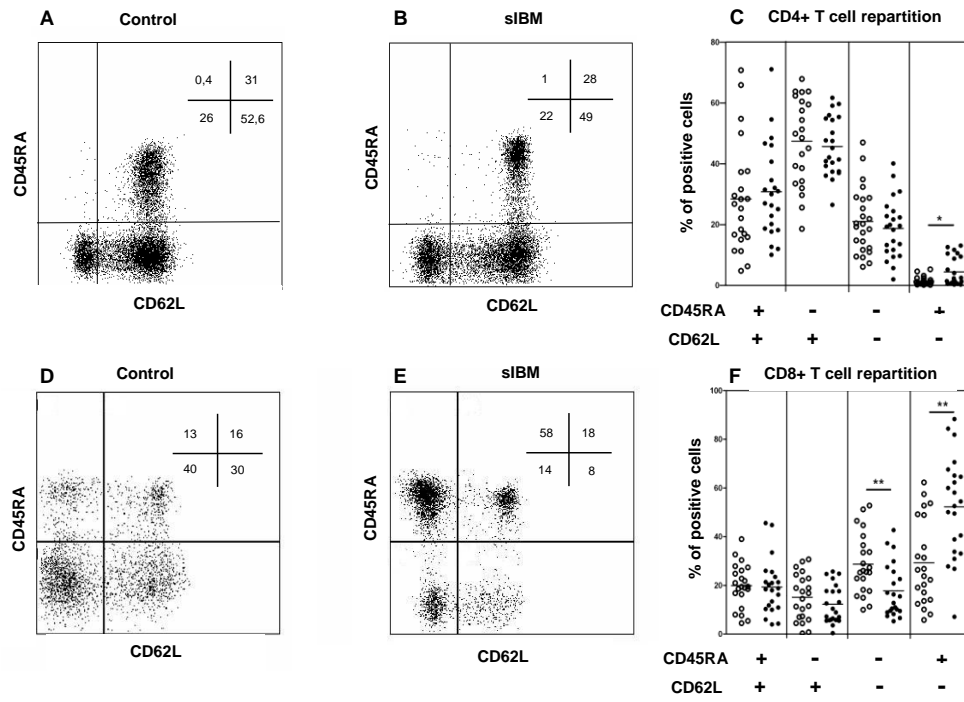


Figure 2 : Increase percentage of CD28-CD8+, which are prone to produce interferon γ , in sIBM patients

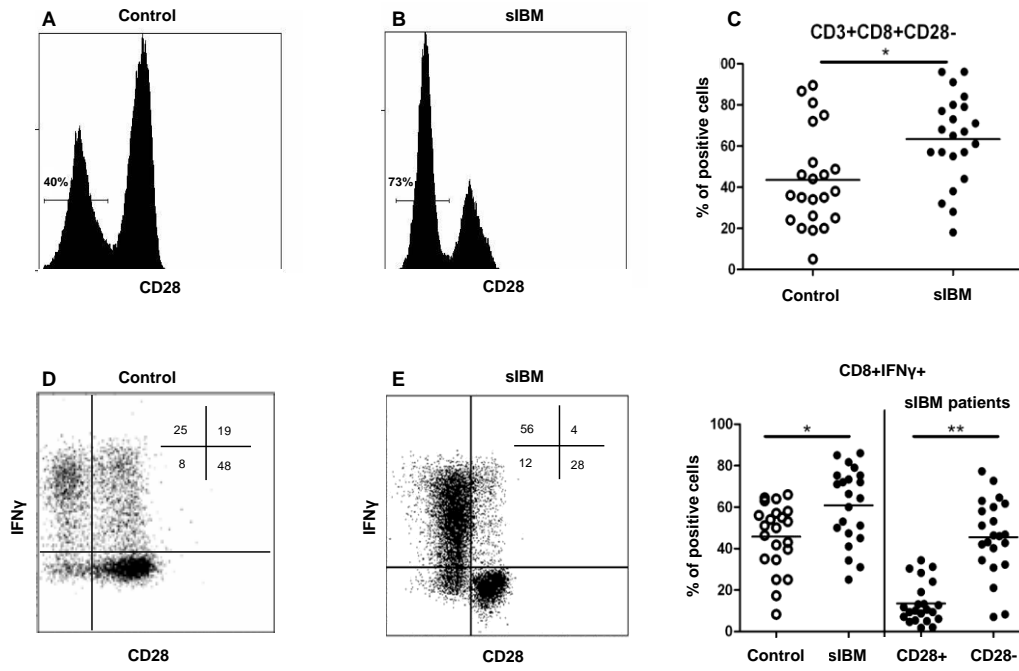


Figure 3 : Th-1 profile of cytokines and chemokines production in sIBM patients associated with increase level of CCL-2.

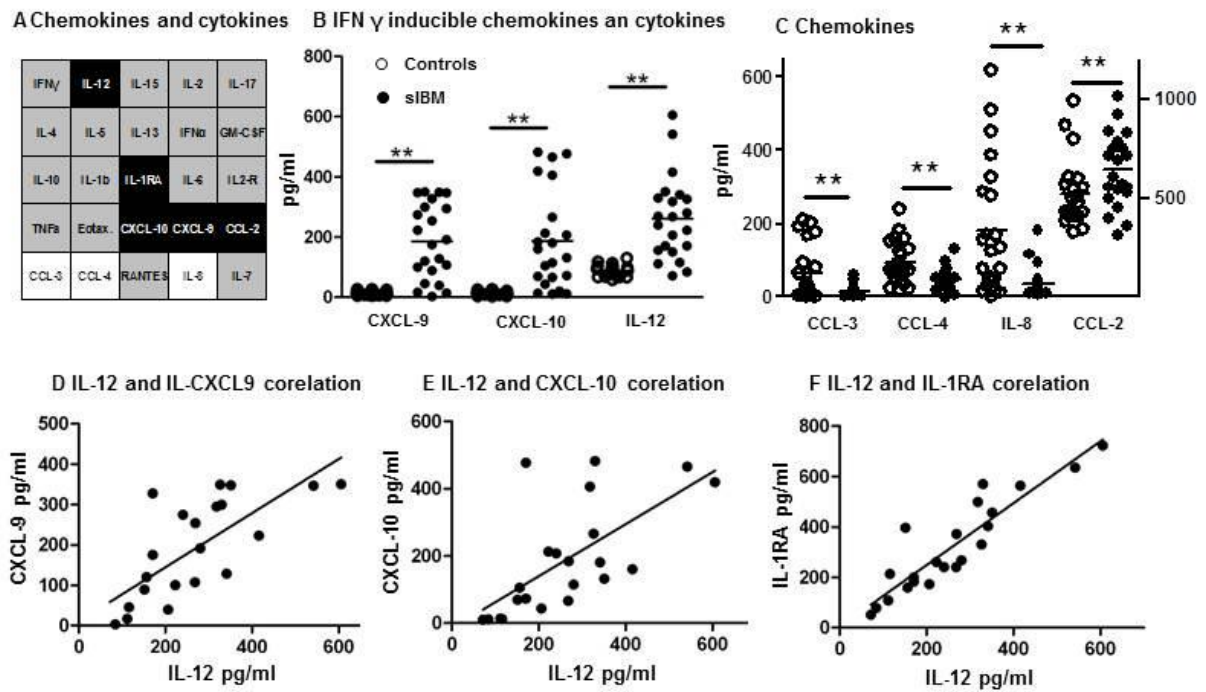


Figure 4: No increase percentage of IL-17+ CD4+ T cells in sIBM.

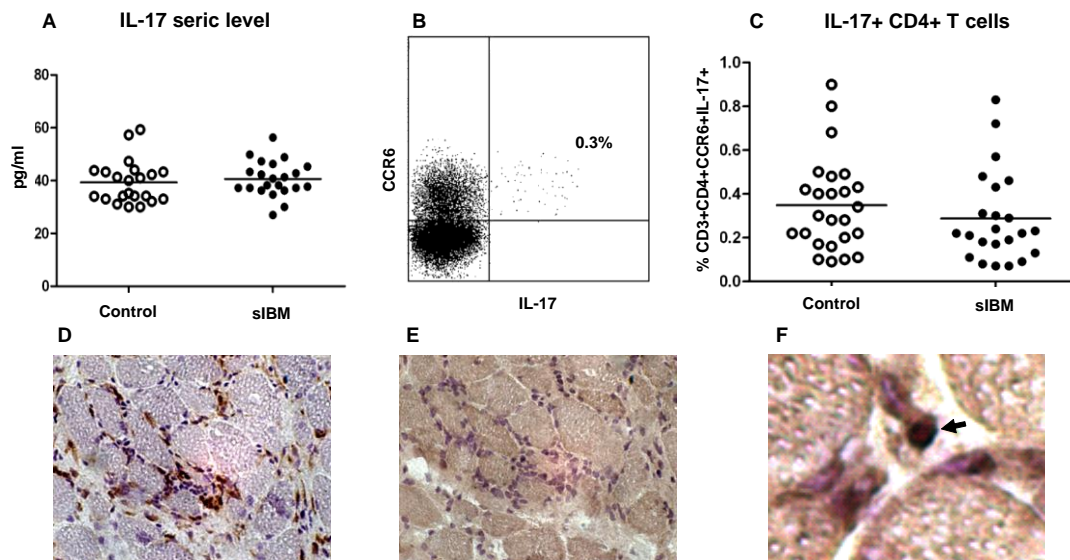


Figure 5 : Treg in sIBM patients

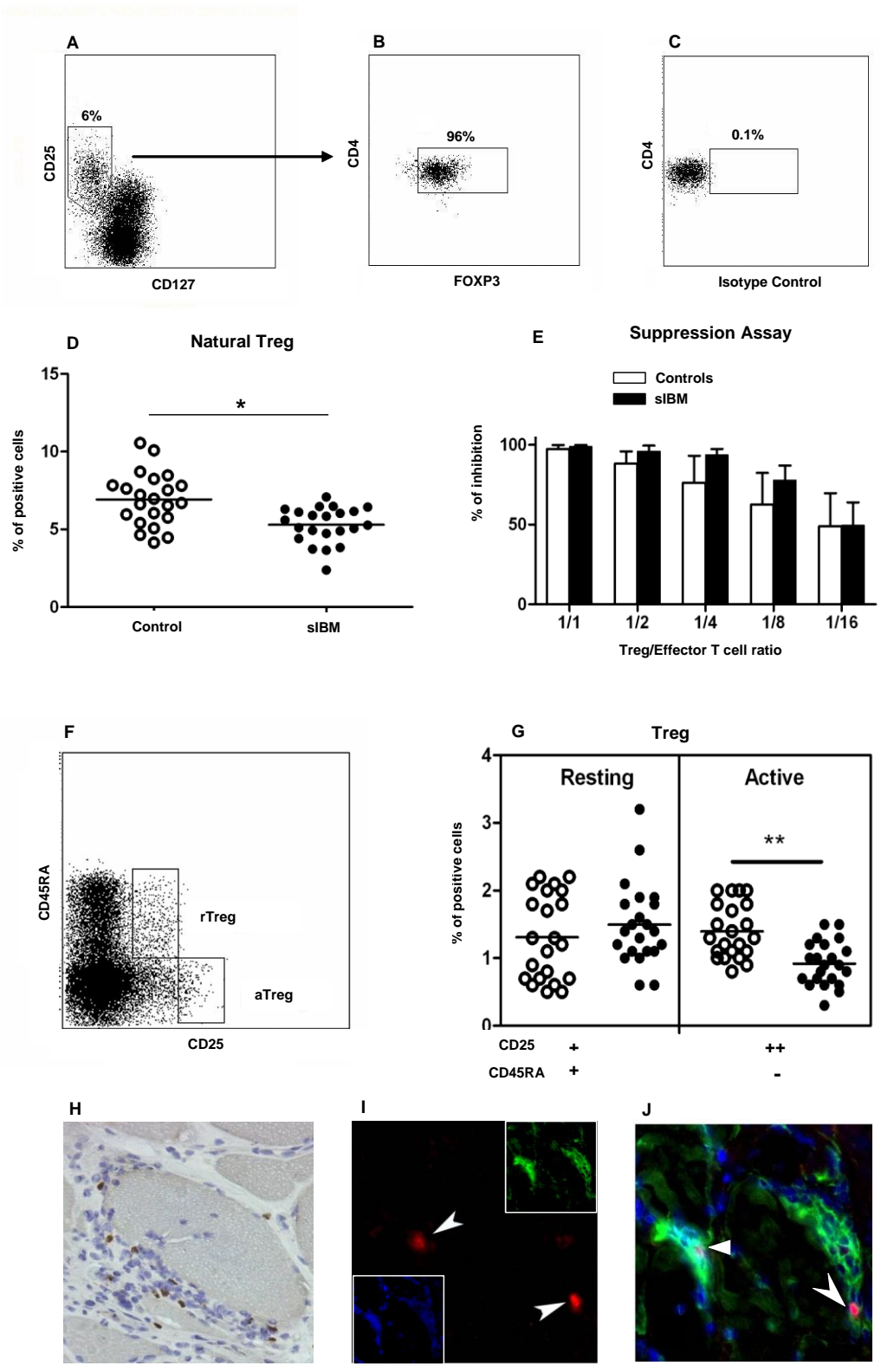
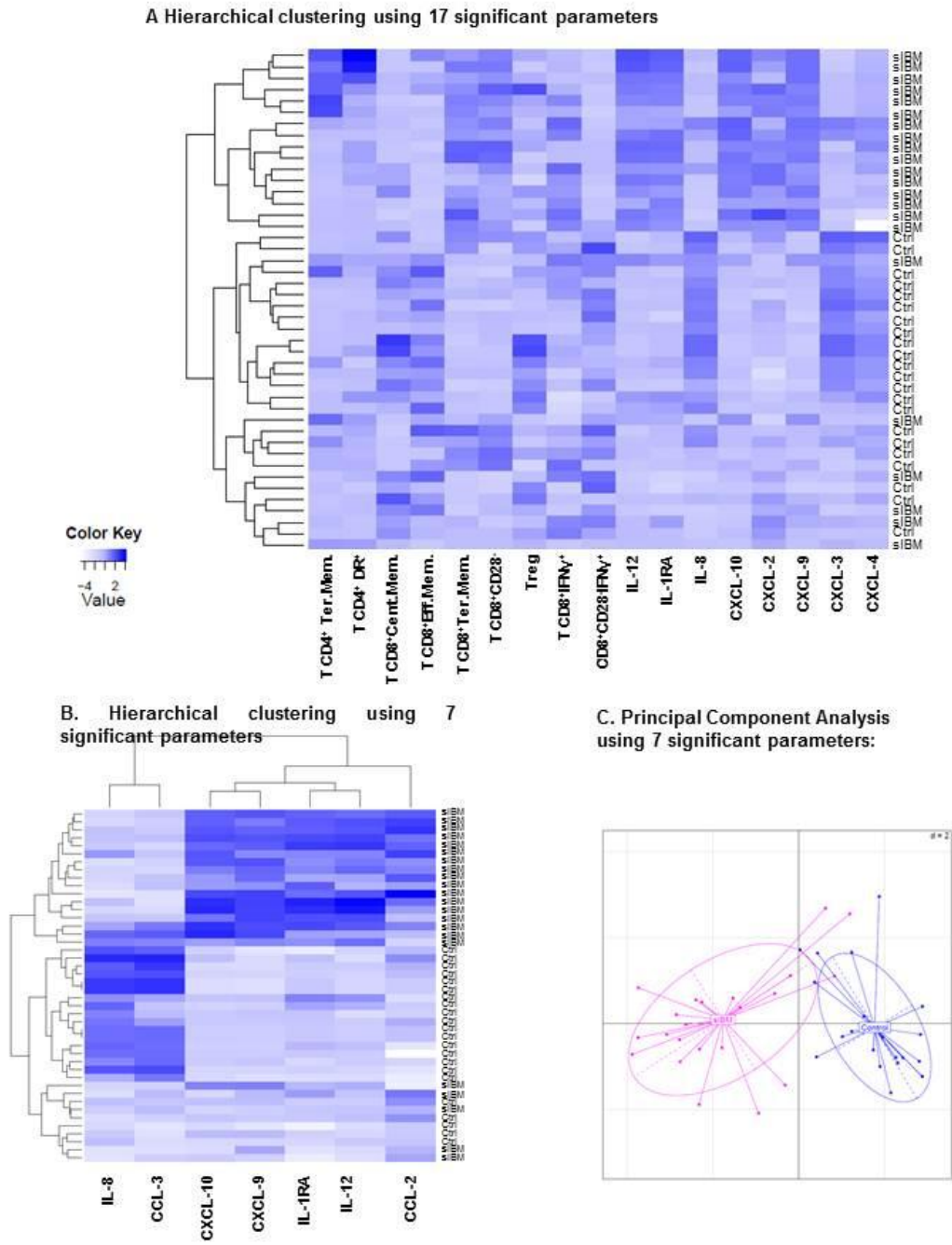


Figure 6 : Cluster analysis showing a Th-1 signature



Article 3

Quadriceps extensor strength is a sensitive marker of disease progression in sporadic inclusion body myositis

Jusqu'à présent, nous avons vu que chez l'animal les Treg avaient un rôle déterminants dans la physiopathologie de la MAE. De plus la manipulation des Treg que ce soit par thérapie cellulaire ou par utilisation de la rapamycine était efficace pour contrôler la MAE. Chez l'homme, les données recueillies au cours de la MI montrent une activation du système immunitaire orientée dans la voie Th1 qui est non contrôlée par les Treg. Les données que nous avons obtenues chez l'animal suggèrent que ce déséquilibre peut être rétabli à la faveur d'un traitement par la rapamycine. (Le rationnel de l'utilisation de la rapamycine sera plus largement abordé au cours de la dernière partie).

Cependant, tester l'efficacité de nouveaux traitements comme la rapamycine suppose des critères d'évaluation fiables et reproductibles. A ce jour, ce critère fait défaut car jusqu'à présent les études ont montré une fluctuation de la force musculaire globale au cours du temps chez les patients souffrants de MI. Ainsi parallèlement à l'étude immunologique que nous avons réalisée, nous avons mené un suivi de la force musculaire, à 9 mois d'intervalle, chez les 22 patients MI inclus.

Nous avons testé des mesures cliniques de la force musculaire comme le testing manuel au lit du patient que nous avons comparées à des mesures réalisées à l'aide d'appareils de mesures spécialisés dans le laboratoire de physiologie musculaire du Dr Hogrel de l'Institut de myologie à la Pitié Salpêtrière. Ces mesures ont été aussi comparées à des échelles fonctionnelles neurologiques non spécifiques ou à des échelles spécifiquement dédiées à la force musculaire. L'étude de la contraction maximale isométrique muscle par muscle a montré que le déficit musculaire prédominait aux fléchisseurs des doigts aux membres supérieurs, et aux extenseurs de la cuisse aux membres inférieurs.

De façon intéressante, nous avons pu observer qu'aux membres supérieurs le côté dominant était moins sévèrement atteint que le côté controlatéral. Cette asymétrie n'a pas été observée aux membres inférieurs mais il faut souligner qu'il n'existe pas de dominance aux membres inférieurs chez un sujet non sportif. Seule la force musculaire du quadriceps était corrélée à l'ancienneté de la maladie. La réévaluation de la force musculaire à 9 mois a permis de montrer une décroissance significative de la force musculaire uniquement pour le groupe

musculaire des extenseurs du genou. Cependant aux membres supérieurs on notait une décroissance significative de la force des fléchisseurs des doigts et de l'extension du coude uniquement du côté dominant, la force de ces groupes musculaires n'étaient pas diminuée de façon significative s'ils étaient mesurés globalement (droite plus gauche). De même, un indice composite évaluant la force globale intégrant tous les groupes musculaires testés permettait d'observer une diminution de la force au cours du temps, mais cette diminution n'était pas significative, comme cela était rapporté dans les travaux précédents. Les scores fonctionnels ne variaient pas significativement, sinon pour un seul score non spécifique : le RMI.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la mesure de la force musculaire volontaire maximale isométrique des extenseurs des genoux, mesurée au moyen d'un appareil de mesure spécialisé, pourrait être un critère d'évaluation objectif au cours d'essais thérapeutiques de la MI.

**Quadriceps extensor strength is a sensitive marker of disease progression in sporadic
inclusion body myositis**

Yves Allenbach*, Olivier Benveniste*, Valérie Decostre, Aurélie Canal, Coralie Bloch,
Bruno Eymard, Serge Herson, Jean-Yves Hogrel

* These two authors contributed equally.

Correspondence to Olivier Benveniste, Service de Médecine Interne 1, Groupe Hospitalier
Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

E-mail address: olivier.benveniste@psl.aphp.fr

ABSTRACT

Objective: There are currently no effective treatments to restore the muscle function in sporadic body myositis (sIBM). Most of the clinical trials already performed in this pathology used a composite strength score as an efficacy criterion. However, natural history studies of this disease are scarce. The goal of this study consisted in defining the functional pattern of sIBM patients and to follow its change over a 9-month period.

Methods: Twenty-two patients with definite sIBM were assessed using clinical and functional scales. Dynamometry was used to evaluate the strength for hand grip and wrist, elbow, ankle and knee flexion and extension. Among the patients, 16 were reassessed 9 months later.

Results: Muscle weakness was generally asymmetrical, especially for upper limbs for which all the functions were stronger at the dominant side. Good correlations were generally observed between clinical, motor and strength variables. The particular role of knee extension strength needs to be underlined owing to its direct correlation with the disease duration, its significantly detectable change over 9 months of natural history and its consequent effect on motor function, particularly on gait abilities.

Conclusion: Knee extension strength seems to be the most relevant marker of disease progression in sIBM when measured with suitable dynamometry.

INTRODUCTION

Sporadic inclusion body myositis (sIBM) is the most common acquired inflammatory myopathy in patients over 50 years of age.¹ The physiopathology is unknown but degenerative and auto-immune inflammatory mechanisms are involved.^{1, 2} To date, there is no validated treatment for this disabling disease. Development of new therapeutic approaches needs sensitive and reproducible evaluation methods to assess their effect on the neuromuscular function. Evaluation of strength in sIBM patients is challenging because of the asymmetric weakness of both proximal and distal arm and leg muscles and the slowness of its progression.³ Natural histories are rather scarce and limited in the number of patients involved. Muscle strength was measured using either handheld dynamometry (HHD)⁴ or fixed dynamometry (QMT: Quantified Muscle Testing)^{5, 6} and was shown to decrease in most patients, but not all.

As new treatments are emerging, robust methods to assess their effects are needed. This study describes the pattern of neuromuscular abilities of patients suffering from sIBM using various functional rating scales and dynamometric measures of strength. The aim was to assess the motor function changes within a period of time of 9 months and to determine the most sensitive outcome measures over this period.

METHODS

Subjects. All patients involved in the study had definite sIBM (i.e. pathological examination of their biopsies showed invaded fibers, vacuoles and amyloid deposits)⁷ and were not treated by any immunosuppressive or immunomodulator drugs for more than 6 months before inclusion. The institutional review board approved the study protocol (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00898989); all patients were enrolled after written, informed consent was obtained. Patients were evaluated during two visits 9 months apart.

Clinical and functional evaluations. During each visit, the same physician performed a conventional clinical muscle strength evaluation by manual muscle testing (MMT using the MRC scale) of 32 muscle groups. Patients were also assessed using two non specific functional scales (Walton⁸ and Rivermead Mobility Index (RMI)⁹) and two specific scales (sIBM weakness composite index (IWCI)³ and Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS)¹⁰). The walking ability of the patients was assessed by a six minute walk test.

Strength assessment. Specific dynamometric measurements were performed to measure hand grip strength and extension and flexion torques for wrist, elbow, ankle and knee. All the tests were performed according to standardized operating procedures (figure 1).

Hand grip strength was measured twice using two different dynamometers, the MyoGrip¹¹ and the Takei (T.K.K. 5401, Takei Scientific Instruments, Japan) handles.

Wrist flexion and extension strength was assessed by measuring the maximal isometric torque generated on a torque meter. The device (namely, the MyoWrist) is equipped with a foam cradle and two Velcro straps in order to firmly maintain the forearm within the cradle. Two vertical bars are positioned at the elbow level aiming to avoid lateral movements of the elbow. A U-shaped support is fixed over the torque meter to receive the hand palm within a dense foam cradle. This support is adjustable with respect to the hand length. The MyoWrist sensitivity is 0.01 Nm.

Ankle flexion and extension were measured on a specific device (namely, the MyoAnkle). The ankle dynamometer was designed to measure the isometric torque generated around the ankle joint in the extension and flexion directions. It consists in an aluminum plate below which are held two load cells on which strain is applied through an inelastic strap going through slots in the plate. The strap is placed and held either on top of the foot at the level of the first metatarsian for flexion measurement, or on the knee at the level of epicondyles for extension measurement. To ensure a larger and stiffer support on the knee, the strap was reinforced with a composite material made of two layers of dense foam between which was held a stiff but flexible metal sheet. The sensitivity of the MyoAnkle is 0.01 kg.

Knee and elbow extension and flexion torques were assessed using a Biodex 3 pro dynamometer in isometric conditions. The precision of such a dynamometer is 0.7 Nm.

Experimental procedures. All strength measurements were performed in isometric conditions (see figure 1). The patients were asked to produce maximal voluntary isometric contractions. For each muscle function, the maximum of two reproducible (within 10%) trials was kept as the maximum voluntary isometric contraction (MVIC) of the evaluation session. The first side tested for each dynamometer was chosen as random. Strong verbal encouragements were given to the patients to help them to produce their true MVIC.

For grip strength assessment, the handle width was adapted to the hand size of the subject. The patient was evaluated on a plinth in a sitting position, the knee and hip forming a right angle, the trunk in an upright position. The height of the plinth was adjusted so that the feet lied flat on the floor. The subject sat on the border of the plinth, the upper limb to be

evaluated extended along the vertical direction. The contralateral hand remained restful on the thigh. The evaluator held the wrist of the patient to avoid compensatory movements with one hand, the other hand supporting the measurement device.

For wrist extension and flexion assessment, the subjects were tested in a sitting position along a plinth with adjustable height. The trunk was in an upright position. The forearm was positioned horizontally within the cradle. The height of the plinth was adjusted so that the arm was positioned at 45° ($\pm 10^\circ$) shoulder abduction and at 30° ($\pm 10^\circ$) shoulder extension. The elbow angle was set at 110° ($\pm 10^\circ$) of extension. The feet were flat on the floor. The contralateral hand was kept on the thigh. The axis of rotation of the wrist was aligned with the axis of the torque meter. The hand palm was then firmly entered and locked in the hand support such as the wrist was in neutral position with regard to extension and flexion.

For ankle extension and flexion assessment, subjects sat upright with the hip, knee and ankle flexed at 90° . The subjects were seated on a plinth which height was adjustable to obtain a 90° knee angle; the leg being vertical. The foot was flat on the dynamometer. For ankle flexion (dorsiflexion) measurement, the top of the foot was tightly strapped to lock up the ankle. The patient was asked to pull up against the strap to flex the ankle. For ankle extension (plantarflexion), the strap was placed distally on the thigh in regard with the malleolus. The subject was asked to pull against the strap by extending its ankle while pushing with the sole of the foot. The length of the lever arm was carefully measured between the lower extremity of the external malleolus and the fifth metatarsal joint. The torque was computed as the product of the force (in Newtons) and the lever arm (in meters).

For knee and elbow extension and flexion assessment, subjects were seated in the Biodex chair with a hip flexion of 85° . Stabilization straps were placed across the trunk and around the waist. For the knee, the knee joint axis was aligned with the measurement axis of the system. The thigh was strapped around the mid-thigh of the leg to be tested. The knee angle was placed at about 90° to have the leg vertically, in order to cancel the effect of gravity. For the elbow, the arm was placed horizontally in a support on which it was firmly attached, the angle between the arm and the sagittal plane adjusted to 20° . The elbow rotation axis was precisely aligned with the measurement axis of the system. The elbow was placed at about 90° to have the forearm vertically, in order to cancel the effect of gravity. The hand was in a neutral position.

The 6MWT was performed in a corridor, between two cones separated by a distance of 25 m.

Data analysis. All the data for strength and 6MWT were converted into percentages of normal reference values from strength databases and predictive equations.¹² For hand grip, wrist and ankle flexion and extension, norms obtained on 288 healthy adult subjects were used to compute percentage of predictive normal theoretical strength from multilinear models with age, sex and weight as variables. For knee and elbow extension and flexion, norms obtained on 270 healthy adult subjects were used with multilinear models using the same variables.¹³ Composite strength scores were computed for the upper limb, the lower limb and the whole body.

Wilcoxon signed rank tests were used to test the difference for strength between genders and between dominant and non dominant sides and for strength changes over 9 months. Spearman rank correlation coefficients (Spearman Rho) were computed to assess correlations between functional scales and strength features. The level of statistical significance was set at 0.05.

RESULTS

Baseline measures. Twenty two patients (8 men, 14 women) were recruited with a mean age of 71.2 ± 8.1 years old. The patients were diagnosed about 5 years after the first symptoms which onset was 59.6 ± 9.3 years for men and 62.4 ± 10.4 for women. The duration of the disease at the beginning of the study was 9.8 ± 5.1 years. Two patients were wheelchair bound and 13 used a walking device occasionally or permanently. All patients were right handed.

The baseline measures were performed in all of the 22 sIBM patients except ankle extension which was not performed by one patient due to discomfort. As expected, we observed a significant alteration of the muscular strength compared to normal values for all muscle groups tested (figure 2) with a mean whole composite index of 43.3 ± 16.5 % of the predicted normal values. The weakest muscle functions were hand grip, wrist flexion and elbow flexion at the upper limbs and knee extension and ankle flexion at the lower limbs. The most spared muscle functions were wrist, elbow and ankle extensions. The same overall pattern of muscle weakness was observed from MMT measurements (figure 3).

Muscle weakness was generally asymmetrical, especially for upper limbs where all tested functions were significantly stronger at the dominant side (except for elbow extension for which only a trend was observed, see figure 2). At lower limbs this dominance effect was not observed. For example, ankle flexion was significantly stronger at the dominant hand side compared to non dominant hand side ($p=0.049$), whereas the opposite was observed for knee flexion was weaker at the dominant hand side compared to the non dominant side ($p=0.002$).

Furthermore, no significant difference was observed concerning ankle and knee extension. MMT could not detect this asymmetry.

Hand grip strength measured with MyoGrip and the Takei handles were significantly correlated (Pearson correlation coefficient: $r=0.856$; $p<0.0001$), but due to its lack of sensitivity, the Takei handle could not detect any strength for 7 patients.

Correlations between clinical, motor and strength variables. A significant correlation was observed between the whole strength composite index and all others functional tests, particularly the specific functional scales IWCI and IBMFRS (Table 1). The scales were also significantly correlated with most of the muscle functions tested. IWCI and IBMFRS were better correlated with upper limb muscle functions, while Walton score and RMI were better correlated with lower limb muscle function. So did also the 6MWD.

The patient strength was correlated with the disease duration only for knee extension (Spearman Rho: -0.721 , $p=0.001$ for left side; -0.680 , $p=0.002$ for right side) (figure 4).

Changes after 9 months. The baseline data and changes over 9 months were computed for the 16 patients who completed the follow-up study. The changes over 9-months are provided for strength measured by dynamometry in percentage of predicted normal values (table 2). Only knee extension changed in a significant way over 9 months, whereas a trend towards a decrease was clearly detectable for hand grip and elbow flexion. Composite scores computed on the upper limb, the lower limb and the whole body did not significantly change (figure 5). For clinical and functional scales, MMT scores, Walton score, IWCI, IBMFRS and 6MWD did not significantly change over the 9 months of follow-up. Only RMI presented a significant change (see table 2).

Discussion:

The present study provides the clinical, motor and functional profiles of 22 patients suffering from sporadic inclusion body myositis and the natural history of this disease for 16 of these patients.

The symptoms onset was found to occur at a mean age of 59.6 ± 9.3 years for men and 62.4 ± 10.4 years for women, in accordance with what has already been described.^{4, 14-16} First symptoms came at a slightly older age for women than for men.¹⁴ The majority of the patients presented with an early atrophy and weakness of the forearm flexors and quadriceps.¹⁷

At upper limbs, right muscle strength was stronger than left side (whereas all 22 patients were right handed) as it was previously reported.^{14, 16} Indirectly, it may suggest that physical activity could be achievable and efficient in sIBM patients. Actually, a recent study showed that an aerobic exercise program could improve muscle strength in such patients.¹⁸

In this study we observed at baseline that hand grip and knee extension were the most altered muscle function in sIBM patients, as Griggs et al. already emphasized this pattern by including finger flexor and quadriceps weakness as diagnostic criteria for sIBM.⁷ This pattern of muscle weakness was also described in previous studies using MMT,^{4, 14, 16} handheld dynamometry⁴ or QMT⁶ and corroborates previous findings stating that knee extensors and finger flexors are the most severely affected muscles.¹⁶ The pattern of muscular deficit observed in the present study is definitely consistent with early atrophy of the forearm flexors and quadriceps described by Amato et al.¹⁷ which can be connected to the important fat infiltration and atrophy measured by magnetic resonance imaging in sIBM patients.¹⁹

Using whole body composite strength score we observed a decrease of 1.6% of the predicted normal values during 9 months of follow up corresponding to a mean decrease of 0.2 % per month. This decrease is lower than the one observed by Rose et al. with a decrease of -0.7 % per month (QMT, n =11),⁶ by Lindberg et al. with a decrease of -1.4 % per month (handheld dynamometry, n=10)⁴ or by Dalakas et al. with a decrease of -1.2% per month observed during a pilot study testing efficacy of Alemtuzumab (QMT, n=13).⁵ However, the procedures for strength measurements, the muscle functions tested and the methods of computation of the composite scores were not always the same. Methods to compute the percentages of changes may also differ since they can be expressed as percentage of changes with respect to baseline, or in variation of percentage of predicted normal values. All these methodological differences make difficult the comparison of the results. By instance, computing a composite strength score with values expressed in Newton meter (except for some functions like hand grip or

pinch which are by default in Newton) may not be consistent because ankle extension torque is naturally about four times stronger than ankle flexion torque. Thus, composite scores must be computed from relative values expressed, as percentage of predicted normal values or as Z-scores. In the present work, strength data were transformed in percentages of normal values using predictive equations. Furthermore in a sIBM clinical trial, age and weight of patients may change significantly during the course of treatment. This underlines the interest to recompute the relative strength at each measurement sessions especially in a slow progressive disease involving elderly people.

The decrease of whole body composite strength score observed in the present study at month 9 were not significant. The same observation was made after 6 months of follow-up by Rose et al. using a similar index.⁶ The analyses of each muscle groups showed significant decrease of strength only for knee extension and a noticeable trend for hand grip and elbow extension (both significant on the right side only). Lindberg et al.⁴ already observed that "the most rapidly declining function was knee extension with a mean decrease of 2.0% per month" in line with Needham et al.¹⁶ Conversely, Rose et al.⁶ quoted that "knee extensors were the weakest muscle at baseline and showed the smallest change over 6 months, but this change was the most statistically significant". From the results of the present study, the particular role of knee extension strength needs to be underlined owing to its direct correlation with the disease duration, its significantly detectable change over 9 months of natural history and its consequent effect on motor function, particularly on gait abilities. From a diagnostic point of view, the quadriceps muscles are probably those to prefer for muscle biopsy since in most patients first symptoms began in the proximal part of the lower extremities.⁴ Knee extension strength is also closely related to the 6MWD, which can be explained by the direct link between quadriceps strength and gait kinematics and kinetics.²⁰

Together those data suggest that muscle strength of knee extensor is a sensitive marker of disease progression knowing that quadriceps weakness are in majority of cases involved in initial symptoms of sIBM patients.¹⁶ In our study, precise measures of knee extensor were performed using a Biodex dynamometer, which allows a precise and reproducible positioning of the patients. In the same line, the decrease of elbow extension strength was observed using the same dynamometer. Rose et al. observed also a significant decrease concerning elbows extension but without precision concerning the side.⁶ Dominant hand grip measure using portative dynamometer could be also useful, since straightforward to perform during a visit. In the present study, the Takei device was used but because of the lack of sensitivity, no measure was recorded for 7 patients whereas strength had been measured for all patients using

the Myogrip device. The choice of the methods to assess the neuromuscular abilities of the patients is thus critical for any therapeutic trial. Measurement devices must be adapted to the patient weakness.

Most of the global evaluation tools we used such as Walton (functional scales evaluating functions of lower limbs), 6MWT or MMT and sIBM specific functional scales (IWCI, IBMFRS) were unable to detect any significant change over 9 months. We failed to observe the significant decrease of IBMFRS observed by Jackson et al.¹⁰ over a 6-month period during a therapeutic trial with beta-interferon-1 α , whereas neither maximal voluntary isometric contraction testing nor MMT showed any significant variations. This is worth to note however than this study was a therapeutic trail, not a natural history. The design of the study may obviously influence the estimation of the rate of change in functional abilities of the patients.

While several therapeutic trials have already been completed in IBM,²¹⁻²⁶ only one presented encouraging results.⁵ MVIC composite score (including or not grip strength) was always a (often primary) criteria of efficacy in all these trials. Our results suggest that objective measures with convenient devices of few muscle groups may be used as outcomes for future clinical trials. Knee extension strength seems to be the most relevant marker of disease progression in sIBM when measured with suitable dynamometry.

BIBLIOGRAPHY

1. Dalakas MC. Inflammatory, immune, and viral aspects of inclusion-body myositis. *Neurology* 2006;66:S33-38.
2. Askanas V, Engel WK. Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2008;116:583-595.
3. Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, et al. Long-term observational study of sporadic body inclusion body myositis in 136 patients. *Brain* in press.
4. Lindberg C, Persson LI, Bjorkander J, Oldfors A. Inclusion body myositis: clinical, morphological, physiological and laboratory findings in 18 cases. *Acta Neurol Scand* 1994;89:123-131.
5. Dalakas MC, Rakocevic G, Schmidt J, et al. Effect of Alemtuzumab (CAMPATH1-H) in patients with inclusion-body myositis. *Brain* 2009;132:1536-1544.
6. Rose MR, McDermott MP, Thornton CA, Palenski C, Martens WB, Griggs RC. A prospective natural history study of inclusion body myositis: implications for clinical trials. *Neurology* 2001;57:548-550.
7. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, et al. Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 1995;38:705-713.
8. Walton J, Karpati G, Hilton-Jones D. Disorders of voluntary muscle, 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
9. Collen FM, Wade DT, Robb GF, Bradshaw CM. The Rivermead Mobility Index: a further development of the Rivermead Motor Assessment. *Int Disabil Stud* 1991;13:50-54.
10. Jackson CE, Barohn RJ, Gronseth G, Pandya S, Herbelin L. Inclusion body myositis functional rating scale: a reliable and valid measure of disease severity. *Muscle Nerve* 2008;37:473-476.
11. Li K, Hewson DJ, Duchene J, Hogrel JY. Predicting maximal grip strength using hand circumference. *Man Ther* 2010;15:579-585.
12. Enright PL, Sherrill DL. Reference equations for the six-minute walk in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1384-1387.
13. Hogrel JY, Payan CA, Ollivier G, et al. Development of a French isometric strength normative database for adults using quantitative muscle testing. *Arch Phys Med Rehabil* 2007;88:1289-1297.

14. Badrising UA, Maat-Schieman ML, van Houwelingen JC, et al. Inclusion body myositis. Clinical features and clinical course of the disease in 64 patients. *J Neurol* 2005;252:1448-1454.
15. Benveniste O, Hilton-Jones D. International Workshop on Inclusion Body Myositis held at the Institute of Myology, Paris, on 29 May 2009. *Neuromuscul Disord* 2010;20:414-421.
16. Needham M, James I, Corbett A, et al. Sporadic inclusion body myositis: phenotypic variability and influence of HLA-DR3 in a cohort of 57 Australian cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:1056-1060.
17. Amato AA, Barohn RJ. Evaluation and treatment of inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:1060-1068.
18. Johnson LG, Collier KE, Edwards DJ, et al. Improvement in aerobic capacity after an exercise program in sporadic inclusion body myositis. *J Clin Neuromuscul Dis* 2009;10:178-184.
19. Cox FM, Reijnierse M, van Rijswijk CS, Wintzen AR, Verschuuren JJ, Badrising UA. Magnetic resonance imaging of skeletal muscles in sporadic inclusion body myositis. *Rheumatology (Oxford)* 2011.
20. Bernhardt KA, Oh TH, Kaufman KR. Gait patterns of patients with inclusion body myositis. *Gait Posture* 2011;33:442-446.
21. Randomized pilot trial of betaINF1a (Avonex) in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 2001;57:1566-1570.
22. Randomized pilot trial of high-dose betaINF-1a in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 2004;63:718-720.
23. Badrising UA, Maat-Schieman ML, Ferrari MD, et al. Comparison of weakness progression in inclusion body myositis during treatment with methotrexate or placebo. *Ann Neurol* 2002;51:369-372.
24. Dalakas MC, Koffman B, Fujii M, Spector S, Sivakumar K, Cupler E. A controlled study of intravenous immunoglobulin combined with prednisone in the treatment of IBM. *Neurology* 2001;56:323-327.
25. Lindberg C, Trysberg E, Tarkowski A, Oldfors A. Anti-T-lymphocyte globulin treatment in inclusion body myositis: a randomized pilot study. *Neurology* 2003;61:260-262.
26. Rutkove SB, Parker RA, Nardin RA, Connolly CE, Felice KJ, Raynor EM. A pilot randomized trial of oxandrolone in inclusion body myositis. *Neurology* 2002;58:1081-1087.

Table 1. Correlations (Spearman Rho) between functional tests and muscle strength assessed by dynamometry.

UPPER LIMB											
	Hand grip		Wrist flexion		Wrist extension		Elbow flexion		Elbow extension		Composite score
	left	right	left	right	left	right	left	right	left	right	
6MWD	*	0.474	*	0.690	0.543	*	0.538	0.626	*	*	0.533
Walton	*	-0.482	*	-0.668	-0.463	*	-0.479	-0.578	*	-0.429	-0.511
RMI	*	0.501	*	0.666	0.551	0.501	0.627	0.682	0.457	0.459	0.583
IWCI	0.642	0.740	0.606	0.818	0.733	0.611	0.808	0.798	0.729	0.699	0.824
IBMFRS	0.556	0.816	0.520	0.758	0.671	0.526	0.784	0.752	0.707	0.664	0.772

LOWER LIMB											WHOLE BODY
	Ankle flexion		Ankle extension		Knee flexion		Knee extension		Composite score	Composite score	
	left	right	left	right	left	right	left	right			
6MWD	*	*	0.724	0.707	0.564	0.607	0.502	0.482	0.781	0.741	
Walton	-0.544	*	-0.616	-0.538	-0.569	-0.626	-0.625	-0.593	-0.834	-0.710	
RMI	0.498	*	0.766	0.682	0.613	0.600	0.600	0.539	0.821	0.791	
IWCI	*	*	*	*	0.499	0.556	0.610	0.598	0.605	0.873	
IBMFRS	0.511	*	*	*	0.552	0.561	0.849	0.890	0.670	0.883	

*: no significant correlation was observed. When $p < 0.005$, the cells are colored.

Table 2. Changes of outcome measures over 9 months.

	Baseline	SD	% change over 9 months	SD	p value
QMT					
Composite score upper limb	37.99	16.49	-4.35	11.83	0.205
Hand grip	31.99	19.31	-4.66	13.51	0.070
Wrist flexion	38.62	18.80	-2.84	16.94	0.469
Wrist extension	57.88	17.68	-4.12	22.30	0.679
Elbow flexion	44.07	20.60	-5.80	10.64	0.098
Elbow extension	60.75	27.08	-5.75	13.97	0.148
Composite score lower limb	44.18	16.88	-6.51	13.06	0.109
Ankle flexion	37.43	15.51	-6.17	25.22	0.433
Ankle extension	67.07	30.93	-2.95	17.39	0.605
Knee flexion	48.11	21.55	-6.88	15.24	0.163
Knee extension	27.55	25.66	-12.79	14.80	0.026
Composite score total	40.71	15.01	-3.30	8.68	0.301
Mean MMT score	3.73	0.69	-2.29	13.75	0.477
6MWD	63.81	19.69	-2.26	11.01	0.551
Walton	5.19	2.17	2.80	18.59	0.666
RMI	10.69	3.79	-7.00	32.78	0.011
IWCI	56.56	23.50	1.50	17.18	0.727
IBMFRS	28.31	8.17	-2.60	13.03	0.455

QMT and 6MWD data are expressed in % predicted normal values. The scales are expressed in their own units.

Figure captions

Figure 1. Strength measurements of several muscle functions by dynamometry. A. Hand grip. B. Wrist flexion and extension. C. Ankle extension. D. Ankle flexion. E. Knee flexion and extension. F. Elbow flexion and extension.

Figure 2. Distribution on muscle weakness on the non dominant and dominant sides for all the muscle functions tested by dynamometry. * : significantly different between sides (Wilcoxon signed rank test). Data are means + standard deviation.

Figure 3. Distribution on muscle weakness for all the muscle functions tested by MMT.

Figure 4. Relationship between knee extension strength and the disease duration.

Figure 5. Composite MVIC score obtained by dynamometry in 16 patients assessed 9 months apart.

Figure 1

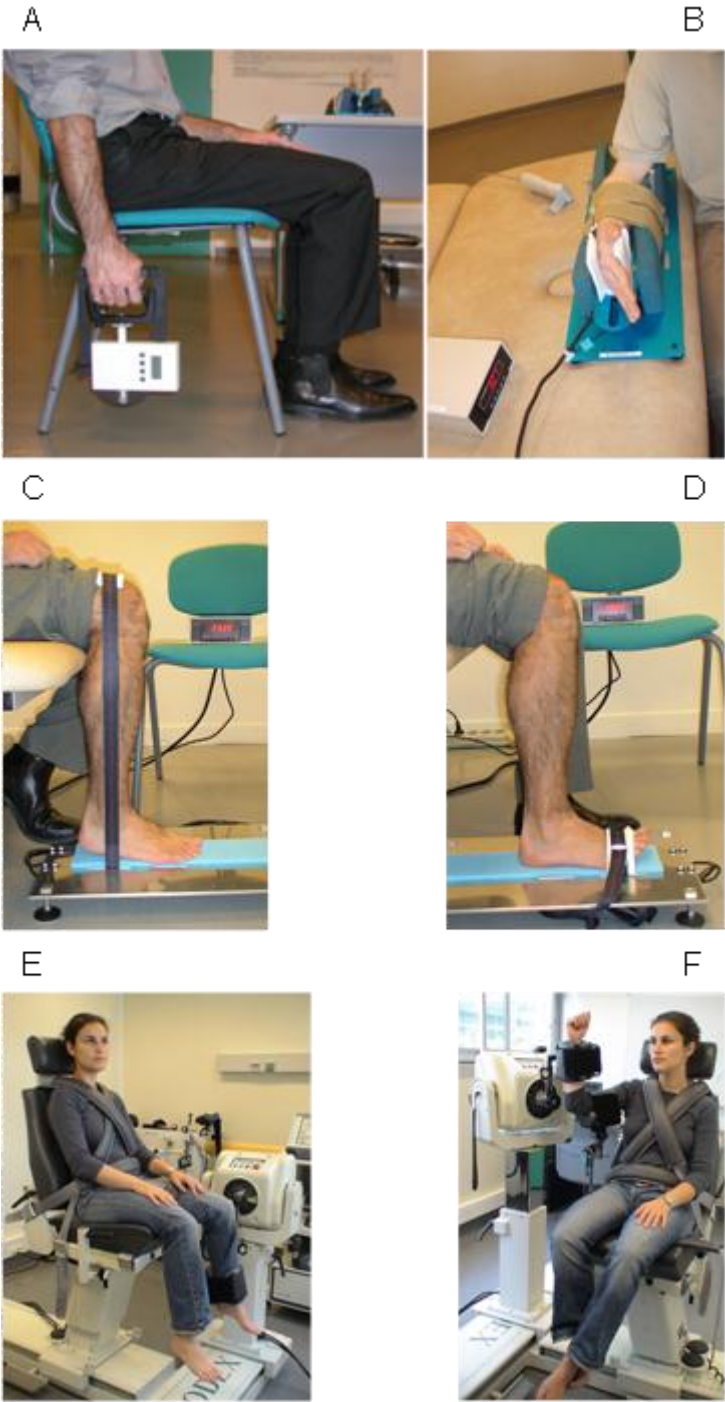


Figure 2

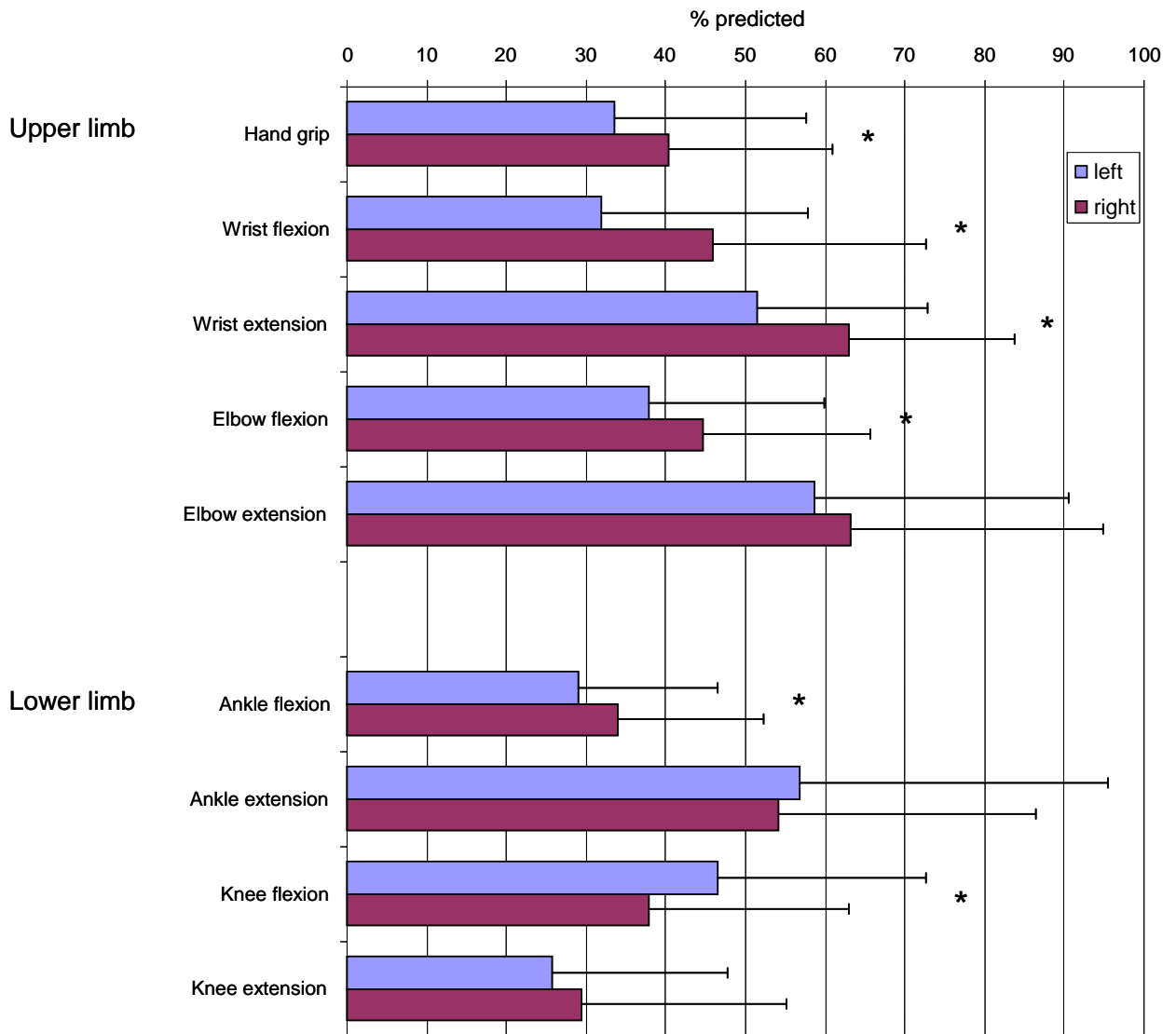


Figure 3

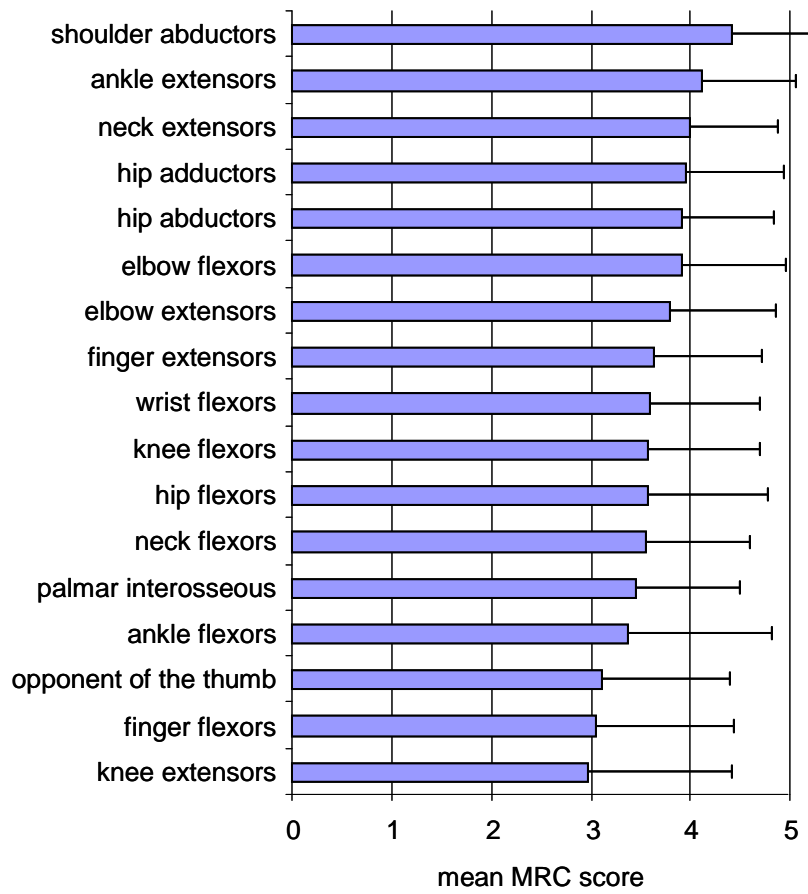


Figure 4

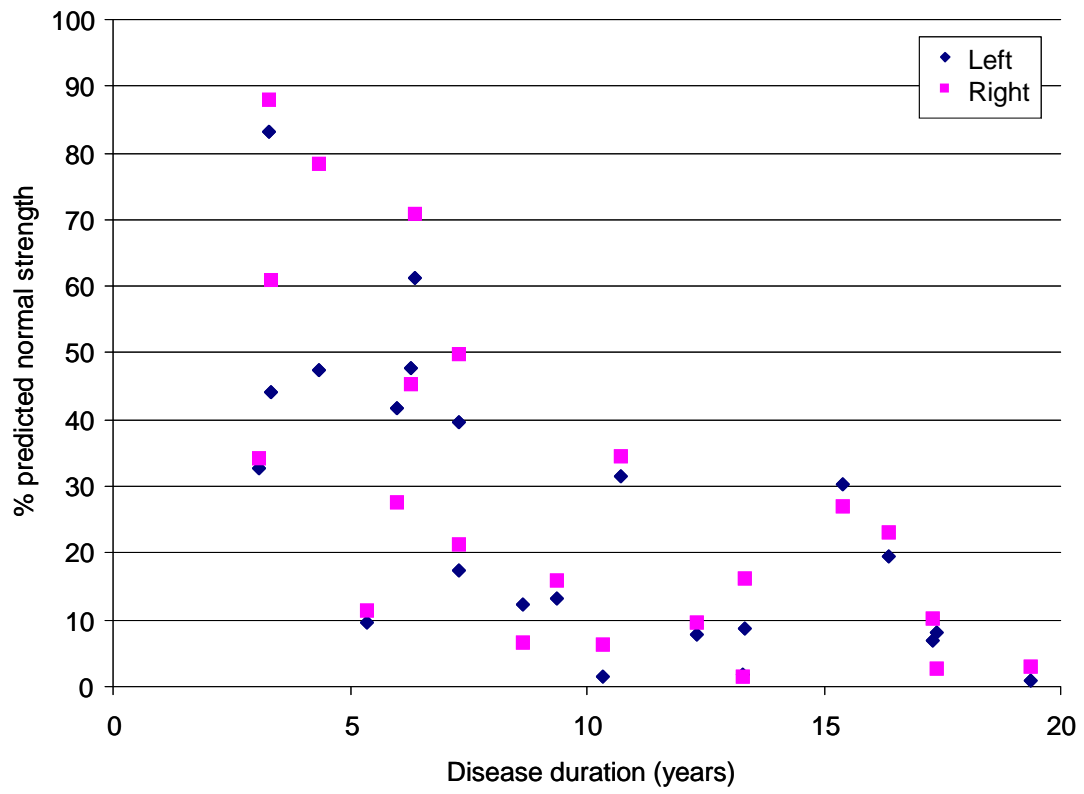
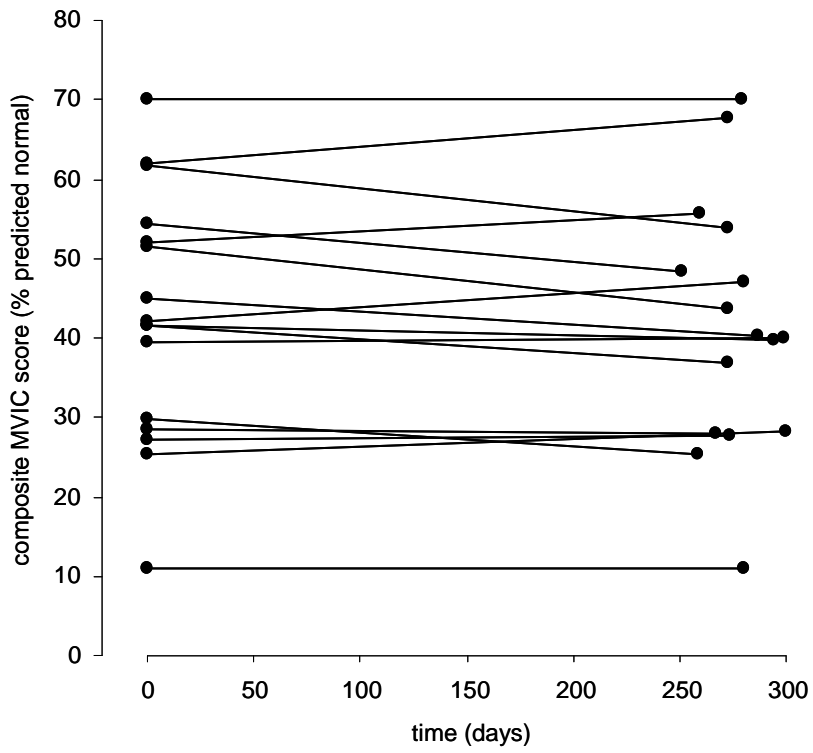


Figure 5



DISCUSSION

1^E PARTIE : LES TREG ET LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES

Au moment où nous avons entrepris ce travail, aucune donnée n'était publiée concernant les Treg dans la physiopathologie des myopathies inflammatoires. C'est pourquoi nous avons débuté ces recherches. Depuis, quelque de données ont été publiées. C'est l'ensemble de ces données que nous allons discuter dans le cadre de la rupture de tolérance au cours des myopathies inflammatoires et de la MI en particulier.

I. Les Treg et la physiopathologie des myopathies inflammatoires dans les modèles animaux

Notre première approche a donc été d'étudier les Treg dans un modèle animal de myopathie auto-immune. En premier lieu, la question est de savoir en quoi ce modèle est il le reflet de MII humaines ?

A. Les modèles de myopathies inflammatoires

1. Le rôle du CMH-I

Dans l'article 1, nous avons vu en quoi la MAE est un modèle de maladie auto-immune. Certaines des caractéristiques histopathologiques de la MAE sont cependant distinctes de celles observées chez l'homme, en particulier au cours de la PM. En effet, on observe au sein de l'infiltrat, la présence de T CD4⁺ et de macrophages (CD11b⁺) envahissant certaines fibres musculaires (phénomène de myophagocytose), associée à une expression non diffuse du CMH-I, et à la présence chez certaines souris d'Ac anti-synthétase, montrant que la MAE est plus proche des myosites de chevauchement (Mozaffar et al, 2000) que de la PM.

Même si le CMH-I est exprimé sur des myocytes qui ne sont pas en régénération, son expression est sensiblement moins diffuse qu'au cours de la pathologie humaine, montrant ainsi une limite à ce modèle. A cet égard, il faut souligner que dans un autre modèle de myopathie auto-immune plus récemment développé, le modèle CIM pour protein C Induce Myositis, l'expression myocytaire de CMH-I n'est pas plus diffuse (Sugihara et al., 2007). Au cours de la CIM, les souris sont immunisées par un peptide issu de la protéine C musculaire. Ainsi, la rupture de la tolérance musculaire induite par l'immunisation avec une

protéine musculaire en présence de CFA s'accompagne d'une expression moins marquée du CMH-I que celle qui est observée en pathologie musculaire.

Puisque le CMH-I n'est pas exprimé à un niveau détectable à l'état physiologique, on peut supposer que la tolérance musculaire est en partie due à l'ignorance. Nous rappelons ici que les travaux de Boyer et al. ont effectivement montré l'importance de ce mécanisme pour le compartiment T CD4⁺ (cf introduction).

Ainsi, certains auteurs ont proposé de développer un modèle où le CMH-I est exprimé spécifiquement par les fibres musculaires sous la dépendance d'un promoteur musculaire (Nagaraju et al., 2000). Dans ce modèle, on observe une myosite définie par la présence de nécrose et d'inflammation. Cependant, le mécanisme auto-inflammatoire n'est pas avéré pour plusieurs raisons.

Premièrement, s'il existe une inflammation musculaire celle-ci est en faible, voire très faible abondance dans le muscle.

D'autre part, l'inflammation est composée quasi-exclusivement de l'immunité innée, car les cellules CD3⁺ représentent moins de 1% des cellules inflammatoires musculaires. De plus, aucune donnée dans ce travail ne montre clairement que le CMH-I est exprimé à la surface des myocytes, même si leur présence intra sarcoplasmique est indiscutable.

Ainsi, rien ne prouve que des auto-antigènes musculaires puissent être reconnu spécifiquement par des CD8⁺ auto-réactifs.

Enfin, dans leurs travaux, les auteurs n'ont pas réalisé d'expérience de transfert de lymphocytes issus de souris malades à des souris sauvages pour confirmer le caractère auto-immun de la myosite.

Ces travaux montrent plus la cytotoxicité musculaire du CMH-I. Ceci expliquerait la persistance de la myosite une fois l'expression transgénique du CMH-I réprimée. En effet, une fois les lésions musculaires établies, il existe une importante production cytokinique au sein du tissu musculaire en particulier sous la dépendance des macrophages (Brigitte et al., 2010) qui elle-même induit l'expression de CMH-I.

2. Rôle des auto-anticorps

La présence de xéno-anticorps anti-Hystil ARN-t-synthétase observée au cours de la MAE, en particulier après la déplétion en Treg. Nous rappelons que cette protéine est la cible antigénique contre laquelle sont produits les Ac spécifiques associés aux myosites de

chevauchement. Cette observation rapproche notre modèle MAE de la MC humaine. La raison de la survenue des ces xéno Ac-anti-ARN-t-synthétase reste imprécise. On peut cependant faire l'hypothèse que les lésions musculaires sont un élément de réponse.

En effet, dans notre modèle comme dans celui de la souris CMH-I induite, il existe des lésions musculaires importantes dont on sait qu'elles sont enrichies en ARN-t-Histidyl transférase (cf introduction). En effet, Casciola-Rosen et al. ont montré que les ARN-t-aminoacide-transférases pouvaient être libérées dans le muscle par les myocytes en nécrose et être exprimées à la surface des fibres musculaires des myosites (Casciola-Rosen et al., 2005). Ainsi, l'environnement inflammatoire serait propice à la survenue d'une réponse humorale anti-Jo1 et de fait il pourrait donc s'agir auto-Ac et non de xéno-Ac. Cependant, il faut souligner que dans notre modèle, seules les souris sans Treg présentent ce type d'Ac, ce qui souligne l'importance des Treg dans le contrôle de la réponse humorale auto-immune (cf Article 1). La place de ces Ac restent à définir, mais il faut rappeler que dans notre modèle ni le transfert de sérum de MAE ou de B n'a permis de transférer la maladie.

Le rôle de l'antigène Jo-1 dans la survenue des MII a été discuté en introduction. Mais des travaux récents montrent qu'il peut avoir un rôle déterminant pour le déclenchement d'une myosite expérimentale.

3. Les cibles auto-antigéniques et le déclenchement de la myosite

Il faut rappeler ici que l'immunisation avec de histidyl-tRNA-synthétase en présence de CFA (Katsumata et al., 2007) est capable de provoquer une myosite histologique. Cependant dans leur travaux, les auteurs n'ont pas décrit l'expression musculaire du CMH-I, ni réalisé d'expériences de transfert. Pour autant, ces expériences montrent l'intérêt de cette cible antigénique ubiquitaire pour provoquer une myosite. Il faut remarquer dans ce modèle qu'il existe une atteinte respiratoire qui n'est observée dans aucun autre modèle, y compris le nôtre.

Dans les autres modèles de myosite auto-immune, les auteurs utilisent la même approche que la notre à savoir, utiliser une protéine musculaire. Ainsi, une myosite a pu être provoquée grâce à l'utilisation de la laminine, une protéine musculaire extra-cellulaire (Nakano et al., 2005) ou la protéine C pour la CIM. Ensemble, ces modèles montrent qu'il existe de nombreux antigènes musculaires capables d'induire une myosite et n'apportent que peu d'information sur la ou les cibles antigéniques potentielles en pathologie humaine.

4. La rupture de la tolérance et le rôle des Treg

La présence de cellules auto-réactives musculaires en périphérie est théoriquement établie ainsi que leur contrôle par des mécanismes périphériques. Chez la souris, leur présence est établie. En effet, les souris *scurfy* (sans Treg) ne présentent pas de maladie musculaire auto-immune. En revanche, si l'on transfère les Tconv de souris *scurfy* à une souris lymphopénique, celle-ci présente une myosite auto-immune. Cette expérience montre que les conditions de lymphopénie favorisent la prolifération des Tconv auto-réactifs musculaires qui ne sont plus contrôlés par les Treg.

Nous avons vu que pour "lever le contrôle de ces Tconv-autoréactifs musculaires", l'utilisation d'un fort adjuvant comme le CFA était indispensable. En effet, quel que soit l'antigène utilisé, la tolérance était rompue grâce à l'utilisation de CFA. Nous avons discuté dans l'article 1, l'importance de cet adjuvant pour générer les signaux de danger et les cytokines pro-inflammatoires indispensables à la rupture de tolérance périphérique musculaire. Cependant, l'intensité de la réponse immunitaire innée secondaire au CFA crée une situation peu physiologique.

Deux autres approches expérimentales apportent des résultats intéressants en évitant l'utilisation d'adjuvant. La première a déjà été abordée en introduction: il s'agit du modèle SM-OVA-OTI (Calbo et al., 2008). Il faut rappeler que dans ce modèle, où le muscle exprime spécifiquement OVA, la tolérance n'est pas rompue par les Tconv OTI (CMH-I-OVA spécifiques). Cette tolérance n'implique pas les Treg car il n'existe pas dans ce modèle de modification du compartiment Treg. Elle implique l'ignorance pour les T CD4⁺ et la surepression de PD-1 (molécules inhibitrice) pour les T CD8⁺ cytotoxiques.

Plus récemment encore, l'équipe d'Ascherman *et al* a pu provoquer une myosite chez la souris en l'absence d'adjuvant, grâce à l'immunisation intra-musculaire au moyen de l'antigène Jo-1 (Soejima et al., 2011).

Cependant, il faut souligner que Jo-1 peut avoir des propriétés proches de celles d'un adjuvant. En effet, il a été montré que cette protéine pouvait activer le système immunitaire inné via les TLR (Plotz et al, 2003 ; Katsumata et al., 2007) et avait des propriétés chimiokines en attirant les lymphocytes ou DC via CCR5 (Howard et al., 2002). Ces propriétés pourraient rendre compte de la persistance de la myosite chez des souris immunodéficientes (*Rag*^{-/-}). En effet, la persistance de la myosite chez des animaux dépourvus de système immunitaire adaptatif témoigne plus de la "toxicité musculaire de

Jo-1” que du caractère auto-immun de la maladie. De plus dans ce modèle, il faut souligner que l’immunisation n’est réalisée que par voie intra-musculaire. Ce type d’administration crée en soi une lésion musculaire dont nous avons vu l’importance pour provoquer une réaction inflammatoire. La lésion musculaire a probablement elle aussi un rôle d’adjuvant. Dans ce travail, aucune immunisation sous cutanée n’est réalisée, et aucun autre muscle que ceux qui sont injectés ne sont analysés.

Ensemble, ces observations nous amènent à considérer ce modèle de myosite sans adjuvant avec réserve. On doit plutôt évoquer une réaction inflammatoire musculaire locorégionnale secondaire à l’effet synergique de la lésion musculaire mécanique et des propriétés inflammatoires de Jo-1.

Ainsi, la revue de ces modèles expérimentaux montre que seul un fort adjuvant est capable de provoquer une myosite. Dans ce sens, on peut noter que l’infection chronique par *Leishmania infantum* chez le hamster s’accompagne d’une myosite proche de celle observée chez l’homme. Là encore, le protozoaire a un rôle d’adjuvant et on peut s’interroger sur le caractère auto-immun de cette myopathie possiblement infectieuse (Paciello et al., 2010).

Ainsi, la rupture de la tolérance musculaire ne peut être obtenue qu’en présence de forts adjuvants ou d’une profonde déplétion en Treg (Scurfy et expérimentations de transfert).

Dans notre modèle, nous avons vu l’importance des Treg qui, lorsqu’ils sont détruits, aggravent la sévérité de la maladie, ce qui souligne ainsi leur participation au contrôle de l’auto-immunité au cours de la MAE. A notre connaissance, ces expérimentations n’ont jamais été réalisées dans d’autres modèles.

À l’inverse, le transfert de Treg diminue significativement la sévérité de la myosite, renforçant ainsi l’importance de leur rôle.

Pour autant, cette thérapie cellulaire ne prévient pas complètement la survenue de la maladie.

D’autre part, le traitement curatif par Treg polyclonaux (résultats non montrés) ne permet pas de guérir la maladie. Ces observations pourraient limiter l’intérêt des Treg au cours des myopathies.

Ce même type de résultat a été observé au cours d’autres modèles expérimentaux de maladie auto-immune. En effet, le transfert de Treg polyclonaux s’est révélé aussi efficace dans des modèles de maladies auto-immunes spécifiques d’organes

comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, le diabète de type I, l'arthrite à collagène, l'uvéite expérimentale, la gastrite, la thyroïdite, l'oophorite ou la maladie inflammatoire digestive (Asseman et al., 1999; Frey et al., 2005; Gartner et al., 2006; Kohm et al., 2002; Sakaguchi et al., 1995; Terrada et al., 2006). Mais, comme nous l'observons dans notre modèle, le transfert ne permet pas une rémission de la maladie, mais le plus souvent une diminution de son intensité.

Nous verrons dans le chapitre sur la thérapie cellulaire que cette efficacité relative ne limite pas l'intérêt des Treg. Au contraire, ces résultats nous éclairent sur les mécanismes d'action des Treg. Ils témoignent en fait de la limite des Treg polyclonaux et de l'importance de la spécificité des Treg pour la mise au point de protocoles thérapeutiques.

B. La MAE et la myosite à inclusions

Nous avons vu que si les caractéristique histologique ou humorale font de la MAE un bon modèle de myosite de chevauchement plus que de PM, elle présente aussi toutes les caractéristiques dysimmunitaire de la MI.

Néanmoins, au cours de la MAE, il n'existe pas d'inclusion. De fait la MAE n'est pas un modèle de MI, même si elle reproduit les mécanismes auto-immuns observés au cours de cette maladie.

Plusieurs équipes ont travaillé pour mettre au point un tel modèle de MI.

Comme pour les modèles de maladie d'Alzheimer, le principe est de faire exprimer de façon transgénique aux souris génétiquement modifiées un précurseur de protéine β amyloïde. Avec les années, les travaux ont permis de mettre au point un modèle où la protéine β amyloïde humanisée est exprimée sous la dépendance d'un promoteur musculaire spécifique. Si ces travaux permettent d'obtenir la formation d'inclusions musculaires contenant de l'A β -42 (la fraction la plus pathogène de la protéine β amyloïde), jamais il n'est observé d'infiltrat inflammatoire (Fukuchi et al., 1998). Le meilleur modèle à ce jour est certainement celui mis au point par Frank Laferla (Kitazawa et al., 2006).

Dans ce modèle comme dans les précédents, est utilisée la production transgénique des l'A β -42 sous la dépendance d'un promoteur musculaire squelettique MCK, croisé avec des souris PS1 pour preseniline 1 mutée. En effet, la mutation de la PS-1 s'accompagne de

modifications de l'activité de la γ -sécrétase qui régule le niveau de production de l'A β -42. Ainsi, cet animal double transgénique (A β -MCK-PS1) exprime l'A β -42 à de hauts niveaux. En plus des anomalies précédemment décrites (inclusions), on observe dans ce modèle la présence d'infiltrats CD8⁺ musculaires. Cependant, l'infiltrat est modeste, il n'existe pas de fibre tunellisée ni d'expression du CMH-I, ce qui montre les limites de ce modèle quant aux caractéristiques inflammatoires de la MI.

Il faut citer que les modèles murins de MI héréditaires avec une mutation sur le gène GNE (UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase) sont responsables, comme chez l'homme, de l'apparition d'inclusions musculaires sans dégénérescence (Malicdan et al., 2007).

De plus, même si dans un autre modèle, la surexpression musculaire d'une enzyme impliquée dans le catabolisme des protéines mal conformées, RNF5 (ER-anchored RING finger E3 ligase), conduit à la formation d'inclusions et apporte des informations importantes sur la physiopathologie de la MI, les caractéristiques inflammatoires de la MI n'y sont pas reproduites (Delaunay et al., 2008).

Ainsi, le modèle de la MAE est un des meilleurs modèles pour reproduire les phénomènes inflammatoires musculaires observés au cours de la MI.

II. Les Treg et myopathies inflammatoires humaines

A. L'aspect quantitatif

Peu de données existent concernant les Treg au cours des myopathies inflammatoires humaines. Nous avons observé un déficit en Treg dans le compartiment systémique des patients MII (article 2). Au cours des MI, une autre étude rapporte aussi un déficit systémique en Treg dans le cas de la DM et la PM (Antiga et al., 2010). Les valeurs rapportées sont difficilement comparables à celles que nous avons mesurées en raison d'une différence de définition des Treg en cytométrie.

Hormis notre travail concernant la MI à ce jour, il n'existe aucune donnée publiée sur les Treg systémiques. Il faut souligner qu'un déficit systémique a été rapporté au cours de nombreuses autres pathologies auto-immunes comme le syndrome de Gougerot Sjogren (Li et al., 2007) le syndrome de Guillain Baré (Chi et al., 2007), le LES (Zhang et al., 2008) ou la myasthénie (Li et al., 2008b).

Comme nous l'avons vu en introduction, en raison de l'intense trafic cellulaire des Treg, l'analyse des Treg dans le seul compartiment sanguin n'est pas suffisante pour estimer

quantitativement les Treg dans leur ensemble. En particulier, il apparaît indispensable d'analyser aussi les Treg dans le site cible de la maladie auto-immune.

Une autre équipe a analysé les Treg dans les biopsies de patients PM, DM et MII (Waschbisch et al., 2010). Dans ce travail, il est observé que les Treg sont présents dans l'infiltrat musculaire et représentent en médiane 10,1% des cellules T CD3⁺, ce chiffre ne variant pas significativement selon le type de myosites étudiées. Dans ce travail, les Treg du compartiment systémique ne sont pas analysés. Dans une autre étude concernant exclusivement la DM, on note que le déficit Treg observé est associé en périphérie à une diminution du pourcentage de Treg dans le tissu cutané comparativement aux contrôles (Biopsies cutanées de patients avec un Lupus, une dermatite atopique ou un psoriasis) (Antiga et al., 2010). Les auteurs de cette étude n'ont pas analysé la présence des Treg dans le compartiment musculaire.

Concernant notre étude et la MII, il est difficile de conclure à déficit quantitatif en Treg dans la mesure où la décroissance des Treg systémiques peut être le reflet de leur migration dans le tissu musculaire. Les Treg peuvent migrer vers le muscle au cours de la MI sous la dépendance des chimiokines Th1 dont le récepteur CXCR3 est exprimé à la surface des Treg (Hoerning et al., 2011).

Pour autant, les Treg musculaires peuvent être des Treg induits (iTreg) issus de la conversion périphérique de Tconv. Cette hypothèse n'a pu être testée dans notre travail. Elle renvoie à la difficulté d'indentification des Treg et à leur hétérogénéité. A ce titre, l'apport de l'identification d'Helios, un marqueur spécifique des iTreg pourrait être utile.

Enfin, les difficultés d'identification des Treg peuvent conduire à tort à définir un Treg alors qu'en fait il s'agit d'un Tconv activé exprimant FoxP3. Ainsi, au cours de la MI, les cellules FoxP3⁺ musculaires pourraient être en fait des Tconv activés, ce qui remettrait en cause l'hypothèse que nous avons avancée sur les capacités migratoires des Treg au cours de la MI. Mais comme nous l'avons vu dans la discussion de l'article 2, lorsque les Tconv expriment FoxP3, l'intensité de cette expression est plus faible que celle des Treg et souvent détectable par les techniques d'immunohistochimie.

B. L'aspect qualitatif de la fonction des Treg

Si les Treg sont capables de migrer dans le tissu musculaire, ils sont incapables d'empêcher la survenue de la myopathie auto-immune. L'efficacité des Treg est déterminée par l'équilibre de la balance Tconv auto-réactifs/Treg. Ainsi, on peut concevoir qu'au cours des myopathies inflammatoires et en particulier de la MI, les Treg ne soient pas en nombre suffisant pour contrôler la réponse auto-immune.

Au-delà du rapport de force quantitatif, il faut évoquer aussi l'hypothèse d'anomalies qualitatives ou fonctionnelles des Treg étant donné l'importance du pourcentage de Treg présents au site de l'inflammation.

En effet, il a déjà été montré qu'au cours de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques, les Treg étaient fonctionnellement déficients, que leur nombre en périphérie soit conservé ou non (Ehrenstein et al., 2004; Thewissen et al., 2007). Or, nous avons pu observer qu'au cours de la MI, les Treg systémiques sont normalement fonctionnels. À notre connaissance, il n'existe pas d'autre travail à ce jour ayant testé la fonction des Treg au cours de la MI.

Il aurait été pertinent de tester la fonction des Treg musculaires, mais pour des raisons techniques, cela n'est pas réalisable. Il faut souligner ici les limites des tests fonctionnels *in vitro*, réalisés en dehors de l'environnement inflammatoire, qui peuvent être à l'origine d'une perte d'efficacité des Treg. En particulier, il a été montré que l'IL-12, produite à un niveau élevé dans le sérum des patients MII, pouvait altérer la fonction des Treg (King and Segal, 2005).

C. La résistance des Tconv

La troisième hypothèse concernant le rôle des Treg au cours de la MII est non plus un déficit quantitatif ou qualitatif des Treg mais une résistance des Tconv qu'ils sont supposés inhiber. En effet, cette résistance a déjà été constatée sur des modèles murins de diabète (Gregori et al., 2003) ou du lupus (Monk et al., 2005). Nous ne revenons pas ici sur les nombreux mécanismes pouvant conduire à ce phénomène.

Cette hypothèse n'a pas été directement testée dans notre travail car il est nécessaire de réaliser des tests de suppression avec des Tconv de patients MI et des Treg issus de sujets sains. Cependant, l'hypothèse d'une résistance des Tconv aux Treg chez les patients MII peut être raisonnablement écartée car les tests de suppression que nous avons réalisés avec des

Tconv autologues sont normaux. En revanche, il aurait été indispensable de réaliser cette expérience si les tests de suppression avaient été anormaux.

D. Myosite à Inclusions : Les Treg face à l'attaque auto-immune

Nous avons déjà discuté l'importance des Treg au cours de la MI, mais il faut rappeler aussi que les Treg sont déterminants pour le contrôle de la tolérance périphérique. Or, l'implication de mécanismes auto-immuns au cours de la MI est toujours sujette à discussion.

En effet, les caractéristiques dégénératives histologiques et l'échec des immunosupresseurs ont conduit certains auteurs à considérer la MI comme une maladie musculaire dégénérative (Askanas et al., 2009) plus que comme une maladie auto-immune. Ainsi, pour souligner l'importance des Treg au cours de la MI, nous allons discuter les éléments montrant l'importance de la rupture de tolérance au cours de la MI.

Il existe de nombreux arguments qui suggèrent que la réponse inflammatoire au cours de la MI est dirigée contre la fibre musculaire. Comme nous l'avons vu, certains haplotype HLA sont associés à la MI (Lampe et al., 2003) ; en particulier l'haplotype HLA B8-DR3, haplotype lui-même associé à d'autres maladies auto-immunes (Badrising et al., 2004). Un tiers des MI sont associées à d'autres maladies auto-immunes (Badrising et al., 2004) ou à la présence d'auto-anticorps (Koffman et al., 1998a). De plus, les données anatomopathologiques montrant l'envahissement de fibres musculaires surexprimant le HLA de classe I par des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques oligoclonaux, exerçant des phénomènes de cytotoxicité (excrétion de granzymes A ou de perforines (Orimo et al., 1994), renforcent le concept de destruction des fibres musculaires par des lymphocytes T auto-réactifs cytotoxiques.

Outre nos résultats sur les Treg, les résultats obtenus sur le phénotype de la réponse immunitaire montrent clairement une activation du système immunitaire orientée dans la voie Th1 (Article 1). A l'inverse, nous n'avons pas vu d'élément montrant une implication des cellules Th17 comme cela a été montré par Miossec et al. au cours de la PM et de la DM.

La finalité de la voie Th1 est l'activation de cellules T CD8⁺ cytotoxiques et à ce titre, l'augmentation des cellules T CD8⁺CD28⁻ que nous avons observée est cohérente.

Comme nous l'avons vu, l'équipe de Lundberg retrouve des résultats similaires en apportant en outre la preuve que ces cellules composent l'infiltrat musculaire (Pandya et al., 2010). Ces mêmes anomalies ont aussi été rapportées au cours de la DM et de la PM, alors que le caractère auto-immun de ces maladies ne fait pas de doute (Fasth et al., 2009). De plus, l'appariement sur l'âge de notre population contrôle écarte l'hypothèse que cette population lymphocytaire puisse être rattachée à l'immunosénescence (article 2). La raison de l'apparition de cette population T CD8⁺CD28⁻ reste inconnue. Elle pourrait être secondaire à une infection chronique par le Cytomégalovirus, ce d'autant que la séroprévalence pour ce virus est plus élevée chez les patients DM et PM que dans la population générale dans l'étude de Fasth. Pourtant dans ce travail, les auteurs retrouvent aussi une augmentation de cette population T CD8⁺CD28⁻ chez des patients séronégatifs pour le CMV. On peut donc supposer que cette population est le reflet de la stimulation auto-antigénique chronique comme cela a été montré au cours de la sclérose en plaques (Markovic-Plese et al., 2001).

Cette population CD8⁺CD28⁻ a des propriétés particulières car elle est résistante à l'apoptose (Posnett et al., 1999; Effros et al., 2005) ce qui pourrait expliquer en partie les échecs des traitements immunosuppresseurs. Mais cette hypothèse n'expliquerait pas la sensibilité de la PM/MC et DM à ces traitements alors même que la population CD8⁺CD28⁻ est aussi présente dans le muscle.

D'autre part, plusieurs observations suggèrent son rôle pathogène. Nous rappelons que cette population est présente dans le muscle des patients MI et que leur adressage musculaire peut être dépendant des chimiokines Th1 comme le suggèrent nos résultats (article 2). De plus, nous avons constaté que cette population avait une forte capacité à produire de l'IFN γ dont on connaît le rôle cytotoxique sur la fibre musculaire (Kalovidouris and Plotkin, 1995). En outre, l'IFN γ favorise l'expression du CMH-I à la surface des fibres musculaires (Nagaraju et al., 2000) et peut donc indirectement faciliter leur destruction en raison de l'exposition d'auto-antigènes musculaires au système immunitaire. De plus, dans l'étude de Fasth et al., au cours de la PM et de la DM, cette population était caractérisée aussi par une importante production de perforine, soulignant ainsi leur potentiel cytotoxique.

Il faut souligner que même si le caractère autoréactif de cette population ne peut être affirmé, les anomalies de répertoire T observées au cours de la MI correspondent très probablement à cette population (Dimitri et al., 2007).

Enfin, montrer l'existence d'une réponse auto-immune contre le muscle au cours de la MI n'implique pas pour autant que celle-ci participe à la survenue du déficit. De la réponse à cette question dépend l'intérêt de l'utilisation de traitement immuno-suppresseur ou immuno-modulateur.

Nous rappellerons ici que deux publications suggèrent la participation du système immunitaire adaptatif au déficit musculaire (Dalakas et al., 2009; Lindberg et al., 2003). Dans ces travaux, il est montré qu'une profonde déplétion lymphocytaire T permet d'arrêter la progression du déficit musculaire, et que la reconstitution du compartiment lymphocytaire est associée à une reprise évolutive du déficit.

Pour conclure, l'ensemble de ces données suggèrent qu'au cours de la MI, il existe une destruction auto-immune des fibres musculaires secondaire à une activation Th1, mettant en jeu une sous-population T CD8⁺CD28⁻ que les Treg ne pourraient pas contrôler, soit en raison d'un déficit quantitatif, soit en raison d'un déficit qualitatif.

Cette hypothèse nous a amené à développer une stratégie thérapeutique visant à augmenter l'efficacité des Treg.

2^E PARTIE : TRAITEMENT DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES VERS UNE THERAPIE CELLULAIRE TREG

Comme nous l'avons vu, nombreux sont les travaux expérimentaux chez l'animal qui ont permis de montrer l'effet bénéfique (préventif et/ou curatif) du transfert de Treg sur l'évolution de pathologies auto-immunes. En particulier, le modèle de myopathie inflammatoire que nous avons développé, nous a permis de montrer l'intérêt du transfert de Treg polyclonaux. Ces dernières années, l'ensemble de ces données a poussé de nombreuses équipes à développer des protocoles expérimentaux pour utiliser les Treg en thérapie cellulaire au cours de maladies auto-immunes humaines. Cependant, le passage de l'animal à l'homme pose un certain nombre de problèmes.

I. Le problème du nombre

A. Des besoins importants

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le rapport de force défini par le rapport $T_{conv} \text{ auto-réactif} / Treg$ est déterminant pour permettre l'effet des Treg. Ainsi, il est indispensable de transférer un nombre suffisant de Treg pour espérer observer un effet thérapeutique. Les Treg ne représentent qu'environ 4% des T CD4+ circulants dans le sang (Takahata et al., 2004) et il est donc indispensable d'en accroître le nombre *in vitro* avant toute utilisation systémique. Evidemment, la problématique est tout autre lorsqu'on s'intéresse à une maladie auto-immune confinée à un organe de petite taille comme l'œil, telle que l'uvéïte. Dans le cas des myosites, dans la mesure où le tissu musculaire représente jusqu'à 30% de la masse corporelle, seul un traitement systémique avec une importante quantité cellulaire est envisageable.

B. Des difficultés de production

La sélection des Treg *ex vivo* impose un recueil de cellules vivantes à partir du compartiment lymphocytaire T périphérique. Ceci est rendu possible par une lymphaphérèse qui permet la récolte des lymphocytes circulants d'un patient. Une fois ces lymphocytes obtenus, il est nécessaire d'en extraire les Treg fonctionnels. Ceci est réalisable par l'utilisation d'Ac monoclonaux reconnaissant spécifiquement les marqueurs membranaires

des Treg. Or, comme nous l'avons vu, nombreux sont les marqueurs membranaires partagés par les Treg et les Tconv activés. Il existe donc un risque important de sélectionner aussi des Tconv activés qui, chez un patient souffrant de maladie auto-immune, sont probablement pathogènes car auto-réactifs.

Une avancée pourrait bien avoir été faite dans ce sens avec l'association des marqueurs $CD4^+CD25^{fort}CD127^-$ définissant des cellules exprimant en grande majorité FoxP3 (Liu et al., 2006). Cependant, nous l'avons vu, ces approches ne permettent pas une discrimination parfaite et de fait font prendre le risque de contaminer la sélection par des Tconv activés pathogènes.

En effet, la sélection de Treg sur le phénotype $CD4^+CD25^{fort}CD127^-$ peut s'accompagner d'une contamination par une population cellulaire non régulatrice $CD45RO^+FOXP3^{faible}$, allant jusqu'à 30-50%, population capable de produire des cytokines pro-inflammatoires (Miyara et al., 2009; Putnam et al., 2009). Le problème de la contamination a été résolu en partie grâce à l'utilisation de rapamycine dans le milieu de culture (Guillot-Delost et al., 2008). La rapamycine permet d'inhiber la prolifération des Tconv tout en épargnant les Treg et d'améliorer ainsi la pureté de la culture cellulaire.

Plusieurs travaux (Hoffmann et al., 2006a; Miyara et al., 2009) suggèrent de privilégier la sélection de la population de Treg naïfs $CD45RA^+FOXP3^{faible}$ qui aurait une plus forte capacité à s'expandre *in vitro*. De plus, cette population de Treg naïfs est plus suppressive que la population effectrice qui, en outre, croît peu *in vitro* du fait de sa propension à l'apoptose même en présence de fortes doses d'IL-2 (Miyara et al., 2009; Fritzsching et al., 2005).

Cependant, il faut souligner que privilégier la sélection d'une sous-population de Treg renforce encore la problématique du nombre de Treg obtenus *ex vivo* avant expansion.

II. Le problème de la spécificité

La spécificité antigénique des Treg cultivés est déterminante pour l'effet thérapeutique attendu.

A. Les Treg polyclonaux

Nous avons montré dans nos travaux, l'intérêt de l'utilisation des Treg polyclonaux pour diminuer la sévérité de la myosite lorsqu'ils sont administrés pendant le protocole d'immunisation. D'autres travaux ont montré des résultats comparables au cours de modèles expérimentaux (article 1). Il faut cependant souligner que l'effet des Treg polyclonaux est variable selon le modèle expérimental utilisé. En effet, ils sont parfois inefficaces comme dans le cas de modèles spontanés de diabète chez la souris NOD (Tang et al., 2004), ou à l'inverse efficaces (Cohen et al., 2002).

Il a été montré en particulier qu'ils étaient très utiles pour la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse allogénique. Dans ces travaux (Cohen et al., 2002), il est montré que le co-transfert de Treg et de cellules souches hématopoïétiques allogéniques pouvait prévenir la survenue de la GVH tout en préservant l'effet anti-tumoral. Ainsi, ces résultats sont meilleurs que ceux que nous avons observés puisque dans notre modèle, la myosite se développe malgré le transfert en Treg bien qu'avec une intensité sensiblement réduite. Comment expliquer alors cette différence, voire l'inefficacité des Treg polyclonaux dans certains modèles ?

L'explication réside sans doute dans la spécificité des Treg utilisés. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les Treg, pour être efficaces, doivent être activés par leur antigène cognitif. De fait, dans un modèle de maladie auto-immune spécifique d'organe comme la MAE ou l'arthrite à collagène, le nombre d'auto-antigènes impliqués dans la réponse auto-immune est restreint et on peut donc supposer que très peu de Treg sont spécifiques de ces antigènes au sein du large répertoire des Treg polyclonaux transférés.

A l'inverse, au cours d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, on estime que la fréquence des T impliqués dans la réponse allo-réactive est beaucoup plus importante (Suchin et al. 2001). Le nombre de Treg capables d'être activés *in vivo* au sein de la population Treg polyclonale transférée est donc largement supérieur à celui supposé au cours d'une maladie auto-immune spécifique d'organe. Cette hypothèse expliquerait les meilleurs résultats obtenus avec le transfert de Treg polyclonaux au cours d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques qu'au cours de maladies auto-immunes spécifiques d'organes.

Indirectement, cette hypothèse est renforcée par l'observation suivante: le transfert de Treg allospécifiques prévient aussi bien la GVH que le transfert de Treg polyclonaux, mais

seul un faible nombre de Treg spécifiques est suffisant pour obtenir ce résultat. La confirmation de l'utilité des Treg spécifiques sera formellement apportée grâce aux modèles transgéniques.

B. Les Treg spécifiques

1. L'efficacité des Treg spécifiques

L'efficacité des Treg spécifiques d'antigène, par rapport aux Treg polyclonaux a été démontrée dans plusieurs modèles et en particulier lorsque les Treg polyclonaux étaient inefficaces. Dans un modèle de diabète induit, il a suffi d'injecter 10^5 Treg spécifiques d'îlots pour prévenir le diabète, alors qu'une quantité 10 fois plus importante de Treg polyclonaux ne conférait aucune protection (Jaekel et al., 2005). Le même type de résultat est retrouvé dans une étude de Jeffrey Bluestone (Tang et al., 2004). La protection contre le diabète induite par les Treg spécifiques d'antigènes d'îlots serait d'autant plus efficace que ceux-ci expriment fortement le TCR clonotypique (Kanagawa et al., 2002). Les Treg spécifiques ont aussi montré leur efficacité dans un modèle transgénique d'uvéïte (Terrada et al., 2006) ou dans des modèles d'étude de l'inflammation (Billiard et al., 2006).

De même, les Treg endogènes n'empêchent pas le rejet d'une tumeur exprimant l'antigène viral HA (hémagglutinine), alors que l'injection d'une petite quantité de Treg spécifiques de HA (10^4) permet à la tumeur de croître sans être rejetée (Chen et al., 2005).

Selon le modèle, on trouve même un effet régulateur des Treg spécifiques lorsque ceux-ci sont injectés en quantités très faibles : 2.10^3 dans les études de (Green et al., 2002) et 5.10^3 dans celle de Ralph Steinman pour la prévention du diabète (Tarbell et al., 2004). Davoust et al. démontrent l'efficacité de 5.10^4 LTreg pour permettre la tolérance à une greffe de moelle osseuse non-compatible (Gross et al., 2006).

Nous avons cherché à tester l'efficacité de Treg spécifiques des antigènes utilisés lors du protocole d'immunisation mais nous nous sommes heurtés à des difficultés de préparation de ces Treg.

2. La production de Treg spécifiques

On ne crée pas des Treg spécifiques *in vitro* mais on fait croître préférentiellement les Treg spécifiques d'antigènes choisis, au sein d'une population Treg polyclonale. Cela suppose que naturellement les Treg *in vivo* expriment des TCR de spécificité auto-antigénique ou allogénique selon que l'on souhaite développer un protocole de thérapie cellulaire au cours de maladies auto-immune ou pour la prévention de la GVH.

Comme nous l'avons vu, l'homme, comme la souris, présente effectivement des cellules allo-réactives (1 à 10%) (Suchin et al., 2001) ou auto-réactives circulantes (0,05% à 0,0005) (Novak et al., 2001). Ces cellules sont en partie des Treg.

Pour autant, il faut connaître l'antigène impliqué dans la réponse auto-immune afin de sélectionner les Treg spécifiques les plus efficaces.

Si les modèles transgéniques de maladie auto-immune permettent, par définition, cette identification, celle-ci est plus délicate au cours de modèles murins spontanés. La problématique est encore plus complexe chez l'homme pour qui s'ajoute encore la variabilité du CMH (à la différence des lignées murines) et donc de la présentation antigénique.

Dans notre modèle, alors même que nous connaissions les antigènes impliqués, nous ne sommes pas parvenus à mettre au point le protocole de culture des Treg spécifiques. En effet, l'immunisation réalisée au cours de la MAE est effectuée à partir d'un lysat musculaire purifié qui comporte les protéines musculaires. Ainsi, si notre préparation musculaire est principalement constituée de myosine, elle est aussi composée d'autres protéines comme la protéine C. D'autre part, bien que nous ayons digéré enzymatiquement cette préparation afin de réduire au mieux la taille des peptides musculaires mis en culture, il n'a pas été possible de sélectionner des Treg spécifiques de façon certaine. En effet, la myosine est une protéine de haut poids moléculaire qui doit être fragmentée afin de faciliter sa présentation par le CMH à la surface des CPA en culture.

Une équipe du laboratoire a montré qu'il était possible chez la souris de sélectionner au sein d'une population polyclonale Treg, les Treg spécifiques de HA (Fisson et al., 2006). Cette méthode met en jeu des DC $CD11c^+CD8^+CD11b^-$, de type lymphoïde (Vremec and Shortman, 1997), chargées avec des peptides de HA. Les Treg anti-HA obtenus après 3 ou 4

semaines de culture sont fonctionnels *in vitro* et *in vivo*. Cette méthode permet la sélection de Treg spécifiques d'une séquence peptique précise mais elle n'a permis, dans notre cas, la sélection de Treg spécifiques. L'utilisation du modèle CIM, impliquant un fragment de la protéine C, pourrait donc être plus intéressante pour la génération de Treg spécifiques.

Chez l'homme, au cours des myopathies inflammatoires, les antigènes impliqués ne sont pas connus. Si comme nous l'avons vu, les myosites de chevauchement sont associées à des auto-anticorps, rien ne permet d'affirmer que la cible de ces auto-anticorps soit impliquée dans la physiopathologie de la maladie. En effet le plus souvent, les cibles de ces anticorps spécifiques des myosites sont des protéines ubiquitaires alors qu'il s'agit de maladies auto-immunes spécifiques du tissu musculaire.

En attendant l'éventuelle identification du ou des antigènes impliqués dans les myosites, la mise au point de Treg spécifiques musculaires chez l'homme au cours des myopathies inflammatoires est difficile. On pourrait envisager des cultures de Treg (obtenus par lymphaphérèse) en présence de peptides musculaires obtenus à partir de lysats musculaires issus de biopsies musculaires autologues. Les Treg seraient mis en culture en présence de CPA du patient dérivées de monocytes circulants présentant ses propres antigènes musculaires. Si ce type d'approche est théoriquement réalisable, nous pouvons émettre certaines réserves quant au résultat, étant donné les difficultés que nous avons rencontrées chez la souris.

En pratique chez l'homme, la production de Treg spécifique en condition GMP n'a pas été encore développée. Seuls ont été mis au point des protocoles de production de Treg polyclonaux (Guillot-Delost et al., 2008; Pahwa et al., 2010).

Le premier essai de thérapie cellulaire avec des Treg polycloneaux cultivés *ex vivo* en présence de bille CD3/CD28 (NCT00602693) vient d'être réalisé et permet effectivement de réduire l'incidence de la GVH (Brunstein et al., 2011).

III. Les problèmes *in vivo* après le transfert

A. L'adressage

Nous l'avons vu dans l'introduction que pour être efficace un Treg doit se trouver là où l'activation des Tconv auto-réactifs a lieu. À ce titre, les intégrines et récepteurs aux chimiokines ont un rôle déterminant, car ils permettent l'adressage tissulaire et jouent le rôle d'un véritable code postal. Nous avons vu l'importance du CD62L qui permet l'adressage ganglionnaire des Treg. Cette propriété migratoire peut être déterminante pour prévenir *in vivo* l'activation des Tconv autoréactifs musculaires dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, l'adressage ganglionnaire des Treg peut se révéler moins utile pour contrôler l'agression dans le tissu musculaire des T CD8⁺ cytotoxiques. À ce titre, nos travaux soulignent l'importance de certaines chemokines Th1 dans la physiopathologie de la MI. Ils suggèrent que la sélection de Treg exprimant les récepteurs aux dites chimiokines (CCR3 et CCR5) permettrait préférentiellement l'adressage musculaire des Treg.

Aussi, en plus de leur spécificité, il faut aussi considérer les capacités migratoires des cellules Treg transférées dans un protocole de thérapie cellulaire. Dans le cas des myopathies, nous ne savons pas à ce jour quel sous type de Treg « ganglionnaire » ou « musculaire » il serait préférable d'utiliser. Cependant, cette question est encore prématurée dans la mesure où la technologie actuelle ne permet pas encore la production de Treg de profil migratoire spécifique. Notre modèle MAE nous offre la possibilité d'étudier ces questions.

B. La plasticité des Treg

Comme nous l'avons souligné au début de ce travail, les Treg sont caractérisés par une grande plasticité. Même si la purification des Treg est satisfaisante, les Treg en culture peuvent donner, sous certaines conditions, naissance à des Tconv producteurs de cytokines pro-inflammatoires (Hoffmann et al., 2006b). Afin d'éviter au mieux ce phénomène, l'ajout de rapamycine au milieu de culture permet d'augmenter la pureté de la culture en Treg.

Nous aborderons plus en détail l'utilité de la rapamycine dans les parties suivantes.

En admettant que la population obtenue au terme de la culture soit enrichie à 100% en Treg, la plasticité des Treg expose là encore à des complications *in vivo* après le transfert. En

effet, nous avons vu que de fortes conditions inflammatoires, comme celles qui peuvent être rencontrées au cours de poussée de maladies auto-immunes (comme une rechute de myosite de chevauchement), peuvent conduire à la conversion de Treg, même naturels, en T Th1, Th2 ou Th17 pathogènes.

C. La survie des Treg transférés

Ralph Steinman (Tarbell et al., 2004) montre qu'il peut prévenir le diabète chez ses souris NOD en injectant des Treg spécifiques d'îlots pancréatiques (BDC2.5), à 4 semaines d'âge. Quand il fait l'analyse 80 jours après l'injection, les souris ne sont toujours pas diabétiques, mais l'insulite observée dans les îlots est aussi importante que celle développée chez des souris injectées avec des splénocytes de souris diabétiques, analysées à 28 jours. Une insulite ne conduit pas toujours à un diabète, mais on peut se demander si les souris finiront par tomber malades.

Un tel défaut de régulation à long terme pourrait alors être le résultat d'une mort prématurée des Treg spécifiques, après avoir été injectés à la souris.

En effet, dans certaines des expériences menées au laboratoire, chez la souris BALB/c, il a pu être observé une disparition précoce après transfert adoptif de Treg cultivés, en comparaison avec des Treg fraîchement purifiés.

Nous n'avons pas analysé la durée de vie des Treg polyclonaux transférés chez les animaux MAE mais *in vitro*, la culture des Treg ne peut pas être maintenue au delà de 4 à 5 semaines. Au delà, la croissance cellulaire s'arrête et le nombre de cellules commence à décliner.

In vivo, des travaux menés au laboratoire ont permis de montrer que les Treg pouvaient être retrouvés chez la souris receveuse plusieurs mois après leur transfert (Fisson et al., 2003). D'autres travaux du laboratoire ont montré que dans un modèle transgénique murin, le transfert de Treg permettait de prévenir la survenue du diabète plus de 40 jours après l'injection des Tconv diabétoènes (Billiard et al., 2006). Toutefois, la prévention à long terme du diabète (plus de 40 jours après l'injection des LTconv diabétoènes) montre que soit les Treg injectés au départ survivent et continuent à exercer leur suppression protectrice soit ils meurent, mais un transfert de tolérance a opéré pour perpétuer cette protection.

Quoiqu' 'il en soit, d'autres équipes ont observé une mort prématurée des Treg issus de culture (Cohen et al., 2002) montrant ainsi que la survie des Treg transférés peut être limitée. Il est possible que cette mort prématurée soit la conséquence de la privation soudaine des Treg en IL-2. En effet, après avoir été cultivés pendant plusieurs semaines en présence de grandes quantités de cette cytokine, les Treg en sont privés dès qu'ils ont été injectés dans un organisme.

D. Les Treg une arme à double tranchant

Les Treg interviennent dans le contrôle des réponses anti-infectieuses ou anti-tumorales. Aussi est-il légitime de s'interroger sur les conséquences du transfert en Treg.

En ce qui concerne les réponses anti-infectieuses, il semble que la déplétion en Treg soit plus préjudiciable que l'ajout de Treg. En effet, nous rappelons que la déplétion en Treg au cours d'une infection murine à Herpes simplex virus (HSV) provoque le décès de l'animal (Lund et al., 2008) alors que la thérapie cellulaire Treg chez la souris n'altère pas ses réponses immunitaires mémoires au virus Influenzae (Bushell et al, 2005).

Concernant le risque de cancer secondaire au transfert de Treg, il reste théorique et difficile à évaluer. On peut cependant souligner qu'à l'inverse de la DM, le risque de cancer n'est pas significativement plus élevé au cours de la MI puisqu'il est comparable à celui de la population générale appariée sur l'âge (Benveniste et al., 2011).

IV. La thérapie cellulaire par Treg au cours de la Myosite à inclusions

A. La production de Treg à ce jour

Si les obstacles à la mise au point de la thérapie cellulaire Treg idéale restent nombreux, nombreuses des difficultés décrites ont pu être contournées à ce jour. Si la production de Treg spécifiques n'est pas encore réalisable, le transfert de Treg polyclonaux autologues peut être envisagé dès aujourd'hui.

En effet, le laboratoire a mis au point une méthode de sélection et d'expansion de Treg polyclonaux à partir du produit de lymphaphérèse (Guillot-Delost et al., 2008). La méthode expérimentale respecte les conditions requises pour la dispensation de tout produit pharmacologique dans le cadre d'essais thérapeutiques (norme GMP). Le taux de croissance permet d'envisager le transfert de 1 à 3.10^6 Treg.Kg⁻¹. Le laboratoire a spécifiquement développé une technique permettant de transfecter les cellules en culture avec un gène rapporteur (Thy1.1 ou CD90) et un gène de sécurité (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase : HS-VTK). L'expression membranaire de la protéine Thy1.1 (CD90) à la surface des Treg transférés permettra la sélection des cellules transduites dans le milieu de culture. D'autre part, l'expression du CD90 permettra le suivi *in vivo* du produit cellulaire administré et ainsi d'analyser la distribution et l'adressage de ces cellules et de mesurer le temps de survie de ces cellule *in-vivo*.

L'expression du gène « de sécurité » HS-VTK permet la synthèse de la Thymidine kinase du virus HSV et la destruction des cellules transduites au moyen du ganciclovir. En effet, HSV-TK a pour substrat le ganciclovir qui est un analogue de la guanine. Le ganciclovir est phosphorylé une première fois par HS-VTK, permettant des phosphorylations successives grâce aux thymidine kinases endogènes (incapables de phosphoryler une première fois le ganciclovir). L'analogue de la guanine triphosphorylée entre alors en compétition avec la déoxyguanosine pour la synthèse de l'ADN et bloque ainsi son élongation.

Il est donc possible de détruire, grâce à l'injection de ganciclovir chez un hypothétique receveur, les cellules transduites en division en cas d'effet indésirable sévère, en particulier en cas de conversion *in vivo* des Treg en Tconv autoréactifs.

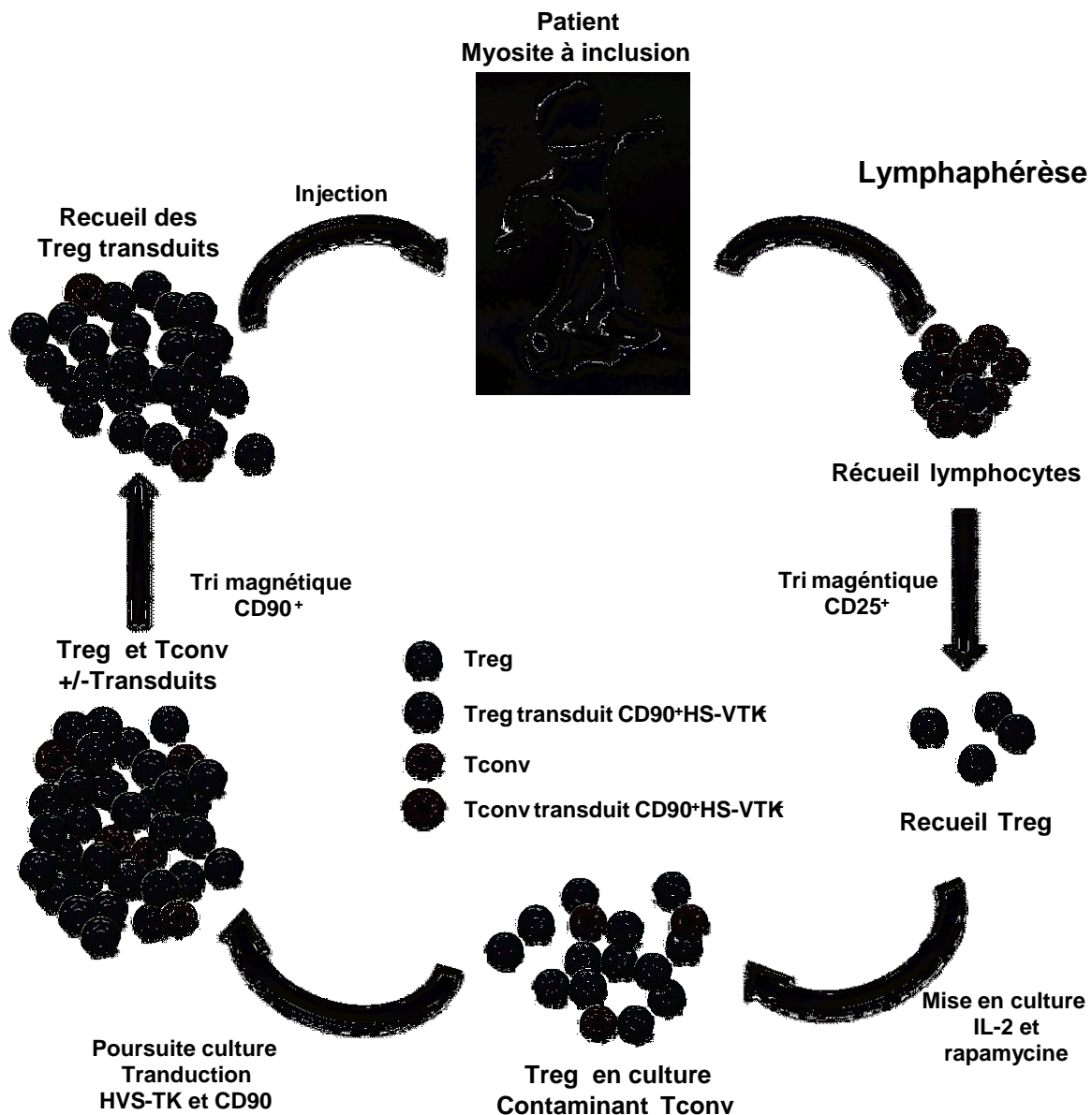
B. La production de Treg chez les patients souffrant de MI

Comme nous l'avons vu, la myosite à inclusions est la seule myosite pour laquelle aucun traitement n'est validé à ce jour (Benveniste et al. 2009). Même si elle présente des mécanismes dégénératifs, il existe une part auto-immune qui semble participer à la progression de la maladie.

L'équipe du Pr Lemoine, sous la direction du Pr Klatzmann et en collaboration avec le Pr O. Benveniste du service de Médecine Interne du Pr Herson à la Pitié Salpêtrière, a réalisé des travaux préliminaires chez les patients souffrant de MI. Pour 4 patients souffrant de MI, le recueil de Treg a été réalisé à partir du produit d'une lymphaphérèse. Les Treg cultivés ont

été transduits par le CD90 et HSV-TK avant d'être sélectionnés. Cette étude de faisabilité, préalable indispensable avant la réalisation de tout essai thérapeutique, a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. À ce jour, 3 nouveaux patients sont à nouveaux testés pour confirmer ces résultats avant de débiter un essai clinique. Dans le protocole en préparation, il est prévu qu'un groupe de patients ayant reçu le produit de thérapie cellulaire soit traité conjointement avec de l'IL-2. L'objectif de ce traitement combiné est de déterminer si l'ajout d'IL-2 exogène permettrait de favoriser la survie des Treg transférés.

Figure 6 : Thérapie cellulaire Treg au cours de la Myosite à inclusion



Shéma représentant la sélection des Treg chez un patient souffrant de Myosite à inclusions à partir du produit d'une lymphaphérèse au moyen d'un tri magnétique des cellules CD25⁺. Les Treg CD25⁺ ainsi récoltés sont mis en culture en présence d'IL-2 et de rapamycine afin de limiter l'expansion du contaminant Tconv CD25⁺. Au cours de la culture, les lymphocytes sont transduits avec un vecteur lentiviral déficient transférant les gènes HSV-TK et CD90 (Thy1). L'expression membranaire du CD90 permet la reconnaissance et la sélection des cellules transduites avant injection. HSV-TK permet la destruction *in vivo* des cellules transférées en cas d'effet secondaire.

3^E PARTIE : La RAPAMYCINE au cours de la MI

I. L'effet immunosuppresseur

La rapamycine a initialement été découverte comme un antibiotique issu du champignon *Streptomyces hygroscopicus* provenant d'une soie originaire de l'île de Pacques (connu localement sous le nom de Rapa nui) (Dennis et al., 1999). Ses propriétés antibiotiques sont en fait faibles, mais il est apparu qu'elle avait des propriétés immunosuppressives.

En effet, la rapamycine inhibe la prolifération lymphocytaire en bloquant la voie mTOR (mammalian target of rapamycine). Elle agit en interférant sur le signal post récepteur de l'IL-2, conduisant ainsi à un arrêt du cycle des lymphocytes T au niveau de la transition de la phase d'activation (G1) à la phase de synthèse de l'ADN (S), inhibant ainsi la prolifération lymphocytaire (Delgoffe et al. 2007). Nous allons voir pourquoi la rapamycine pourrait être un traitement utile au cours des myopathies inflammatoires, et particulièrement au cours de la MI.

A. L'effet anti lymphoprolifératif de la rapamycine

L'une des caractéristiques du système immunitaire est son très fort besoin en énergie, qui serait comparable à celui des cellules cancéreuses (Fox et al., 2005). De fait, l'activation cellulaire T, via le TCR, s'accompagne d'une augmentation très importante du métabolisme cellulaire (Jones et Thompson, 2007). Ces importants besoins énergétiques et les modifications métaboliques cellulaires qu'ils impliquent sont sous la dépendance de la voie mTOR (Frauwirth et al., 2002; Frauwirth et Thompson, 2004).

Au cours de la MI, nous avons effectivement vu l'importance de l'activation du système immunitaire impliquant une orientation Th1 (article 2), ce qui suggère une activation de la voie mTOR. Ceci est d'autant plus probable que l'IL-12 et l'IFN- γ sont d'importants activateurs de la voie mTOR (Lekmine et al., 2004) et que ces 2 cytokines sont significativement augmentées au cours de la MI (article 2).

Ainsi, la rapamycine, en inhibant la voie mTOR, pourrait permettre d'inhiber l'activation des Tconv et leur prolifération au cours de la MI.

Il faut cependant souligner un élément important qui pourrait limiter cet effet. Il a été montré que l'activation de la voie mTOR impliquait la voie de signalisation d'aval de la molécule de co-stimulation CD28 (Colombetti et al., 2006) et il faut rappeler qu'une des caractéristiques que nous avons observées au cours de la MI était une perte importante de l'expression de CD28 à la surface des T CD8⁺, témoignant de leur phénotype mémoire à différenciation terminale. Cette restriction possible de l'effet de la rapamycine au cours de la MI doit être interprétée avec prudence car nombreux sont les modes d'action de la rapamycine. Notamment, l'activation de la voie mTOR après activation implique aussi la voie de signalisation d'aval du récepteur de l'IL-2 (Colombetti et al., 2006). De plus, il faut souligner que la voie mTOR est impliquée dans le statut cellulaire naïf/effecteur/mémoire.

B. L'effet de la rapamycine sur l'état naïf/mémoire des T

D'un point de vue métabolique, les Tconv sont de forts consommateurs en énergie alors que les cellules mémoires sont à l'état de repos avec un faible niveau de besoin énergétique. Il n'est donc pas surprenant d'observer que le traitement par rapamycine chez le petit animal s'accompagne d'une augmentation importante du compartiment T mémoires et ce en particulier, dans le compartiment T CD8⁺ (Araki et al., 2009; Pearce et al., 2009; Rao et al., 2010). Le statut effecteur ou mémoire d'un Tconv est sous la dépendance de l'IL-12 qui est fortement augmentée au cours de la MI. L'IL-12 induit l'augmentation du facteur de transcription Th1, t-bet, et inhibe le facteur de transcription eomesodermine, indispensable à la conversion effecteur/mémoire (Takemoto et al., 2006). La rapamycine, en inhibant mTOR, favorise la transcription de l'eomesodermine et inhibe celle de t-bet.

La population « mémoire » à différenciation terminale CD28⁻ que nous avons mise en évidence est une population particulière car elle correspond à une population mémoire réactivée. Il est donc possible que la rapamycine, en inhibant le métabolisme de ces cellules, modifie aussi leur statut mémoire à différenciation terminale.

C. L'effet de la rapamycine sur le trafic cellulaire

1. La rapamycine KLF2, CCR7 et CD62L

Dans notre modèle murin de MAE, nous avons observé que le traitement par rapamycine s'accompagnait d'une augmentation du niveau des marqueurs d'expression de molécules

d'adressage ganglionnaire comme le CCR7, et que cette augmentation était associée au facteur de transcription KLF2.

En effet, ce facteur régule de façon positive l'expression membranaire de CD62L et CCR7 (Fabre et al., 2008). KLF2, en particulier, augmente cette expression par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription: Foxo1 (Kerdiles et al., 2009).

Ainsi, l'activation de mTOR permet la séquestration intra-cytoplasmique de FoxO1 conduisant à la diminution de l'expression de KLF2 et donc la transcription de CD62L et de CCR7. La rapamycine, en inhibant mTOR, active KLF2 et induit donc l'expression de CD62L et CCR7. Cette observation est en accord avec les résultats que nous avons obtenus chez la souris MAE traitée par rapamycine, suggérant que ce traitement bloque les Tconv dans le ganglion, empêchant ainsi leur migration dans le muscle.

Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Sebzda et al. (Sebzda et al., 2008). Dans ses travaux, cette équipe montre que l'inactivation de KLF2 dans les lymphocytes (KLF2^{-/-}) conduit non seulement à une diminution de l'expression de CD62L et de CCR7 (et donc à une diminution du taux lymphocytes T naïfs circulants) mais à une expression inappropriée de récepteurs aux chimiokines de type CCR3 et CCR5, les conduisant à migrer préférentiellement dans les tissus périphériques non lymphoïdes. A cet égard, il est important de signaler que le tissu musculaire est la cible privilégiée de ces T KLF2^{-/-}. Cette dernière observation souligne l'importance de cette voie de régulation dans la migration lymphocytaire musculaire et donc l'intérêt potentiel de la rapamycine pour le contrôle des myopathies inflammatoires.

2. La rapamycine et S1P1

Sphingosine 1-phosphate (S1P) représente, avec son récepteur S1P1, un mécanisme crucial de la régulation du trafic lymphocytaire dépendant de KLF2 (Carlson et al., 2006). De fait, un inhibiteur pharmacologique est en cours de développement pour la prise en charge de patients transplantés ou souffrant de sclérose en plaques (Brinkmann et al., 2002). La liaison de S1P à son ligand S1P1 à la surface des lymphocytes permet leur sortie du thymus ou des organes lymphoïdes secondaires (Matloubian et al., 2004 ; Chi and Flavell, 2005) et ce en activant la voie Pi3K-Akt-mTOR (Ishii et al., 2004). Ainsi, bloquer la voie mTOR peut participer à la rétention des Tconv auto-réactifs pathogènes dans le compartiment ganglionnaire. Dans notre modèle, nous sommes en train d'explorer l'expression de S1P1 par

RT-Q-PCR dans les différentes sous-populations T ganglionnaires de la MAE, afin d'évaluer l'effet de la rapamycine sur cette voie au cours de la MAE. Il faut noter que S1P1 étant dépendant de mTOR, il joue aussi un rôle déterminant dans l'homéostasie des Treg.

D. L'effet de la rapamycine sur les Treg

Comme cela vient d'être expliqué, S1P1 joue un rôle déterminant à la fois dans le trafic ganglionnaire et dans l'homéostasie des Treg. S1P1 régule négativement la production thymique en Treg et les fonctions régulatrices des Treg (Liu et al., 2009). En particulier *in vivo*, la surexpression de S1P1 par les Treg s'accompagne de manifestations auto-immunes. Cet effet implique la voie de signalisation de akt-mTOR. Ainsi, l'inhibition de mTOR par la rapamycine peut participer positivement à la fonction des Treg et à leur production thymique.

De plus, l'inhibition de mTOR peut participer à la génération de iTreg *in vivo* selon le principe de la tolérance infectieuse décrite en introduction (Cobbold et al., 2009). D'autre part, l'expression de FoxP3 est sous la dépendance de FoxO qui est lui-même sous la dépendance de la voie Pi3K-Akt-mTOR. Ainsi, l'inhibition de mTOR par la rapamycine participerait à l'induction de l'expression de FoxP3 (Harada et al., 2010). Enfin, il faut rappeler aussi le rôle dynamique de la rapamycine pour la levée *in vitro* de l'anergie des Treg. On note aussi que la plupart des protocoles de recherche pour la culture de Treg humains (dans l'optique de la thérapie cellulaire) utilisent la rapamycine pour faciliter l'expansion des Treg et détruire les contaminants Tconventionnels (Guillot-Delost et al., 2008).

L'effet bénéfique sur les Treg de la rapamycine peut se mesurer *in vivo* chez l'homme. Les patients transplantés rénaux, traités par rapamycine au long cours, ont un pourcentage de Treg qui augmente de 5 à 20% à 1 an de traitement (Hendrikx et al., 2009).

L'effet anti-lymphoprolifératif de la rapamycine sur les Tconv, combiné à l'effet trophique sur les Treg, peut expliquer l'effet bénéfique du traitement que nous avons observé au cours de la MAE. Ainsi, la rapamycine faciliterait le rétablissement de la balance Tconv auto-réactif/Treg. Cet effet serait favorisé par l'effet « anti-migratoire » de la rapamycine, qui

en séquestrant Tconv et Treg dans le ganglion, favoriserait l'effet inhibiteur des Treg sur les Tconv.

Ainsi, la rapamycine serait une drogue immunosuppressive de choix pour la prise en charge de maladies auto-immunes, et en particulier au cours des myosites comme le suggèrent nos données au cours de la MAE.

II. L'effet de la rapamycine sur la dégénérescence

Dans le cas précis de la MI, la rapamycine est aussi un traitement possible dans la mesure où elle partage des mécanismes dysimmunitaire avec la PM/MC (cf ci avant). La rapamycine est d'autant plus intéressante qu'elle exerce aussi des propriétés qui dépassent le champ de l'immunologie. En particulier, les propriétés anti-autophagiques sont particulièrement intéressantes pour lutter contre les mécanismes dégénératifs. En effet, même si les mécanismes dégénératifs n'ont pas été abordés directement au cours de ce travail immunologique, l'effet de la rapamycine sur ce mécanisme doit être abordé en terme de perspective.

La protéine mTOR est une protéine ubiquitaire. La voie mTOR est une voie de signalisation majeure qui, intègre la disponibilité de nutriments et de facteurs de croissance avec le métabolisme cellulaire (Sarbasov et al., 2005) grâce à deux complexes mTORC1 et mTORC2 (Guertin et al., 2006) afin de répondre au mieux aux besoins énergétiques cellulaires. À ce titre, mTOR est impliquée dans l'autophagie. L'autophagie est un mécanisme clef du renouvellement protéique dans le cadre de l'homéostasie cellulaire. La voie mTOR joue notamment un rôle déterminant dans la protection contre les Tauopathies (Menziés et al., 2006). L'autophagie est un mécanisme majeur de la dégradation des organelles (lysosome par exemple) et des agrégats protéiques (Rubinsztein, 2007) comme ceux mis en cause dans la survenue de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la MI. Or l'autophagie est déficiente au cours de la MII (Nogalska et al., 2010b) et l'inhibition mTOR par la rapamycine active l'autophagie (Diaz-Troya et al., 2008).

L'effet bénéfique potentiel de la rapamycine au cours de la MI est suggéré *in vivo* par des études pratiquées chez des patients souffrant de maladies dégénératives. Les souris

exprimant la protéine amyloïde d'origine humaine, sous la dépendance d'un promoteur neurologique (souris PDAPP) représentent un bon modèle de maladie d'Alzheimer (Mucke et al., 2000). Une étude récente a montré que l'inhibition prolongée de mTOR par la rapamycine prévenait l'apparition de la maladie, le déclin cognitif et le niveau de production d' A β ₄₂ (Spilman et al., 2010).

Enfin dans cette partie, il faut rappeler l'étroite relation existant entre les mécanismes inflammatoires et dégénératifs de la MI.

On peut donc envisager qu'en plus du bénéfice direct de l'effet immunosupresseur de la rapamycine, la baisse de l'inflammation puisse ralentir la progression des mécanismes dégénératifs.

III. La mise au point d'un essai thérapeutique

Avant tout essai thérapeutique utilisant la rapamycine comme traitement de la MI, il était nécessaire de bien définir la population étudiée.

A. La difficulté de l'inclusion: l'intérêt d'un test diagnostique précoce

En pratique, la distinction entre MI et PM/MC est souvent difficile. À ce titre, la mise en évidence de la signature Th1 (article 2) est intéressante car elle pourrait permettre, avec le dosage simple de 7 cytokines et chimiokines sériques, de distinguer les patients des sujets contrôles, appariés sur l'âge. Ce résultat permet d'envisager une aide au diagnostic précoce de la MI afin de mieux différencier la MI de la PM/MC. Cependant, nous n'avons pas encore testé la capacité de cette signature à distinguer les 2 groupes. On peut d'ailleurs envisager que la signature ne permette pas de différencier correctement PM/MC et MI dans la mesure où, à ce jour, les données dont nous disposons sur la réponse immunitaire sont très proches dans ces deux maladies. Ce travail sera réalisé très prochainement et d'autres molécules sériques seront utilisées, afin de mettre au point une signature plus spécifique. Outre l'intérêt diagnostique d'un tel test, ce type d'approche pourrait permettre un diagnostic plus précoce de la maladie. Or, dans le cadre d'une maladie pour laquelle des mécanismes dégénératifs sont suspectés, démarrer un traitement plus tôt pourrait être un avantage.

B. La difficulté de l'évaluation clinique

Comme cela a été abordé dans l'article 3, la MI souffre d'un manque de moyens objectifs de suivi. À ce jour, il n'existe pas de marqueur fiable et objectif pour suivre cette maladie du fait de la variabilité de la topographie du déficit moteur, variabilité qui rend peu sensibles les outils d'évaluation globaux de la force musculaire. Ce manque de sensibilité est renforcé par la nature même des tests qui font appel soit à la volonté du patient (contraction musculaire) soit à la subjectivité du patient (échelles fonctionnelles). Les travaux que nous avons menés afin de définir un marqueur de suivi pourront peut-être permettre de résoudre cette question. En effet, la force musculaire des quadriceps semble intéressante à plusieurs égards. L'atteinte quadricipitale est l'atteinte la plus fréquente au début de la maladie : 90% des patients présentent un déficit quadricipital dès le début de la maladie et l'intensité du déficit est corrélée à l'ancienneté de la maladie (article 3). D'autre part, il s'agit d'une mesure objective de la force musculaire, ce qui en fait une mesure plus robuste que celle obtenue à partir de tests fonctionnels.

Enfin, la décroissance de ce déficit est la plus importante au cours du temps avec une diminution proche de 13% en 1 an (article 3). L'importance de cette décroissance permet de fait de réduire l'importance des effectifs à inclure dans le cadre d'un essai clinique. Enfin, ce déficit paraît être un bon reflet de la maladie car il est significativement corrélé avec les autres outils de mesure, y compris les échelles fonctionnelles.

Il faut souligner que seule la mesure de la force volontaire maximale isométrique mesurée au moyen d'appareils de mesure performants et précis permet de détecter cette décroissance, soulignant ainsi la nécessité d'avoir recours à des centres spécialisés pour ce type d'étude. Nous allons maintenant tester une procédure simplifiée de cette évaluation quadricipitale que l'on pourrait utiliser en consultation et dans tous les centres.

C. La rapamycine au cours de la MI : un essai clinique aujourd'hui

L'ensemble de ce travail permet d'élaborer un essai clinique pour les patients souffrant de MI. Nous envisageons de débiter un essai incluant une vingtaine de patient dans lequel les patients seraient traités par rapamycine pendant 1 an. La force musculaire du quadriceps serait donc le critère de suivi. Les patients seraient leur propre contrôle avec une évaluation avant traitement, en fin de traitement à M12 (fin du traitement) et à M24 (12 mois après l'arrêt du traitement). Ce projet a été déposé à l'appel d'offres INSERM de médecine translationnelle en mai 2011.

BIBLIOGRAPHIE :

Aandahl, E.M., Michaelsson, J., Moretto, W.J., Hecht, F.M., and Nixon, D.F. (2004). Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 78, 2454-2459.

Adams, E.M., Kirkley, J., Eidelman, G., Dohlman, J., and Plotz, P.H. (1997). The predominance of beta (CC) chemokine transcripts in idiopathic inflammatory muscle diseases. *Proc Assoc Am Physicians* 109, 275-285.

Aerts, N.E., Dombrecht, E.J., Ebo, D.G., Bridts, C.H., Stevens, W.J., and De Clerck, L.S. (2008). Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 251, 109-115.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2, 725-731.

Alger, H.M., Raben, N., Nagarahu.,K. The role of Tumor necrosis factor α related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in mediating autophagy in msyositsi skeletal muscle: apotent non-immune mechanism of muscle damage. *Athritis Rheum.* 2011

Allenbach Y., B.O. (2011). Myopathy in HIV patient. *Congres de médecine Interne* 2011.

Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266-271.

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.

Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O'Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 205, 1975-1981.

Ansari, M.J., Salama, A.D., Chitnis, T., Smith, R.N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T., Azuma, M., Iwai, H., Houry, S.J., *et al.* (2003). The programmed deaTh1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 198, 63-69.

Antiga, E., Kretz, C.C., Klembt, R., Massi, D., Ruland, V., Stumpf, C., Baroni, G., Hartmann, M., Hartschuh, W., Volpi, W., *et al.* (2010). Characterization of regulatory T cells in patients with dermatomyositis. *J Autoimmun* 35, 342-350.

Appleman, L.J., and Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192, 161-180.

Arahata, K., and Engel, A.G. (1986). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. III: Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann Neurol* 19, 112-125.

Araki, K., Turner, A.P., Shaffer, V.O., Gangappa, S., Keller, S.A., Bachmann, M.F., Larsen, C.P., and Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460, 108-112.

Arlet, J.B., Dimitri, D., Pagnoux, C., Boyer, O., Maisonobe, T., Authier, F.J., Bloch-Queyrat, C., Goulvestre, C., Heshmati, F., Atassi, M., *et al.* (2006). Marked efficacy of a therapeutic strategy associating prednisone and plasma exchange followed by rituximab in two patients with refractory myopathy associated with antibodies to the signal recognition particle (SRP). *Neuromuscul Disord* 16, 334-336.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057-1069.

Aschenbrenner, K., D'Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8, 351-358.

Ascherman, D.P., Oriss, T.B., Oddis, C.V., and Wright, T.M. (2002). Critical requirement for professional APCs in eliciting T cell responses to novel fragments of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in Jo-1 antibody-positive polymyositis. *J Immunol* 169, 7127-7134.

Ashley, C.W., and Baecher-Allan, C. (2009). Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *J Immunol* 183, 4843-4847.

Askanas, V., and Engel, W.K. (2005). Molecular pathology and pathogenesis of inclusion-body myositis. *Microsc Res Tech* 67, 114-120.

Askanas, V., and Engel, W.K. (2006). Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 66, S39-48.

Askanas, V., and Engel, W.K. (2008). Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 116, 583-595.

Askanas, V., and Engel, W.K. (2011). Sporadic inclusion-body myositis: conformational multifactorial ageing-related degenerative muscle disease associated with proteasomal and lysosomal inhibition, endoplasmic reticulum stress, and accumulation of amyloid-beta42 oligomers and phosphorylated tau. *Presse Med* 40, e219-235.

Askanas, V., Engel, W.K., and Nogalska, A. (2009). Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome

inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathol* 19, 493-506.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004.

Badrising, U.A., Maat-Schieman, M., van Duinen, S.G., Breedveld, F., van Doorn, P., van Engelen, B., van den Hoogen, F., Hoogendijk, J., Howeler, C., de Jager, A., *et al.* (2000). Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study. *Neurology* 55, 1385-1387.

Badrising, U.A., Maat-Schieman, M.L., Ferrari, M.D., Zwinderman, A.H., Wessels, J.A., Breedveld, F.C., van Doorn, P.A., van Engelen, B.G., Hoogendijk, J.E., Howeler, C.J., *et al.* (2002). Comparison of weakness progression in inclusion body myositis during treatment with methotrexate or placebo. *Ann Neurol* 51, 369-372.

Badrising, U.A., Schreuder, G.M., Giphart, M.J., Geleijns, K., Verschuuren, J.J., Wintzen, A.R., Maat-Schieman, M.L., van Doorn, P., van Engelen, B.G., Faber, C.G., *et al.* (2004). Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology* 63, 2396-2398.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.

Baecher-Allan, C., Wolf, E., and Hafler, D.A. (2006). MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 176, 4622-4631.

Bakocevic, N., Worbs, T., Davalos-Miszlitz, A., and Forster, R. (2010). T cell-dendritic cell interaction dynamics during the induction of respiratory tolerance and immunity. *J Immunol* 184, 1317-1327.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Baron, P., Galimberti, D., Meda, L., Scarpini, E., Conti, G., Cogiamanian, F., and Scarlato, G. (2001). Production of IL-6 by human myoblasts stimulated with A β : relevance in the pathogenesis of IBM. *Neurology* 57, 1561-1565.

Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grutzkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T.J., Hoffmann, P., Edinger, M., *et al.* (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37, 2378-2389.

Basta, M., and Dalakas, M.C. (1994). High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest* 94, 1729-1735.

Basu, S., Golovina, T., Mikheeva, T., June, C.H., and Riley, J.L. (2008). Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human Tregulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol* 180, 5794-5798.

Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., and Roncarolo, M.G. (2006). Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 177, 8338-8347.

Bayer, A.L., Lee, J.Y., de la Barrera, A., Surh, C.D., and Malek, T.R. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ Tregulatory cells. *J Immunol* 181, 225-234.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Belkaid, Y., and Tarbell, K. (2009). Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu Rev Immunol* 27, 551-589.

Bender A, Ernst N, Iglesias A, Dornmair K, Wekerle H, Hohlfeld R. T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1995

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.

Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., and Laufer, T.M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)/25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 194, 427-438.

Bensinger, S.J., Walsh, P.T., Zhang, J., Carroll, M., Parsons, R., Rathmell, J.C., Thompson, C.B., Burchill, M.A., Farrar, M.A., and Turka, L.A. (2004). Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5287-5296.

Benveniste, O., Drouot, L., Jouen, F., Charuel, J.L., Bloch-Queyrat, C., Behin, A., Amoura, Z., Marie, I., Guiguet, M., Eymard, B., *et al.* (2011). Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 63, 1961-1971.

Benveniste O, G.M., Freebody J, Hilton Jonce D (2011). Long-term observational study of sporadic body inclusion body myositis in 136 patients. *Brain in press*.

Benveniste, O., Herson, S., Antonelli, D., Salomon, B., Klatzmann, D., and Boyer, O. (2004a). Long-term persistence of T cell repertoire perturbations in polymyositis patients under therapy. *Ann Neurol*, In press.

Benveniste, O., Herson, S., Salomon, B., Dimitri, D., Trebeden-Negre, H., Jean, L., Bon-Durand, V., Antonelli, D., Klatzmann, D., and Boyer, O. (2004b). Long-term persistence of clonally expanded T cells in patients with polymyositis. *Ann Neurol* 56, 867-872.

Benveniste, O., and Hilton, D.J. (2011). Natural history of sporadic Inclusion Body Myositis. *Brain* In press.

Benveniste, O., and Leger, J.M. (2011). Inflammatory or necrotizing myopathies, myositides and other acquired myopathies, new insight in 2011. *Presse Med* 40, e197-198.

Bernasconi, P., Confalonieri, P., Andreetta, F., Baggi, F., Cornelio, F., and Mantegazza, R. (1998). The expression of co-stimulatory and accessory molecules on cultured human muscle cells is not dependent on stimulus by pro-inflammatory cytokines: relevance for the pathogenesis of inflammatory myopathy. *J Neuroimmunol* 85, 52-58.

Bernatsky, S., Joseph, L., Pineau, C.A., Belisle, P., Boivin, J.F., Banerjee, D., and Clarke, A.E. (2009). Estimating the prevalence of polymyositis and dermatomyositis from administrative data: age, sex and regional differences. *Ann Rheum Dis* 68, 1192-1196.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

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

Betteridge, Z., Gunawardena, H., North, J., Slinn, J., and McHugh, N. (2007). Identification of a novel autoantibody directed against small ubiquitin-like modifier activating enzyme in dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 56, 3132-3137.

Bettini, M., and Vignali, D.A. (2009). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21, 612-618.

Bianchi, T., Pincus, L.B., Wurbel, M.A., Rich, B.E., Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., and Boes, M. (2009). Maintenance of peripheral tolerance through controlled tissue homing of antigen-specific T cells in K14-mOVA mice. *J Immunol* 182, 4665-4674.

- Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C., and Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 175, 246-253.
- Billerbeck, E., Blum, H.E., and Thimme, R. (2007). Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁻ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 179, 1039-1048.
- Billiard, F., Litvinova, E., Saadoun, D., Djelti, F., Klatzmann, D., Cohen, J.L., Marodon, G., and Salomon, B.L. (2006). Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol* 177, 2167-2174.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.
- Bohan, A., and Peter, J.B. (1975a). Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 292, 344-347.
- Bohan, A., and Peter, J.B. (1975b). Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 292, 403-407.
- Bohan, A., Peter, J.B., Bowman, R.L., and Pearson, C.M. (1977). Computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine (Baltimore)* 56, 255-286.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7, 1092-1100.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Borrow, P., Tishon, A., and Oldstone, M.B. (1991). Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection. *J Exp Med* 174, 203-212.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., *et al.* (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225-1232.
- Boyman, O., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006). Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther* 6, 1323-1331.
- Brigitte, M., Schilte, C., Plonquet, A., Baba-Amer, Y., Henri, A., Charlier, C., Tajbakhsh, S., Albert, M., Gherardi, R.K., and Chretien, F. (2010). Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* 62, 268-279.

- Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., *et al.* (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277, 21453-21457.
- Brod, S.A., Rudd, C.E., Purvee, M., and Hafler, D.A. (1989). Lymphokine regulation of CD45R expression on human T cell clones. *J Exp Med* 170, 2147-2152.
- Brouwer, R., Hengstman, G.J., Vree Egberts, W., Ehrfeld, H., Bozic, B., Ghirardello, A., Grondal, G., Hietarinta, M., Isenberg, D., Kalden, J.R., *et al.* (2001). Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 60, 116-123.
- Brulhart, L., Waldburger, J.M., and Gabay, C. (2006). Rituximab in the treatment of antisynthetase syndrome. *Ann Rheum Dis* 65, 974-975.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., *et al.* (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.
- Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., Defor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., *et al.* (2011). Infusion of ex vivo expanded Tregulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061-1070.
- Bruzzo, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 15, 10-12.
- Bruzzo, S., Moreschi, I., Guida, L., Usai, C., Zocchi, E., and De Flora, A. (2006). Extracellular NAD⁺ regulates intracellular calcium levels and induces activation of human granulocytes. *Biochem J* 393, 697-704.
- Buckner, J.H., and Ziegler, S.F. (2008). Functional analysis of FOXP3. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 151-169.
- Bunch, T.W., Worthington, J.W., Combs, J.J., Ilstrup, D.M., and Engel, A.G. (1980). Azathioprine with prednisone for polymyositis. A controlled, clinical trial. *Ann Intern Med* 92, 365-369.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.
- Burd, C.J., Kinyamu, H.K., Miller, F.W., and Archer, T.K. (2008). UV radiation regulates Mi-2 through protein translation and stability. *J Biol Chem* 283, 34976-34982.

- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.P., Coyle, A.J., Kroczeck, R.A., and Hutloff, A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* *180*, 774-782.
- Buttgereit, F., Brand, M.D., and Muller, M. (1992). ConA induced changes in energy metabolism of rat thymocytes. *Biosci Rep* *12*, 109-114.
- C. Bloch Queyrat , A.R., O. Dubourg , P. Laforet , N. Costedoat-Chalumeau , P. Grenier , Z. Amoura , B. Eymard , S. Herson , L. Musset , O. Benveniste (2008). Les myopathies à anticorps Les myopathies à anticorps anti-SRP : caractérisation et suivi de 24 patients anti-SRP : caractérisation et suivi de 24 patients. Paper presented at: SNFMI Bordeaux 2008 (Bordeaux).
- Calbo, S., Delagreverie, H., Arnoult, C., Authier, F.J., Tron, F., and Boyer, O. (2008). Functional tolerance of CD8+ T cells induced by muscle-specific antigen expression. *J Immunol* *181*, 408-417.
- Callen, J.P. (2000). Dermatomyositis. *Lancet* *355*, 53-57.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnicka-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* *27*, 635-646.
- Caretto, D., Katzman, S.D., Villarino, A.V., Gallo, E., and Abbas, A.K. (2010). Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* *184*, 30-34.
- Carpenter, J.R., Bunch, T.W., Engel, A.G., and O'Brien, P.C. (1977). Survival in polymyositis: corticosteroids and risk factors. *J Rheumatol* *4*, 207-214.
- Carpenter, S., and Karpati, G. (1981). The major inflammatory myopathies of unknown cause *Pathol Annu*, 205-237.
- Carpenter, S., Karpati, G., Heller, I., and Eisen, A. (1978). Inclusion body myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. *Neurology* *28*, 8-17.
- Casciola-Rosen, L., Nagaraju, K., Plotz, P., Wang, K., Levine, S., Gabrielson, E., Corse, A., and Rosen, A. (2005). Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med* *201*, 591-601.
- Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* *30*, 1538-1543.
- Chahin, N., and Engel, A.G. (2008). Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM. *Neurology* *70*, 418-424.
- Chambers, C.A., Cado, D., Truong, T., and Allison, J.P. (1997). Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9296-9301.

- Chandiramani, M., Joynson, C., Panchal, R., Symonds, R.P., Brown, L.J., Morgan, B., and Decatris, M. (2006). Dermatomyositis as a paraneoplastic syndrome in carcinosarcoma of uterine origin. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 18, 641-648.
- Chang, C.C., Ciubotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., *et al.* (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243.
- Chang, X., Zheng, P., and Liu, Y. (2008). Homeostatic proliferation in the mice with germline FoxP3 mutation and its contribution to fatal autoimmunity. *J Immunol* 181, 2399-2406.
- Chaudhry, V., Cornblath, D.R., Griffin, J.W., O'Brien, R., and Drachman, D.B. (2001). Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology* 56, 94-96.
- Chazaud, B., Sonnet, C., Lafuste, P., Bassez, G., Rimaniol, A.C., Poron, F., Authier, F.J., Dreyfus, P.A., and Gherardi, R.K. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* 163, 1133-1143.
- Chen, M., Daha, M.R., and Kallenberg, C.G. (2010). The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* 34, J276-286.
- Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 419-424.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ Tregulatory cells. *J Immunol* 179, 154-161.
- Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2010). TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun* 11, 119-134.
- Cherin, P., Pelletier, S., Teixeira, A., Laforet, P., Simon, A., Herson, S., and Eymard, B. (2002). Intravenous immunoglobulin for dysphagia of inclusion body myositis. *Neurology* 58, 326.
- Chevrel, G., Page, G., Granet, C., Streichenberger, N., Varennes, A., and Miossec, P. (2003). Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J Neuroimmunol* 137, 125-133.
- Chi, H., and Flavell, R.A. (2005). Cutting edge: regulation of T cell trafficking and primary immune responses by sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J Immunol* 174, 2485-2488.

- Chi, L.J., Wang, H.B., Zhang, Y., and Wang, W.Z. (2007). Abnormality of circulating CD4(+)CD25(+) regulatory T cell in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 192, 206-214.
- Chinoy, H., Salway, F., Fertig, N., Shephard, N., Tait, B.D., Thomson, W., Isenberg, D.A., Oddis, C.V., Silman, A.J., Ollier, W.E., *et al.* (2006). In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific/associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther* 8, R13.
- Choi, Y.C., and Dalakas, M.C. (2000). Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 54, 65-71.
- Chou, S.M. (1968). Myxovirus-like structures and accompanying nuclear changes in chronic polymyositis. *Arch Pathol* 86, 649-658.
- Choy EH, H.J., Lecky B, Winer JB. (2005). Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Christopher-Stine, L., Casciola-Rosen, L.A., Hong, G., Chung, T., Corse, A.M., and Mammen, A.L. (2010). A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 62, 2757-2766.
- Chung, L., Genovese, M.C., and Fiorentino, D.F. (2007). A pilot trial of rituximab in the treatment of patients with dermatomyositis. *Arch Dermatol* 143, 763-767.
- Cid, M.C., Grau, J.M., Casademont, J., Tobias, E., Picazo, A., Coll-Vinent, B., Esparza, J., Pedrol, E., and Urbano-Marquez, A. (1996). Leucocyte/endothelial cell adhesion receptors in muscle biopsies from patients with idiopathic inflammatory myopathies (IIM). *Clin Exp Immunol* 104, 467-473.
- Ciechanover, A. (2006). The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology* 66, S7-19.
- Civatte, M., Bartoli, C., Schleinitz, N., Chetaille, B., Pellissier, J.F., and Figarella-Branger, D. (2005). Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31, 70-79.
- Cobbold, S.P., Adams, E., Farquhar, C.A., Nolan, K.F., Howie, D., Lui, K.O., Fairchild, P.J., Mellor, A.L., Ron, D., and Waldmann, H. (2009). Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12055-12060.
- Cohen, A.C., Nadeau, K.C., Tu, W., Hwa, V., Dionis, K., Bezrodnik, L., Teper, A., Gaillard, M., Heinrich, J., Krensky, A.M., *et al.* (2006). Cutting edge: Decreased accumulation and regulatory function of CD4+ CD25(high) T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol* 177, 2770-2774.
- Cohen, J.L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D., and Salomon, B.L. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196, 401-406.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* *11*, 1093-1101.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566-569.

Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D.L., and Mondino, A. (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol* *176*, 2730-2738.

Coomes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* *204*, 1757-1764.

Cosgrove, D., Chan, S.H., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1992). The thymic compartment responsible for positive selection of CD4⁺ T cells. *Int Immunol* *4*, 707-710.

Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., *et al.* (2003). Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* *102*, 4107-4114.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942-949.

Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* *29*, 114-126.

Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626-635.

Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2004). CD25⁺ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* *173*, 7259-7268.

Curotto de Lafaille, M.A., Muriglan, S., Sunshine, M.J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G.C., Wensky, A.K., Olivares-Villagomez, D., and Lafaille, J.J. (2001). Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* *194*, 1349-1359.

Curti, A., Trabanelli, S., Salvestrini, V., Baccharani, M., and Lemoli, R.M. (2009). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* *113*, 2394-2401.

- D'Cruz, L.M., and Klein, L. (2005). Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6, 1152-1159.
- Dalakas, M.C. (1991). Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N Engl J Med* 325, 1487-1498.
- Dalakas, M.C. (2002). Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* 28, 779-798, vi.
- Dalakas, M.C. (2003). Therapeutic approaches in patients with inflammatory myopathies. *Semin Neurol* 23, 199-206.
- Dalakas, M.C. (2006). Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 437-447.
- Dalakas, M.C., and Hohlfeld, R. (2003). Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 362, 971-982.
- Dalakas, M.C., Illa, I., Dambrosia, J.M., Soueidan, S.A., Stein, D.P., Otero, C., Dinsmore, S.T., and McCrosky, S. (1993). A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 329, 1993-2000.
- Dalakas, M.C., Rakocevic, G., Schmidt, J., Salajegheh, M., McElroy, B., Harris-Love, M.O., Shrader, J.A., Levy, E.W., Dambrosia, J., Kampen, R.L., *et al.* (2009). Effect of Alemtuzumab (CAMPATH1-H) in patients with inclusion-body myositis. *Brain* 132, 1536-1544.
- Dalakas, M.C., Sonies, B., Dambrosia, J., Sekul, E., Cupler, E., and Sivakumar, K. (1997). Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 48, 712-716.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347-1355.
- Darrasse-Jeze, G., Bergot, A.S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B.L., Cohen, J.L., Bellier, B., Podsypanina, K., and Klatzmann, D. (2009a). Tumor emergence is sensed by self-specific CD44^{hi} memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest*.
- Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., *et al.* (2009b). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 206, 1853-1862.
- Darrasse-Jeze, G., Klatzmann, D., Charlotte, F., Salomon, B.L., and Cohen, J.L. (2006). CD4⁺CD25⁺ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett* 102, 106-109.

- Darrasse-Jeze, G., Marodon, G., Salomon, B.L., Catala, M., and Klatzmann, D. (2005). Ontogeny of CD4⁺CD25⁺ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood* *105*, 4715-4721.
- Dastmalchi, M., Grundtman, C., Alexanderson, H., Mavragani, C.P., Einarsdottir, H., Helters, S.B., Elvin, K., Crow, M.K., Nennesmo, I., and Lundberg, I.E. (2008). A high incidence of disease flares in an open pilot study of infliximab in patients with refractory inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* *67*, 1670-1677.
- Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* *196*, 947-955.
- de Merieux, P., Verity, M.A., Clements, P.J., and Paulus, H.E. (1983). Esophageal abnormalities and dysphagia in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* *26*, 961-968.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* *204*, 1257-1265.
- Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2009). IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol* *131*, 298-307.
- Delaunay, A., Bromberg, K.D., Hayashi, Y., Mirabella, M., Burch, D., Kirkwood, B., Serra, C., Malicdan, M.C., Mizisin, A.P., Morosetti, R., *et al.* (2008). The ER-bound RING finger protein 5 (RNF5/RMA1) causes degenerative myopathy in transgenic mice and is deregulated in inclusion body myositis. *PLoS One* *3*, e1609.
- Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., and Powell, J.D. (2009). The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* *30*, 832-844.
- Dennis, P.B., Fumagalli, S., and Thomas, G. (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 49-54.
- Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* *4*, 851-865.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* *193*, 1303-1310.
- Dimitri, D., Andre, C., Roucoules, J., Hosseini, H., Humbel, R.L., and Authier, F.J. (2007). Myopathy associated with anti-signal recognition peptide antibodies: clinical heterogeneity contrasts with stereotyped histopathology. *Muscle Nerve* *35*, 389-395.

Dimitri, D., Benveniste, O., Dubourg, O., Maisonobe, T., Eymard, B., Amoura, Z., Jean, L., Tiev, K., Piette, J.C., Klatzmann, D., *et al.* (2006). Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain* 129, 986-995.

Dion, E., Cherin, P., Payan, C., Fournet, J.C., Papo, T., Maisonobe, T., Auberton, E., Chosidow, O., Godeau, P., Piette, J.C., *et al.* (2002). Magnetic resonance imaging criteria for distinguishing between inclusion body myositis and polymyositis. *J Rheumatol* 29, 1897-1906.

Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2008). T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *J Leukoc Biol* 84, 614-622.

Douglas, W.W., Tazelaar, H.D., Hartman, T.E., Hartman, R.P., Decker, P.A., Schroeder, D.R., and Ryu, J.H. (2001). Polymyositis-dermatomyositis-associated interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1182-1185.

Du, C., and Wang, Y. (2011). The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 12.

Dudda, J.C., Perdue, N., Bachtanian, E., and Campbell, D.J. (2008). Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med* 205, 1559-1565.

Earle, K.E., Tang, Q., Zhou, X., Liu, W., Zhu, S., Bonyhadi, M.L., and Bluestone, J.A. (2005). In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 115, 3-9.

Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2002). Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 13, 2276-2288.

Effros, R.B., Dagarag, M., Spaulding, C., and Man, J. (2005). The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 205, 147-157.

Eggena, M.P., Barugahare, B., Jones, N., Okello, M., Mutalya, S., Kityo, C., Mugenyi, P., and Cao, H. (2005). Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 174, 4407-4414.

Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200, 277-285.

Eloranta, M.L., Barbasso Helters, S., Ulfgren, A.K., Ronnblom, L., Alm, G.V., and Lundberg, I.E. (2007). A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum* 56, 3112-3124.

Emslie-Smith, A.M., Arahata, K., and Engel, A.G. (1989). Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol* 20, 224-231.

Emslie-Smith, A.M., and Engel, A.G. (1990). Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann Neurol* 27, 343-356.

Engel, A.G., and Arahata, K. (1984). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann Neurol* *16*, 209-215.

Engel, A.G., and Arahata, K. (1986). Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum Pathol* *17*, 704-721.

Englund, P., Lindroos, E., Nennesmo, I., Klareskog, L., and Lundberg, I.E. (2001). Skeletal muscle fibers express major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* *159*, 1263-1273.

Erdman, S.E., Sohn, J.J., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Ge, Z., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2005). CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in *ApcMin/+* mice. *Cancer Res* *65*, 3998-4004.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* *105*, 2220-2226.

Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* *178*, 7868-7878.

Eymard, B., and Laforet, P. (2003). [A patient with suspected muscle disease?]. *Rev Neurol (Paris)* *159*, 114-121.

Fabre, S., Carrette, F., Chen, J., Lang, V., Semichon, M., Denoyelle, C., Lazar, V., Cagnard, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Mangeney, M., *et al.* (2008). FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* *181*, 2980-2989.

Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., and Powrie, F. (2005). T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* *201*, 737-746.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003a). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 1206-1212.

Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2003b). T cell apoptosis by kynurenines. *Adv Exp Med Biol* *527*, 183-190.

Fasth, A.E., Dastmalchi, M., Rahbar, A., Salomonsson, S., Pandya, J.M., Lindroos, E., Nennesmo, I., Malmberg, K.J., Soderberg-Naucler, C., Trollmo, C., *et al.* (2009). T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells. *J Immunol* *183*, 4792-4799.

Fenner, B.F. (1949). *The Production of Antibodies*. Melbourne, Editeur, 2e édition.

- Figarella-Branger, D., Civatte, M., Bartoli, C., and Pellissier, J.F. (2003). Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 28, 659-682.
- Filaci, G., Fravega, M., Fenoglio, D., Rizzi, M., Negrini, S., Viggiani, R., and Indiveri, F. (2004). Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* 4, 86-92.
- Filaci, G., Rizzi, M., Setti, M., Fenoglio, D., Fravega, M., Basso, M., Ansaldo, G., Ceppa, P., Borgonovo, G., Murdaca, G., *et al.* (2005). Non-antigen-specific CD8(+) T suppressor lymphocytes in diseases characterized by chronic immune responses and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1050, 115-123.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B.L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.
- Fisson, S., Djelti, F., Trenado, A., Billiard, F., Liblau, R., Klatzmann, D., Cohen, J.L., and Salomon, B.L. (2006). Therapeutic potential of self-antigen-specific CD4+ CD25+ regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol* 36, 817-827.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5, e38.
- Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005a). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202, 901-906.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005b). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142-1151.
- Fox, C.J., Hammerman, P.S., and Thompson, C.B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 5, 844-852.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015-3029.
- Frauwirth, K.A., Alegre, M.L., and Thompson, C.B. (2000). Induction of T cell anergy in the absence of CTLA-4/B7 interaction. *J Immunol* 164, 2987-2993.
- Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769-777.
- Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2004). Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 172, 4661-4665.

- Frazier, A.R., and Miller, R.D. (1974). Interstitial pneumonitis in association with polymyositis and dermatomyositis. *Chest* 65, 403-407.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., *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, 1027-1034.
- Frey, O., Petrow, P.K., Gajda, M., Siegmund, K., Huehn, J., Scheffold, A., Hamann, A., Radbruch, A., and Brauer, R. (2005). The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther* 7, R291-301.
- Frikha, F., Rigolet, A., Behin, A., Fautrel, B., Herson, S., and Benveniste, O. (2009). Efficacy of rituximab in refractory and relapsing myositis with anti-JO1 antibodies: a report of two cases. *Rheumatology (Oxford)* 48, 1166-1168.
- Fritzsching, B., Korporal, M., Haas, J., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., and Wildemann, B. (2006a). Similar sensitivity of regulatory T cells towards CD95L-mediated apoptosis in patients with multiple sclerosis and healthy individuals. *J Neurol Sci* 251, 91-97.
- Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., Quick, S., Haas, J., Wildemann, B., Krammer, P.H., and Suri-Payer, E. (2005). In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol* 175, 32-36.
- Fritzsching, B., Oberle, N., Pauly, E., Geffers, R., Buer, J., Poschl, J., Krammer, P., Linderkamp, O., and Suri-Payer, E. (2006b). Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 108, 3371-3378.
- Fukuchi, K., Pham, D., Hart, M., Li, L., and Lindsey, J.R. (1998). Amyloid-beta deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am J Pathol* 153, 1687-1693.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-1049.
- Gallichan, W.S., Balasa, B., Davies, J.D., and Sarvetnick, N. (1999). Pancreatic IL-4 expression results in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 163, 1696-1703.
- Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058-2065.
- Gartner, D., Hoff, H., Gimsa, U., Burmester, G., and Brunner-Weinzierl, M. (2006). CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol*, 73– 84

- Garza, K.M., Chan, S.M., Suri, R., Nguyen, L.T., Odermatt, B., Schoenberger, S.P., and Ohashi, P.S. (2000). Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity. *J Exp Med* *191*, 2021-2027.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723-737.
- Gherardi, R.K. (2011). Pathogenic aspects of dermatomyositis, polymyositis and overlap myositis. *Presse Med* *40*, e209-218.
- Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., Rinchik, E.M., and Russell, L.B. (1991). Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5528-5532.
- Goebels, N., Michaelis, D., Engelhardt, M., Huber, S., Bender, A., Pongratz, D., Johnson, M.A., Wekerle, H., Tschopp, J., Jenne, D., *et al.* (1996). Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J Clin Invest* *97*, 2905-2910.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* *2*, 882-888.
- Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* *204*, 2521-2528.
- Green, E.A., Choi, Y., and Flavell, R.A. (2002). Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent Tregulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* *16*, 183-191.
- Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ Tregulatory 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*, 10878-10883.
- Greenberg, S.A., and Amato, A.A. (2004). Uncertainties in the pathogenesis of adult dermatomyositis. *Curr Opin Neurol* *17*, 359-364.
- Greenberg, S.A., Bradshaw, E.M., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Burleson, T., Due, B., Bregoli, L., O'Connor, K.C., and Amato, A.A. (2005a). Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. *Neurology* *65*, 1782-1787.
- Greenberg, S.A., Pinkus, G.S., Amato, A.A., and Pinkus, J.L. (2007). Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis. *Muscle Nerve* *35*, 17-23.
- Greenberg, S.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Burleson, T., Sanoudou, D., Tawil, R., Barohn, R.J., Saperstein, D.S., Briemberg, H.R., Ericsson, M., *et al.* (2005b). Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* *57*, 664-678.

- Gregori, S., Giarratana, N., Smiroldo, S., and Adorini, L. (2003). Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol* *171*, 4040-4047.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., and Roncarolo, M.G. (2010). Differentiation of type 1 Tregulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* *116*, 935-944.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* *270*, 1189-1192.
- Griggs, R.C., Askanas, V., DiMauro, S., Engel, A., Karpati, G., Mendell, J.R., and Rowland, L.P. (1995). Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* *38*, 705-713.
- Grinberg-Bleyer, Y., Saadoun, D., Baeyens, A., Billiard, F., Goldstein, J.D., Gregoire, S., Martin, G.H., Elhage, R., Derian, N., Carpentier, W., *et al.* (2010). Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* *120*, 4558-4568.
- Griseri, T., Asquith, M., Thompson, C., and Powrie, F. (2010). OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J Exp Med* *207*, 699-709.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., *et al.* (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* *3*, 1097-1101.
- Gross, D.A., Chappert, P., Leboeuf, M., Monteilhet, V., Van Wittenberghe, L., Danos, O., and Davoust, J. (2006). Simple conditioning with monospecific CD4+CD25+ regulatory T cells for bone marrow engraftment and tolerance to multiple gene products. *Blood* *108*, 1841-1848.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and Tregulatory cells. *Blood* *104*, 2840-2848.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* *389*, 737-742.
- Guertin, D.A., Guntur, K.V., Bell, G.W., Thoreen, C.C., and Sabatini, D.M. (2006). Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. *Curr Biol* *16*, 958-970.
- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* *115*, 1958-1968.
- Guillot-Delost, M., Cherai, M., Hamel, Y., Rosenzweig, M., Baillou, C., Simonin, G., Leclercq, V., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Six, A., Bon-Durand, V., *et al.* (2008). Clinical-grade preparation of human natural regulatory T-cells encoding the thymidine kinase suicide gene as a safety gene. *J Gene Med* *10*, 834-846.

Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F., and Jablonski-Westrich, D. (2000). Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol* 30, 3207-3218.

Hamano, T., Gendron, T.F., Causevic, E., Yen, S.H., Lin, W.L., Isidoro, C., Deture, M., and Ko, L.W. (2008). Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci* 27, 1119-1130.

Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.H., DePinho, R.A., and Liu, Y.C. (2010). Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* 207, 1381-1391.

Harlan, D.M., Hengartner, H., Huang, M.L., Kang, Y.H., Abe, R., Moreadith, R.W., Pircher, H., Gray, G.S., Ohashi, P.S., Freeman, G.J., *et al.* (1994). Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3137-3141.

Haupt, H.M., and Hutchins, G.M. (1982). The heart and cardiac conduction system in polymyositis-dermatomyositis: a clinicopathologic study of 16 autopsied patients. *Am J Cardiol* 50, 998-1006.

Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J Exp Med* 205, 565-574.

Heikkinen, J., Mottonen, M., Alanen, A., and Lassila, O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 136, 373-378.

Hendriks, T.K., Velthuis, J.H., Klepper, M., van Gurp, E., Geel, A., Schoordijk, W., Baan, C.C., and Weimar, W. (2009). Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells in renal recipients. *Transpl Int* 22, 884-891.

Hengstman, G.J., De Bleecker, J.L., Feist, E., Vissing, J., Denton, C.P., Manoussakis, M.N., Slott Jensen, H., van Engelen, B.G., and van den Hoogen, F.H. (2008). Open-label trial of anti-TNF-alpha in dermato- and polymyositis treated concomitantly with methotrexate. *Eur Neurol* 59, 159-163.

Hengstman, G.J., van Engelen, B.G., Vree Egberts, W.T., and van Venrooij, W.J. (2001). Myositis-specific autoantibodies: overview and recent developments. *Curr Opin Rheumatol* 13, 476-482.

Hepp, p. (1887). *Klin Wochschr* 24.

Herson, S. (2010). OBSERVATION PERSONNELLE

Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786-800.

Hilton-Jones, D. (2001). Inflammatory muscle diseases. *Curr Opin Neurol* 14, 591-596.

- Hirakata, M. (2005). Autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetases. *Intern Med* 44, 527-528.
- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12, 5423-5434.
- Hoerning, A., Koss, K., Datta, D., Boneschansker, L., Jones, C.N., Wong, I.Y., Irimia, D., Calzadilla, K., Benitez, F., Hoyer, P.F., *et al.* (2011). Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol*.
- Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Albrecht, J., Doser, K., Piseshka, B., Dada, A., Niemand, C., Assenmacher, M., Orso, E., *et al.* (2006a). Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 267-274.
- Hoffmann, P., Eder, R., Boeld, T.J., Doser, K., Piseshka, B., Andreesen, R., and Edinger, M. (2006b). Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108, 4260-4267.
- Hohlfeld, R., and Engel, A.G. (1991a). Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies. *Ann Neurol* 29, 498-507.
- Hohlfeld, R., and Engel, A.G. (1991b). HLA expression in myoblasts. *Neurology* 41, 2015.
- Holman, P.O., Walsh, E.R., and Hogquist, K.A. (2003). The central tolerance response to male antigen in normal mice is deletion and not receptor editing. *J Immunol* 171, 4048-4053.
- Holst, J., Wang, H., Eder, K.D., Workman, C.J., Boyd, K.L., Baquet, Z., Singh, H., Forbes, K., Chruscinski, A., Smeyne, R., *et al.* (2008). Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 9, 658-666.
- Hoogendijk, J.E., Amato, A.A., Lecky, B.R., Choy, E.H., Lundberg, I.E., Rose, M.R., Vencovsky, J., de Visser, M., and Hughes, R.A. (2004). 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 14, 337-345.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Housley, W.J., Adams, C.O., Nichols, F.C., Puddington, L., Lingenheld, E.G., Zhu, L., Rajan, T.V., and Clark, R.B. (2011). Natural but Not Inducible Regulatory T Cells Require TNF- α Signaling for In Vivo Function. *J Immunol* 186, 6779-6787.
- Howard, O.M., Dong, H.F., Yang, D., Raben, N., Nagaraju, K., Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Hartlein, M., Kron, M., Yiadom, K., *et al.* (2002). Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* 196, 781-791.

- Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7, 401-410.
- Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., *et al.* (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503-513.
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., and Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* 207, 2561-2568.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., *et al.* (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 199, 303-313.
- Huizinga, R., Hintzen, R.Q., Assink, K., van Meurs, M., and Amor, S. (2009). T-cell responses to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *Int Immunol* 21, 433-441.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Illa, I., Nath, A., and Dalakas, M. (1991). Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis. *Ann Neurol* 29, 474-481.
- Inukai, A., Kuru, S., Liang, Y., Takano, A., Kobayashi, Y., Sakai, M., Doyu, M., and Sobue, G. (2000). Expression of HLA-DR and its enhancing molecules in muscle fibers in polymyositis. *Muscle Nerve* 23, 385-392.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., Alonso Adel, C., and Grundke-Iqbal, I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118, 53-69.
- Isenberg, D.A., Allen, E., Farewell, V., Ehrenstein, M.R., Hanna, M.G., Lundberg, I.E., Oddis, C., Pilkington, C., Plotz, P., Scott, D., *et al.* (2004). International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. *Rheumatology (Oxford)* 43, 49-54.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73, 321-354.
- Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X., Gilliet, M., and Liu, Y.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28, 870-880.

Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X., and Liu, Y.J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13138-13143.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162, 5317-5326.

Iwaki, T., Tanaka, A., Miyawaki, Y., Suzuki, A., Kobayashi, T., Takamatsu, J., Matsushita, T., Umemura, K., Urano, T., Kojima, T., *et al.* (2011). Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost* 9, 1200-1206.

Jackson, C.E., Barohn, R.J., Gronseth, G., Pandya, S., and Herbelin, L. (2008). Inclusion body myositis functional rating scale: a reliable and valid measure of disease severity. *Muscle Nerve* 37, 473-476.

Jaeckel, E., von Boehmer, H., and Manns, M.P. (2005). Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 306-310.

Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W., and Su, L. (2006). Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol* 7, 6.

Joffe, M.M., Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Hicks, J.E., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1993). Drug therapy of the idiopathic inflammatory myopathies: predictors of response to prednisone, azathioprine, and methotrexate and a comparison of their efficacy. *Am J Med* 94, 379-387.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* 27, 173-178.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.

Kalovidouris, A.E., and Plotkin, Z. (1995). Synergistic cytotoxic effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on cultured human muscle cells. *J Rheumatol* 22, 1698-1703.

Kameda, H., Nagasawa, H., Ogawa, H., Sekiguchi, N., Takei, H., Tokuhira, M., Amano, K., and Takeuchi, T. (2005). Combination therapy with corticosteroids, cyclosporin A, and intravenous pulse cyclophosphamide for acute/subacute interstitial pneumonia in patients with dermatomyositis. *J Rheumatol* 32, 1719-1726.

- Kanagawa, O., Militech, A., and Vaupel, B.A. (2002). Regulation of diabetes development by regulatory T cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice. *J Immunol* *168*, 6159-6164.
- Kanellopoulos-Langevin, C., Caucheteux, S.M., Verbeke, P., and Ojcius, D.M. (2003). Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Reprod Biol Endocrinol* *1*, 121.
- Kapp, J.A., Kapp, L.M., and McKenna, K.C. (2004). Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance. *Immunol Res* *29*, 93-102.
- Kassiotis, G., and Kollias, G. (2001). TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models. *J Clin Invest* *107*, 1507-1508.
- Katsumata, Y., Ridgway, W.M., Oriss, T., Gu, X., Chin, D., Wu, Y., Fertig, N., Oury, T., Vandersteen, D., Clemens, P., *et al.* (2007). Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are associated with muscle and lung inflammation. *J Autoimmun* *29*, 174-186.
- Kearley, J., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* *122*, 617-624 e616.
- Keir, M.E., Francisco, L.M., and Sharpe, A.H. (2007). PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* *19*, 309-314.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* *10*, 176-184.
- Kim, J., Lahl, K., Hori, S., Loddenkemper, C., Chaudhry, A., deRoos, P., Rudensky, A., and Sparwasser, T. (2009). Cutting edge: depletion of Foxp3+ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice. *J Immunol* *183*, 7631-7634.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* *8*, 191-197.
- King, C.G., Kobayashi, T., Cejas, P.J., Kim, T., Yoon, K., Kim, G.K., Chiffoleau, E., Hickman, S.P., Walsh, P.T., Turka, L.A., *et al.* (2006). TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nat Med* *12*, 1088-1092.
- King, I.L., and Segal, B.M. (2005). Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of Tregulatory cells. *J Immunol* *175*, 641-645.
- Kinter, A.L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., Ziegler, S.F., *et al.* (2004). CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* *200*, 331-343.

- Kissel, J.T., Halterman, R.K., Rammohan, K.W., and Mendell, J.R. (1991). The relationship of complement-mediated microvasculopathy to the histologic features and clinical duration of disease in dermatomyositis. *Arch Neurol* 48, 26-30.
- Kissel, J.T., Mendell, J.R., and Rammohan, K.W. (1986). Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *N Engl J Med* 314, 329-334.
- Kitazawa, M., Green, K.N., Caccamo, A., and LaFerla, F.M. (2006). Genetically augmenting Abeta42 levels in skeletal muscle exacerbates inclusion body myositis-like pathology and motor deficits in transgenic mice. *Am J Pathol* 168, 1986-1997.
- Klamp, T., Sahin, U., Kyewski, B., Schwendemann, J., Dhaene, K., and Tureci, O. (2006). Expression profiling of autoimmune regulator AIRE mRNA in a comprehensive set of human normal and neoplastic tissues. *Immunol Lett* 106, 172-179.
- Klein, J. (1982). *Immunology : the science of self-nonsel self discrimination*.
- Klein, L., Khazaie, K., and von Boehmer, H. (2003). In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8886-8891.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O., and Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105, 2877-2886.
- Kloetzel, P.M., and Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 76-81.
- Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J., and Mosmann, T.R. (2006). Tregulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177, 6780-6786.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10, 595-602.
- Koenen, H.J., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M., and Joosten, I. (2008). Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112, 2340-2352.
- Koffman, B.M., Rugiero, M., and Dalakas, M.C. (1998a). Immune-mediated conditions and antibodies associated with sporadic inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 21, 115-117.
- Koffman, B.M., Sivakumar, K., Simonis, T., Stroncek, D., and Dalakas, M.C. (1998b). HLA allele distribution distinguishes sporadic inclusion body myositis from hereditary inclusion body myopathies. *J Neuroimmunol* 84, 139-142.

- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169, 4712-4716.
- Koonpaew, S., Shen, S., Flowers, L., and Zhang, W. (2006). LAT-mediated signaling in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203, 119-129.
- Kopf, H., de la Rosa, G.M., Howard, O.M., and Chen, X. (2007). Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3⁺ Tregulatory cells. *Int Immunopharmacol* 7, 1819-1824.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007a). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., *et al.* (2007b). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13, 423-431.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krystufkova, O., Vallerskog, T., Helmers, S.B., Mann, H., Putova, I., Belacek, J., Malmstrom, V., Trollmo, C., Vencovsky, J., and Lundberg, I.E. (2009). Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 68, 836-843.
- Kuhl, A.A., Pawlowski, N.N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., Loddenkemper, C., and Hoffmann, J.C. (2009). Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology* 128, 580-588.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 770-774.
- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., and Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 12, 1145-1155.
- Kurts, C., Heath, W.R., Kosaka, H., Miller, J.F., and Carbone, F.R. (1998). The peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* 188, 415-420.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204, 57-63.

- Lampe, J.B., Gossrau, G., Kempe, A., Fussel, M., Schwurack, K., Schroder, R., Krause, S., Kohnen, R., Walter, M.C., Reichmann, H., *et al.* (2003). Analysis of HLA class I and II alleles in sporadic inclusion-body myositis. *J Neurol* 250, 1313-1317.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., *et al.* (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 180, 4763-4773.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19, R1046-1052.
- Larkin, J., 3rd, Picca, C.C., and Caton, A.J. (2007). Activation of CD4+ CD25+ regulatory T cell suppressor function by analogs of the selecting peptide. *Eur J Immunol* 37, 139-146.
- LaRosa, D.F., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Zhang, J., Turka, L.A., and Walsh, P.T. (2007). CpG DNA inhibits CD4+CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells. *Immunol Lett* 108, 183-188.
- Launois, P., Swihart, K.G., Milon, G., and Louis, J.A. (1997). Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* 158, 3317-3324.
- Lee, J.H., Kang, S.G., and Kim, C.H. (2007). FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* 178, 301-311.
- Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M.A., and Boothby, M. (2010). Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* 32, 743-753.
- Lehman, N.L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol* 118, 329-347.
- Lekmine, F., Sassano, A., Uddin, S., Smith, J., Majchrzak, B., Brachmann, S.M., Hay, N., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2004). Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp Cell Res* 295, 173-182.
- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Lepidi, H., Frances, V., Figarella-Branger, D., Bartoli, C., Machado-Baeta, A., and Pellissier, J.F. (1998). Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 73-79.
- Levine, S.M., Raben, N., Xie, D., Askin, F.B., Tuder, R., Mullins, M., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L.A. (2007). Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis. *Arthritis Rheum* 56, 2729-2739.

- Levine, S.M., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L.A. (2003). Anti-aminoacyl tRNA synthetase immune responses: insights into the pathogenesis of the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 15, 708-713.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M.G. (2001a). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 Tregulatory cells. *J Immunol* 166, 5530-5539.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001b). Human cd25(+)cd4(+) Tregulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193, 1295-1302.
- Levison, P. (1937). *Acta Psychiat Neural*, 12.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., Sproles, A.A., Shah, J.S., Kohl, J., Belkaid, Y., *et al.* (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 202, 1549-1561.
- Li, C.K., Knopp, P., Moncrieffe, H., Singh, B., Shah, S., Nagaraju, K., Varsani, H., Gao, B., and Wedderburn, L.R. (2009). Overexpression of MHC class I heavy chain protein in young skeletal muscle leads to severe myositis: implications for juvenile myositis. *Am J Pathol* 175, 1030-1040.
- Li, Q., Guo, Z., Xu, X., Xia, S., and Cao, X. (2008a). Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. *Eur J Immunol* 38, 2751-2761.
- Li, X., Qian, L., Wang, G., Zhang, H., Wang, X., Chen, K., Zhai, Z., Li, Q., Wang, Y., and Harris, D.C. (2007). Tregulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 34, 2438-2445.
- Li, X., Xiao, B.G., Xi, J.Y., Lu, C.Z., and Lu, J.H. (2008b). Decrease of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells and elevation of CD19(+)BAFF-R(+) B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol* 126, 180-188.
- Liau, N., Ooi, C., Reid, C., Kirkwood, I.D., and Bartholomeusz, D. (2007). F-18 FDG PET/CT detection of mediastinal malignancy in a patient with dermatomyositis. *Clin Nucl Med* 32, 304-305.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2004). Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 114, 1640-1649.

- Lindberg, C., Trysberg, E., Tarkowski, A., and Oldfors, A. (2003). Anti-T-lymphocyte globulin treatment in inclusion body myositis: a randomized pilot study. *Neurology* 61, 260-262.
- Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100-111.
- Liprandi, A., Bartoli, C., Figarella-Branger, D., Pellissier, J.F., and Lepidi, H. (1999a). Local expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 97, 642-648.
- Liprandi, A., Figarella-Branger, D., Daniel, L., Lepidi, H., Bartoli, C., and Pellissier, J.F. (1999b). [Expression of adhesion molecules in idiopathic inflammatory myopathies. Immunohistochemical study of 17 cases]. *Ann Pathol* 19, 12-18.
- Liu, G., Burns, S., Huang, G., Boyd, K., Proia, R.L., Flavell, R.A., and Chi, H. (2009). The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* 10, 769-777.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., *et al.* (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9, 632-640.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A.H., and Abbas, A.K. (2003). The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 4, 664-669.
- Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Dalakas, M., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1991). A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 70, 360-374.
- Lu, L., Yu, Y., Li, G., Pu, L., Zhang, F., Zheng, S., and Wang, X. (2009). CD8(+)CD103(+) regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int Immunopharmacol* 9, 546-548.
- Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., and Rudensky, A.Y. (2008). Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320, 1220-1224.
- Maciver, N.J., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Coloff, J.L., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol* 84, 949-957.
- Madan, V., Chinoy, H., Griffiths, C.E., and Cooper, R.G. (2009). Defining cancer risk in dermatomyositis. Part I. *Clin Exp Dermatol* 34, 451-455.

- Majithia, V., and Harisdangkul, V. (2005). Mycophenolate mofetil (CellCept): an alternative therapy for autoimmune inflammatory myopathy. *Rheumatology (Oxford)* *44*, 386-389.
- Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* *108*, 111-165.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* *17*, 167-178.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., and Nishino, I. (2007). A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* *16*, 115-128.
- Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, Casciola-Rosen LA. (2011) Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011
- Marguerie, C., Bunn, C.C., Beynon, H.L., Bernstein, R.M., Hughes, J.M., So, A.K., and Walport, M.J. (1990). Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med* *77*, 1019-1038.
- Marie, I., and Dominique, S. (2006). [Pulmonary damage during polymyositis and dermatomyositis: interstitial lung disease]. *Presse Med* *35*, 683-695.
- Marie, I., Hachulla, E., Cherin, P., Dominique, S., Hatron, P.Y., Hellot, M.F., Devulder, B., Herson, S., Levesque, H., and Courtois, H. (2002). Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* *47*, 614-622.
- Marie, I., Heliot, P., Roussel, F., Herve, F., Muir, J.F., and Levesque, H. (2005). Fatal Mycobacterium peregrinum pneumonia in refractory polymyositis treated with infliximab. *Rheumatology (Oxford)* *44*, 1201-1202.
- Marino, M., Scuderi, F., Mannella, F., and Bartoccioni, E. (2003). TGF-beta 1 and IL-10 modulate IL-1 beta-induced membrane and soluble ICAM-1 in human myoblasts. *J Neuroimmunol* *134*, 151-157.
- Marino, M., Scuderi, F., Mazzarelli, P., Mannella, F., Provenzano, C., and Bartoccioni, E. (2001). Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *J Neuroimmunol* *116*, 94-101.
- Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., and Martin, R. (2001). CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* *108*, 1185-1194.
- Marodon, G., Fisson, S., Levacher, B., Fabre, M., Salomon, B.L., and Klatzmann, D. (2006). Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood* *108*, 2972-2978.

Mascaro, J.M., Jr., Hausmann, G., Herrero, C., Grau, J.M., Cid, M.C., Palou, J., and Mascaro, J.M. (1995). Membrane attack complex deposits in cutaneous lesions of dermatomyositis. *Arch Dermatol* 131, 1386-1392.

Mastaglia, F.L. (2008). Inflammatory muscle diseases. *Neurol India* 56, 263-270.

Mastaglia, F.L., and Phillips, B.A. (2002). Idiopathic inflammatory myopathies: epidemiology, classification, and diagnostic criteria. *Rheum Dis Clin North Am* 28, 723-741.

Masteller, E.L., Warner, M.R., Tang, Q., Tarbell, K.V., McDevitt, H., and Bluestone, J.A. (2005). Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175, 3053-3059.

Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Aire. *Annu Rev Immunol* 27, 287-312.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.

Mayack, S.R., and Berg, L.J. (2006). Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals. *J Immunol* 176, 2059-2063.

Mazzucchelli, R., and Durum, S.K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7, 144-154.

McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and Anderton, S.M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175, 3025-3032.

McGee, H.S., and Agrawal, D.K. (2009). Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 211-225.

Medsger, T.A., Jr., Dawson, W.N., Jr., and Masi, A.T. (1970). The epidemiology of polymyositis. *Am J Med* 48, 715-723.

Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.

Mendell, J.R., Sahenk, Z., Gales, T., and Paul, L. (1991). Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Arch Neurol* 48, 1229-1234.

Menzies, F.M., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D.C. (2006). Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies. *Autophagy* 2, 224-225.

Miller, F., Walsh Y, Saminaden S, Lecky BRF, Winer JB (2002). Randomised blind controlled trial of methotrexate and steroid compared with azathioprine and steroid in

treatment of idiopathic inflammatory myopathy. *Journal of Neurological Sciences supplement 1* : S53.

Miller, T., Al-Lozi, M.T., Lopate, G., and Pestronk, A. (2002). Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 420-428.

Min, B., Thornton, A., Caucheteux, S.M., Younes, S.A., Oh, K., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2007). Gut flora antigens are not important in the maintenance of regulatory T cell heterogeneity and homeostasis. *Eur J Immunol* 37, 1916-1923.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., *et al.* (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911.

Monk, C.R., Spachidou, M., Rovis, F., Leung, E., Botto, M., Lechler, R.I., and Garden, O.A. (2005). MRL/Mp CD4⁺,CD25⁻ T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52, 1180-1184.

Mora, J.R., Iwata, M., and von Andrian, U.H. (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 8, 685-698.

Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., and Wilson, D.B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256-259.

Mosser, D.M., and Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226, 205-218.

Mozaffar, T., and Pestronk, A. (2000). Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68, 472-478.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20, 4050-4058.

Mueller, D.L., and Jenkins, M.K. (1995). Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness. *Curr Opin Immunol* 7, 375-381.

Muller, A.J., Malachowski, W.P., and Prendergast, G.C. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 9, 831-849.

Munn, D.H., Mellor, A.L., Rossi, M., and Young, J.W. (2005). Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not. *Blood* 105, 2618.

- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191-1193.
- Munoz, M.A., Conejo-Mir, J.S., Congregado-LoCERTALES, M., Holgado, C., Moya, F., and LoCERTALES, J. (2007). The utility of positron emission tomography to find an occult neoplasm in a patient with dermatomyositis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21, 1418-1419.
- Murawski, M.R., Litherland, S.A., Clare-Salzler, M.J., and Davoodi-Semiromi, A. (2006). Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1079, 198-204.
- Musial, J., Undas, A., and Celinska-Lowenhoff, M. (2003). Polymyositis associated with infliximab treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 1566-1568.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., *et al.* (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17, 393-398.
- Nagaraju, K., Raben, N., Loeffler, L., Parker, T., Rochon, P.J., Lee, E., Danning, C., Wada, R., Thompson, C., Bahtiyar, G., *et al.* (2000). Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9209-9214.
- Nagaraju, K., Raben, N., Merritt, G., Loeffler, L., Kirk, K., and Plotz, P. (1998). A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin Exp Immunol* 113, 407-414.
- Nakajima, H., Liu, X.W., Wynshaw-Boris, A., Rosenthal, L.A., Imada, K., Finbloom, D.S., Hennighausen, L., and Leonard, W.J. (1997). An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity* 7, 691-701.
- Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (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, 629-644.
- Nakano, J., Yoshimura, T., Okita, M., Motomura, M., Kamei, S., Matsuo, H., and Eguchi, K. (2005). Laminin-induced autoimmune myositis in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 790-796.
- Needham, M., and Mastaglia, F.L. (2007). Inclusion body myositis: current pathogenetic concepts and diagnostic and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* 6, 620-631.
- Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Takemitsu, T., Saito, K., Wang, L., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Nakayama, T., Taniguchi, M., *et al.* (2005). Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9253-9257.

- Nishimura, H., and Honjo, T. (2001). PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 22, 265-268.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., *et al.* (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-322.
- Nishio, J., Suzuki, M., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2001). Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis. *J Immunol* 167, 4051-4058.
- Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
- Nogalska, A., D'Agostino, C., Engel, W.K., Klein, W.L., and Askanas, V. (2010a). Novel demonstration of amyloid-beta oligomers in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Acta Neuropathol* 120, 661-666.
- Nogalska, A., D'Agostino, C., Terracciano, C., Engel, W.K., and Askanas, V. (2010b). Impaired autophagy in sporadic inclusion-body myositis and in endoplasmic reticulum stress-provoked cultured human muscle fibers. *Am J Pathol* 177, 1377-1387.
- Nogalska, A., Wojcik, S., Engel, W.K., McFerrin, J., and Askanas, V. (2007). Endoplasmic reticulum stress induces myostatin precursor protein and NF-kappaB in cultured human muscle fibers: relevance to inclusion body myositis. *Exp Neurol* 204, 610-618.
- Novak, E.J., Masewicz, S.A., Liu, A.W., Lernmark, A., Kwok, W.W., and Nepom, G.T. (2001). Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4high, proliferating subset. *Int Immunol* 13, 799-806.
- Nowak, M., and Stein-Streilein, J. (2007). Invariant NKT cells and tolerance. *Int Rev Immunol* 26, 95-119.
- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C.S., Krammer, P.H., and Suri-Payer, E. (2007). Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179, 3578-3587.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (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, 240-249.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206, 549-559.

Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., *et al.* (2009). Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31, 772-786.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.

Orimo, S., Koga, R., Goto, K., Nakamura, K., Arai, M., Tamaki, M., Sugita, H., Nonaka, I., and Arahata, K. (1994). Immunohistochemical analysis of perforin and granzyme A in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 4, 219-226.

Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2006). Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity* 25, 249-259.

Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2007). Nonspecific antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 27, 493-504.

Paciello, O., Wojcik, S., Gradoni, L., Oliva, G., Trapani, F., Iovane, V., Politano, L., and Papparella, S. (2010). Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: a new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 41, 355-361.

Page, G., Chevrel, G., and Miossec, P. (2004). Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum* 50, 199-208.

Pahwa, R., Jaggaiahgari, S., Pahwa, S., Inverardi, L., Tzakis, A., and Ricordi, C. (2010). Isolation and expansion of human natural Tregulatory cells for cellular therapy. *J Immunol Methods* 363, 67-79.

Pandiyan, P., and Lenardo, M.J. (2008). The control of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell survival. *Biol Direct* 3, 6.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 8, 1353-1362.

Pandya, J.M., Fath, A.E., Zong, M., Arnardottir, S., Dani, L., Lindroos, E., Malmstrom, V., and Lundberg, I.E. (2010). Expanded T cell receptor Vbeta-restricted T cells from patients with sporadic inclusion body myositis are proinflammatory and cytotoxic CD28null T cells. *Arthritis Rheum* 62, 3457-3466.

Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.

Pavlath GK. Regulation of class I MHC expression in skeletal muscle: deleterious effect of aberrant expression on myogenesis. *J Neuroimmunol.* 2002 Apr;125(1-2):42-50.

- Paust, S., Lu, L., McCarty, N., and Cantor, H. (2004). Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10398-10403.
- Pavlath, G.K. (2002). Regulation of class I MHC expression in skeletal muscle: deleterious effect of aberrant expression on myogenesis. *J Neuroimmunol* *125*, 42-50.
- Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* *460*, 103-107.
- Pearson, C.M. (1966). Polymyositis. *Annu Rev Med* *17*, 63-82.
- Peng, G., Wang, H.Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K.H., and Wang, R.F. (2007). Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* *27*, 334-348.
- Pennington, D.J., Silva-Santos, B., Silberzahn, T., Escorcio-Correia, M., Woodward, M.J., Roberts, S.J., Smith, A.L., Dyson, P.J., and Hayday, A.C. (2006). Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature* *444*, 1073-1077.
- Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E.M. (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*, 237-246.
- Pillemer, B.B., Qi, Z., Melgert, B., Oriss, T.B., Ray, P., and Ray, A. (2009). STAT6 activation confers upon T helper cells resistance to suppression by regulatory T cells. *J Immunol* *183*, 155-163.
- Pisoni, C.N., Cuadrado, M.J., Khamashta, M.A., Hughes, G.R., and D'Cruz, D.P. (2007). Mycophenolate mofetil treatment in resistant myositis. *Rheumatology (Oxford)* *46*, 516-518.
- Plotz, P.H. (2003). The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol* *3*, 73-78.
- Posnett, D.N., Edinger, J.W., Manavalan, J.S., Irwin, C., and Marodon, G. (1999). Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones. *Int Immunol* *11*, 229-241.
- Potain, E. (1875). *Bull Soc Med Hop Paris* *12*.
- Prevot, N., Briet, C., Lassmann, H., Tardivel, I., Roy, E., Morin, J., Mak, T.W., Tafuri, A., and Boitard, C. (2010). Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur J Immunol* *40*, 2267-2276.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Galgani, M., Abanni, L., Cali, G., Porcellini, A., Carbone, F., Fontana, S., Horvath, T.L., La Cava, A., *et al.* (2010). An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity* *33*, 929-941.

Putnam, A.L., Brusko, T.M., Lee, M.R., Liu, W., Szot, G.L., Ghosh, T., Atkinson, M.A., and Bluestone, J.A. (2009). Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 58, 652-662.

Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., and Waldmann, H. (1993). "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259, 974-977.

R Stanciu, Z.A., M Guiguet, L Musset, F Capron, D Touitou, A Rigolet, P Cacoub, JC Piette, S herson, O Benveniste (2008)Le pronostic du syndrome des anti-synthétases est aux poumons. Paper presented at: Congrès SNFMI Luxembourg.

Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. (2010). The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32, 67-78.

Reed, A.M., and Ytterberg, S.R. (2002). Genetic and environmental risk factors for idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* 28, 891-916.

Reeves, W.H., Nigam, S.K., and Blobel, G. (1986). Human autoantibodies reactive with the signal-recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9507-9511.

Reimers, C.D., Fleckenstein, J.L., Witt, T.N., Muller-Felber, W., and Pongratz, D.E. (1993). Muscular ultrasound in idiopathic inflammatory myopathies of adults. *J Neurol Sci* 116, 82-92.

Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 14, 2076-2084.

Richards, T.J., Eggebeen, A., Gibson, K., Yousem, S., Fuhrman, C., Gochuico, B.R., Fertig, N., Oddis, C.V., Kaminski, N., Rosas, I.O., *et al.* (2009). Characterization and peripheral blood biomarker assessment of anti-Jo-1 antibody-positive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 60, 2183-2192.

Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 200, 1123-1134.

Rigolet, A.N.C.-C., H. Naffatia, O. Dubourgc, M.-C. Diemertd, P. Cacoubb, S. Hersona, Z. Amourab, L. Mussetd and O. Benvenistea (2009). Les myosites à anticorps anti-Ku : caractérisation et suivi de 28 patients. Paper presented at: SNFMI (Bordeaux).

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.

Ronneld, J., Barbasso Helmers, S., Storfors, H., Grip, K., Ronnblom, L., Franck-Larsson, K., Nordmark, G., and Lundberg, I.E. (2009). Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies. *Autoimmun Rev*.

- Rubinsztein, D.C. (2007). Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron* 54, 854-856.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329, 1667-1671.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., *et al.* (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546-558.
- Russell, S.M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M.C., Roberts, J.L., Aman, M.J., Migone, T.S., Noguchi, M., Markert, M.L., Buckley, R.H., *et al.* (1995). Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 270, 797-800.
- Safford, M., Collins, S., Lutz, M.A., Allen, A., Huang, C.T., Kowalski, J., Blackford, A., Horton, M.R., Drake, C., Schwartz, R.H., *et al.* (2005). Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 6, 472-480.
- Saito, E., Koike, T., Hashimoto, H., Miyasaka, N., Ikeda, Y., Hara, M., Yamada, H., Yoshida, T., Harigai, M., and Ichikawa, Y. (2008). Efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin therapy in Japanese patients with steroid-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 18, 34-44.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161, 72-87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Salama, A.D., Chitnis, T., Imitola, J., Ansari, M.J., Akiba, H., Tushima, F., Azuma, M., Yagita, H., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2003). Critical role of the programmed death 1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 198, 71-78.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303.

- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501.
- Santmyre-Rosenberger, B., and Dugan, E.M. (2003). Skin involvement in dermatomyositis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 714-722.
- Santodomingo-Garzon, T., Han, J., Le, T., Yang, Y., and Swain, M.G. (2009). Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXCR3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 49, 1267-1276.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sarween, N., Chodos, A., Raykundalia, C., Khan, M., Abbas, A.K., and Walker, L.S. (2004). CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 173, 2942-2951.
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 10, 347-353.
- Sather, B.D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowiec, M., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., and Campbell, D.J. (2007). Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 204, 1335-1347.
- Sato, S., Hirakata, M., Kuwana, M., Suwa, A., Inada, S., Mimori, T., Nishikawa, T., Oddis, C.V., and Ikeda, Y. (2005). Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 52, 1571-1576.
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., *et al.* (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7797-7802.
- Sayers, M.E., Chou, S.M., and Calabrese, L.H. (1992). Inclusion body myositis: analysis of 32 cases. *J Rheumatol* 19, 1385-1389.
- Schallenberg, S., Tsai, P.Y., Riewaldt, J., and Kretschmer, K. (2010). Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. *J Exp Med* 207, 1393-1407.
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009). NAD+ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 182, 2898-2908.
- Schmidt, J., Barthel, K., Wrede, A., Salajegheh, M., Bahr, M., and Dalakas, M.C. (2008). Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131, 1228-1240.

- Schmidt, J., Rakocevic, G., Raju, R., and Dalakas, M.C. (2004). Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain* *127*, 1182-1190.
- Schneider-Gold, C., Hartung, H.P., and Gold, R. (2006). Mycophenolate mofetil and tacrolimus: new therapeutic options in neuroimmunological diseases. *Muscle Nerve* *34*, 284-291.
- Schneider, M.A., Meingassner, J.G., Lipp, M., Moore, H.D., and Rot, A. (2007). CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* *204*, 735-745.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* *352*, 621-624.
- Schubert, L.A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F., and Ziegler, S.F. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* *276*, 37672-37679.
- Scott-Browne, J.P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., Bevan, M.J., and Urdahl, K.B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing Tregulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* *204*, 2159-2169.
- Sebzda, E., Zou, Z., Lee, J.S., Wang, T., and Kahn, M.L. (2008). Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat Immunol* *9*, 292-300.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., *et al.* (2006a). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* *203*, 1693-1700.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Tangye, S.G., Alexander, S.I., Solomon, M., Lee, S., Nanan, R., and Fazekas de Saint Groth, B. (2006b). Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood* *107*, 2830-2838.
- Sekul, E.A., and Dalakas, M.C. (1993). Inclusion body myositis: new concepts. *Semin Neurol* *13*, 256-263.
- Selva-O'Callaghan, A., Trallero-Araguas, E., Grau-Junyent, J.M., and Labrador-Horrillo, M. (2010). Malignancy and myositis: novel autoantibodies and new insights. *Curr Opin Rheumatol* *22*, 627-632.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* *19*, 571-582.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723-735.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.

Shamim, E.A., Rider, L.G., and Miller, F.W. (2000). Update on the genetics of the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 12, 482-491.

Sharma, R., Jarjour, W.N., Zheng, L., Gaskin, F., Fu, S.M., and Ju, S.T. (2007). Large functional repertoire of regulatory T-cell suppressible autoimmune T cells in scurfy mice. *J Autoimmun* 29, 10-19.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.

Shimojima, Y., Ishii, W., Kato, T., Hoshi, K., Matsuda, M., Hashimoto, T., Tanaka, Y., and Ikeda, S. (2003). Intractable skin necrosis and interstitial pneumonia in amyopathic dermatomyositis, successfully treated with cyclosporin A. *Intern Med* 42, 1253-1258.

Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., and Selkoe, D.J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263-269.

Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., *et al.* (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.

Shy, G.M., and McEachern, D. (1951). *Neurdl Neurosurg Psychiat* 101.

Siddiqui, K.R., and Powrie, F. (2008). CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1, S34-38.

Sigurgeirsson, B., Lindelof, B., Edhag, O., and Allander, E. (1992). Risk of cancer in idiopathic inflammatory myopathy. *N Engl J Med* 326, 363-367.

Simons, D.M., Picca, C.C., Oh, S., Perng, O.A., Aitken, M., Erikson, J., and Caton, A.J. (2010). How specificity for self-peptides shapes the development and function of regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 88, 1099-1107.

Singer, D.S., and Maguire, J.E. (1990). Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 10, 235-257.

Singer, D.S., Mozes, E., Kirshner, S., and Kohn, L.D. (1997). Role of MHC class I molecules in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 17, 463-468.

Singh, N., Yamamoto, M., Takami, M., Seki, Y., Takezaki, M., Mellor, A.L., and Iwashima, M. (2010). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells resist a novel form of CD28- and Fas-dependent p53-induced T cell apoptosis. *J Immunol* *184*, 94-104.

Singh, R.P., La Cava, A., Wong, M., Ebling, F., and Hahn, B.H. (2007). CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J Immunol* *178*, 7649-7657.

Sitkovsky, M.V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., Ohta, A., and Thiel, M. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* *22*, 657-682.

Smith, K.A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* *240*, 1169-1176.

Soejima, M., Kang, E.H., Gu, X., Katsumata, Y., Clemens, P.R., and Ascherman, D.P. (2011). Role of innate immunity in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1)-mediated myositis. *Arthritis Rheum* *63*, 479-487.

Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., and Drayson, M.T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* *112*, 38-43.

Sontheimer, R.D. (2002). Dermatomyositis: an overview of recent progress with emphasis on dermatologic aspects. *Dermatol Clin* *20*, 387-408.

Soper, D.M., Kasprovicz, D.J., and Ziegler, S.F. (2007). IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* *37*, 1817-1826.

Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* *5*, e9979.

Steinert, W. (1903). Dermatomyositis, with report of case which presented a rare muscle anomaly but once describes in man. *J ex med* *6*.

Stephens, G.L., McHugh, R.S., Whitters, M.J., Young, D.A., Luxenberg, D., Carreno, B.M., Collins, M., and Shevach, E.M. (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* *173*, 5008-5020.

Stertz, G. (1916). *Klin Wochschr* *53*.

Stone, K.B., Oddis, C.V., Fertig, N., Katsumata, Y., Lucas, M., Vogt, M., Domsic, R., and Ascherman, D.P. (2007). Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* *56*, 3125-3131.

Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J.T., and Whiteside, T.L. (2007). A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and

transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13, 4345-4354.

Suchin, E.J., Langmuir, P.B., Palmer, E., Sayegh, M.H., Wells, A.D., and Turka, L.A. (2001). Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 166, 973-981.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.

Suffner, J., Hochweller, K., Kuhnle, M.C., Li, X., Kroczeck, R.A., Garbi, N., and Hammerling, G.J. (2010). Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in Foxp3⁺.LuciDTR mice. *J Immunol* 184, 1810-1820.

Sugihara, T., Okiyama, N., Suzuki, M., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2010). Definitive engagement of cytotoxic CD8 T cells in C protein-induced myositis, a murine model of polymyositis. *Arthritis Rheum* 62, 3088-3092.

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2007). A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis. *Arthritis Rheum* 56, 1304-1314.

Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S. (2006). Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 18, 1197-1209.

Sugiura, T., Kawaguchi, Y., Harigai, M., Takagi, K., Ohta, S., Fukasawa, C., Hara, M., and Kamatani, N. (2000). Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 164, 6593-6600.

Suvas, S., Azkur, A.K., Kim, B.S., Kumaraguru, U., and Rouse, B.T. (2004). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* 172, 4123-4132.

Suzuki, T., Hiromatsu, K., Ando, Y., Okamoto, T., Tomoda, Y., and Yoshikai, Y. (1995). Regulatory role of gamma delta T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal antifetal immune response. *J Immunol* 154, 4476-4484.

Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C.G. (2002). The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 169, 2461-2465.

Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203, 505-511.

Tafuri, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1995). T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270, 630-633.

Takada, K., Nagasaka, K., and Miyasaka, N. (2005). Polymyositis/dermatomyositis and interstitial lung disease: a new therapeutic approach with T-cell-specific immunosuppressants. *Autoimmunity* 38, 383-392.

Takahashi, S., Kataoka, H., Hara, S., Yokosuka, T., Takase, K., Yamasaki, S., Kobayashi, W., Saito, Y., and Saito, T. (2005). In vivo overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur J Immunol* 35, 399-407.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.

Takahata, Y., Nomura, A., Takada, H., Ohga, S., Furuno, K., Hikino, S., Nakayama, H., Sakaguchi, S., and Hara, T. (2004). CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 32, 622-629.

Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* 172, 3580-3589.

Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2006). Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 177, 7515-7519.

Takizawa, H., Shiga, J., Moroi, Y., Miyachi, S., Nishiwaki, M., and Miyamoto, T. (1987). Interstitial lung disease in dermatomyositis: clinicopathological study. *J Rheumatol* 14, 102-107.

Tan, M.C., Goedegebuure, P.S., Belt, B.A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W.E., Eberlein, T.J., Hsieh, C.S., and Linehan, D.C. (2009). Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 182, 1746-1755.

Tang, A.L., Teijaro, J.R., Njau, M.N., Chandran, S.S., Azimzadeh, A., Nadler, S.G., Rothstein, D.M., and Farber, D.L. (2008). CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4+ FoxP3+ T cell homeostasis. *J Immunol* 181, 1806-1813.

Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7, 83-92.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199, 1455-1465.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Bluestone, J.A. (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 3348-3352.

- Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* *199*, 1467-1477.
- Targoff, I.N. (2002). Laboratory testing in the diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* *28*, 859-890, viii.
- Targoff, I.N. (2008). Autoantibodies and their significance in myositis. *Curr Rheumatol Rep* *10*, 333-340.
- Targoff, I.N., Mamyrova, G., Trieu, E.P., Perurena, O., Koneru, B., O'Hanlon, T.P., Miller, F.W., and Rider, L.G. (2006). A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis Rheum* *54*, 3682-3689.
- Taylor, P.A., Noelle, R.J., and Blazar, B.R. (2001). CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* *193*, 1311-1318.
- Terracciano, C., Nogalska, A., Engel, W.K., and Askanas, V. (2010). In AbetaPP-overexpressing cultured human muscle fibers proteasome inhibition enhances phosphorylation of AbetaPP751 and GSK3beta activation: effects mitigated by lithium and apparently relevant to sporadic inclusion-body myositis. *J Neurochem* *112*, 389-396.
- Terrada, C., Fisson, S., De Kozak, Y., Kaddouri, M., Lehoang, P., Klatzmann, D., Salomon, B.L., and Bodaghi, B. (2006). Regulatory T cells control uveoretinitis induced by pathogenic Th1 cells reacting to a specific retinal neoantigen. *J Immunol* *176*, 7171-7179.
- Tews, D.S., and Goebel, H.H. (1995). Expression of cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* *59*, 185-194.
- Tews, D.S., and Goebel, H.H. (1996). Inflammatory myopathies. *Curr Opin Neurol* *9*, 375-379.
- Thewissen, M., Somers, V., Hellings, N., Fraussen, J., Damoiseaux, J., and Stinissen, P. (2007). CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* *179*, 6514-6523.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ Tregulatory cells. *J Immunol* *184*, 3433-3441.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* *188*, 287-296.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* *164*, 183-190.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H.

(1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.

Tomasova Studynkova, J., Charvat, F., Jarosova, K., and Vencovsky, J. (2007). The role of MRI in the assessment of polymyositis and dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 1174-1179.

Tonkin, D.R., and Haskins, K. (2009). Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *Eur J Immunol* 39, 1313-1322.

Tournadre, A., Lenief, V., and Miossec, P. (2010). Expression of Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 7 in muscle is characteristic of inflammatory myopathy and is differentially regulated by Th1 and Th17 cytokines. *Arthritis Rheum* 62, 2144-2151.

Tournadre, A., and Miossec, P. (2009). Chemokines and dendritic cells in inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 68, 300-304.

Trallero-Araguas, E., Labrador-Horrillo, M., Selva-O'Callaghan, A., Martinez, M.A., Martinez-Gomez, X., Palou, E., Rodriguez-Sanchez, J.L., and Vilardell-Tarres, M. (2010). Cancer-associated myositis and anti-p155 autoantibody in a series of 85 patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Medicine (Baltimore)* 89, 47-52.

Tran, D.Q., Ramsey, H., and Shevach, E.M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110, 2983-2990.

Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., *et al.* (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361-365.

Trenado, A., Charlotte, F., Fisson, S., Yagello, M., Klatzmann, D., Salomon, B.L., and Cohen, J.L. (2003). Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 112, 1688-1696.

Troyanov, Y., Targoff, I.N., Tremblay, J.L., Goulet, J.R., Raymond, Y., and Senecal, J.L. (2005). Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* 84, 231-249.

Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.

Tuovinen, H., Kekalainen, E., Rossi, L.H., Puntila, J., and Arstila, T.P. (2008). Cutting edge: human CD4-CD8- thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR. *J Immunol* 180, 3651-3654.

Uhlir, H.H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J.D., Ramsdell, F., and Powrie, F. (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* *177*, 5852-5860.

Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *blood*. 2006 Jul 1;108(1):253-61.

Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A.D., and Colombo, M.P. (2005). Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* *105*, 2845-2851.

van der Meulen, M.F., Bronner, I.M., Hoogendijk, J.E., Burger, H., van Venrooij, W.J., Voskuyl, A.E., Dinant, H.J., Linssen, W.H., Wokke, J.H., and de Visser, M. (2003). Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* *61*, 316-321.

van der Pas, J., Hengstman, G.J., ter Laak, H.J., Borm, G.F., and van Engelen, B.G. (2004). Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *75*, 136-139.

van Maren, W.W., Jacobs, J.F., de Vries, I.J., Nierkens, S., and Adema, G.J. (2008). Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology* *124*, 445-452.

van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of Treg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* *200*, 1221-1230.

Vancsa, A., Csipo, I., Nemeth, J., Devenyi, K., Gergely, L., and Danko, K. (2009). Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients. *Rheumatol Int* *29*, 989-994.

Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* *181*, 3285-3290.

Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., and Askanas, V. (2004). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am J Pathol* *164*, 1-7.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* *9*, 1341-1346.

Vencovsky, J., Jarosova, K., Machacek, S., Studynkova, J., Kafkova, J., Bartunkova, J., Nemcova, D., and Charvat, F. (2000). Cyclosporine A versus methotrexate in the treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol* *29*, 95-102.

Venturi, G.M., Conway, R.M., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2007). CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *J Immunol* *178*, 291-300.

- Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* *172*, 5986-5993.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* *199*, 971-979.
- Villalba, L., Hicks, J.E., Adams, E.M., Sherman, J.B., Gourley, M.F., Leff, R.L., Thornton, B.C., Burgess, S.H., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1998). Treatment of refractory myositis: a randomized crossover study of two new cytotoxic regimens. *Arthritis Rheum* *41*, 392-399.
- Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballos, A., Martinez, A.C., and Varona, R. (2009). CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol* *39*, 1671-1681.
- Vock, C., Hauber, H.P., and Wegmann, M. (2010). The other T helper cells in asthma pathogenesis. *J Allergy (Cairo)* *2010*, 519298.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* *159*, 565-573.
- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, P.C., Macallan, D.C., *et al.* (2006). Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* *116*, 2423-2433.
- Wagner, E. (1863). Fall einer seltenen Muskelkanheit. *Arch d heilk iv*.
- Wagner, E. (1886-7). Ein fall von acuter polymyositis. *Deutsches Archiv f klin Med Leipz xl*.
- Walker, E.J., and Jeffrey, P.D. (1988). Sequence homology between encephalomyocarditis virus protein VPI and histidyl-tRNA synthetase supports a hypothesis of molecular mimicry in polymyositis. *Med Hypotheses* *25*, 21-25.
- Walker, L.S. (2009). Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* *126*, 466-474.
- Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Dooks, H., and Abbas, A.K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* *198*, 249-258.
- Walker, U.A. (2008). Imaging tools for the clinical assessment of idiopathic inflammatory myositis. *Curr Opin Rheumatol* *20*, 656-661.
- Walsh, P.T., Buckler, J.L., Zhang, J., Gelman, A.E., Dalton, N.M., Taylor, D.K., Bensinger, S.J., Hancock, W.W., and Turka, L.A. (2006). PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. *J Clin Invest* *116*, 2521-2531.

Walsh, R.J., Kong, S.W., Yao, Y., Jallal, B., Kiener, P.A., Pinkus, J.L., Beggs, A.H., Amato, A.A., and Greenberg, S.A. (2007). Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 56, 3784-3792.

Walther, M., Tongren, J.E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R.F., Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S.J., *et al.* (2005). Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23, 287-296.

Walunas, T.L., Bakker, C.Y., and Bluestone, J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183, 2541-2550.

Wang, B., Geng, Y.B., and Wang, C.R. (2001). CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* 194, 313-320.

Wang, R., Kozhaya, L., Mercer, F., Khaitan, A., Fujii, H., and Unutmaz, D. (2009). Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13439-13444.

Waschbisch, A., Schwab, N., Ruck, T., Stenner, M.P., and Wiendl, H. (2010). FOXP3+ Tregulatory cells in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 225, 137-142.

Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW(1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8.

Weber, M.A., Jappe, U., Essig, M., Krix, M., Ittrich, C., Huttner, H.B., Meyding-Lamade, U., Hartmann, M., Kauczor, H.U., and Delorme, S. (2006). Contrast-enhanced ultrasound in dermatomyositis- and polymyositis. *J Neurol* 253, 1625-1632.

Webster, K.E., Walters, S., Kohler, R.E., Mrkvan, T., Boyman, O., Surh, C.D., Grey, S.T., and Sprent, J. (2009). In vivo expansion of Treg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med* 206, 751-760.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., *et al.* (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155-167.

Welters, M.J., Kenter, G.G., de Vos van Steenwijk, P.J., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Essahsah, F., Stynenbosch, L.F., Vloon, A.P., Ramwadhoebe, T.H., Piersma, S.J., *et al.* (2010). Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with

- kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11895-11899.
- Wendling, D., Prati, C., Ornetti, P., Toussiot, E., and Streit, G. (2007). [Anti TNF-alpha treatment of a refractory polymyositis]. *Rev Med Interne* 28, 194-195.
- Werth, V.P., Callen, J.P., Ang, G., and Sullivan, K.E. (2002). Associations of tumor necrosis factor alpha and HLA polymorphisms with adult dermatomyositis: implications for a unique pathogenesis. *J Invest Dermatol* 119, 617-620.
- Whitmore, S., Rosenshein, N., and Provost, T. (1994). Ovarian cancer in patients with dermatomyositis. *Medicine (Baltimore)* 60-73.
- Wieman, H.L., Wofford, J.A., and Rathmell, J.C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell* 18, 1437-1446.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Lochmuller, H., Melms, A., and Weller, M. (2003). Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *Faseb J* 17, 1892-1894.
- Wilkes, M.R., Sereika, S.M., Fertig, N., Lucas, M.R., and Oddis, C.V. (2005). Treatment of antisynthetase-associated interstitial lung disease with tacrolimus. *Arthritis Rheum* 52, 2439-2446.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.
- Witkiewicz, A., Williams, T.K., Cozzitorto, J., Durkan, B., Showalter, S.L., Yeo, C.J., and Brody, J.R. (2008). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. *J Am Coll Surg* 206, 849-854; discussion 854-846.
- Wohlfert, E.A., and Clark, R.B. (2007). 'Vive la Resistance!'--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression. *Trends Immunol* 28, 154-160.
- Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstien, B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 606-612.
- Wolf, M., Schimpl, A., and Hunig, T. (2001). Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* 31, 1637-1645.

Xu H, Zhang GX, Ciric B, Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett.* 2008

Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178, 6725-6729.

Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., *et al.* (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 1643-1656.

Yamasaki, Y., Yamada, H., Yamasaki, M., Ohkubo, M., Azuma, K., Matsuoka, S., Kurihara, Y., Osada, H., Satoh, M., and Ozaki, S. (2007). Intravenous cyclophosphamide therapy for progressive interstitial pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 46, 124-130.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-247.

Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., *et al.* (2008). CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 181, 8391-8401.

Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352.

Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., *et al.* (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109, 4368-4375.

Yazici, Y., and Kagen, L. (2000). The association of malignancy with myositis. *Curr Opin Rheumatol*, 498-500.

Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., *et al.* (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.

Yu, P., Gregg, R.K., Bell, J.J., Ellis, J.S., Divekar, R., Lee, H.H., Jain, R., Waldner, H., Hardaway, J.C., Collins, M., *et al.* (2005a). Specific Tregulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol* 174, 6772-6780.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H., and Fu, Y.X. (2005b). Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 201, 779-791.

Zantos, D., Zhang, Y., Felson, D., and (1994;). The overall and temporal association of cancer with polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol*, 1855-1859.

- Zeiser, R., Leveson-Gower, D.B., Zambricki, E.A., Kambham, N., Beilhack, A., Loh, J., Hou, J.Z., and Negrin, R.S. (2008). Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood* *111*, 453-462.
- Zhang, B., Zhang, X., Tang, F., Zhu, L., and Liu, Y. (2008). Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* *153*, 182-187.
- Zhang, N., Schroppe, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J.C., Ding, Y., *et al.* (2009). Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* *30*, 458-469.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* *92*, 83-92.
- Zheng, X., Gao, J.X., Chang, X., Wang, Y., Liu, Y., Wen, J., Zhang, H., Zhang, J., and Zheng, P. (2004). B7-CD28 interaction promotes proliferation and survival but suppresses differentiation of CD4-CD8- T cells in the thymus. *J Immunol* *173*, 2253-2261.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* *10*, 1000-1007.
- Zorn, E., Nelson, E.A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R.J., *et al.* (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* *108*, 1571-1579.