



**HAL**  
open science

## Recherche de thérapies innovantes dans un modèle murin de myopathies inflammatoires

Nicolas Prevel

► **To cite this version:**

Nicolas Prevel. Recherche de thérapies innovantes dans un modèle murin de myopathies inflammatoires. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066569 . tel-01333630

**HAL Id: tel-01333630**

**<https://theses.hal.science/tel-01333630>**

Submitted on 18 Jun 2016

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

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



Institut de myologie  
Muscle Inflammatoire, UMRS 974, UPMC-  
INSERM  
Hôpital de la Pitié Salpêtrière  
105, bd de l'hôpital -75651 Paris Cedex 13

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

Spécialité Immunologie

**Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie**

Présentée par  
**Nicolas PREVEL**

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

**Recherche de thérapies innovantes dans un modèle murin de myopathies inflammatoires**

Soutenue le 16 juin 2014 devant le jury composé de :

<b>M. Thomas VOIT:</b>	<b>Président</b>
<b>M. Olivier BENVENISTE :</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. Olivier BOYER:</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Werner STENZEL:</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. Rozen LEPANSE:</b>	<b>Examinatrice</b>

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6  
Bureau d'accueil, inscription des doctorants  
Esc. G, 2<sup>ème</sup> étage  
15 rue de l'école de médecine  
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 44 27 28 10

Fax : 01 44 27 23 95

Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 44 27 28 07

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

Spécialité Immunologie

**Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie**

Présentée par  
**Nicolas PREVEL**

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

**Recherche de thérapies innovantes dans un modèle murin de myopathies inflammatoires**

**Thèse dirigée par le Professeur Olivier Benveniste**

Soutenue le 16 juin 2014 devant le jury composé de :

<b>M. Thomas VOIT:</b>	<b>Président</b>
<b>M. Olivier BENVENISTE :</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. Olivier BOYER:</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Werner STENZEL:</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. Rozen LEPANSE:</b>	<b>Examinateur</b>

## TRAVAUX DE THESE

Mes travaux de thèse ont fait l'objet de:

### ARTICLE PUBLIÉ

#### **Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
PLoS One. 2013 Nov 12;8(11):e74450.

### ARTICLE SOUMIS

#### **Intravenous immunoglobulin decreases experimental autoimmune myositis by Th2 pathway**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, Louiza Arouche-Delaperche, Damien Amelin, Gillian Butler Browne, Benveniste Olivier  
Soumis à J NeuroImmunol,

### TRAVAUX EN COURS

#### **Preventive effect of Arsenic Trioxyde in model of Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Damien Amelin, Louiza Arouche-Delaperche, Yves Allenbach, Benveniste Olivier

### COMMUNICATIONS ORALES

#### **Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
*2nd French-Israeli workshop on Regulatory T cells, Tolerance & Immunotherapy, Jerusalem, Israel, 31 October – 1 November 2011*

**Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
*2012 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, D.C., November 9-14, 2012*

COMMUNICATIONS ÉCRITES

**Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
*World Muscle society 2011, October 18-22, Almancil, Portugal, 2011*

**Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
*4e Congrès international de Myologie, 9 au 13 MII 2011, Lille*

<b>TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>3</b>
ARTICLE PUBLIE .....	3
ARTICLE SOUMIS.....	3
TRAVAUX EN COURS.....	3
COMMUNICATIONS ORALES .....	3
COMMUNICATIONS ECRITES .....	4
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>IMUNNITÉ ADAPTATIVE ET CELLULES REGULATRICES.....</b>	<b>10</b>
<b>I. IMMUNITE ADAPTATIVE : LA DISTINCTION SOI ET NON SOI.....</b>	<b>10</b>
A. <i>La tolérance centrale</i> .....	11
B. <i>La tolérance périphérique</i> .....	12
1. L'ignorance .....	13
2. L'anergie.....	14
3. La délétion périphérique .....	15
4. Les mécanismes passifs de la tolérance musculaire:.....	15
C. <i>Tregs: Les mécanismes actifs de la tolérance</i> .....	16
1. Historique des Tregs .....	16
2. La reconnaissance des Tregs chez l'homme .....	17
a. Le CD127 .....	17
b. Integrines et autres récepteurs aux chimiokines.....	18
c. GITR.....	18
d. Marqueurs de fonctions suppressives.....	18
3. L'ontogénie des Tregs naturels et induits.....	19
4. Tregs dans les compartiments cellulaires .....	21
a. Tregs sortant du thymus .....	21
b. L'entrée dans le ganglion, CCR7 et CD62L.....	21
c. L'anergie des Tregs .....	22
d. Prolifération des Tregs ganglionnaires à l'homéostasie.....	22
e. Tregs naïfs et mémoires .....	23
5. Les Tregs induits en périphérie.....	24
a. Induction de Tregs FoxP3 <sup>+</sup> avec l'IL-10 et de l'IL-35 .....	24
b. Tregs induits FoxP3 <sup>+</sup> et le TGF-β .....	25
<b>LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS : MECANISMES D'ACTION .....</b>	<b>26</b>
A. <i>Les conditions d'action des Tregs et l' « effet bystander »</i> .....	26
B. <i>L'importance des interactions entre Tregs et Tconv</i> .....	27
C. <i>La mort cellulaire des Tconv induites par les Tregs</i> .....	27
D. <i>Le blocage métabolique des Tconv induits par les Tregs</i> .....	28
E. <i>L'inhibition des Tconv par les Tregs contact-dépendant</i> .....	29
F. <i>Production de cytokines inhibitrices pas les Tregs</i> .....	29
G. <i>Physiopathologie des Tregs</i> .....	30
1. Régulation de l'auto-immunité à l'état basal:.....	31
2. Rôle des Tregs dans l'allo-immunité et la tolérance foeto-maternelle.....	32
3. Régulation des réponses anti-infectieuses.....	33
4. Régulation des réponses anti-tumorales .....	33
5. Les molécules importantes pour l'homéostasie des Tregs à l'état basal.....	34

a.	Les cytokines indispensable aux Tregs .....	34
i.	IL-2.....	34
ii.	IL-15/IL-7.....	35
b.	La famille CD28.....	36
i.	CD28 : une voie de co-stimulation critique dans l'homéostasie des Tregs.....	36
ii.	CTLA-4 contrôle la fonction des Tregs <i>in vivo</i> .....	36
iii.	ICOS.....	37
iv.	La voie PD-1/PDL-1-2.....	37
c.	Les voies de signalisation des Tregs intracellulaires: PI3K/Akt/mTOR et JAK3/STAT-5.....	38
<b>LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES IDIOPATHIQUES .....</b>		<b>40</b>
I.	CLINIQUE.....	40
a.	Epidémiologie et facteurs de prédisposition.....	42
b.	Les manifestations musculaires .....	43
c.	Expression extra-musculaire squelettique .....	45
i.	Expression extra-musculaire .....	45
ii.	Anticorps associés aux myosites.....	46
1)	La polymyosite et les auto-anticorps.....	47
2)	La dermatomyosite et les auto-anticorps.....	48
3)	Anticorps et myopathie nécrosante auto-immune .....	49
4)	Anticorps et myosite à inclusion.....	50
II.	PHYSIOPATHOLOGIE DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES .....	50
1.	Immunité Innée et les cellules présentatrice d'Ag .....	50
2.	Cellules musculaires comme CPA .....	51
3.	Profil cytokinique .....	52
4.	Les mécanismes de dégénérescences musculaires .....	53
5.	Modèle murin de myopathies inflammatoires .....	54
6.	Traitement des myopathies inflammatoires.....	57
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....</b>		<b>59</b>
<b>RESULTATS.....</b>		<b>60</b>
ARTICLE 1 .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	
ARTICLE 2 .....		73
ARSENIC TRIOXYDE DANS LA MAE.....		97
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>100</b>
LE MODELE ANIMAL.....		101
L'EFFET DE LA RAPAMYCINE .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	
RAPAMYCINE ET MYOSITE A INCLUSION .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	
L'EFFET DES IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUX .....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	
CONCLUSION.....	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>	
<b>REFERENCES .....</b>		<b>110</b>
<b>RESUME.....</b>		<b>139</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**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

**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<sup>+</sup>

**Tregs:** lymphocyte T régulateur

**Th:** *T helper cell pour lymphocyte T auxiliaire*

**TNF  $\alpha$  :** *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

**TCR:** *T cell receptor*

**TGF:** *Transforming Growth Factor*

**TLR:** *Toll-Like Receptor*

**TNF:** *Tumor Necrosis Factor*

## **INTRODUCTION**

## **IMMUNITÉ ADAPTATIVE ET CELLULES REGULATRICES**

Les myosites, comme toutes les autres maladies auto-immunes, interrogent sur la raison de la rupture de la tolérance. Pourquoi un tissu du soi, comme le muscle est-il reconnu comme étranger ?

Dans une première partie, nous décrirons comment le système immunitaire différencie le soi et le non soi puis les mécanismes de tolérance immunitaire, notamment le rôle des lymphocytes T régulateurs. Dans une seconde partie, nous décrirons la physiopathologie des myosites.

### **I. IMMUNITÉ ADAPTATIVE : LA DISTINCTION SOI ET NON SOI**

L'immunité innée fait appel à des cellules capables de répondre rapidement à une infection. Elle reconnaît des éléments communs à plusieurs pathogènes, les PAMPS (« Pathogen Associated Molecular Patterns ») par ses récepteurs PRR (« Pattern Recognition Receptors »). C'est un système de réponse rapide aux agressions et est la première ligne de défense. Il est composé de cellules dendritiques (DC), de cellules Natural Killer (NK), de macrophages, monocytes et de granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes). Ces cellules ne sont pas douées de mémoire immunitaire, et même si leur action est rapide, elle ne sert souvent que de première défense, en attendant l'intervention du système immunitaire adaptatif.

L'immunité adaptative fait appel aux lymphocytes B (B) et lymphocyte T (T). Elle permet la reconnaissance des antigènes par leur récepteur spécifique (respectivement le BCR pour le B et le TCR pour le T). 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).

## A. LA TOLERANCE CENTRALE

La tolérance centrale permet au TCR et au BCR de distinguer le soi du non-soi. Elle est effectuée dans le thymus pour les T et dans la moelle osseuse pour les B. Nous décrivons ici uniquement la tolérance centrale des T car elle est prépondérante dans les myosites et surtout dans notre modèle animal, contrairement aux lymphocytes B. Le TCR du T doit reconnaître de façon spécifique un épitope présenté par le CMH. La sélection des T se déroule en 2 étapes (Figure 1). Tout d'abord, les T après réarrangement de leur TCR, reconnaissent sur les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) un peptide avec leur CMH. Seuls les T porteur de TCR ayant une affinité modérée 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. La deuxième étape est la sélection négative pour empêcher la circulation de T ayant une trop forte affinité pour le TCR, avec des risques d'auto-immunité. Les TCR ayant une trop forte affinité seront éliminés dans le thymus (Gallegos and Bevan, 2004).

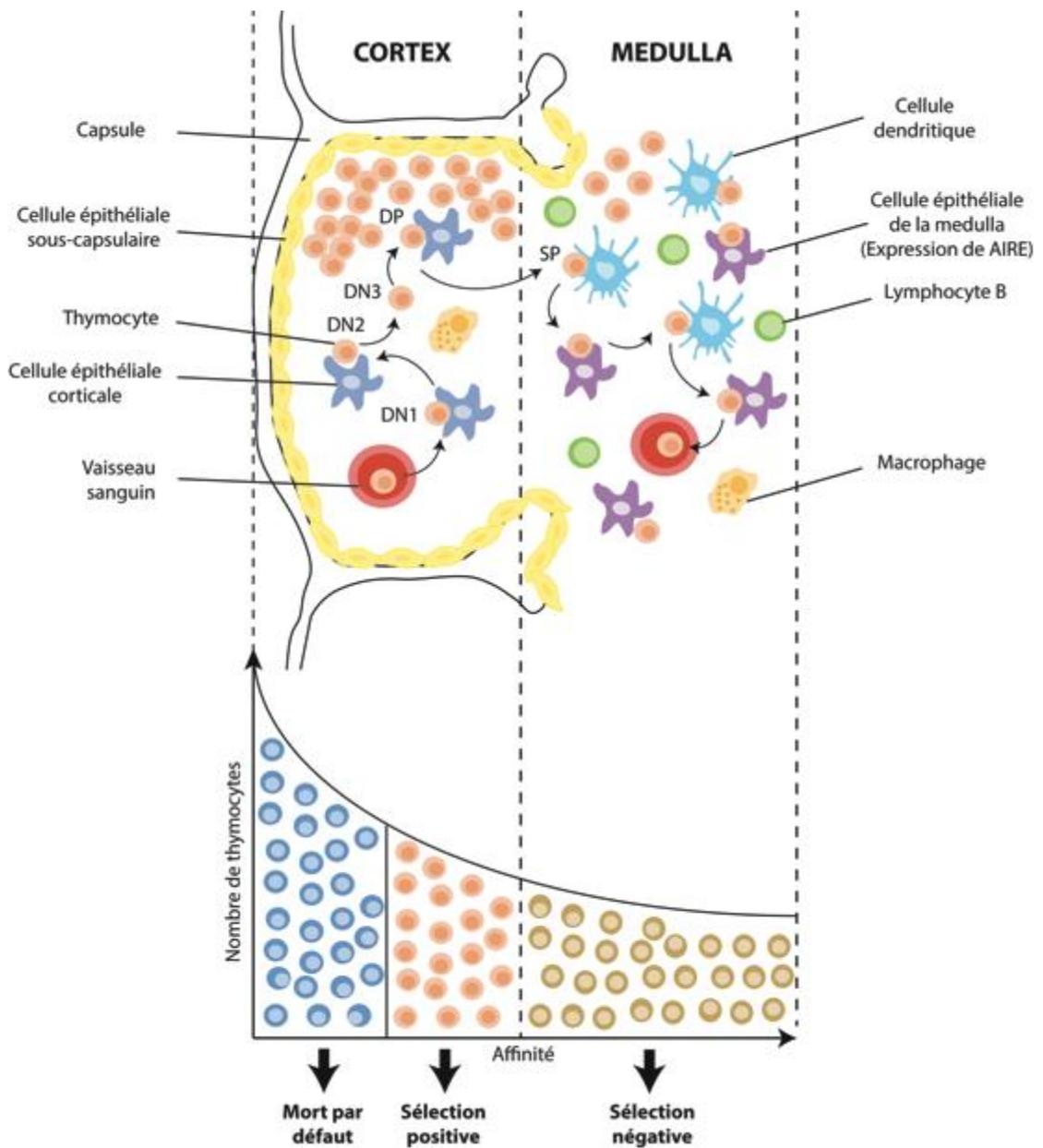


Figure 1: La Tolérance centrale

### B. LA TOLERANCE PERIPHERIQUE

Malgré ces mécanismes, ils existent des cellules circulantes auto-réactives (Huizinga et al. 2009). Cependant, dans des conditions physiologiques normales, l'organisme est capable de contrôler ces lymphocytes grâce à plusieurs mécanismes.

## 1. L'ignorance

Ils existent des sites dits « immuno-privilégiés ». Certains tissus sont en effet difficiles d'accès pour les cellules du système immunitaire en raison de barrière physique (par exemple barrière hémato-encéphalique) et les antigènes tissulaires ne sont pas présentés par les CPA dans les organes lymphoïdes secondaires drainant le tissu concerné. On parle alors d'ignorance.

Cependant, il semble aujourd'hui que des Ag issus de sites immuno-privilégiés puissent être présentés aux T. Mais l'absence de réponse inflammatoire serait due à des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- $\beta$  ou des molécules comme Fas-ligand présentes dans les sites immuno-privilégiés. En effet, dans les sites immuno-privilégiés, il est possible de greffer un tissu allogénique sans provoquer de rejet (Gores et al., 2003).

A l'état physiologique, les fibres musculaires n'expriment pas le CMH-I à un niveau détectable (Pavlath, 2002; Singer et al., 1997). De fait, le tissu musculaire pourrait être ignoré. Il faut souligner ici que le tissu musculaire ne peut être considéré comme un site immun privilégié car il n'en possède pas les caractéristiques anatomiques comprenant une exclusion du réseau lymphatique. De plus, l'expression de CMH-I est observée sur les fibres musculaires, au cours des myopathies auto-immunes (Dalakas, 1991) permettant ainsi la présentation des antigènes aux CPA ou aux T.

Il a pu être effectivement montré *in vitro* que l'expression du CMH-I pouvaient être induite sur des fibres musculaires en cultures quand elles sont cultivées en présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou IL-1 (Nagaraju et al., 1998); (Marino et al., 2001; Pavlath, 2002). Pour autant, pour que les T spécifiques de l'antigène n'atteignent pas leur cible, il faut que les conditions de leur migration soient réunies.

Dans un murin transgénique, Des expériences ont montré qu'il y avait dans les ganglions drainants de tissu cutané où était exprimé de façon spécifique l'antigène OVA (sous la dépendance d'un promoteur cutané), une prolifération de T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène OVA (lignée OT-II). Néanmoins, dans ce modèle expérimental, les T CD4<sup>+</sup> spécifiques ne sont pas capable de se rendre dans le tissu cutané. En revanche, la migration lymphocytaire T

devient possible si une inflammation cutanée est provoquée (Bianchi et al., 2009). Cette expérience rappelle que la réaction immunitaire inflammatoire ne peut avoir lieu qu'après une étape de stimulation impliquant d'une part la reconnaissance de l'antigène et d'autre part, des signaux d'activation (signaux de danger)

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, il n'y a pas de prolifération lymphocytaire, on parle ici d'anergie.

## 2. L'anergie

Le concept d'anergie a bien été illustré par des expériences chez l'animal. Des travaux utilisant l'expression transgénique d'ilots  $\beta$  par la cellule pancréatique ont montré que le transfert de T conventionnels (Tconv) spécifiques d'une protéine virale pouvait induire la destruction de ces ilots si on induisait l'expression de la protéine B7 ou de la protéine virale. Inversement, ce transfert ne crée pas de destruction pancréatique dans la souris simple transgénique B7 ou simple transgénique pour la protéine virale (Harlan et al., 1994). L'activation d'un lymphocyte T sans second signal conduit donc à l'anergie, il ne prolifère pas.

Les signaux de danger comme les PAMPs, que délivrent les agents infectieux, sont reconnus spécifiquement par les PRR. Par exemple, les TLR (pour « Toll Like Receptors »), appartenant à famille des PRR, sont des acteurs centraux de la défense contre les pathogènes. En reconnaissant les PAMPs, ils induisent une réponse immunitaire innée et adaptative contre les pathogènes (van Maren et al., 2008). En particulier, grâce à leur capacité d'augmenter le niveau d'expression de CD80/86, ils permettent l'induction d'une réponse inflammatoire (Garza et al., 2000).

Il existe cependant un seuil d'activation qui, s'il n'est pas franchi, induit une anergie lymphocytaire. Cependant, l'anergie est réversible puisqu'elle peut être remplacée *in vitro* par un état cellulaire activé si de fortes doses d'IL-2 sont ajoutées ainsi que des molécules de co-stimulation (Schwartz et al. 1990).

### **3. La délétion périphérique**

Pour compléter les mécanismes d'ignorance et d'anergie, il existe un phénomène dit de « délétion » pour supprimer définitivement les T auto-réactifs. Ce mécanisme implique l'interaction entre les molécules Fas et FasL présentes sur les T et les CPA (Kurts et al., 1998; Suda et al., 1993). L'apoptose est induite après l'activation de Fas à la surface des T via Bim, un facteur pro-apoptotique (Davey et al., 2002).

### **4. Les mécanismes passifs de la tolérance musculaire:**

Un nombre restreint de travaux ont été effectués spécifiquement sur la tolérance musculaire. L'équipe de Boyer et coll. a mis au point une souris double transgénique (Calbo et al., 2008) exprimant à la fois l'antigène OVA et ce spécifiquement dans le tissu musculaire (SM-OVA) croisée avec des souris ayant un TCR spécifique pour OVA (OTI/II). Ces souris OT-SM-OVA ne développent pas de réponses auto-immunes musculaires car un mécanisme de tolérance sur les CD4<sup>+</sup> spécifiques se met en place secondairement à un mécanisme d'ignorance. En effet, il est possible de détecter en périphérie ces cellules. *In vitro*, ces cellules prolifèrent si l'on ajoute au milieu de culture OVA. De plus, la surexpression de PD-1 (« Program cell death ») sur les CD8<sup>+</sup> inhibe leurs fonctions cytotoxiques. Il existe donc d'autres mécanismes que ceux cités ci-dessus.

### C. TREGS: LES MECANISMES ACTIFS DE LA TOLERANCE

Outre l'ignorance, l'anergie et la déplétion, il existe un autre système de régulation de la réponse auto-immune impliquant des cellules régulatrices spécialisées. On considère que les cellules régulatrices principales sont les T CD4<sup>+</sup> régulateurs (Tregs).

Cependant, il faut citer l'existence d'autres cellules régulatrices dont l'importance dans les mécanismes de tolérance semble moindre : les lymphocytes B régulateurs, les cellules NKT, T CD8<sup>+</sup> régulateurs et les lymphocytes T  $\gamma$   $\delta$  et les cellules mésenchymateuses.

#### 1. Historique des Tregs

La première expérience montrant l'existence de cellules immunorégulatrices thymiques remonte à 1969. Dans ce travail, des souris âgées de 3 jours sont thymectomisées. Cela entraîne de nombreuses manifestations auto-immunes qui peuvent être bloquées par le transfert de T CD4<sup>+</sup> de souris normales (Nishizuka and Sakakura, 1969) ; (Gershon and Kondo, 1970).

S. Sakaguchi sera le premier à découvrir un marqueur membranaire CD5 pour ces cellules régulatrices dans les années 80,. Il utilisa dans ses expériences des souris immunodéficientes (athymique: « Nude »). Il démontra que la reconstitution du système immunitaire par le transfert de cellule T CD5<sup>fort</sup> ne crée aucune pathologie. A l'inverse, le transfert de T CD5<sup>faible</sup> permettait l'apparition de manifestations auto-immunes létales. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une population lymphocytaire T capable de contrôler les réponses auto-réactives (cellules T CD5<sup>fort</sup> régulatrices) et de prouver qu'il existe à l'état basal des T auto-réactifs circulants (Sakaguchi et al., 1985).

L'équipe de Sakaguchi découvrit ensuite un marqueur plus spécifique des cellules régulatrices, le CD25. Il s'agit plus précisément du récepteur de haute affinité à l'IL-2, la sous-unité  $\alpha$ . Avec une approche similaire à son premier papier, il démontra que les cellules régulatrices étaient CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Sakaguchi et al., 1995). Cependant, il fut démontré que le CD25 n'est pas exprimé uniquement sur les Tregs. Il est exprimé de façon transitoire sur les

Tconv après leur activation (Kuniyasu et al., 2000) mais son expression reste inférieure à celle des Tregs qui le garde toujours à un niveau élevé (Fisson et al., 2003).

Le premier marqueur spécifique des Tregs sera finalement FoxP3 (« Forkhead Box Protein 3 »). Son rôle a été montré chez les souris « scurfy » (Godfrey et al., 1991) et chez l'homme souffrant du syndrome IPEX (« Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome »). Dans les 2 cas, on observe un déficit d'expression de FoxP3 lié à une anomalie génétique dans le gène *FoxP3* (Bennett et al., 2001). Cela induit de l'auto-immunité et des allergies importantes, similaires à celles observées après déplétion des T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Bennett et al., 2001).

Il fut démontré que FoxP3 est exprimé fortement par les Tregs (Yagi et al., 2004). De plus, son expression induite dans des Tconv leur donne des propriétés immunorégulatrices (Hori et al., 2003). Chez l'homme, FoxP3 n'est pas totalement un marqueur spécifique des Tregs. En effet, il existe des Tregs qui n'expriment pas FoxP3 et après stimulation de leur TCR, des Tconv peuvent l'exprimer (Tran et al., 2007).

Chez la souris, FoxP3 est plus spécifique des Tregs. Cependant, le marquage FoxP3 est intra nucléaire, ce qui entraîne la mort cellulaire. Pour pouvoir trier ces cellules sans perméabilisation, on peut se contenter des marqueurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>fort</sup> qui permettent une bonne sélection des Tregs, mais il y aura probablement une contamination en Tconv activés exprimant CD25. Le meilleur moyen aujourd'hui pour trier ces cellules est d'utiliser des souris « *Knock'in* FoxP3-GFP » permettant de sélectionner les Tregs sur la base d'une fluorescence verte lié à l'expression de FoxP3 dans la cellule.

## **2. La reconnaissance des Tregs chez l'homme**

### *a. Le CD127*

Chez l'homme, FoxP3 ou CD25 ne sont pas suffisant pour une bonne distinction des Tregs. Le marqueur CD127 (récepteur de l'IL-7) est une cible intéressante car les cellules CD127<sup>+</sup> ont une expression de FoxP3 forte et des fonctions immunosuppressives importantes (Seddiki

et al., 2006a). Malgré cela, des expériences ont montré que les Tconv aussi, pouvaient baisser l'expression de CD127 rendant son utilisation pour définir les Tregs moins intéressantes (Mazzucchelli and Durum, 2007); (Aerts et al., 2008).

#### *b. Integrines et autres récepteurs aux chimiokines*

Une autre approche chez l'homme serait d'utiliser le CD62L (L sélectine). En combinant plusieurs marqueurs membranaires dont CD62L et CD127 on peut différencier les Tregs des Tconv. Le marquage  $CD4^+ CD25^+ CD127^- CD62L^+$  permet de distinguer de manière plus spécifique les Tregs des Tconv activés qui sont  $CD62^{\text{faible}}$  (Hamann et al., 2000). Aujourd'hui, beaucoup d'intégrines ont été observées à la surface des Tregs. Cependant, aucune ne permet une bonne différenciation entre les Tregs et les Tconv. De plus, il existe une grande diversité dans la population Tregs qui complexifie leur analyse.

#### *c. GITR*

Le GITR (« glucocorticoid-induced TNFR-related protein ») est une protéine exprimée de façon constante à la surface des Tregs comme pour CTLA-4 (« Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 »). Néanmoins, cette expression ne permet pas de séparer les Tregs des Tconv activés (Fontenot et al., 2003). Nous pouvons aussi noter que pour différencier les Tregs activés, la protéine GARP (« Glycoprotein A repetitions predominant, ») semble intéressante (Wang et al., 2009a).

#### *d. Marqueurs de fonctions suppressives*

Des protéines ayant des fonctions suppressives sont aussi retrouvées à la surface des Tregs. On peut distinguer notamment CTLA-4 et ICOS (« Integrated Carbon Observation System »). Mais, comme discuté précédemment pour d'autres marqueurs, on peut aussi détecter ces

protéines à la surface des Tconv activés. Néanmoins, ICOS permet la distinction entre deux populations distinctes de Tregs. Les ICOS<sup>-</sup> qui sécrètent du TGF $\beta$  et les ICOS<sup>+</sup> qui sécrètent de l'IL-10 (Ito et al., 2008).

### 3. L'ontogénie des Tregs naturels et induits

Après avoir décrits les marqueurs importants des Tregs, nous allons différencier les Tregs en deux groupes distincts. Les Tregs naturels (nTregs) provenant du thymus qui sont dès leur création suppresseurs et les iTregs induits en périphérie à partir de Tconv. Il faut noter que la grande majorité des Tregs circulants sont d'origines thymiques.

Une thymectomie précoce induit une auto-immunité létale chez la souris, montrant l'origine des Tregs naturels (Nishizuka and Sakakura, 1969). Dans le même sens, l'injection de cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> prévient la survenue des manifestations auto-immunes chez les souris immunodéficientes (Itoh et al., 1999; Sakaguchi et al., 1995). Les Tregs sont détectables en périphérie au bout du 3<sup>ème</sup> jour chez la souris (Fontenot et al., 2005).

Dans la littérature, les premières cellules exprimant FoxP3 sont décrites chez les simples positifs CD4<sup>+</sup> (Fontenot et al., 2005). Des expériences suggèrent que les Tregs sont créés dans la médullaire thymique (Jordan et al., 2001) grâce notamment à AIRE (« autoimmune regulator »), un facteur de transcription qui permet aux cellules médullaires du thymus (mTEC) l'expression d'un nombre conséquent d'antigènes (Aschenbrenner et al., 2007);(Klamp et al., 2006). D'ailleurs, les animaux développent des maladies auto-immunes avec l'inactivation de ce gène (Anderson et al., 2002).

Comme pour les Tconv, l'identification par le TCR du complexe CMH-peptide est obligatoire pour les Tregs. Il a été démontré que les Tregs ont une forte affinité avec leur antigène spécifique (Simons et al., 2010). Des expériences menées dans un modèle murin ayant un TCR anti-A, ont montré une augmentation du nombre de Tregs si l'antigène A est exprimé dans le thymus (D'Cruz and Klein, 2005). Dans le même sens, le nombre de Tregs augmente dans des souris TCR-HA si l'on introduit un lentivirus exprimant HA dans le thymus (Marodon et al., 2006).

Cependant le TCR n'est pas seul. Les signaux de co-stimulation sont aussi prépondérants à la genèse des Tregs. Il a été démontré dans des souris CD80/86<sup>-/-</sup> ou son ligand CD28<sup>-/-</sup>, ce qui entraîne un nombre restreint de Tregs circulants (Salomon et al., 2000); (Tang et al., 2003).

En plus de ces facteurs de co-stimulation, des cytokines jouent aussi un rôle déterminant pour les nTregs, notamment l'IL-2 et l'IL-15. Dans des souris déficientes en IL-2 dans le thymus, le nombre de Tregs est réduit de 50% (Burchill et al., 2007); (D'Cruz and Klein, 2005), si l'on ajoute la suppression de l'IL-15, le nombre de Tregs circulant est inexistant (Vang et al., 2008). L'IL-15 permet en partie la génération de nTregs en absence d'IL-2 car elle se fixe sur le même récepteur que l'IL-2 (CD122-CD132) (Pandiyana and Lenardo, 2008) en induisant la même signalisation intracellulaire via la voie STAT-5 (« Signal Transducer and Activator of Transcription 5 »). Ce facteur de transcription est lui aussi indispensable pour l'ontogénie des nTregs. Sa délétion entraîne une disparition des nTregs chez la souris (Yao et al., 2007). Pour l'activation du gène *foxp3*, la fixation de STAT-5 est indispensable, dans des souris dépourvues de récepteur à l'IL-2 et l'IL-15, il a été montré que l'expression induite de ce facteur de transcription permettait le retour à un nombre normal de Tregs (Burchill et al., 2007).

Outre ces deux cytokines, le TGF  $\beta$  (« Transforming growth factor beta ») joue un rôle important. Dans des souris, la déplétion de son récepteur entraîne une forte diminution à la naissance des nTregs. Néanmoins, le taux de nTregs revient rapidement à la normale grâce notamment à une surexpression de l'IL-2. Comme pour l'IL-2 et l'IL15, si l'on supprime le TGF  $\beta$  et l'IL-2, on ne retrouve pas de nTregs en périphérie (Liu et al., 2008).

#### 4. Tregs dans les compartiments cellulaires

Nous allons maintenant nous intéresser aux Tregs après la sortie du thymus dans un état physiologique basal.

##### a. *Tregs sortant du thymus*

Les Tregs humains ont un phénotype assez homogène quand on les extrait du sang de cordon, avec un phénotype majoritairement naïf ( $CD45RA^+ CD62L^+ CCR7^+$ ) (Fritzsching et al., 2006a; Seddiki et al., 2006b). A l'inverse, chez des patients plus âgés, leur phénotype est plus diversifié (Miyara et al., 2009) du à l'activation d'une partie d'entre eux après la rencontre avec leur antigène permettant une très grande variété de sous populations Tregs ayant des fonctions, des phénotypes et des sites de résidence différents.

##### b. *L'entrée dans le ganglion, CCR7 et CD62L*

Comme pour les Tconv, la reconnaissance de l'antigène spécifique a lieu dans les ganglions drainants par la reconnaissance de l'antigène par le TCR. L'adressage des Tregs se fait grâce aux intégrines qui permettent l'entrée dans les ganglions.

Une des molécules les plus importantes est l'intégrine CD62L (L-Selectine) pour la migration lymphocytaire T dans les organes lymphoïdes secondaires. Contrairement aux souris sauvages, les souris  $CD62L^{-/-}$  ont un nombre de Tregs très faibles (Venturi et al., 2007). De même, pour guérir une GVH, l'utilisation de nTregs  $CD62L^{fort}$  est plus efficace que l'utilisation de nTreg  $CD62L^{faible}$  (Szanya et al., 2002) ainsi que dans la souris NOD, un modèle de diabète (Ermann et al., 2005).

Le « C-C chemokine receptor type 7 » (CCR7): récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21 est aussi important pour les fonctions régulatrices que l'adressage ganglionnaire des Tregs. Son absence empêche les Tregs de contrôler une colite (Schneider et al., 2007). CCR7 est

remplacé par « C-X-C chemokine receptor type 5 » (CXCR5) après l'activation des Tregs, cette chimiokine permet sa migration vers les follicules B et empêche une réaction des cellules B induite par les CD4 conv (*Lim et al., 2004*).

#### c. *L'anergie des Tregs*

Des études *in vitro* ont montré en premier lieu que les Tregs étaient anergiques (*Takahashi et al., 1998*). On n'observe pas de prolifération des Tregs après stimulation par leur TCR (via un anti-CD3), cette anergie peut être levée si l'on ajoute dans le milieu de culture des molécules de co-stimulation (anti-CD28) (*Nakamura et al., 2001*) ou de l'IL-2 (que les Tregs sont incapables de produire) (*Thornton and Shevach, 1998*), ou de manière plus physiologique avec l'ajout de DC dans le milieu (*Yamazaki et al., 2003*). La prolifération des Tregs n'est possible qu'avec des seconds signaux d'activation après celui du TCR.

#### d. *Prolifération des Tregs ganglionnaires à l'homéostasie*

Dans les ganglions, il existe majoritairement deux populations de Tregs dans un état physiologique normal, des Tregs naïfs et des Tregs activés notamment avec le marqueur d'activation, le CD44<sup>fort</sup> ce qui signifierait que ces Tregs ont déjà rencontré leur antigène (*Lee et al., 2007*); (*Huehn et al., 2004*). Ils ont de plus, une prolifération supérieure aux Tregs naïfs (*Min et al., 2007*).

Dans une souris exprimant HA ou OVA spécifiquement dans le pancréas, les Tregs transférés spécifiques anti-HA ou anti-OVA prolifèrent de manière plus soutenue dans les ganglions pancréatiques et de manière comparable au Tconv (*Fisson et al., 2003; Walker et al., 2003*) en l'absence d'inflammation. Chez une souris sauvage, on observe grâce à l'injection de BrdU, agent intercalant de l'ADN, une prolifération de certains Tregs. De plus, ces Tregs en division expriment fortement CD44 (*Fisson et al., 2003*) et on peut supposer qu'ils sont comme certains Tconv auto-réactifs (*Darrasse-Jeze et al., 2009a*).

Ainsi, l'ensemble de ces études émet l'hypothèse d'une population de Tregs auto-réactifs, permettant le contrôle de potentielles réponses auto-immunes venant des Tconv auto-réactifs.

### e. *Tregs naïfs et mémoires*

Les données chez la souris ont donc montré qu'il existait une population de Tregs en constante activation. Elles ont permis chez l'homme une meilleure différenciation des Tregs.

A l'état basal, une population Tregs  $CD4^+ CD25^+ CD45RA^+ FOXP3^{faible}$  est observée (Miyara et al., 2009). Il existe aussi une population Tregs exprimant CD45RO ayant un phénotype mémoire. A noter que le CD45RA peut aussi être présent sur certain Tregs activés. Initialement, tous les Tregs ont un phénotype naïf,  $CD4^+ CD25^+ CD45RA^+ FOXP3^{faible}$  comme cela est observé dans le sang de cordon maternel (Fritzsching et al., 2006b). Ces Tregs expriment aussi le CD31, montrant qu'ils ont quitté le thymus récemment (Ito et al., 2008). Ces cellules n'expriment pas le marqueur Ki67, que l'on observe uniquement dans les cellules en prolifération stimulées par leur TCR (Miyara et al., 2009).

Aux Tregs naïfs ou au repos, on oppose les Tregs  $CD45RO^+ CD25^{fort} FoxP3^{fort}$  issus de la population naïve  $CD4^+ CD25^+ CD45RA^+ FOXP3^{faible}$ . Ces cellules prolifèrent peu *in vitro* après stimulation de leur TCR (elles sont anergiques (Jonuleit et al., 2001) et s'engagent dans une voie apoptotique (Fritzsching et al., 2005). *In vivo*, ils expriment le marqueur d'activation CD95 et expriment de façon prononcée le marqueur Ki67 (Miyara et al., 2009). A l'inverse des Tregs naïfs, ces Tregs sont principalement retrouvés chez les personnes âgées (Miyara et al., 2009).

Dans cette sous-population de Tregs effecteurs, on distingue les Tregs effecteurs  $ICOS^+$  (« Inducible T-cell COStimulator ») pouvant produire de l'IL-10 et inhiber les DC, des Tregs  $ICOS^-$  qui produisent du  $TGF\beta$  (Ito et al., 2008). De plus, on remarque qu'un 1/3 des Tregs expriment un marqueur d'activation, le  $HLA-DR^+$  (Baecher-Allan et al., 2001). *Ex vivo*, ces Tregs prolifèrent plus et ont des propriétés immunosuppressives supérieures aux Tregs  $HLA-DR^-$  (Baecher-Allan et al., 2006).

## 5. Les Tregs induits en périphérie

En plus des Tregs venant du thymus, on retrouve une population de Tregs créés à la périphérie. Des expériences ont démontré que des animaux A ayant reçu une greffe B et devenus tolérants à celle-ci, sont capables d'accepter une autre greffe venant de souris ayant un fond génétique BxC s'ils reçoivent un traitement permettant la déplétion des lymphocytes T CD4 et CD8 (Qin et al., 1993). Ces expériences prouvent que l'animal est devenu tolérant à la greffe C grâce aux cellules tolérantes venant de la greffe B, il y a eu un transfert de tolérance.

### *a. Induction de Tregs FoxP3<sup>-</sup> avec l'IL-10 et de l'IL-35*

Des travaux *in vitro* ont permis d'observer des cellules immunorégulatrices à partir de T naïfs humains ou murins en ajoutant au milieu de culture de l'IL-10. Ces cellules ont la capacité d'empêcher la prolifération des Tconv. Dans un modèle murin, cette population créée permet de guérir d'une colite en sécrétant des doses fortes d'IL-10 (Groux et al., 1997). De manière surprenante, cette population nommée Tr1 n'exprime pas FoxP3 malgré ses fonctions régulatrices (Vieira et al., 2004).

Il existe aussi une autre sous-population de Tregs n'exprimant pas FoxP3, il s'agit des iTregs35. Ces cellules permettent le blocage de la prolifération des lymphocytes grâce à la sécrétion d'IL-35 de manière indépendante à l'IL-10. Ces cellules sont retrouvées à la fois chez la souris et l'humain. De plus, l'IL-35 permet la différenciation en iTregs de Tconv (Collison et al., 2010).

### *b. Tregs induits FoxP3<sup>+</sup> et le TGF- $\beta$*

En plus des iTregs n'exprimant pas FoxP3, ils existent d'autres populations régulatrices induites, exprimant eux le facteur de transcription spécifique des nTregs. On observe la survenue d'une population FoxP3<sup>+</sup> dans des souris lymphopéniques après transfert de cellules FoxP3<sup>-</sup> (Curotto de Lafaille et al., 2004).

*In vivo*, l'apparition de Tregs FoxP3<sup>+</sup> est notée dans divers conditions expérimentales, notamment l'administration orale d'antigènes (Coombes et al., 2007) ou dans des modèles inflammatoires (Curotto de Lafaille et al., 2008). Ces expériences ont toutes en commun la carence en signal de co-stimulation CD80/CD86 ou un niveau bas de stimulation du TCR.

Pour cette population de iTregs, le TGF $\beta$  semble être déterminant. En effet, en son absence, dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, la stimulation TCR et les signaux de co-stimulation ne sont pas suffisants pour leur genèse (Chen et al., 2003). Cette population régulatrice est maintenant appelée iTregs FoxP3<sup>+</sup>. De manière similaire au nTregs, ces iTregs ne peuvent survivent qu'en présence d'IL-2 (Curotto de Lafaille et al., 2004). Leur phénotype est très proche. Cependant, ces iTregs ont des fonctions régulatrices inférieures au nTregs et une spécificité aux antigènes du soi moins importantes (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Il existe des liens importants entre nTregs et iTregs FoxP3<sup>+</sup>, les premiers étant capables d'induire les seconds (Andersson et al., 2008)

Il faut noter la plasticité de ces iTregs, qui sont capables selon leur environnement de revenir à l'état de Tconv. En effet, l'expression de FoxP3 est fragile chez ces iTregs à cause du gène *foxp3* ayant une mauvaise déméthylation de la région TSDR (« Tregs-cell specific Demethylated Region »). Sans la présence de TGF- $\beta$  ou l'ajout de ces iTregs à des souris immunodéprimées, la transcription de FoxP3 s'arrête et ces iTregs redeviennent Tconv (Baron et al., 2007).

En conclusion, même si ces iTregs ont des fonctions régulatrices proches des nTregs, à cause de leur plasticité, les nTregs restent les cellules les plus importantes pour maintenir la tolérance en périphérie.

## LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS : MECANISMES D'ACTION

Dans la partie précédente, nous avons décrit les mécanismes de tolérance périphérique et expliqué la genèse des Tregs. Puis, nous avons décrit le phénotype de ces Tregs chez la souris puis l'homme. Nous allons maintenant nous intéresser aux mécanismes d'action mis en place par les Tregs pour contrôler la réponse immunitaire dans les différentes situations pathologiques. Nous verrons qu'ils sont très nombreux, variés et redondants, afin de permettre aux Tregs d'être efficaces dans des situations physiologiques et non physiologiques très diverses.

### A. LES CONDITIONS D'ACTION DES TREGS ET L' « EFFET BYSTANDER »

La première expérience qui montra le rôle immunorégulateur des Tregs eu lieu *in vitro*. Dans cette étude, il fut démontré que les Tregs étaient capables de réguler la prolifération des Tconv (Thornton and Shevach, 1998). Cependant, il fut démontré ultérieurement, que sans une activation préalable de leur TCR, leur fonction immunorégulatrice était inopérante. Seuls les Tregs activés sont des immunorégulateurs (Levings et al., 2001). Ce phénomène a été décrit dans plusieurs modèles mais le premier a été l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle assez proche de notre modèle MAE. Dans l'EAE, la maladie est déclenchée par l'injection d'un adjuvant (le CFA) couplé à un anticorps de la gaine de myéline (MOG ou PLP1 principalement). Il a été démontré qu'au cours de l'EAE, les Tregs spécifiques de PLP1 étaient capables de diminuer la sévérité de la maladie quand l'immunisation a lieu avec l'antigène PLP1. A l'inverse, ces Tregs spécifiques sont incapables de réguler la maladie si les souris sont immunisées par le peptide MOG (Yu et al., 2005). Cela démontre *in vivo* que sans activation des Tregs, ils n'ont pas de fonction immunorégulatrice. Dans le même sens, si l'on active préalablement les Tregs spécifiques de PLP1 *in vitro* et que l'on injecte ces cellules dans une souris EAE induite par le peptide MOG, les Tregs permettent la diminution de la force de l'EAE en inhibant les Tconv spécifiques de MOG (Yu et al., 2005). On appelle ce phénomène, l'effet « bystander ».

Cet effet est important : les Tregs, une fois activés, peuvent inhiber les Tconv spécifiques du même antigène mais aussi d'autres Tconv. Il a d'abord été démontré *in vivo* (Yu et al., 2005) puis *in vitro* dans l'EAE (Yu et al., 2005), puis au cours d'autres pathologies auto-immunes comme le diabète (Tarbell et al., 2004) notamment. L'effet « bystander » des Tregs leur permet de réguler des réponses auto-immunes variées, susceptibles de déclencher à terme une maladie auto-immune.

La concentration peptidique est aussi déterminante à l'activation des Tregs. La concentration nécessaire à leur activation est 10 à 100 fois inférieure à celle nécessaire pour les Tconv (Takahashi et al., 1998). Ainsi les Tregs ont un avantage important dans la compétition avec les Tconv d'autant qu'ils ne représentent que 5 à 10% des CD4 totaux circulant. La balance Tregs/Tconv activés est aussi importante pour le contrôle ou non de la maladie. Un nombre limité de Tregs activés par rapport au Tconv ne permettra pas de réguler la réponse auto-immune. Dans le modèle de souris diabétique (Non Obese Diabetic NOD), il faut utiliser un grand nombre de Tregs, 10 à  $20 \cdot 10^6$ , pour prévenir la maladie (Masteller et al., 2005). Cependant, en utilisant des Tregs spécifiques du pancréas, le nombre de Tregs nécessaire est drastiquement réduit (Tang et al., 2004), un ratio de 1:9 (Tregs :Tconv) est suffisant pour réguler la maladie. Le taux de Tregs spécifiques des antigènes pancréatiques est en effet très limité au sein des Tregs polyclonaux : moins de 1%.

## B. L'IMPORTANCE DES INTERACTIONS ENTRE TREGS ET TCONV

De manière surprenante, il a été montré que les Tconv pouvaient, sous certaines conditions, être capables d'augmenter la prolifération et les capacités immunosuppressives des Tregs (Grinberg-Bleyer et al., 2010b). Dans une souris exprimant le peptide HA spécifiquement dans le pancréas, le co-transfert de Tregs et Tconv, tous spécifiques du peptide HA est plus efficace pour l'expansion et l'immunorégulation des Tregs que le transfert des Tregs seuls, on appelle ce phénomène, l'effet « boost »

## C. LA MORT CELLULAIRE DES TCONV INDUITES PAR LES TREGS

Outre d'empêcher leur activation, les Tregs sont capables d'induire la mort des Tconv de plusieurs manières. Grâce à la molécule d'adhésion CD18, les Tregs exercent un phénomène de cytotoxicité avec les perforines et le granzyme A (Grossman et al., 2004). Les Tregs, au cours du cancer notamment, peuvent induire la mort des CD8<sup>+</sup> et des NK grâce à leurs propres granzymes et perforines favorisant la croissance tumorale (Cao et al., 2007). Des expériences nouvelles ont observé la mort des Tconv par les Tregs par un mécanisme utilisant la voie TRAIL-DR5 (tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5) (Ren et al., 2007) ou la Galectine 1 (Garin et al., 2007). Ici, les mécanismes mis en jeu sont ceux de l'apoptose.

#### *D. LE BLOCAGE METABOLIQUE DES TCONV INDUITS PAR LES TREGS*

Les Tregs, en plus d'être capables d'empêcher l'activation ou d'induire la mort des Tconv (nécrose par cytotoxicité ou apoptose), sont capables d'interférer avec leur métabolisme directement ou indirectement.

Pour la survie des Tregs, l'IL-2 est indispensable mais elle est aussi nécessaire pour la prolifération des Tconv. Les Tregs ont un avantage par rapport au Tconv, ils expriment fortement le récepteur de haute affinité à l'IL-2, le CD25. Il existe ainsi une compétition pour l'IL-2 entre les Tregs et les Tconv (Thornton and Shevach, 1998). De plus, le gène codant l'IL-2 par les Tconv peut être inhibé par les Tregs (Sarween et al., 2004). Ces deux mécanismes conduisent à l'apoptose des Tconv par la privatisation de l'IL-2 (Pandiyan et al., 2007).

Ajouter à l'IL-2, les Tregs utilisent l'adénosine. Le CD39 permet la dégradation de l'ATP en AMP (Adenosine Mono-Phosphate) dans le milieu extra-cellulaire et le CD73 dégrade l'AMP en adénosine qui se lie au récepteur A2A des Tconv pour inhiber leur prolifération (Sitkovsky et al., 2004). Les molécules CD39 et CD73 sont présentes sur les Tregs (Deaglio et al., 2007) ;(Borsellino et al., 2007) et participent à l'inhibition de la prolifération des Tconv grâce à la production d'adénosine via le récepteur A2A.

#### E. L'INHIBITION DES TCONV PAR LES TREGS CONTACT-DEPENDANT

Il existe aussi des interactions directes entre Tconv et Tregs. Le CTLA-4 est toujours exprimé à l'état basal à la surface des Tregs. Il permet aux Tregs d'inhiber les Tconv par un contact direct avec CD80/86 (Paust et al., 2004). La suppression de CTLA-4 à la surface des Tregs conduit à une auto-immunité létale chez la souris dont l'expression spécifique du gène CTLA-4 a été inhibée (Wing et al., 2008). Les fonctions suppressives des Tregs deviennent nulles. D'autre part, la cytokine TGF- $\beta$  dans sa forme soluble, une cytokine anti-inflammatoire, serait aussi sécrétée par les DC en présence de CTLA-4 (Travis et al., 2007).

D'autre part le TGF- $\beta$  membranaire est exprimé sur les Tregs et permet une immunosuppression des Tconv par contact direct comme cela fut démontré dans la souris NOD (Green et al., 2003) (Shull et al., 1992).

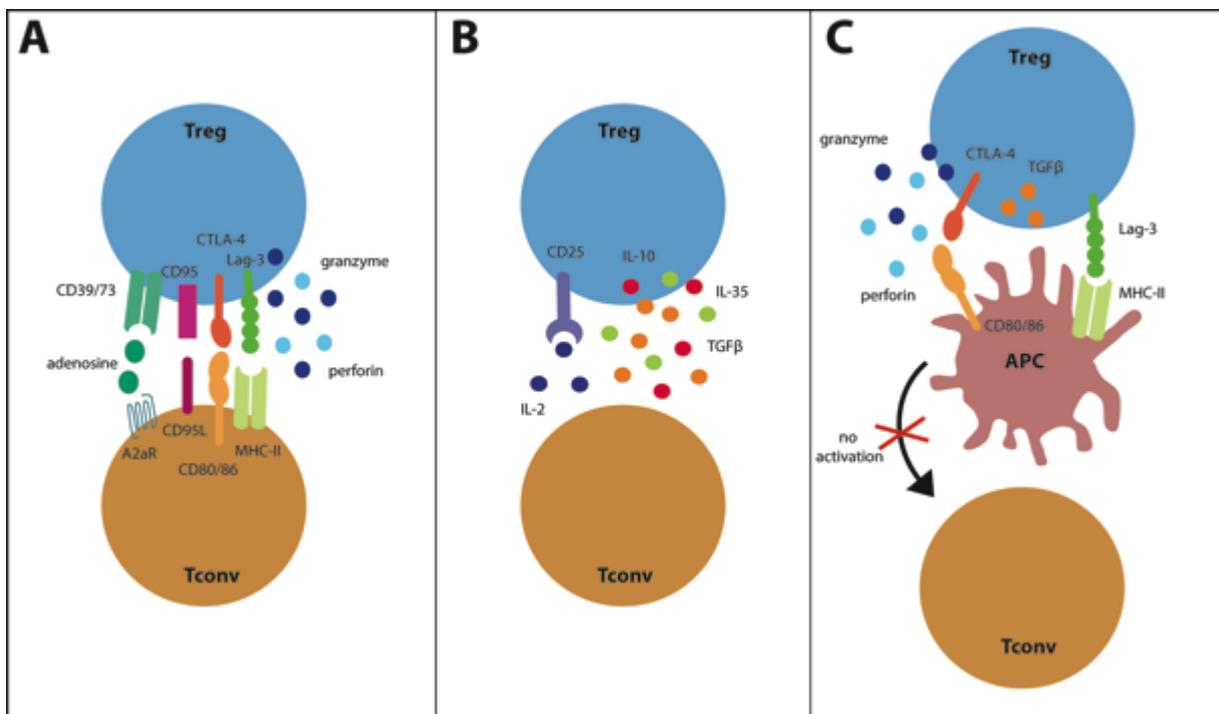
#### F. PRODUCTION DE CYTOKINES INHIBITRICES PAS LES TREGS

Au contact cellulaire direct, s'ajoute les cytokines inhibitrices sécrétées par les Tregs. Le TGF- $\beta$  soluble peut aussi inhiber la prolifération des Tconv. Les souris invalidées pour le gène du TGF  $\beta^{-/-}$  meurent rapidement d'auto-immunité. *In vitro* chez l'homme, l'inhibition du TGF- $\beta$  avec un Ac neutralisant amoindrit les fonctions des Tregs issus des tumeurs (Strauss et al., 2007) et diminue chez la souris les fonctions des Tregs dans un modèle de colite inflammatoire (Fahlen et al., 2005). Néanmoins, il existe d'autres mécanismes permettant de maintenir les fonctions immunosuppressives des Tregs en l'absence de cette molécule (Piccirillo et al., 2002).

L'IL-10 est une autre cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la prolifération et la maturation des DC. Cependant, ses propriétés immunorégulatrices sont moindres puisqu'à l'inverse du TGF- $\beta$ , les souris IL-10 $^{-/-}$  ou IL-10R $^{-/-}$  ne décèdent pas spontanément de manifestations auto-immunes même si elles présentent une colite (Kuhn et al., 1993) avec défaut de tolérance de la flore intestinale (Uhlig et al., 2006). L'IL-10 est sécrété par les monocytes, les macrophages, les B et les T (Mosser and Zhang, 2008) dont les Tconv Th2 et les Tregs. La

production d'IL-10 par les Tregs participe à l'effet immunomodulateur des Tregs au cours de l'EAE (McGeachy et al., 2005). Néanmoins, comme pour tous les mécanismes d'action des Tregs décrits à ce jour, le rôle de l'IL-10 n'est pas indispensable car les fonctions suppressives des Tregs persistent en son absence (Bettini and Vignali, 2009).

L'IL-35 est aussi une cytokine impliquée dans la fonction des Tregs (Collison et al., 2007). Elle est fortement exprimée par les Tregs. Les Tregs issus des souris IL-35<sup>-/-</sup> ont une perte importante de leurs fonctions immunorégulatrices. De plus, l'expression de l'IL-35 par les Tconv leur confère des propriétés immunosuppressives (Collison et al., 2007).



**FIGURE 2 : Mode d'action des Tregs.** **A:** Les Tregs inhibent directement les Tconv avec le contact de CTLA-4 à CD80 ou CD86 et de LAG3 au CMH-II. Pour empêcher la prolifération des Tconv, CD73 et CD39 sécrètent de l'adénosine. CD95 peut induire la lyse des Tconv ainsi que granzyme et perforine. **B:** L'inhibition des Tconv passe par des contacts indirects comme la sécrétion d'IL-10, d'IL-35 ou de TGFβ et peut permettre la conversion de Tconv en iTregs. De plus, le CD25 crée une déplétion en IL-2 en la l'accaparant. **C:** Les mécanismes indirects impliquent notamment les CPA. Les CPA peuvent être inhibé par le CTLA-4, LAG-3 ou le TGFβ. La lyse des CPA peut survenir grâce aux enzymes cytotoxiques.

Nous avons étudié la genèse des Tregs, leur profil à l'état basal puis leurs mécanismes d'actions globaux pour réguler la réponse immunitaire. Nous allons maintenant définir dans chaque grande pathologie, les mécanismes d'actions des Tregs.

### **1. Régulation de l'auto-immunité à l'état basal:**

Dans tous travaux scientifiques, pour connaître précisément le rôle d'une protéine, une des premières expériences à effectuer est de rendre cette protéine inactive ou non transcrite. Chez la souris, une thymectomie ou l'utilisation de souris FoxP3<sup>-/-</sup> induit la mort par divers atteintes auto-immunes (Brunkow et al., 2001). Chez l'homme, le syndrome IPEX, du à inactivation du gène FoxP3 crée, de façon similaire à la souris, des atteintes auto-immunes graves et létales à cause notamment d'un diabète, une thyroïdite, et une anémie hémolytique et une colite (Bennett et al., 2001).

Pour observer l'effet de la déplétion en Tregs à l'âge adulte, il est obligatoire d'utiliser des modèles transgéniques. Un modèle intéressant est la souris FoxP3DTR (Diphtheria Toxin Receptor, pour récepteur de la toxine diphtérique). Dans ces souris, tout les Tregs expriment le récepteur à la toxine diphtérique à leur surface. On peut donc avec l'utilisation de cette drogue induire la mort cellulaires des cellules régulatrices de manières spécifiques (Kim et al., 2007). Cette injection entraine une rapide activation des Tconv en seulement deux jours, en comparaison avec les nouveau-né, la disparition des Tregs induits des attaques auto-immunes encore plus forte. L'hypothèse principale étant qu'à l'âge adulte, le système immunitaire est plus complet, la proportion de Tconv auto-réactives de surcroit plus importante. Il faut noter que l'injection dans ce modèle de Tregs de souris WT après la déplétion permet de contenir les attaques auto-immunes (Kim et al., 2009). Cela démontre aussi que l'effet néfaste est du aux Tconv auto-réactifs et non à l'injection de la toxine.

De façon similaire à FoxP3, l'inhibition de l'IL-2, indispensable à la survie des Tregs, induit rapidement une baisse drastique des Tregs chez des souris WT. Il en résulte une activation rapide des Tconv auto-réactifs et la survenue d'attaques auto-immunes (Setoguchi et al., 2005).

Dans des modèles plus physiologiques que les souris déplétées d'un gène ou l'utilisation d'anticorps monoclonal, les modèles spontanés de maladie permettent de voir le rôle crucial

joué par les Tregs. Notamment les modèles de diabète : Souris NOD, modèle de lupus : Souris NZW ou provoqué par des immunisations (Modèles de sclérose en plaques : Encéphalite expérimentale auto-immune ou de modèle de polyarthrite rhumatoïde d'arthrite à collagène). Dans toutes ces expériences il a été démontré que la suppression des Tregs induisait une augmentation de la maladie et qu'à l'inverse, le transfert de Tregs permettait une baisse des symptômes (Sakaguchi et al., 1995); (Frey et al., 2005); (Szanya et al., 2002); (Salomon et al., 2000).

Chez l'homme, des résultats similaires ont été trouvés. On observe un biais quantitatif ou parfois qualitatifs des Tregs dans beaucoup de maladies auto-immunes comme le syndrome de Guillain Barré (Chi et al., 2007), la sclérose en plaque (Viglietta et al., 2004) le Lupus (Zhang et al., 2008) et la myosite à inclusion (Allenbach et al., 2014).

## **2. Rôle des Tregs dans l'allo-immunité et la tolérance foeto-maternelle**

Les Tregs ont un rôle important dans la tolérance aux allo-antigènes. Des premières expériences ont montré *in vitro* que des Tregs allo-réactifs, 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). Ces Tregs permettent de guérir la GVH après une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Cohen et al., 2002; Hoffmann et al., 2002). Ces expériences ont été reproduites dans d'autres modèles pour démontrer le rôles des Tregs, notamment pour diminuer le rejet d'allogreffes de cœur (Tsang et al., 2009) ou de peau (Joffre et al., 2008),

Le rôle bénéfique des Tregs a aussi été démontré pendant la grossesse. En effet, le fœtus peut être considéré comme une « greffe » semi-allogénique, qui n'est pas, dans la majorité des cas, rejeté au cours de la grossesse. Le nombre de Tregs augmentent durant la grossesse dans la membrane utérine (Tilburgs et al., 2008). Chez la souris de fonds génétique différents, après une reproduction, on observe une augmentation dans le sang et les ganglions des Tregs (Darrasse-Jeze et al., 2006; Zhao et al., 2007). Il a aussi été démontré qu'une souris reconstituée par des cellules dépletées en CD25 avorter systématiquement après accouplement. Cela n'est pas le cas si les souris sont reconstituées avec des cellules totales (Aluvihare et al.,

2004). De même, l'élimination des Tregs *in vivo* par injection d'anticorps anti-CD25 provoque une drastique augmentation du nombre d'avortement (Darrasse-Jeze et al., 2006).

### **3. Régulation des réponses anti-infectieuses**

De nombreuses études ont montré un rôle des Tregs dans la réponse aux infections avec selon les cas, un effet positif ou négatif des Tregs.

Son rôle peut être bénéfique en diminuant l'inflammation créée par la réponse anti-infectieuse. Par exemple, dans le cas d'une infection par le virus HSV-1 dans l'œil, il a été démontré que la suppression des Tregs induisait une augmentation des lésions. Inversement, le transfert de Tregs permet leur réduction (Suvas et al., 2004). Dans un autre modèle d'infection, HSV-2, il fut démontré que le ganglion drainant et les tissus cibles était rapidement rempli de Tregs ainsi que des cellules effectrices. La déplétion en Tregs, permet là aussi une augmentation de l'infection et une mort rapide des souris (Lund et al., 2008). Les Tregs auraient aussi un effet bénéfique sur la mémoire immunitaire après une infection. Une étude a montré qu'ils stoppaient la destruction totale du parasite *Leishmania Major*, favorisant le maintien de l'antigène à la périphérie et par conséquent la mémoire immunitaire dans le cas d'une nouvelle infection (Belkaid et al., 2002).

Cependant, le rôle des Tregs n'est pas toujours bénéfique. Dans le cas d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis*, des études ont démontré une importante baisse du nombre de bactéries dans les poumons après la suppression des Tregs (Scott-Browne et al., 2007). On note un effet similaire avec le parasite *L.Sigmoidontis* chez la souris (Taylor et al., 2005).

### **4. Régulation des réponses anti-tumorales**

Il est maintenant certain que les Tregs jouent un rôle néfaste dans le développement tumoral. Sur le site tumoral, une partie des antigènes présentés étant du soi, il fut démontré que les Tregs pouvaient être activé et par conséquent inhiber la réponse anti-tumorale comme c'est le cas dans les maladies auto-immunes (Nishikawa and Sakaguchi, 2010). En utilisant un

anticorps déplétant anti-CD25 juste avant l'injection des cellules tumorales pour la suppression des Tregs, on obtient dans divers lignée tumorale soit une diminution de leur croissance soit leur rejet total (Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999). Dans le même sens, le transfert de Tregs spécifiques d'antigènes tumoraux permet aux tumeurs un développement plus rapide (Nishikawa et al., 2005). Chez la souris, les Tregs augmentent fortement pendant la croissance tumorale à la fois dans la tumeur mais aussi dans les ganglions drainants et le sang (Darrasse-Jeze et al., 2009b). Des résultats similaires ont été observés chez l'homme (Wolf et al., 2003).

De plus, es Tconv infiltrant la tumeur peuvent se transformer en iTregs du aux grandes quantités de TGF- $\beta$  issue de la tumeur (Liu et al., 2007). Les Tregs seraient aussi capable d'induire la mort cellulaire des T CD8<sup>+</sup> et des DC présent dans la tumeur (Boissonnas et al., 2010; Cao et al., 2007) ou dans d'autres modèles d'inhiber les fonctions cytotoxiques des CD8 et des NK (Shimizu et al., 1999). Enfin, il y aurait un recrutement préférentiel dans la tumeur des Tregs CCR4<sup>+</sup> grâce à son ligand CCL22 présent dans la tumeur (Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

## **5. Les molécules importantes pour l'homéostasie des Tregs à l'état basal**

### **a. Les cytokines indispensable aux Tregs**

Pour les Tregs, les cytokines pouvant ceux lier à leur récepteur CD122 ont un rôle important dans leur homéostasie, notamment l'IL-2 et l'IL-15

#### *i. IL-2*

L'IL-2 a été longtemps été considérée comme essentielle à l'activation des T en général, son nom initial étant « T-Cell growth factor » (Smith, 1980). C'est seulement avec l'apparition des souris IL-2<sup>-/-</sup>, on l'on observe une lymphoprolifération importante causant la mort des souris que l'on compris le rôle déterminant de l'IL-2 pour les Tregs. En effet, ces souris IL-2<sup>-/-</sup> ont un déficit important en Tregs (Malek et al., 2002). De plus le transfert de

Tregs dans des souris CD25<sup>-/-</sup> et CD122<sup>-/-</sup> diminue l'auto-immunité (Malek et al., 2002). Inversement, on observe une disparition des Tregs et la survenue d'un diabète plus précoce chez la souris NOD en utilisant un anticorps monoclonal pour neutraliser l'IL-2 (Setoguchi et al., 2005).

*In vitro*, l'IL-2 est indispensable pour levée l'anergie en ajoutant un anticorps anti-CD3 ou CD28 (Thornton and Shevach, 1998). *In vivo*, l'IL-2 est indispensable à la survie et la croissance des Tregs. Dans des souris immunodéficientes, le nombre et la survie des Tregs est en lien étroit avec les doses d'IL-2 produit par les Tconv restant (Almeida et al., 2002). Sans le récepteur CD25, les Tregs ne peuvent proliférer et finissent par mourir. Grâce à la forte expression de CD25 sur les Tregs par rapport aux Tconv, les Tregs ont un avantage pour capter l'IL-2. Il a d'ailleurs été démontré quand utilisant des faibles doses d'IL-2, on empêche la prolifération des Tconv tout en permettant une prolifération des Tregs créant une diminution de l'incidence du diabète dans les souris NOD (Tang et al., 2008) (Grinberg-Bleyer et al., 2010a).

Des expériences ont démontré que l'injection d'IL-2 couplé à un anticorps anti-IL-2 (clone JES1.6), créé une forte augmentation du pourcentage des Tregs dans la périphérie (Boyman et al., 2006; Webster et al., 2009). Le pourcentage de cellule exprimant FoxP3 passant à 50% dans le compartiment CD4 contrairement au 10% à l'état basal. Ces résultats sont dus à la durée de vie fortement augmentée de l'IL-2 quand elle est couplée à cet anticorps. Quand toute l'IL-2 a été consommée, sans une nouvelle injection, le taux de Tregs revient progressivement à son taux normal.

## ii. IL-15/IL-7

Comme nous l'avons vu, un déficit en IL-2 ne permet pas la disparition totale des Tregs. Il faut combiner la désactivation de l'IL-2 et de l'IL-15, qui ont en commun le récepteur CD122 pour permettre la disparition quasi-totale des Tregs (Burchill et al., 2007). L'IL-15 aurait un effet similaire à l'IL-2 dans la génération des Tregs. Cependant, son rôle n'est pas indispensable car les souris IL-15<sup>-/-</sup> ou IL-15Ra<sup>-/-</sup> présentent un nombre normal de Tregs et n'ont pas d'atteintes auto-immunes (Burchill et al., 2007).

Pour l'IL-7, même si les Tregs expriment faiblement le récepteur CD127 (Liu et al., 2006), *in vitro* cette cytokine est capable d'induire l'expression de FoxP3 à partir de cellules thymiques (Bayer et al., 2008). Néanmoins, *in vivo* le rôle de l'IL-7 est plus complexe. Les souris IL-7<sup>-/-</sup> ou CD127<sup>-/-</sup> sont lymphopéniques et on observe une baisse du nombre de Tregs (Mazzucchelli et al., 2008). D'autres expériences démontrent aussi que l'IL-7 ne parait pas permettre le maintien préférentiel des Tregs en périphérie (Bayer et al., 2008).

#### b. La famille CD28

De façon similaire aux Tconv, pour une activation optimum des Tregs, il est nécessaire d'ajouter au signal TCR, des signaux de co-stimulation.

##### i. CD28 : une voie de co-stimulation critique dans l'homéostasie des Tregs

Le CD28 est exprimé chez tous les T, elle permet l'interaction avec ses ligands CD80 et CD86. Le rôle de CD28 a été bien décrit chez les Tregs. Chez les souris CD28<sup>-/-</sup> et CD80/86<sup>-/-</sup> on observe une absence quasi-complète des Tregs (Salomon et al., 2000; Tang et al., 2003). De plus, CD28 est obligatoire pour la survie des Tregs en 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, permet une baisse drastique des Tregs en périphérie (Salomon et al., 2000). *In vivo* la prolifération des Tregs est strictement dépendante de CD28 (Tang et al., 2003). Il faut noter cependant que dans les souris CD28<sup>-/-</sup>, les fonctions suppressives des cellules régulatrices ne sont pas différentes que des Tregs issues de souris WT (Takahashi et al., 2000);

##### ii. CTLA-4 contrôle la fonction des Tregs *in vivo*

Le CTLA-4 est un récepteur de même famille que CD28 et se fixe aux mêmes récepteurs CD80 et CD86 (Bour-Jordan and Bluestone, 2009); (Tivol et al., 1995). Il est exprimé constitutivement sur les Tregs, mais aussi sur les Tconv activés (Salomon et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Grâce aux souris CTLA-4<sup>-/-</sup>, le rôle de cette molécule fut mise en évidence car ces souris développent une lymphoprolifération et une auto-immunité létale à

l'âge de 3-4 semaines (Tivol et al., 1995). Il fut aussi démontré un rôle inhibiteur du CTLA-4 sur l'activation des Tconv (Walunas et al., 1996).

On peut aussi noter que le CTLA-4 semble avoir un effet négatif sur la prolifération des Tregs. En effet, chez les souris FoxP3<sup>cre</sup> X CTLA-4<sup>fl/fl</sup>, le taux de Tregs reste très élevée par rapport aux souris contrôles (jusqu'à 50% de cellules FoxP3<sup>+</sup> parmi les LT CD4) (Wing et al., 2008). Dans le même sens, l'injection d'anticorps bloquant anti-CTLA-4 à des souris naïves crée une importante prolifération des Tregs (Farber JI 2008). Ces observations suggèrent que même si le CTLA-4 est important pour le contrôle de l'auto-immunité par les Tregs, il peut aussi les réguler négativement pour empêcher une trop forte prolifération.

### iii. ICOS

La molécule ICOS (pour « Inducible CO-Stimulator ») est elle aussi issue de la famille CD28 (Hutloff et al., 1999). Elle n'est exprimée que chez 20 % des Tregs mais aussi chez les T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après activation, et seulement 20% des Tregs l'expriment à l'état basal (Ito et al., 2008). Elle reconnaît son ligand, ICOS-L qui est exprimé sur les CPA (DC, macrophages, B; (Yoshinaga et al., 1999).

Chez les souris ICOS<sup>-/-</sup>, le pourcentage de Tregs est diminué d'environ 30% à la périphérie (Burmeister et al., 2008). Chez l'homme, environ 30% des Tregs expriment fortement ICOS et dépendraient de ce signal pour leur survie, alors que les Tregs ICOS<sup>-</sup> dépendraient plutôt de CD28 (Ito et al., 2008).

### iv. La voie PD-1/PDL-1-2

PD-1 (pour Programmed Death-1) est une molécule de co-stimulation de la famille CD28 exprimée par les T et B après leur activation. Elle se fixe à son ligand PDL-1, exprimé de façon quasi ubiquitaire, et PDL-2, exprimés sur les lymphocytes et macrophages activés. Les souris déficientes pour PD-1 développent une cardiomyopathie auto-immune ou un lupus (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001). Le blocage de la voie PD-1 accélère aussi l'apparition du diabète chez la souris NOD (Ansari et al., 2003) et aggrave l'EAE induite chez la souris C57/Bl6 (Salama et al., 2003). Une étude de 2007 montre que l'injection d'un anticorps bloquant anti-PDL-1 diminue la proportion de Tregs en périphérie et empêche la

prise d'une allogreffe de peau (Tanaka et al., 2007). Par ailleurs, il semble que la voie PD-1 augmente la fonction suppressive des Tregs. Le contact des Tregs avec des cellules endothéliales exprimant PDL-1 augmente *in vitro* l'inhibition de la prolifération des Tconv (Bedke et al.). De même, le blocage de PD-1 augmente la réponse anti-tumorale en inhibant la fonction suppressive des Tregs chez l'homme (Wang et al., 2009b)..

### c. Les voies de signalisation des Tregs intracellulaires: PI3K/Akt/mTOR et JAK3/STAT-5

La signalisation déclenchée par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur, et la signalisation CD28, sont capables d'engager plusieurs voies de signalisation dans les lymphocytes T. Parmi elles, on trouve les voies PI3K/Akt/mTOR, JAK1-3/STAT5 et MAPK (Zeiser et al., 2008). Inversement des Tconv, les Tregs utiliseraient peu ou pas la voie PI3K/Akt/mTOR en présence d'IL-2. En effet, des travaux ont démontré qu'Akt est peu phosphorylé après activation via l'IL-2 *in vitro* (Bensinger et al., 2004). Ceci expliquerait l'effet inhibiteur de la rapamycine sur les Tconv mais pas sur les Tregs (Zeiser et al., 2008). Une des hypothèses est que PTEN (pour « Phosphatase and Tensin homolog deleted »), un inhibiteur de la voie PI3K/Akt, est plus fortement exprimé par rapport aux Tconv chez les Tregs (Walsh et al., 2006). Cela n'engendre pas une baisse du taux de PTEN chez les cellules régulatrices comparées aux Tconv, cela expliquerait les voies de signalisation différentes dans les Tregs et les Tconv (Zeiser et al., 2008). De plus l'activation constitutive d'AKT interfère avec l'expression de FoxP3 (Haxhinasto et al., 2008), en séquestrant les facteurs Foxo dans le cytoplasme, qui permet la transcription de foxp3 (Ouyang et al., 2010). Il a aussi été démontré que l'inhibition de PI3K/Akt/mTOR conduit à l'accroissement de l'expression de FoxP3 dans les Tconv (Sauer et al., 2008).

En fait, il semble que l'activation de Tregs par l'IL-2 conduise plutôt au recrutement de JAK3 et à la phosphorylation de STAT-5 (Zeiser et al., 2008). Le promoteur du gène foxp3 ayant des sites de fixation pour STAT-5, cette donnée expliquerait le contrôle de l'expression de FoxP3 par l'IL-2 décrit précédemment (Zorn et al., 2006). De plus il apparaît que l'inhibition de JAK3 par l'inhibiteur chimique AG-490 induit une forte baisse de l'expression de FoxP3

en quelques heures (Murawski et al., 2006). Ceci établit donc un lien très fort entre l'IL-2, la voie JAK3/STAT5 et les Treg. En effet miroir la voie PI3K/Akt est peu utilisée et même délétère pour les Treg. On notera enfin que la voie des MAPK semble également accessoire dans les Treg (Zeiser et al., 2008).

# LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES IDIOPATHIQUES

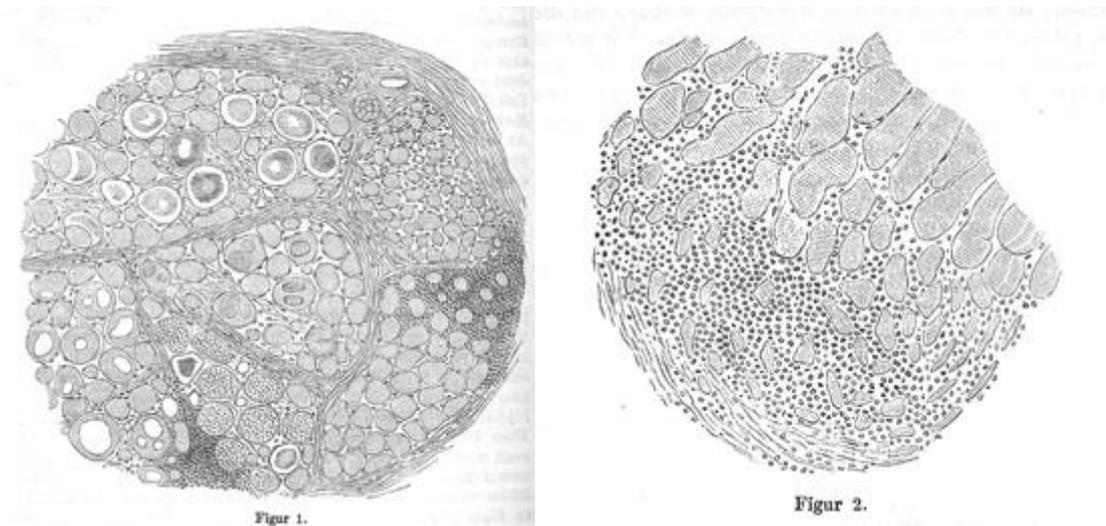
## I. CLINIQUE

On distingue deux groupes de myopathies, les myopathies héréditaires d'origine génétique et les myopathies acquises. La première myopathie héréditaire connue fut la myopathie de Duchenne au 19<sup>ème</sup> siècle. A l'heure actuelle, nos connaissances font état de dizaine d'autres mutations.

Les myopathies acquises peuvent être secondaires à un agent connu (médicamenteux, toxique, infectieux ou endocrinien) ou être sans cause retrouvée, on parle alors de myopathie inflammatoire idiopathique.

La dénomination « myopathie inflammatoire idiopathique » (MII) n'est apparue qu'au cours des années 70 (Bohan and Peter, 1975) (« The major inflammatory myopathies of unknown cause » (Carpenter and Karpati, 1981)). Les premiers cas supposés de ces myopathies ont été décrits par Wagner en 1863 (Wagner, 1863) (Figure 3).

Le Dr Wagner crée le terme de Polymyosite (PM) en 1886 dans cet article «Ein fall von acuter polymyositis » (Wagner, 1886-7). L'examen post-mortem des biopsies musculaires montrait alors la présence d'un infiltrat inflammatoire. Steinert (Steinert, 1903) publia la première revue sur les PM avec 28 cas décrits au début du XX<sup>ème</sup> siècle.



**Figure 3** : Illustration de l'examen anatomopathologique musculaire post mortem du patient du Dr Wagner en 1886. (Wagner, 1886-7)

Au sein des MII, on a fini par distinguer Polymyosite (PM) et dermatomyosite (DM) sur la base des présentations cliniques (signes dermatologiques) et histologique différentes, mais la classification, jusque dans les années 70, restera confuse entre PM et DM notamment. C'est avec la découverte d'auto-anticorps (auto-Ac) associés aux myopathies inflammatoires que le cadre nosologique des PM se précise (Love et al., 1991). En effet, à cette période, on observe que selon la présence ou non d'Ac, le phénotype des PM vari. Cette observation conduira à une nouvelle classification sérologique. Dans cette classification, le terme de myosite de chevauchement (MC) (Trojanov et al., 2005) est préféré à celui de PM, dénomination que les auteurs préfèrent réserver aux patients sans Ac. Aujourd'hui, la quasi-totalité des PM sont associées à des auto-anticorps (Allenbach and Benveniste, 2013). Ainsi, certains experts, dans un éditorial intitulé « Unicorns, dragons, polymyositis, and other mythological beasts » (Amato and Griggs, 2003), ont proposé l'abandon de la dénomination PM.

Néanmoins, la dernière classification des MII de « European Neuromuscular Centre » (ENMC) conserve le terme de PM même en présence d'auto-anticorps (Hoogendijk et al., 2004) et la plupart des articles publiés utilise cette dénomination. Ainsi, nous garderons ici le terme de PM.

Aux groupes PM et DM, il faut ajouter un nouveau groupe : les myopathies nécrosantes auto-immunes (MN) (Hoogendijk et al., 2004). La MN est caractérisée par l'absence ou la faible abondance d'infiltrats inflammatoires et la présence de fibres en nécrose est majoritaire. Ce sous-groupe est notamment associé à la présence soit d'Ac anti-SRP (Miller et al., 2002a; Reeves et al., 1986), soit d'Ac anti-HMGcoA (Christopher-Stine et al., 2010).

Enfin, au sein des MII, il faut distinguer un dernier groupe : la Myosite à Inclusions (MI) (Carpenter et al., 1978). Elle est considérée comme une myopathie inflammatoire mais la présence de signes de dégénérescences musculaires (altération du protéasome, dépôt de Beta-amyloïde) en fait une entité à part que certains auteurs proposent d'exclure du groupe des MII (Askanas and Engel, 2008).

#### a. *Epidémiologie et facteurs de prédisposition*

La prévalence des myopathies inflammatoires est estimée entre 0,6 et 1 pour 100 000 (Dalakas, 1991) (Hilton-Jones, 2001; Mastaglia and Phillips, 2002). Une étude au Canada a estimé la prévalence des DM et PM à 21,5 pour 100 000 avec une prédominance chez les femmes. (Bernatsky et al., 2009). A contrario, la MI est majoritaire chez les hommes (3 pour 1), avec une prévalence de 4,9 par million d'habitants (Mastaglia, 2008). A ce jour, seule la DM a été observée chez les juvéniles. Les PM sont le groupe majoritaire (Trojanov et al., 2005), elles représentent 68% des myosites dans leur groupe étudié contre seulement 10% pour les DM. Si la PM 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).

Au niveau génétique, quelques gènes « Human Leucocyte Antigen » (HLA) ont été associés avec la PM 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). Un haplotype est aussi observé chez la MI HLA-DR  $\beta$  1\*0301 (Koffman et al., 1998) ce qui suggère des mécanismes physiopathologiques communs à ces deux entités. Inversement, les haplotypes

retrouvés durant la DM sont différents (Chinoy et al., 2006; Reed and Ytterberg, 2002; Werth et al., 2002).

### *b. Les manifestations musculaires*

Les patients atteints de MII souffrent d'un déficit de la force musculaire plus ou moins sévère. Typiquement au cours des PM, DM et MN, l'atteinte est bilatérale et symétrique. Le déficit s'installe en quelques semaines ou moins. Au cours de la MI, l'installation est beaucoup plus lente et le déficit musculaire est asymétrique proximal et distal. Ces caractéristiques font que le diagnostic de MI repose principalement sur la présentation clinique.

Au cours des MII, l'origine musculaire du déficit moteur est en outre suggérée par l'élévation du taux sérique d'enzyme musculaire CPK (créatine phosphokinase) (Dalakas and Hohlfeld, 2003) ; cependant ce taux peut être normal en particulier au cours de la DM.

Dans tous les cas, la biopsie musculaire reste indispensable pour affirmer le diagnostic de MII et préciser le cadre nosologique (Dalakas, 1991; Hilton-Jones, 2001; Mastaglia and Phillips, 2002). Au cours des MII, on peut observer trois grands types d'anomalies : la présence d'inflammation musculaire, des anomalies des fibres musculaires et/ou du réseau capillaire musculaire.

La présence d'infiltrat inflammatoire permet d'orienter vers le diagnostic de myosite et donc vers le diagnostic de PM, DM ou MI. L'infiltrat est majoritairement présent dans l'endomysium au cours des PM et MI (Dalakas, 1991). Il est fréquent d'apercevoir des fibres envahies non nécrotiques, dont certaines peuvent être « tunellisées » par les cellules inflammatoires. A l'inverse, l'infiltrat est majoritairement péri-vasculaire ou inter/péri-fasciculaire chez les DM (Mastaglia and Phillips, 2002).

Au cours de la PM et de la MI, l'infiltrat est principalement constitué de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de macrophages. On observe également des lymphocytes B qui semblent prédominer chez les patients atteints de DM (Dalakas, 2002). A l'opposé, au cours des MN, il n'y a pas ou peu d'infiltrat inflammatoire (Miller et al. 2008, Bloch et al. 2009). En revanche, ce sont les anomalies des fibres musculaires qui dominent avec la présence de nombreuses fibres en nécrose et ou en régénération.

Au cours des PM, DM et MI, les fibres musculaires ré-expriment le CMH-I. Contrairement à la majorité des cellules, à l'état physiologique, les fibres musculaires n'expriment pas le CMH-I (Singer and Maguire, 1990). Cependant, la présence du CMH-I sur les fibres musculaires chez les patients PM et MI (van der Pas et al., 2004) est un signe d'inflammation musculaire.

Au cours des MI, on observe dans les fibres musculaires des vacuoles bordées de 3 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces vacuoles contiennent notamment des inclusions amyloïdes (Griggs et al., 1995; Mendell et al., 1991). En effet, ces dépôts sont composés de diverses protéines mais principalement de protéines  $\beta$  amyloïdes et  $\tau$  phosphorylées (Arahata and Engel, 1986). Les vacuoles bordées, témoins de la dégénérescence musculaire, sont des éléments décisifs pour le diagnostic de MI (Griggs et al., 1995).

Les anomalies des fibres peuvent aussi concerner leur taille. L'atrophie des fibres musculaires est un élément diagnostique important. Si elle est fréquente et sans topographie particulière au cours des MII, elle est typiquement péri-fasciculaire au cours des DM donc elle est un des critères diagnostiques (Dalakas, 1991; Dalakas, 2002).

Enfin, les anomalies du réseau capillaire peuvent aussi orienter le diagnostic. C'est au cours de la DM qu'elles sont les plus caractéristiques. On observe une raréfaction des capillaires associés à des dépôts, en leur sein de complément (C5B9). 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 constituée par le C5-b9 (Chen et al., 2010).

Malgré tout, la biopsie ne permet pas toujours un diagnostic précis et la présence de manifestations extra-musculaires et des Ac en particulier est alors déterminante.

### *c. Expression extra-musculaire squelettique*

#### *i. Expression extra-musculaire*

Outre l'atteinte musculaire observée au cours des MII, il est fréquent d'observer des atteintes extra-musculaires. Non seulement, elles sont un élément d'orientation diagnostic, mais elles peuvent aussi modifier le pronostic des patients en particulier en cas d'atteinte respiratoire.

Tous les sous-groupes de MII peuvent être exposés à des atteintes respiratoires en raison de l'atteinte musculaire respiratoire. Une atteinte spécifique parenchymateuse pulmonaire peut aussi être observée. C'est le cas au cours de la PM, DM et MN. Il y a une forte variation (5 à 64 %) en fonction des séries (Frazier and Miller, 1974; Miller et al., 2002b; Takizawa et al., 1987) de la prévalence des pneumopathies interstitielles au cours des MII. Néanmoins, elle est estimée à 30% des cas au cours des MN (C. Bloch Queyrat 2008; Douglas et al., 2001) alors qu'elle est très fréquente au cours des PM avec le syndrome des anti-synthétases (70 à 90 %) (R Stanciu, 2008 Richards et al., 2009) et de certaines DM associées à l'auto-anticorps anti-MDA5. L'atteinte respiratoire peut être parfois très sévère et responsable de détresse respiratoire engageant le pronostic vital, elle doit donc être dépistée précocement.

L'atteinte cardiaque est l'autre atteinte grave extra-musculaire squelettique. Des cardiopathies spécifiques ont été rapportées au cours des MII (Haupt and Hutchins, 1982).

Les atteintes cutanées au cours des myopathies inflammatoires sont fréquentes. Ils concernent principalement les DM (Trojanov et al., 2005). Chez les patients souffrant de DM, elles sont un critère diagnostique majeur et leurs caractéristiques sont souvent spécifiques. Au cours de certaines PM, les manifestations cutanées peuvent orienter vers des sous-groupes de MII (Syndrome des anti-synthétases cf ci après) bien qu'elles soient moins spécifiques (Mains de mécaniciens) (Santmyire-Rosenberger and Dugan, 2003; Sontheimer, 2002).

Enfin, il existe une augmentation de la prévalence du cancer (Zantos et al., 1994;) au cours des MII. Ce risque concerne principalement les DM (Sigurgeirsson et al., 1992) et en particulier les patients présentant la présence d'Ac-anti-TIF1- $\gamma$  (Selva-O'Callaghan et al., 2010; Trallero-Araguas et al., 2010).

## ii. Anticorps associés aux myosites

La découverte d'auto-Ac au cours des myosites a bouleversé les classifications traditionnelles (PM, DM, MI). En effet, ils sont associés à des sous-groupes de MII ayant une présentation clinique, histologique homogène et une évolution commune. Ainsi l'hétérogénéité observée au sein des 4 grands groupes de MII, a été grandement diminuée depuis l'identification des auto-Ac. Si bien qu'une nouvelle classification en grande partie fondée sur l'analyse sérologique sera certainement développée. Les Ac au cours des MII sont un outil diagnostique fondamental.

En effet, 60 à 80 % des MII sont associées à des auto-anticorps (Koenig et al., 2007) et plus d'une trentaine de cibles antigéniques nucléaires ou cytoplasmiques ont été identifiées. Il faut distinguer les auto-anticorps spécifiques des myopathies (ASM) idiopathiques des auto-anticorps associés aux MII (AAM). Les ASM ne sont observés qu'au cours des MII et ne sont présents que dans 30 à 58 % des cas (Arnett et al., 1981; Koenig et al., 2007) alors que les AAM sont aussi présents au cours d'autres maladies auto-immunes comme la sclérodermie, le lupus érythémateux systémique ou le syndrome de Gougerot-Sjögren par exemple. Chez un patient donné, il n'existe qu'un seul ASM en règle générale qui peut parfois être associé à un ou plusieurs AAM.

Depuis les années 1980, date de découverte du premier ASM, de nombreux autres ASM ont été identifiés. Et comme nous allons le voir, chacun d'entre eux est associé à un type de MII particulier et au sein d'un groupe de MII, ils sont associés à des phénotypes particuliers de maladie avec des pronostics qui leur sont propres.

Nom de l'anticorps	Fréquence au cours des MII (%)	Myosite associée
<b>ASM</b>		
Anti-Jo1	15	Syndrome anti-synthétases
Anti-PL-7	5	Syndrome anti-synthétases
Anti-PL-12	1	Syndrome anti-synthétases
Anti-OJ	<1	Syndrome anti-synthétases
Anti-EJ	<1	Syndrome anti-synthétases
Anti-MI2	6	DM
Anti-TIF1γ	6	DM
Anti-MDA5	6	DM
Anti-SRP	3	MNAI
Anti-HMGR	6	MNAI
<b>AAM</b>		
Anti-Ro52	30	PM, DM, MI
Anti-Ro-60/SSA	11	PM, DM, MI
Anti-La/SSB	13	PM, DM, MI
Anti-Ku	23	PM
Anti-RNP	15	PM
Anti-PM-Scl	9	PM, MNAI
Anti-Mitochondrie	10	PM

**Tableau 1** : Auto-anticorps au cours des myosites inflammatoires idiopathiques

### *1) La polymyosite et les auto-anticorps*

Le premier anticorps ASM décrit fut en 1981, chez un patient ayant les initiales J.O. souffrant d'une polymyosite (Arnett et al., 1981). L'Ac était spécifique de l'histidine-ARN (acide ribonucléique)-t-synthétase qui a un rôle dans la synthèse protéique. On dénombre aujourd'hui 7 autres anticorps qu'il est possible de quantifier (anti-Jo-1, PL-7, PL-12, EJ et OJ). Cependant, Ac-Jo1 est le plus répandu, on le retrouve chez 20 % des patients MII (Brouwer et al., 2001) et est 4 à 5 fois plus présents que les autres anti-ARN-t-synthétases (Koenig et al., 2007). La présence d'Ac anti-ARN-t-synthétases est associée au syndrome des anti-synthétases qui regroupe outre la myosite, des mains de mécaniciens, des arthralgies, et une pneumopathie interstitielle. Ces Ac délimitent un sous-groupe de MII très bien caractérisé avec en particulier des anomalies histologiques propres, et un pronostic dominé par l'atteinte respiratoire. Ainsi, il a été proposé de créer un groupe à part de MII, distinct de la PM, défini par la présence d'Ac anti-ARN-t-synthétases. L'entité imprécise de la PM, laisse donc peu à peu la place à des sous-groupes définis selon le statut sérologique.

La présence de l'AAM : anticorps anti-mitochondrie (habituellement associé à la cirrhose biliaire primitive) est observée chez 10 % des malades classés PM (Maeda et al., 2012). Sa présence est associée à une atteinte histologique particulière (myosite granulomateuse) et une augmentation de la fréquence de cardiopathie spécifique (Maeda et al., 2012).

L'anticorps anti-Ro-52 est l'AAM le plus fréquemment rencontré (30 % des MII) (Koenig et al., 2007; Ronnelid et al., 2009) dans le groupe PM et n'est pas associé à une forme de PM spécifique, sinon un risque discrètement plus élevé de pneumopathie. Dans 1 à 20% des MII, l'Ac-Ku est présent (Koenig et al., 2007; Selva-O'Callaghan et al., 2006). Sa présence délimite un groupe de patients dont les caractéristiques sont proches du syndrome des anti-synthétases (Rigolet et al., 2012).

Des anticorps anti-U1RNP peuvent aussi être détectés au cours MII (10 % des cas) (Koenig et al., 2007; Selva-O'Callaghan et al., 2006). Ils s'intègrent alors dans le cadre du syndrome de Sharp ou de connectivite mixte (Coppo et al., 2002). Ils sont associés à une myosite de bon pronostic.

## **2) *La dermatomyosite et les auto-anticorps***

Des ASM sont aussi retrouvés chez environ 20 % des malades avec une DM (Hamaguchi et al., 2011). L'anticorps anti-MI-2 est le premier d'entre eux à avoir été associé spécifiquement à la DM. Il est trouvé dans 4 à 6 % des patients avec une MII (Koenig et al., 2007) et 10 à 20 % chez les DM (Selva-O'Callaghan et al., 2006). La présence de l'Ac anti-MI2 est associée un sous-groupe de patients DM ayant une forme classique, sans association avec un cancer ou une pneumopathie (Muro et al., 2012).

Plus récemment, la présence d'anticorps anti-TIF1- $\gamma$  a été spécifiquement retrouvée au cours des DM. Environ 11% des patients DM ont un Ac anti-TIF1- $\gamma$  (Fujimoto et al., 2012). Il est spécifique de TIF1- $\gamma$  (« *transcription intermediary factor 1 family proteins* ») un facteur de transcription nucléaire engagé dans la signalisation du TGF- $\beta$ . La positivité à cet Ac a une valeur prédictive dans 42% des cas pour l'association avec un cancer (Chinoy et al., 2007).

L'anticorps anti-MDA-5 (« *melanoma differentiation-associated gene 5* ») est le dernier ASM de DM. Cet Ac cible une protéine de l'immunité innée impliquée dans les défenses antivirales. Il est observé dans 10 à 20% des DM (Hamaguchi et al., 2011; Muro et al., 2011). Sa présence délimite un sous-groupe de DM caractérisé par l'absence ou la faiblesse de l'atteinte musculaire alors que les manifestations extra-musculaires sont au premier plan avec une atteinte respiratoire souvent sévère et responsable du taux élevé de mortalité de cette maladie (20%).

### 3) *Anticorps et myopathie nécrosante auto-immune*

L'anticorps anti-SRP, décrit pour la première fois en 1986 (Reeves et al., 1986), est présent chez 3 à 6 % des patients ayant une MII (Koenig et al., 2007) et 17 % des patients ayant une MN (Christopher-Stine et al., 2010). Typiquement, ces myopathies associées à l'anticorps anti-SRP se distinguent des autres MII par un déficit moteur dès le début important et une élévation importante des CPK. Histologiquement, la nécrose musculaire prédomine alors que l'inflammation est faible ou absente définissant ainsi une MN sur le plan histologique. Les patients ayant l'Ac anti-SRP souffrent donc d'une myopathie sévère alors qu'il existe peu ou pas de manifestation extra-musculaire à la différence des PM ou DM. Si on peut parfois observer une pneumopathie interstitielle, elle est asymptomatique et peu sévère.

Un autre auto-Ac découvert par l'équipe de Mammen dans les MN, l'anti-HMGCR est retrouvé chez 42 % des patients ayant une MN (Christopher-Stine et al., 2010) et 6 % des MII (Mammen, 2011). Les patients HMGCR+ partagent avec les patients SRP+ les mêmes caractéristiques musculaires (sévérité de l'atteinte motrice et myopathie nécrosante histologique). Les myopathies HMGCR+ sont aussi dominées par la présentation musculaire puisqu'à ce jour, il semble qu'aucune manifestation extra-musculaire ait été rapportée (Mammen et al., 2012). Il faut souligner que chez les patients HMGCR+ il existe une proportion importante (40-75%) d'exposition aux statines (Allenbach and Benveniste, 2013; Mammen et al., 2011).

#### **4) Anticorps et myosite à inclusion**

Il n'existe pas encore au sens strict d'ASM spécifique durant les MI. Cependant, un Ac dirigé contre un antigène musculaire a été trouvé dans 52% des patients MI (Salajegheh et al., 2011). Il a ensuite été confirmé que cet Ac ciblait l'enzyme 5' -nucléotidase cytosolique qu'on retrouvait dans environ un tiers des cas de myosite à inclusions (Larman et al., 2013). Au cours de la MI, des AAM sont retrouvés. Il s'agit fréquemment d'anticorps anti-SSA (Rojana-Udomsart et al., 2012).

## **II. PHYSIOPATHOLOGIE DES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES**

Il y a beaucoup d'arguments qui suggèrent l'existence des mécanismes auto-immuns dans la physiopathologie des MII, notamment l'immunité cellulaire pour les MI et PM.

### **1. Immunité Innée et les cellules présentatrice d'Ag**

Les macrophages sont les cellules les plus abondantes au cours des MII, quel que soit le type de MII. (Greenberg et al., 2005; Page et al., 2004). Leur rôle dans la physiopathogénie des MII a été encore peu étudié. Ils assurent certainement la déterision des fibres nécrosées comme on peut l'observer fréquemment, en particulier au cours des MN, avec des images de myophagocytoses.

Les macrophages CD11c<sup>faible</sup> localisés au niveau des lésions musculaires secrètent des chimiokines comme MCP-1 (Gherardi, 2011). Ainsi, ils permettent l'arrivée des monocytes-macrophages CCR2<sup>+</sup> qui se différencient en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) CD11c<sup>moyen</sup> et pourraient ensuite migrer ensuite vers les ganglions drainants en tant que CPA pour présenter les antigènes musculaires.

Les cellules dendritiques (DC) sont aussi des CPA. Elles sont présentes dans l'infiltrat musculaire des PM et DM (Page et al., 2004) et MI. En particulier, un sous type de DC de

type plasmacytoïde (CD4<sup>+</sup>) est retrouvé de façon importante aux cours des PM et DM. Les pDC sont caractérisées par leur capacité à produire de l'IFN-alpha (Greenberg et al., 2005 200). En accord avec cette observation, il a pu être montré à partir d'analyse transcriptomique que les gènes impliqués dans la réponse immunitaire stimulée par l'IFN étaient parmi ceux qui étaient les plus transcrits (Greenberg et al., 2005 200). Cette signature IFN a été observée dans le compartiment musculaire et sanguin des patients atteints de DM et de PM. Au cours de la DM elles sont particulièrement abondantes. A noter, que les DC myéloïdes sont aussi présentes, mais dans une proportion moindre (Greenberg et al., 2007).

## 2. Cellules musculaires comme CPA

La fibre musculaire pourrait-elle jouer le rôle de CPA ? Il a été démontré que, dans un environnement cytokinique pro-inflammatoire tel que : IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$  IL-1  $\beta$ , MIP1- $\alpha$  (Marino et al., 2001; Nagaraju et al., 1998), les myoblastes en culture peuvent exprimer le CMH-I. Des études *in vitro* et *in vivo* (Hohlfeld and Engel, 1991; Inukai et al., 2000) ont permis de prouver dans la MI, que les T étaient capable de reconnaître des antigènes grâce aux CMH-I présent sur fibres musculaires.

Cette présentation antigénique ne crée une réaction immunitaire seulement s'il y a un second signal et des molécules permettant des interactions avec des lymphocytes. ICAM-1 permet notamment le lien entre les fibres musculaires et les lymphocytes (Marino et al., 2003) grâce au récepteur LFA-1 exprimés par les lymphocyte T CD8<sup>+</sup> (Figarella-Branger et al., 2003). Cependant, il n'y a pas d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 sur les fibres à contrario de ICOS-ligand (Schmidt et al., 2004).

Comme les CPA, les « Toll Like Receptor » (TLR), notamment les TLR3 et 7 peuvent être exprimés à la surface des fibres musculaires (Tournadre et al., 2010) mais cette observation n'a été faite qu'en environnement cytokinique pro-inflammatoire. En particulier, la stimulation des TLR musculaires induit la production musculaire de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6).

### 3. Profil cytokinique

Tout d'abord, pour les chimiokines, des molécules permettant la migration des cellules du système immunitaire, on observe une expression importante de chimiokines  $\beta$  (présent uniquement sur les lymphocytes et monocytes) au cours des MII dans les fibres musculaires (Tournadre and Miossec, 2009). Dans les PM en particulier, des molécules comme CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1  $\alpha$ , CCL5/RANTES et leurs ligands CCR2, CCR1, CCR5 ont été trouvés (Civatte et al., 2005).

Il y a une grande variation dans le profil cytokinique durant les MII. On observe une variation du profil ayant d'une réponse plutôt Th1 (réponse cellulaire) à une réponse plutôt Th2 (réponse humorale). On observe notamment la présence de cytokines avec des capacités pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou le TNF $\alpha$  aux cours des MII (Lepidi et al., 1998), notamment chez les patients PM et MI. Il a aussi été démontré que les cellules musculaires, dans des conditions pro-inflammatoires pouvaient produire des cytokines comme l'IL-6 (Nagaraju et al., 1998).

Les différents travaux effectués montrent des conclusions différentes entre réponse cellulaire et réponse humorale. (Figarella-Branger et al., 2003). Cependant, une majorité de travaux vont dans le sens du rôle important des cytokines de la réponse cellulaire (Th1, IL-2, IFN- $\gamma$ ) pour le groupe PM (Adams et al., 1997; Allenbach et al., 2014; Cid et al., 1996; Tews and Goebel, 1996). A la suite de la migration des CD8<sup>+</sup> dans le muscle, il y a une reconnaissance des antigènes du soi musculaire par certain CD8<sup>+</sup> grâce avec l'expression du CMH-I présent sur les cellules musculaires. Il est possible que le biais de répertoire des CD8<sup>+</sup> observé chez les patients PM soit en cause (Benveniste et al., 2004; Nishio et al., 2001). Le rôle cytotoxique des CD8<sup>+</sup> durant la PM est au cœur de la réponse immune. Des travaux ont prouvé dans un modèle murin que l'absence d'activation des CD8<sup>+</sup> par le CMH-I (grâce à des souris Beta(2)-microglobuline<sup>-/-</sup>) permettait une baisse forte de la maladie dans un modèle de myosite (Sugihara et al., 2010). Cette étude montre aussi que la réponse immune est orientée vers Th1 comme cela est observé dans la PM chez l'homme. D'autres travaux chez l'homme montrent aussi un profil Th1 pour la MI (Allenbach et al., 2014; Tournadre and Miossec, 2009).

A l'inverse, durant la DM, la réponse observée est de type Th-2, notamment grâce à la présence de DC plasmacytoïdes (permettant la sécrétion d'IFN-1 dans des proportions importantes). On observe aussi de l'IFN $\alpha$  dans le muscle et le sang (Walsh et al., 2007). Une étude a montré que le transcriptome issu de biopsie musculaire et de lymphocyte du sang avait un profil Th-2, avec une « signature » INF- $\alpha$  (Greenberg et al., 2005) semblable aux observations faites dans le Lupus (Blanco et al., 2001). On note aussi, chez quelques patients, un infiltrat composé de lymphocyte B (Yokoyama et al., 2013)

#### 4. Les mécanismes de dégénérescences musculaires

La MI est un cas à part. On observe des vacuoles bordées intra-cytoplasmiques (allant de 3 à 30 $\mu$ m de diamètre) dans les cellules musculaires normales, parfois atrophiques. Les protéines composant ces vacuoles sont de façon très surprenante quasi-similaire à celle retrouvée dans le cerveau durant la maladie d'alzheimer, ce sont notamment des dépôts amyloïdes. Des travaux ont démontré la relation entre ces agrégats protéiques dans la fibre musculaire ou dans le système nerveux central avec un dysfonctionnement du protéasome 26S (Lehman, 2009), une élévation du stress du réticulum endoplasmique (Vattemi et al., 2004), un stress oxydatif (Askanas and Engel, 2005) et des mécanismes empêchant le bon fonctionnement de l'autophagie (Hamano et al., 2008; Nogalska et al., 2010b). Cette accumulation de protéine est toxique pour la fibre musculaire notamment A $\beta$ -42 (Nogalska et al., 2010a; Terracciano et al., 2010). La raison de la survenue de ces anomalies reste inconnue, mais le vieillissement joue probablement un rôle négatif (Ciechanover, 2006). Ainsi les molécules A $\beta$ -42 et  $\tau$  ont une action délétère sur le bon déroulement du protéasome et de la formation de l'autophagosome (Nogalska et al., 2010b). Ces observations vont dans le sens de l'inefficacité des traitements immunosuppresseurs dans la MI. Il y a une coexistence des mécanismes dysimmunitaires et dégénératifs dans la MI sans que l'on connaisse le premier phénomène mis en jeu. Cependant, il y a un lien, il a été démontré *in vitro* que les protéines amyloïdes permettaient une sur-expression de l'IL-6 provenant des fibres musculaires (Baron et al., 2001). De plus, on constate *in vivo* une localisation similaire entre l'IL-1 $\beta$  (cytokine pro-inflammatoire) et des précurseurs amyloïdes (Schmidt et al., 2008).

## 5. Modèle murin de myopathies inflammatoires

Les modèles expérimentaux permettent de préciser les mécanismes physio-pathologiques et en particulier, il a été développé des modèles expérimentaux de myopathies auto-immunes. De longue date, il existait une myosite « allergique » expérimentale (MAE) chez le rat (Esiri and MacLennan, 1974) par immunisation par la myosine, finalement semblable dans son concept aux modèles d'arthrite à collagène ou d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Notre équipe a adapté ce modèle animal chez la souris qui s'apparente à une PM chez l'homme (Allenbach et al., 2009).

Un autre modèle a été mis au point. L'approche méthodologique est proche de celle utilisée dans le modèle précédant mais les immunisations sont réalisées, non pas avec de la myosine enrichie, mais avec la « protein C Induce Myositis », c'est le modèle CIM. Les caractéristiques de la myosite sont similaires à celles des souris MAE. En particulier, on note une expression du CMH-I qui reste limitée (Sugihara et al., 2007). D'autres auteurs ont cherché à exprimer spécifiquement le CMH-I par un promoteur musculaire (MCK) sur les fibres (Nagaraju et al., 2000). Ces souris présentent une myosite avec de l'inflammation et la présence de fibre en nécrose. Cependant, cette inflammation est faible, comparée au modèle MAE ou CIM et l'infiltrat est presque exclusivement constitué de cellules de l'immunité innée. En outre, ces travaux ont montré que l'expression du CMH-I est exclusivement intracellulaire, mais pas exprimé à la surface de la fibre musculaire comme cela est observé chez l'homme. Ainsi, les auteurs n'ont pas pu montrer que des auto-antigènes musculaires pouvaient être reconnus de façon spécifique par des CD8<sup>+</sup> auto-réactifs. Ce modèle a surtout démontré l'effet cytotoxique du CMH-I quand il est fortement exprimé à l'intérieur des fibres musculaires. L'équipe de Boyer et coll, a aussi montré dans une souris immunodéficiente (RAG<sup>-/-</sup>) que l'expression du CMH-I crée de graves myopathies (Freret et al., 2013).

Dans le modèle MAE, on observe une diminution drastique de la force musculaire et un infiltrat important constitué majoritairement de macrophages (CD11b<sup>+</sup>) et de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> et dans une moindre mesure de lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. De même, on a constaté une expression du CMH-I par certaines fibres musculaires. Dans notre modèle, nous retrouvons sous certaines conditions (déplétion en Tregs) des xéno-anticorps anti-Hystidil ARN-t-

synthétase (anti-JO-1) survenue probablement après les lésions musculaires. En effet, dans notre modèle comme dans celui de la souris CMH-I induite, il existe des lésions musculaires importantes que l'on sait enrichies en ARN-t-Hystidil transférase. Une équipe a démontré (Casciola-Rosen et al., 2005) que l'ARN-t-aminoacide-transférases pouvaient être libérés dans le muscle par les myocytes en nécrose et être exprimés à la surface des fibres musculaires des myosites. Une réponse anti-Jo1 (ou PL7) est possible grâce à l'inflammation, on pourrait considérer que ceux sont des auto-Ac et non de xéno-Ac.

Dans tous les modèles cités précédemment, les auteurs utilisent une protéine musculaire pour induire une myosite, comme la myosine (pour la MAE), la protéine C (pour la CIM) ou la laminine, une protéine musculaire extracellulaire (Nakano et al., 2005). Ils existent donc de nombreuses cibles antigéniques capables d'induire une myosite.

Le modèle MAE utilise un fort adjuvant, l'adjuvant complet de Freund (CFA), pour rompre la tolérance et lever le contrôle sur les T conventionnels auto-réactifs. Il permet l'arrivée de cytokines pro-inflammatoires pour permettre la rupture de la tolérance périphérique musculaire, même si cela est loin de la physiopathologie chez l'homme. Deux autres approches expérimentales donnent des résultats originaux sans l'utilisation d'adjuvant. Le modèle SM-OVA-OTI (Calbo et al., 2008). Dans ce modèle, le muscle exprime spécifiquement OVA, la tolérance n'est pas rompue par les Tconv OTI (CMH-I-OVA spécifiques). Il n'y a pas de modification des Tregs dans ce modèle mais une surexpression notamment de PD-1 sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Grâce à l'antigène Jo-1, une autre équipe a obtenu une myosite (Soejima et al., 2011). Néanmoins, Jo-1 peut avoir des propriétés similaires à un adjuvant en activant les TLR (Katsumata et al., 2007; Plotz, 2003) et grâce à CCR5 pourrait attirer des DC et des lymphocytes (Howard et al., 2002). De plus, l'injection est intramusculaire et seul le muscle du lieu de l'injection est analysé. Ce modèle se résume plutôt à une réaction inflammatoire musculaire régionale, secondaire aux propriétés inflammatoires de Jo-1 et aux lésions musculaires qui en découlent.

Ainsi, l'analyse des différents modèles expérimentaux montre que seul un fort adjuvant est capable de provoquer une myosite. Dans le même ordre d'idée, l'infection chronique par *Leishmania infantum*, qui joue le rôle d'adjuvant chez le hamster, crée aussi une myosite

proche de celle observée chez l'homme (Paciello et al., 2010). Ainsi, la rupture de la tolérance musculaire ne peut être obtenue qu'en présence de forts adjuvants.

Dans le modèle MAE, le rôle des Tregs est primordial, leur déplétion aggrave la sévérité de la maladie et à l'inverse, le transfert de Tregs diminue significativement la sévérité de la myosite, renforçant ainsi l'importance de leur rôle (Allenbach et al., 2009). Malheureusement, cette thérapie cellulaire chez l'homme avec des Tregs polyclonaux n'est pas encore possible. Il faut donc mettre au point des techniques alternatives pour augmenter les Tregs *in vivo*.

Malgré les similitudes entre notre modèle murin avec la PM et la MI d'un point de vue immunitaire, notre modèle ne reproduit pas les phénomènes de dégénérescences protéiques présents dans la MI. D'autres études ont voulu créer un modèle reproduisant ces caractéristiques. Ces études se sont basées sur celles effectuées pour reproduire la maladie d'alzheimer chez la souris. Le but étant de faire exprimer de façon tissu-spécifique (ici un promoteur musculaire) la protéine  $\beta$  42. Malgré la présence de cette protéine en grande quantité dans le muscle, on n'observe pas la présence de cellules du système immunitaire dans ces modèles (Fukuchi et al., 1998). Un autre modèle a été créé par l'équipe de Frank Laferla (Kitazawa et al., 2006). Dans ces travaux ils croisent des souris PS1 (pour preseniline 1 mutée) avec des souris exprimant l'A  $\beta$  -42 toujours sous contrôle d'un promoteur musculaire. Ces souris doubles transgéniques expriment fortement l'A  $\beta$  -42 dans le muscle grâce à la modification de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase contrôlé par PS-1. De plus, on observe parfois un infiltrat inflammatoire composé de CD8+ mais dans des proportions beaucoup plus faible que la MAE. Malheureusement, il n'y a pas de sur-expression du CMH-I sur les fibres musculaires ni de fibres tunnellisées.

Ainsi, le modèle de la MAE est un des meilleurs modèles pour reproduire les phénomènes inflammatoires musculaires observés au cours de la PM ou de la MI et tester des traitements qui pourraient réguler la réponse immunitaire, en augmentant les Tregs, qui sont aussi diminués dans ces maladies chez l'homme (Allenbach et al., 2014) et réactive le protéasome pour diminuer l'agrégation de protéine pathogène.

## 6. Traitement des myopathies inflammatoires

Avant tout, il faut préciser qu'il existe très peu d'essais thérapeutiques de bonnes qualités (Gordon et al., 2012). Cela est dû, d'une part aux difficultés d'évaluation des patients, et d'autre part à l'inclusion de groupes de patients hétérogènes dans ces essais. Ainsi, les recommandations reposent souvent sur un niveau de preuves modestes. Le but de ces traitements est d'améliorer la force musculaire du patient tout en évitant au mieux les effets secondaires qui sont souvent inévitables.

La kinésithérapie a montré son efficacité. Pour la MI, c'est le seul traitement recommandé à ce jour dans la mesure où aucunes molécules, en particulier les immunosuppresseurs, n'ont montré leurs efficacités (Benveniste et al., 2011; Johnson et al., 2009).

La corticothérapie est la base du traitement (excepté pour la MI). Elle débute à forte dose (1 mg/Kg/j) et est diminuée très progressivement. On observe une amélioration clinique sous corticoïdes dans 60 à 70% des cas (Bohan et al., 1977). Cependant, les effets secondaires sont lourds comme la prise de poids, le dérèglement endocrinien ou des troubles digestifs. Ce traitement est inefficace pour les MI (Dalakas, 2006). Une étude a même démontré (Benveniste and Hilton, 2011) non seulement que celle-ci est inefficace, mais pourrait être même délétère.

Avec la corticothérapie, on associe fréquemment un immunosuppresseur. Les immunosuppresseurs en première ligne restent discutés (Choy et al., 2005). Néanmoins, à la vue du risque très important de rechute (Stanciu et al., 2012), ils sont souvent utilisés dès la première ligne, à visée d'épargne cortisonique. Le Méthotrexate et l'azathioprine ont été les plus évalués et utilisés (Choy et al., 2005). Le micofénolate mofétil, la cyclosporine ont montré des effets en particulier dans les formes réfractaires en deuxième et troisième ligne. Le cyclophosphamide est le traitement des formes sévères qui est réservé aux patients présentant des atteintes respiratoires graves ou cardiaques.

Les immunomodulateurs, notamment les immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse (IgIV) ont une place importante dans le traitement des MII. Les IgIV semblent efficaces (Dalakas and Hohlfeld, 2003; Saito et al., 2008) sauf pour la MI (Benveniste and Hilton, 2011; Needham and Mastaglia, 2007). Elles sont proposées en cures mensuelles

pendant 3 à 6 mois pour la prise en charge de patients présentant des signes de gravité musculaire (Elovaara et al., 2008; Patwa et al., 2012).

L'anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) est aussi un traitement immunomodulateur important ayant montré son efficacité. Une étude a montré qu'il était efficace au cours des MII réfractaires (Oddis et al., 2013). Les facteurs de réponses étaient en particulier la présence d'ASM de type Jo-1 et MI-2 (Aggarwal et al., 2014).

En conclusion, il n'existe pas de recommandations basées sur les preuves pour le traitement des myosites. Ils ne sont pas toujours efficaces et entraînent la plus part du temps des effets secondaires importants. De plus, leur coût peut être élevé (IgIV, rituximab). Il est donc important de mettre au point de nouveaux traitements, d'abord dans notre modèle animal, qui pourront ensuite être applicables chez l'homme.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Dans un premier temps nous avons décrit les phénomènes généraux permettant la tolérance au soi avec notamment le rôle primordial joué par les Tregs. Dans un deuxième temps nous avons définis les myopathies auto-immunes d'un point de vue clinique puis immunologique. Nous avons démontré, comme dans d'autres maladies auto-immunes, la rupture de tolérance et le rôle des Tregs est crucial. Dans notre modèle animal (MAE), Les Tregs sont aussi important avec une augmentation de la maladie par déplétion des Tregs et une amélioration de la force des souris en injectant des Tregs avant les immunisations (Allenbach et al., 2009).

A ce jour, il n'existe pas de traitement miracle pour les myosites. Ils ne sont pas toujours efficaces et entraînent la plus part du temps des effets secondaires importants, il est important de trouver des nouveaux traitements. Pour cela, notre modèle animal peut servir de première approche, comme tous les modèles pré-cliniques.

D'une part, nous étudierons différent traitement pharmacologique pour augmenter les Tregs *in vivo* chez la souris et ainsi améliorer leur force musculaire, notamment la rapamycine.

D'autre part, nous étudierons l'effet des IgIV dans ce modèle afin de déterminer leur mécanisme d'action afin.

La finalité de ces travaux de thèse est la mise en place de nouveaux traitements thérapeutiques chez les patients ayant une myopathie inflammatoire pour éviter le recours aux traitements existant ayant des effets secondaires importants.

## RESULTATS

### **Beneficial role of rapamycin in experimental autoimmune myositis**

Nicolas Prevel, Yves Allenbach, David Klatzmann, Benoit Salomon, Olivier Benveniste  
PLoS One. 2013 Nov 12;8(11):e74450.

A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'utiliser les Tregs en thérapie cellulaire chez l'homme. Pour augmenter les Tregs *in vivo* dans notre modèle animal, nous avons cherché des traitements pharmacologiques permettant leur croissance dans le compartiment CD4+. Plusieurs études ont démontré que la rapamycine, un immunosuppresseur utilisé depuis plusieurs années chez les patients greffés permettait une augmentation des Tregs dans ce compartiment. La rapamycine a pour fonction d'inhiber la voie mTOR, cette voie est déterminante pour la croissance et la prolifération des Tconv. Cependant, les Tregs sont moins dépendants que les Tconv à cette voie de signalisation grâce à une voie alternative régulée par FoxP3. Il a notamment été démontré *in vivo* que l'ajout de rapamycine au milieu de culture n'affecte pas la prolifération des Tregs contrairement aux Tconv, et permet de plus, un meilleur pourcentage de Tregs dans la culture finale (Guillot-Delost et al., 2008).

Une première série d'expérience dans notre modèle animal a eu pour but de montrer l'effet de la rapamycine en traitement préventif. Il a débuté le même jour que la première immunisation par gavage et a continué jusqu'à la fin de l'expérience. Nous avons observé qu'avec ce traitement, les souris ont augmenté significativement leur force musculaire et diminué l'infiltrat inflammatoire. De plus, par une analyse en cytométrie en flux, on observe une diminution importante du nombre absolu de T dans les ganglions drainants et la rate comparée au traitement contrôle. Cela n'est pas le cas pour les B. Dans les sous-populations T, les CD4+ et CD8+ baissent de façon similaire. Cependant, dans la sous-population CD4+, le pourcentage de Tregs est fortement augmenté sous rapamycine, comme dans les données de la littérature. Dans la sous-population de TCD4+ activés, le pourcentage de Tregs passe de 30% chez les souris contrôles à plus de 50% avec la rapamycine. L'analyse montre aussi une différence de prolifération entre les Tregs et les Tconv (Ki67+). Enfin, chez les Tconv, sous rapamycine, on observe une augmentation du facteur de transcription KLF2 ainsi que du

CCR7 qui est contrôlé par KLF2. Cette voie de signalisation importante pour l'adressage des lymphocytes dans les ganglions et le tissu cible semble modifiée par la rapamycine.

Une deuxième série d'expériences a démontré que la rapamycine en traitement curatif crée également une diminution de la sévérité de la maladie avec notamment une augmentation du ratio Tregs/Tconv.

Toutes ces analyses permettent d'envisager la rapamycine comme traitement alternatif pour les myopathies inflammatoires en favorisant la prolifération des Tregs par rapport aux Tconv auto-réactifs.

# Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis

Nicolas Prevel<sup>1,2,3</sup>, Yves Allenbach<sup>4,5</sup>, David Klatzmann<sup>1,2,3,4</sup>, Benoit Salomon<sup>1,3</sup>, Olivier Benveniste<sup>4</sup>

**1** UPMC Univ Paris 06, UMR 7211, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (B); F-75005, Paris, France, **2** CNRS, UMR 7211, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (B); F-75005, Paris, France, **3** INSERM, UMR\_S 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (B); F-75005, Paris, France, **4** AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-811) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy department (I2B), F-75651, Paris, France

## Abstract

**Introduction:** We developed an experimental autoimmune myositis (EAM) mouse model of polymyositis where we outlined the role of regulatory T (Treg) cells. Rapamycin, this immunosuppressant drug used to prevent rejection in organ transplantation, is known to spare Treg. Our aim was to test the efficacy of rapamycin *in vivo* in this EAM model and to investigate the effects of the drug on different immune cell sub-populations.

**Methods:** EAM is induced by 3 injections of myosin emulsified in CFA. Mice received rapamycin during 25 days starting one day before myosin immunization (preventive treatment), or during 10 days following the last myosin immunization (curative treatment).

**Results:** Under preventive or curative treatment, an increase of muscle strength was observed with a parallel decrease of muscle inflammation, both being well correlated ( $R^2 = -0.645$ ,  $p < 0.0001$ ). Rapamycin induced a general decrease in muscle of CD4 and CD8 T cells in lymphoid tissues, but spared B cells. Among T cells, the frequency of Treg was increased in rapamycin treated mice in draining lymph nodes ( $16.9 \pm 2.2\%$  vs.  $9.3 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.001$ ), which were mostly activated regulatory T cells (CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>):  $58.1 \pm 5.78\%$  vs.  $33.1 \pm 7\%$ , treated vs. untreated,  $p < 0.001$ ). In rapamycin treated mice, inhibition of proliferation (Ki-67<sup>+</sup>) is more important in effector T cells compared to Tregs cells ( $p < 0.05$ ). Furthermore, during preventive treatment, rapamycin increased the levels of KLF2 transcript in CD44<sup>low</sup> CD62L<sup>high</sup> naive T cell and in CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>high</sup> activated T cell.

**Conclusions:** Rapamycin showed efficacy both as curative and preventive treatment in our murine model of experimental myositis, in which it induced an increase of muscle strength with a parallel decrease in muscle inflammation. Rapamycin administration was also associated with a decrease in the frequency of effector T cells, an increase in Tregs, and, when administered as preventive treatment, an upregulation of KLF2 in naive and activated T cells.

**Citation:** Prevel N, Allenbach Y, Klatzmann D, Salomon B, Benveniste O (2013) Beneficial Role of Rapamycin in Experimental Autoimmune Myositis. PLoS ONE 8(11): e74450. doi:10.1371/journal.pone.0074450

**Editor:** Othman Aktas, University of Disseldorf, Germany

**Received:** December 17, 2012; **Accepted:** August 6, 2013; **Published:** November 12, 2013

**Copyright:** © 2013 Prevel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This project was sponsored by the grants from the Association Française contre les Myopathies to A.F.M. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: nicolasprevel@gmail.com

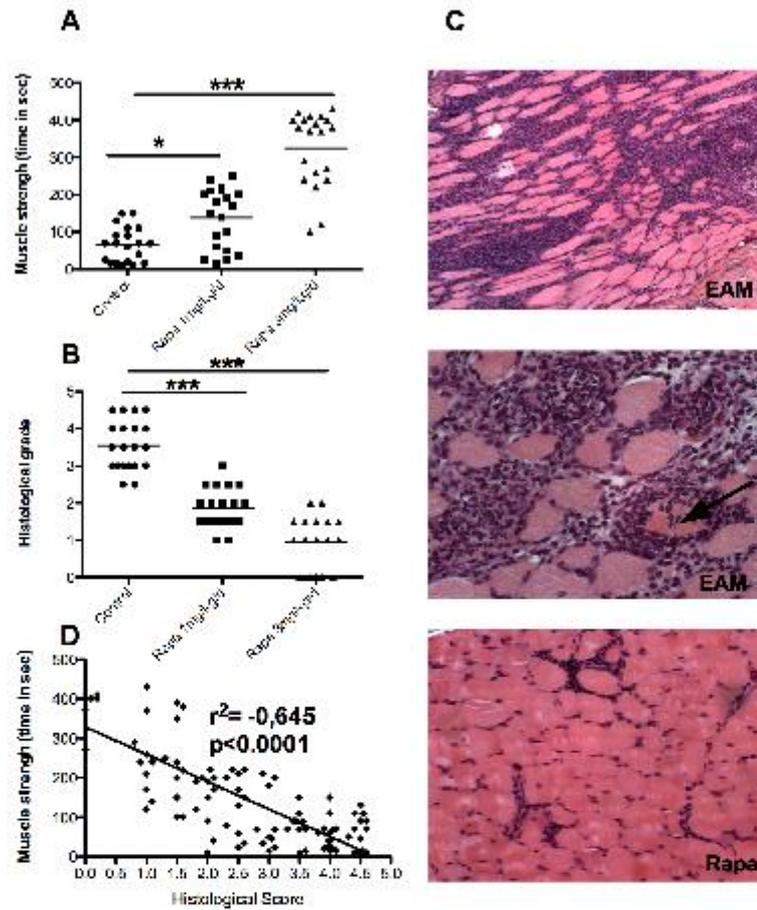
† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Idiopathic inflammatory myopathies are a heterogeneous group of different diseases, classified into four main categories: dermatomyositis, polymyositis which frequently overlap other connective tissue diseases, immune-mediated necrotizing myopathy, and sporadic inclusion body myositis [1–3]. Polymyositis presents endomyarial inflammatory cell infiltrates (rich in CD8<sup>+</sup> T-cells), surrounding and invading non-necrotic muscle fibres, in parallel with a diffuse histocompatibility class I overexpression [4]. The treatment of polymyositis consists of corticosteroids frequently associated with other immunosuppressive drugs [5]. The obligatory and often severe side effects of these drugs, which have to be taken for several months or years, prompted us to propose alternative treatments, which were tested in experimental animal models.

We previously described the induction of experimental autoimmune myositis (EAM) in mice by immunization with partially-purified myosin [6]. This EAM model mimics closely polymyositis, showing muscle weakness and inflammation, and extensive CD8<sup>+</sup> T cells and macrophages infiltrates. We further demonstrated that it was possible to induce the disease by adoptive transfer of unsorted lymph node cells or *in vitro* restimulated sorted CD4<sup>+</sup> T cells in wild type mice. In this EAM model, we also demonstrated that regulatory T cells (Treg) can ameliorate the disease phenotype [6].

Tregs represent around 10% of CD4<sup>+</sup> T cells. Tregs in mice and humans express the transcriptional factor FoxP3 encoding for the forkhead/winged-helix transcription factor scurf1 [7–9]. Quantitative or qualitative deficits in the Treg compartment have been reported in many mouse models of autoimmune diseases and in humans [10–14].



**Figure 1. Preventive administration of rapamycin permits to decrease severity of EAM.** A: strength (time to fall) improvement in rapamycin-treated mice. B: gastrocnemius, quadriceps, and triceps muscle inflammatory infiltrates evaluated by histological grading after hematoxylin-eosin staining as illustrated in C. C: the first two upper images represent a gastrocnemius section of an EAM mouse untreated with a histological score of 4 (HE,  $\times 20$ ). The middle picture also shows an invaded/tunnelized fiber (arrow, HE,  $\times 40$ ). The third image panel represents a gastrocnemius section of a EAM mouse treated with 3 mg/kg/day of rapamycin, displaying a histological score of 1 (HE,  $\times 20$ ). D: correlation between muscle strength (time to fall) and histological grade of inflammation. doi:10.1371/journal.pone.0074450.g001

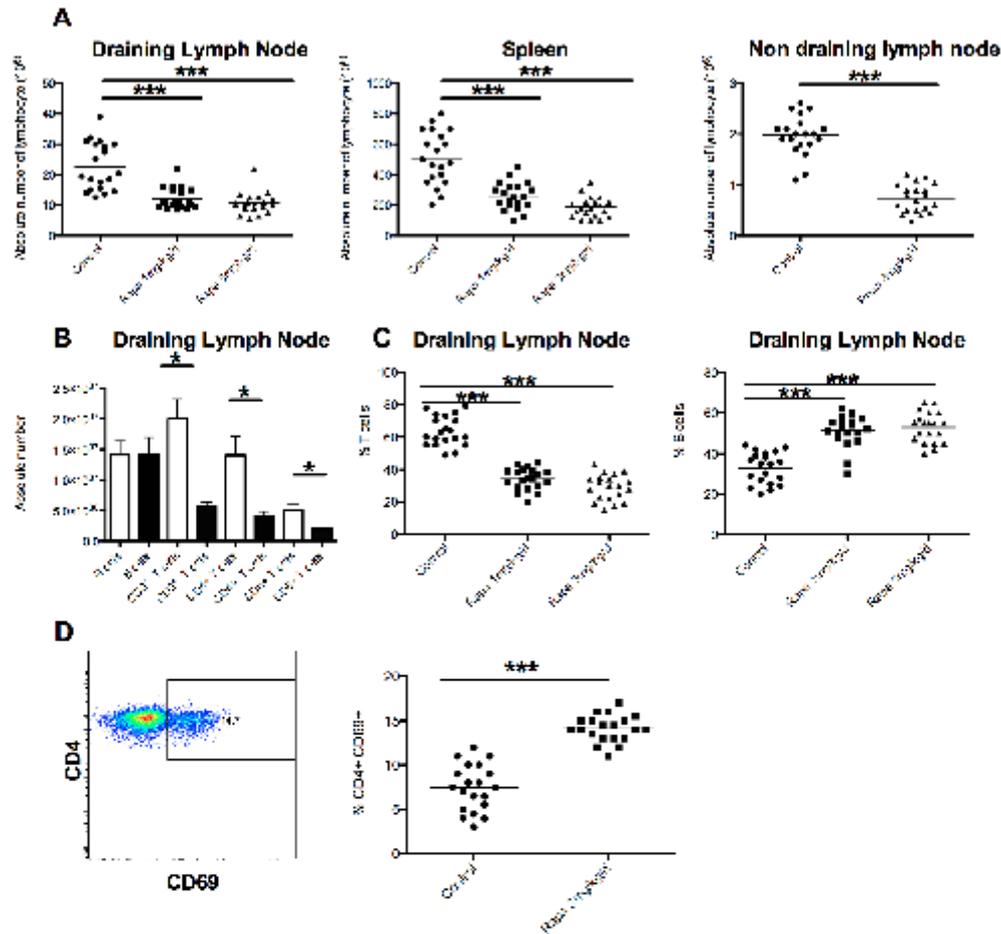
Rapamycin is a known potent immunomodulator with less side effects compared to other immunosuppressants (e.g. ciclosporin). Rapamycin has been used for a decade in transplant patients to prevent graft rejection [15]. *In vivo*, rapamycin has been described to increase the percentage of Treg [16–18].

The aim of this study was to test the efficacy of rapamycin *in vivo* in our EAM model and to investigate the effects of the drug on different immune cell sub-populations, with the ultimate goal of developing a new therapeutic approach for polymyositis.

## Methods

### Mice

Six to ten-week-old female BALB/c mice were purchased from Janvier Laboratories. All mice were kept under specific pathogen free conditions and manipulated according to European council directive 86/609/EEC. The study was approved by the Regional Ethical Committee 3 of Ile-de-France.



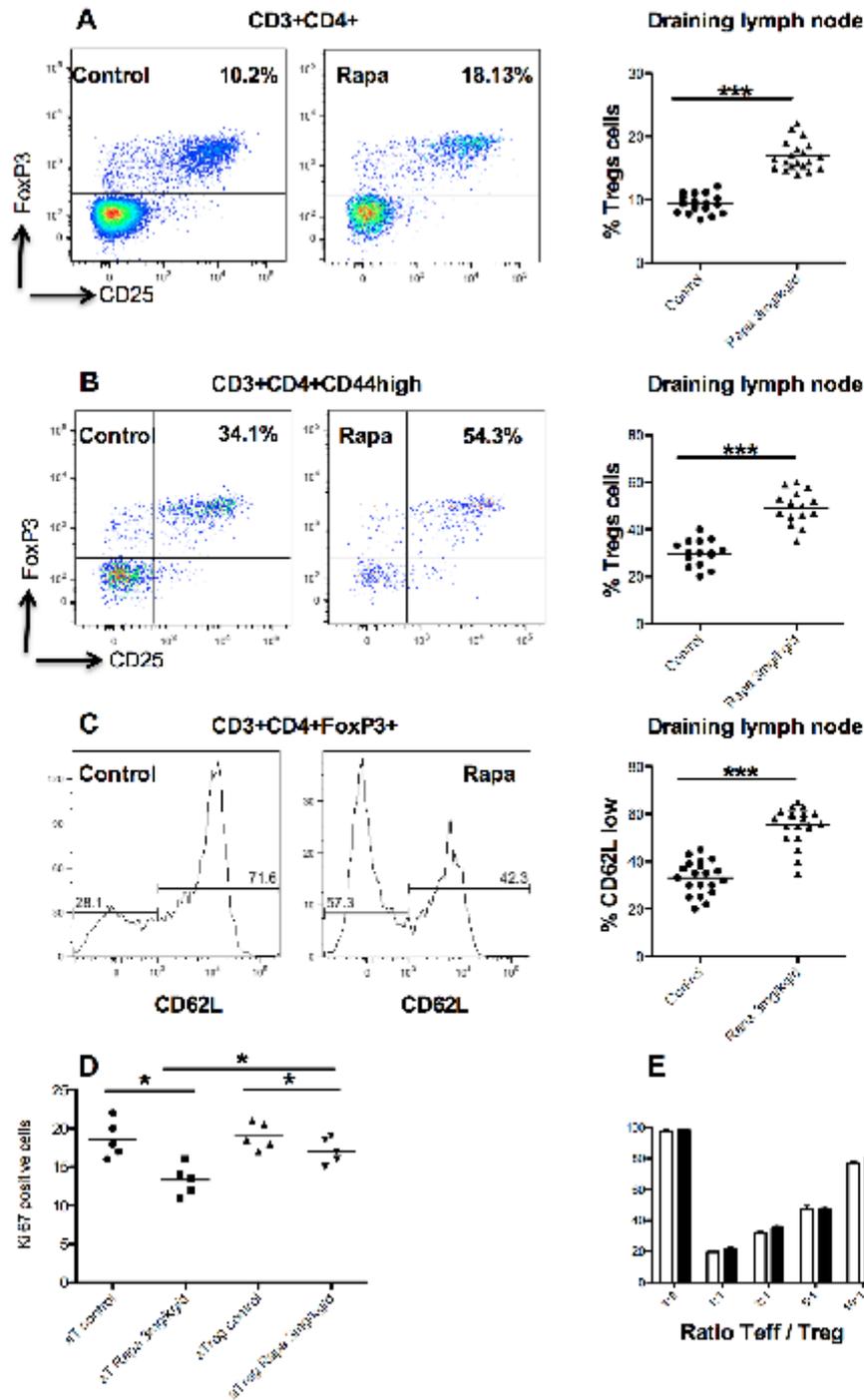
**Figure 2. Rapamycin treatment induced a T cells lymphopenia sparing B cells.** A: absolute lymphocyte number in draining lymph nodes, spleen, and non-draining lymph nodes is decreased in rapamycin-treated mice compare to controls in a dose-dependent fashion. B: quantification of the different sub-populations of lymphocytes: B lymphocytes (B, CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>), T (CD3<sup>+</sup>), T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) and T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) cells. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001. White histogram bars: control mice, black histogram bars: rapamycin treated mice (3 mg/kg/day). C: percent of T or B lymphocytes in draining lymph nodes. D: Representative dot plot of flow cytometry analysis of draining lymph nodes for percentage of pre-activated CD4<sup>+</sup> T cell (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) and percentage of pre-activated CD4<sup>+</sup> T cell (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) in controls and rapamycin (3 mg/kg/day) treated mice. doi:10.1371/journal.pone.0074450.g002

#### Evaluation of Muscle Strength

Muscle strength was evaluated using an inverted screen test as described previously [6, 19] one day before mice sacrifice. Briefly, a mouse was placed at the center of a wire mesh screen, which was inverted horizontally and the time to fall off the screen was recorded. All mice were evaluated independently by one investigator who was blinded to the immunization protocol.

#### Preparation of Myosin

Myosin was partially purified according to the method previously reported [6]. Briefly, A total of 30 ml of chilled 0.3 M/L KCl–0.15 M/L sodium phosphate buffer (pH 6.5) was added to 10 g of minced muscle tissue and kept on ice for 45 minutes. This homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 30 minutes at 4°C, and the supernatant collected. The filtrate was then diluted with 15 volumes of chilled Milli-Q-filtered (Millipore,



**Figure 3. Effect of rapamycin on Treg cells.** Representative dot plot of flow cytometry analysis of draining lymph nodes for percent of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in CD4<sup>+</sup> (A) and in CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (B) in controls and rapamycin (3 mg/kg/day) treated mice. Percent of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in CD4<sup>+</sup> (A, right) and in CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (B, right) in controls and rapamycin (3 mg/kg/day) treated mice. C: Histogram representative of the difference in activation of Treg (CD62L<sup>low</sup> cell) and naive Treg (CD62L<sup>high</sup>) in controls and rapamycin (3 mg/kg/day) treated mice. D: Suppressive test. Horizontal lines indicate means. Suppressive activity of sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (Treg) from controls (white bars) and rapamycin (3 mg/kg/day, black bars) mice on the proliferation of autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells (responders) stimulated with irradiated (15 Gy) splenocytes. Proliferation of responder cells (Teff) was measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (counts per minute, cpm). Results are indicated as percentage inhibition ( $\pm$ SD) compared to a max (ratio 1.0). Different Teff:Treg ratios were tested. E: Percent of Ki-67 positive cells (i.e. proliferative cells) in activated effector (aT) and activated regulatory (aTreg) T cells in controls and rapamycin (3 mg/kg/day) treated mice.  
doi:10.1371/journal.pone.0074450.g003

France) purified water to precipitate the myosin. The precipitated myosin was collected by centrifugation at 5000 rpm, dissolved in 0.5 M/L KCl, and stored at  $-80^{\circ}$ .

#### Mice Immunization Protocol

Mice were immunized 3 times, at 1-week intervals, with 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mg myosin (or with 200  $\mu$ l of PBS in control groups) emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma). Myosin was purified from mouse muscle, an extract containing 80% of myosin. These emulsified preparations were injected on bilateral sides of the hind footpads (first immunization), the tail base (second immunization), and flanks (third immunization). Pertussis toxin (Sigma) was injected intra-peritoneally (500 ng in 200  $\mu$ l of saline) during the first immunization. Ten days after the last immunization, muscle blocks were collected for histology.

#### Treatments of mice

In the preventive treatment (Figure S1A), mice received daily oral placebo (200  $\mu$ l of water only, referred to as controls) by force-feeding with a cannula, 1 mg/kg/day of rapamycin (referred to as Rapa 1 mg), or 3 mg/kg/day of rapamycin (referred to as Rapa 3 mg) diluted in 200  $\mu$ l of water, from the day before the first myosin immunization to day 10 after the third myosin immunization (date of their sacrifice). In curative treatment (Figure S1B), mice received daily oral rapamycin (3 mg/kg/d) from one day after the third myosin immunization (at a date where all mice presented inflammatory infiltrates within muscle, Figure S2A) to day 10 after the last immunization (date of their sacrifice). Control animals received 200  $\mu$ l of water daily.

#### Histological Grading of Inflammatory Lesions and Immunohistochemistry

For each animal, paraffin sections from three muscles (gastrocnemius, quadriceps, and triceps) were examined histologically for the presence of mononuclear cell infiltrates and necrosis of muscle fibers. For each sample, eight groups of serial sections were cut at a 200  $\mu$ m distance. From each group, one 5  $\mu$ m-thick section was used for hematoxylin and eosin staining. All fields of each section were analysed. The histological severity of inflammation in each muscle block was graded as previously described [20] by Matsumoto: Grade 1 = involvement of a single muscle fiber or <5 muscle fibers; grade 2 = a lesion involving 5 to 30 muscle fibers; grade 3 = a lesion involving a muscle fasciculus; and grade 4 = diffuse, extensive lesions. When multiple lesions with the same grade were found in a single muscle block, 0.5 points were added to the grade. All slides were evaluated independently by two investigators who were blinded to the immunization protocol that had been used. When results were discordant, the slides were re-evaluated by two pathologists and a consensual score was given after review. For each muscle analysed, only the highest score was reported. The maximum score is 4.5. Theoretically, the maximum score is 4 (i.e. diffuse, extensive lesions) but when multiple lesions

with the same grade were found in a single muscle block, 0.5 points were added to the grade. If the score is different, the slides are discussed during a pathologists meeting and a consensual score is given after review.

For immunohistological analyses, serial cryosections were fixed with cold acetone and immunostained with rat anti-mouse CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences), rat anti-mouse CD8b (clone 53-5.8, BD Biosciences), rat anti-mouse CD45R/B220 (clone RA3-6B2, BD Biosciences), rat anti-mouse CD11b (clone M1-70.15, BD Biosciences) monoclonal antibodies (BD Biosciences), and rabbit anti-laminin (Sigma) polyclonal antibodies. APC and PE conjugated anti-rat (Ebiosciences) and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (HI, Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and appeared in blue.

#### Flow Cytometric Analysis

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: PE-labeled anti-CD4 (RM4-5, BD Biosciences), anti-CD8 (clone 53-6.7 BD Biosciences), anti-CD19 (clone 1D3, BD Biosciences), anti-CD62L (clone MEL-14, BD Biosciences), anti-FoxP3 (FJK16-second, eBioscience), anti-Ki-67 (SolA15, Ebiosciences), FITC-labeled anti-CD4 (clone RM4-5 BD Biosciences), anti-CD44 (clone MEL-14, BD Biosciences), APC-labeled anti-CD25 (clone PC61 BD Biosciences), PercP CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences), and biotinylated anti-CD25 (clone 7D4, BD Biosciences) revealed with streptavidin-Cy-Chrome (BD Biosciences) and appropriate isotype antibody controls. At least 100,000 events were acquired on a FACS LSRII (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software.

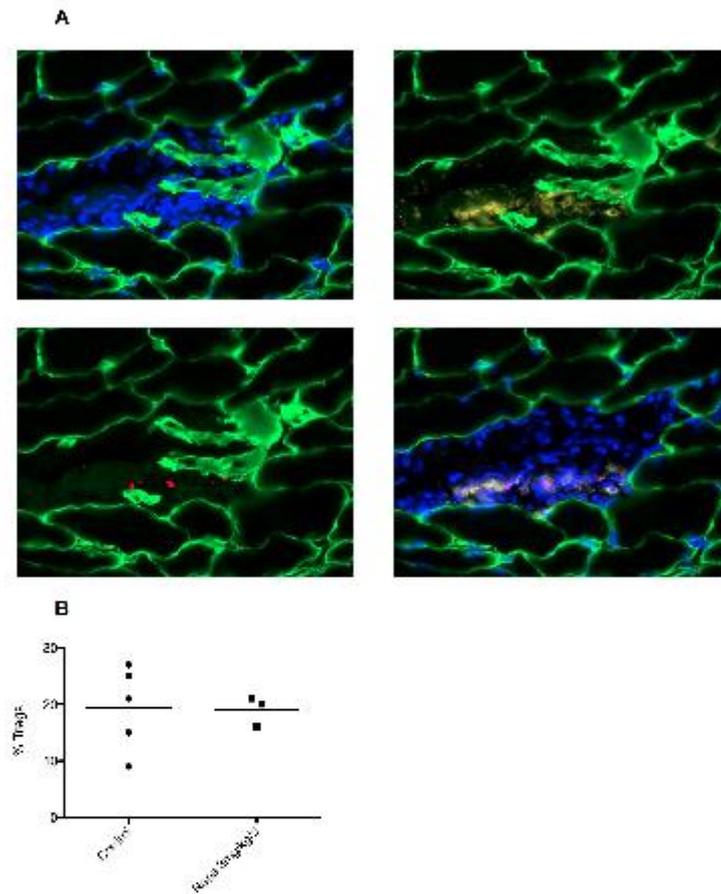
#### Suppression Assays

Splenocytes harvested from control or rapamycin treated mice, were irradiated (20 Gy) and plated onto 96-well plates ( $10^5$  cells/well). T effector cells (Teff, lymph node cells harvested from naive mice) at a constant number ( $10^5$  cells/well) were then added with a varying number of in situ expanded Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sorted cells) to provide Teff/Treg ratios of 1:0, 1:1, 2:1, 5:1, and 10:1. Soluble anti-CD3 mAb (145-2C11, Pharmingen) at a concentration of 2  $\mu$ g/ml provided the polyclonal stimulus for proliferation. Cells were incubated in RPMI with 10% fetal bovine serum in a total volume of 200  $\mu$ l. After 3 days of culture, 1  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Biosciences) was added for the final 12 hours to assess proliferation.

#### Quantitative PCR

Total RNA was extracted from tissues or purified cell populations with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, treated with DNase using a DNA-free kit (Ambion) and subjected to reverse transcription with SuperScript III reverse transcriptase and random hexamers (both from Invitrogen). cDNA was analyzed in duplicate by QPCR amplification using Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems).

Data were analyzed by comparative quantification with MxPro software (Genomics, Agilent Technologies).



**Figure 4. Rapamycin treatment did not alter muscle infiltrates composition.** A: Gastrocnemius muscle fiber membranes are stained with an anti-laminin antibody (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Cells of muscular inflammatory infiltrates are stained with anti-CD4 (yellow) and with anti-FoxP3 (red) antibodies. B: Percent of Tregs (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in muscle inflammatory infiltrates. doi:10.1371/journal.pone.0074450.g004

#### Primer sequences

We looked at the expression of KLF2 in different cell populations using the following primers: forward 5'-AGCC-TATCTTGCCGTCGTTT-3', reverse 5'-CGCCTCGGGTT-CATTTC-3'. We normalized our results with the expression of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPT) in the same cells, using the following primers: forward 5'-CT-TCCCTGCTCAGACCGTTTT-3', reverse 5'-ACCTGGTTC-ATCATCGCTAA-3'.

#### Statistical Analysis

Data are presented as a mean ( $\pm$ SD) for continuous variables and percentage for qualitative variables. Non-parametric Mann-Whitney test was used to compare variables. A p value <0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed

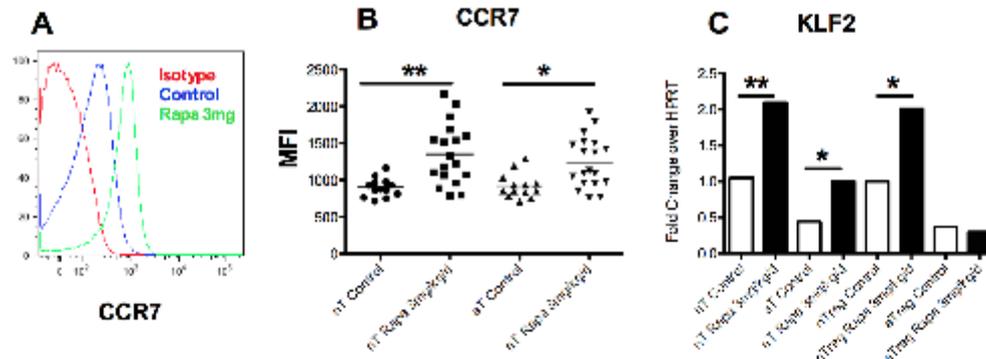
using GraphPad Prism version 4.0 and Instat version 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### Results

##### Preventive treatment with rapamycin results in a reduction of inflammatory infiltrates parallel to an increase in muscle strength

The first step in our study was to investigate preventive effects of rapamycin on EAM by testing two doses of the drug: 1 and 3 mg/kg/day.

Rapamycin was very well tolerated by all mice for the entire duration of the administration protocol, for instance no weight loss was observed (data not shown).



**Figure 5. Change in KLF2 pathway induced by rapamycin treatment.** A: Histogram plot of the shift of CCR7 expression in controls and rapamycin-treated (3 mg/kg/day) mice showing naive T cell subset (nT:CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>). B: Shift of CCR7 expression in controls and rapamycin-treated (3 mg/kg/day) mice in naive T cells (nT:CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>) and activated T cells (aT:CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>hi</sup>). C: Q-RT-PCR of KLF2 in naive T cells (nT:CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup>), activated T cells (aT:CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>hi</sup>), naive regulatory T cells (nTreg:CD62L<sup>hi</sup>), activated Treg cells (aTreg:CD62L<sup>low</sup>) in controls and rapamycin treated (3 mg/kg/day) mice. doi:10.1371/journal.pone.0074450.g005

Compared with controls, a dose-dependent increase in muscle strength was observed (time to fall: controls 66±46 seconds; Rapa 1 mg 138±80 seconds  $p<0.05$ ; Rapa 3 mg 325±1001 seconds;  $p<0.001$  for control vs Rapa 3 mg, Figure 1A). This was accompanied with a parallel decrease in muscle inflammation attested by a lower histological score in EAM animals treated with rapamycin (controls, 3.55±0.67, Rapa 1 mg, 1.85±0.54,  $p<0.001$ , Rapa 3 mg, 0.92±0.69;  $p<0.001$  for control vs Rapa 3 mg, Figure 1B and Figure 1C). In the treated and control animals, clinical and pathological scores showed good correlation ( $R^2 = -0.645$ ,  $p<0.0001$ , Figure 1D).

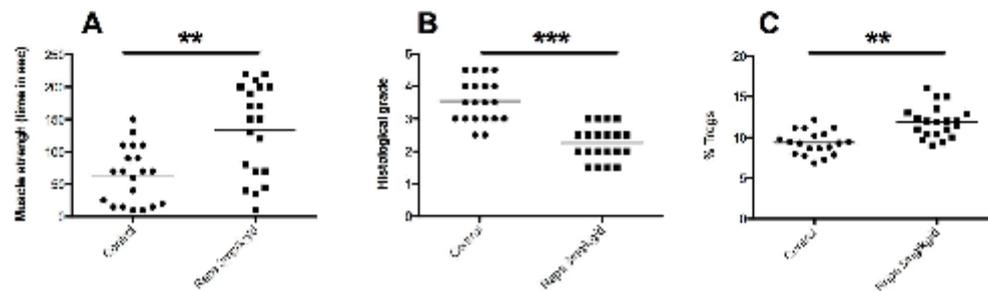
#### Preventive treatment with rapamycin induced a general reduction in frequency of T cells

To explore the mechanisms involved in the improvement of muscle inflammation, we analysed lymphocyte population changes induced by rapamycin in different lymphoid organs. As shown in Figure 2, by comparison to controls, rapamycin induced a

significant decrease in the absolute number of lymphocytes in every tested lymphoid organ (draining or non draining lymph nodes and spleen, Figure 2A) with a dose effect. For instance, in popliteal draining lymph nodes, the number of total lymphocytes was  $21.8\pm 6.9\times 10^6$  in control mice compared to  $11.5\pm 2.7\times 10^6$  ( $p<0.001$ ) in Rapa 1 mg-treated animals.

The lymphopenia observed in rapamycin-treated mice was due to a decrease in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations, i.e. among CD3<sup>+</sup>T cells, the decrease in number was equally partitioned between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2B), leading to a significant decrease in the overall T cell frequency (Figure 2C). Rapamycin had no effect on B cells whose absolute number remained stable (Figure 2B) and percent relative to T cells increased (Figure 2B) due to the reduction in T cell frequency. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells ratio was not different in Rapa 1 and 3 mg/kg/day compare to the control group (Figure 2B).

In the CD4<sup>+</sup> T cell compartment, we observed an increase of pre-activated CD4<sup>+</sup> T (CD69<sup>+</sup>) in popliteal draining lymph nodes



**Figure 6. Beneficial effect of rapamycin (3 mg/kg/day) in curative treatment of EAM.** Rapamycin (or water for control animals) was given orally for 10 days at a dose of 3 mg/kg. A: strength of mice evaluated by inverted screen test (time to fall in seconds). B: Gastrocnemius muscle inflammatory infiltrates evaluated by histological grading after haematoxylin-eosin staining. C: Percent of Treg cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in draining lymph nodes from controls and rapamycin-treated (3 mg/kg/day) mice. doi:10.1371/journal.pone.0074450.g006

in rapamycin treated mice,  $14.1 \pm 1.5\%$  vs.  $7.4 \pm 2.6\%$  in controls mice ( $p < 0.001$ ) (Figure 2D).

#### Despite CD4<sup>+</sup> T cells decrease, rapamycin spares Tregs

Because changes were more marked in animals treated with rapamycin 3 mg/kg/day (Rapa 3 mg), we focused our efforts in comparing this group to control mice. An increased percent of Treg (defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells) was observed in the CD4<sup>+</sup>T cells compartment in Rapa 3 mg mice compare to controls ( $16.9 \pm 2.2\%$  vs.  $9.3 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.001$ , Figure 3A) in draining lymph nodes. In the activated CD4<sup>+</sup>T cells compartment (CD3<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>), a higher proportion of Treg was observed in rapamycin treated mice (Figure 3B). In the Treg compartment, the percentage of activated Treg (CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>hi</sup>Treg) was increased in rapamycin treated mice compare to control ( $58.1 \pm 5.78\%$  vs.  $33.1 \pm 7\%$ ,  $p < 0.001$ , Figure 3C).

As rapamycin increased the relative frequency of Tregs, we tested the suppressive activity of this subset of T cells. To test Treg function, suppressor assays were performed, showing that regulatory functions of Treg were not modified by rapamycin treatment compared to control (37% vs. 39% of suppression at 2:1 suppressor:effector ratio, Figure 3D).

In the activated regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>T cells), we observed (Figure 3E) a decrease of Ki-67 cells ( $19 \pm 1.6$  vs.  $17 \pm 1.4$ ,  $p < 0.05$ ) in rapamycin treated mice compared to control mice. We observed the same effect in effector T cells (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>CD62L<sup>hi</sup>T cells, Figure 3E). Furthermore, inhibition of proliferation under rapamycin is more important in effector cells compared to Tregs cells ( $p < 0.05$ ). Because rapamycin treated mice have an increase percentage of Treg in draining lymph nodes, we wanted then to analyse Treg infiltration within muscles. Infiltrates were mainly composed by macrophages (CD11b), and CD8<sup>+</sup> T cells (data not shown). Some CD4<sup>+</sup> T cells were also observed (Figure 4A), but Treg (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells) remained sparse (Figure 4A). Like for total CD4<sup>+</sup> T cells in draining lymph nodes, there was a decrease in the absolute number of Tregs within the muscle following treatment with rapamycin even if the percentage seemed to remain stable. For 5 different mice in both groups (rapamycin treated and control), one representative cryosection was selected from the most inflamed muscle and FoxP3 and CD4<sup>+</sup> positive cells were counted. In control mice, on 5 representative sections, we counted 16 FoxP3 positive cells out of 81 CD4<sup>+</sup> positive cells. Treg represent then 20% of CD4<sup>+</sup> cells. In rapamycin treated mice, we counted significantly less CD4<sup>+</sup> and FoxP3 positive cells since 2 mice had no detectable inflammatory infiltrate and the 3 remaining had 7 FoxP3<sup>+</sup> cells on 37 CD4<sup>+</sup> cells), but the percentage remained roughly the same, 19% vs 20% in treated vs. control mice ( $p > 0.1$  Figure 4B).

#### Rapamycin modified the KLF2 pathway

An increase in the percent of Treg but also in the frequency of pre-activated CD69<sup>+</sup> effector T cells (Figure 2D) was observed in draining lymph node of Rapa 3 mg mice whereas muscular infiltrates decreased. Therefore, we hypothesized that a T cell trafficking modification under rapamycin treatment could represent one of the mechanisms of action of the drug.

KLF2 is a transcription factor which controls three important genes for lymphocyte homing: the integrins CCR7 and CD62L, involved in the entry of T cells in lymph nodes, and SIP1, involved in their exit [21]. mTOR is known to negatively regulate KLF2<sup>21</sup>. We have then tested if rapamycin is able to modulate these proteins. After 25 days of treatment with rapamycin, an up-regulation of CCR7 was observed at the surface of CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>hi</sup> naive T cell ( $897 \pm 126$  mean fluorescent units [mfi] in

control mice vs.  $1352 \pm 414$  mfi in rapamycin treated mice in draining lymph nodes,  $p < 0.001$ ) but also in CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>hi</sup> activated T cells ( $920.2 \pm 168$  mfi vs.  $1243 \pm 343$  mfi,  $p < 0.05$ , Figure 5A and B). This result is in line with the observed increase level of KLF2 transcripts (Figure 5C) in CD44<sup>low</sup> CD62L<sup>hi</sup> naive T cell ( $1.05 \pm 0.09$  vs.  $2.1 \pm 0.14$ , fold change over HPRT;  $p < 0.05$ ) and in CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>hi</sup> activated T cell ( $0.44 \pm 0.08$  vs.  $1.02 \pm 0.18$ , fold change over HPRT;  $p < 0.05$ ). In naive regulatory T cells, we observed an increase of KLF2 ( $1 \pm 0.15$  vs.  $2.05 \pm 0.19$ ,  $p < 0.05$ ) but not in activated Tregs (Figure 5C).

#### Curative treatment with rapamycin allows for a reduction of inflammatory infiltrates, increase in Treg frequency, and a simultaneous increase in muscle strength

The final step of our study was to test the effect a curative treatment in mice with established EAM (i.e. once EAM is induced by myosin immunization). At the third immunization, all mice presented inflammatory infiltrates within muscle (Figure S2A). Compared to control mice, we observed an increase of muscle strength with rapamycin (time to fall:  $64 \pm 43$  seconds vs.  $134 \pm 70$  seconds,  $p < 0.01$ , Figure 6A) and a decrease of muscle inflammatory infiltrates ( $3.5 \pm 0.6$  vs.  $2.2 \pm 0.5$ ,  $p < 0.001$ , Figure 6B). However, muscular infiltrate was higher in the curative treated mice than the preventive treated mice ( $2.2 \pm 0.5$  vs.  $0.92 \pm 0.69$ ,  $p < 0.001$ ). In the treated and control animals, clinical and pathological scores showed good correlation (Figure S2B) like during the preventive treatment. As in the preventive treatment, we observed an increase in Treg frequency in draining lymph nodes of rapamycin treated mice ( $11.9 \pm 1.92\%$  of Tregs) compared to control mice ( $9.33 \pm 1.4\%$  of Tregs;  $p < 0.001$ , Figure 6C). However, curative treatment had no significant impact on the KLF2, CCR7 cell surface expression comparatively to preventive treatment (data not shown). As for the preventive treatment, we observed around 20% of Treg (FoxP3<sup>+</sup>) among the CD4<sup>+</sup> cells within the muscle inflammatory infiltrates in treated and untreated mice (data not shown).

#### Discussion

In this study we showed that rapamycin decreases the severity of myositis (both clinical and pathological endpoints of the disease) in our model of EAM. This was achieved with both preventive and curative treatment. The amelioration of the disease phenotype was associated with a decrease in effector T cells (Teff) which was not compensated by an increase of proliferation of activated cells and a relative increase of Treg cells in draining lymph nodes. In addition, there is a change in the KLF2 pathway in preventive treatment.

A beneficial role of rapamycin in mice models of autoimmune diseases like experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [17], auto-immune arthritis [22], or NOD mice (diabetic model) [23] have already been reported. Mechanism involved in disease improvement includes a lymphopenia [21] as we observed in our study. Unlike other publication [24], we observed only a modulation of T cells, but not of B cells. Such discrepancy maybe explained by the fact that rapamycin inhibits mainly proliferating cell [6,21]. Rapamycin also induced an increase in the frequency of Treg cells in draining lymph nodes of EAM mice. Others have reported such observation in human and mice for other diseases but not for EAM and polymyositis [16–18,23].

The reason why anti-proliferative effect of rapamycin spare Treg may be explained by the fact that mTOR pathway is not crucial for Treg proliferation [24], differently from effector T cell. It is confirmed by the greater decrease of Ki-67<sup>+</sup> (proliferative)

cells among T<sub>H</sub>17 cells compared to Tregs. On the other hand, we did not observe an increase percentage of Treg in muscular compartment. This is in contrast with other models, in particular in EAE [17] in which Treg were strongly increased in the central nervous system and to a less extent in draining lymph nodes. Differences in immunisation protocols, in the site of inflammation (muscles vs. central nervous system), and in the treatment regimens, may induce different patterns of T cells proliferation and trafficking [25].

In our study, we also observed an increase in the expression of T cell homing marker KLF2 in rapamycin treated mice (in preventive treatment). KLF2 is a transcription factor which positively regulate the expression of the integrin CD62L and the chemokine receptor CCR7 involved in the entry of lymphocytes in lymph nodes [26–29]. Notably KLF2<sup>-/-</sup> mice have decrease naive T cell and accumulation of T cells within tissues especially muscles because of an over expression of CCR-3 and CCR-5 [30]. Indeed, recent *in vitro* data showed that the KLF2 is down regulated by mTOR pathway and that rapamycin increased its expression [31]. For the first time, we show *in vivo* an increase of KLF2, expression in naive and effector T cells with the administration of rapamycin.

Thus together our data suggest that rapamycin improved EAM by inhibiting effector T cell responses, including autoreactive T cells proliferation (Ki-67<sup>+</sup> cells), but also maintaining effector T cells in draining lymph nodes. Furthermore, by sparing Treg proliferation in draining lymph node, rapamycin permits to increase Treg/Teffector cells ratio which is crucial to improve Treg-mediated immunosuppression [24].

Curative treatment also permitted to decrease the severity of the myositis but less efficacious than the preventive treatment did. This discrepancy is probably due to the fact that in curative regimen muscular inflammation is already established whereas by definition in preventive settings treatments avoid muscular infiltrates and/or that the duration of treatment is longer in the preventive protocol.

Rapamycin has been extensively used as immunosuppressant in transplantation. In recent years, a growing interest in the sparing

effect of rapamycin on Tregs [32] has promoted the initiation of several clinical trials in which the drug has been tested in autoimmune diseases like diabetes (Rapamune in Type 1 Diabetes, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, number NCT00525889). To date, no cases were reported in which rapamycin was used to treat polymyositis, nevertheless, two cases of refractory dermatomyositis treated by rapamycin with good results have been published [33,34], suggesting that the drug could have a beneficial effect in patient affected by autoimmune myositis.

## Conclusion

These observations suggest that rapamycin may represent an effective new therapeutic approach in patients with polymyositis, allowing to reduce steroid administration. This approach may be particularly beneficial in this patient population, as a deficiency in Treg frequency has been reported in individuals affected by polymyositis [35].

## Supporting Information

**Figure S1 Description of preventive treatment (A) and curative treatment (B) by rapamycin in the EAM model. (TIFF)**

**Figure S2 Kinetic of histological score and correlation between muscle strength (time to fall) and histological grade. A: histological score of animals over time after 3 weekly immunizations against myosin at day 0, 7, and 14 (D0, D7, and D14, respectively). B: correlation between muscle strength (time to fall) and histological grade of inflammation after curative treatment of EAM. (TIFF)**

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DK BS OB. Performed the experiments: NP YA. Analyzed the data: NP YA. Contributed reagents/materials/analysis tools: DK BS OB. Wrote the paper: NP YA.

## References

- Banker BQ (1975) Dermatomyositis of childhood, ultrastructural alterations of muscle and intramuscular blood vessel. *J Neuropathol Exp Neurol* 34: 46–75.
- Dalakas MC (2007) Autoimmune inflammatory myopathies. *Health Clin Neurol* 86: 273–301.
- Troyanov Y, Targoff IN, Tenckhoff JL, Coulet JB, Raymond V, et al. (2003) Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* 84: 231–240.
- van der Meulen MF, Benzer IM, Hoogendijk JE, Burger H, van Venrooij WJ, et al. (2003) Rbmyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61: 316–321.
- Dalakas MC (2012) Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. *Autoimmun Rev* 11: 203–206.
- Alkhabaz Y, Soly S, Cregoire S, Dubourg O, Salomon B, et al. (2009) Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis. *Am J Pathol* 174: 989–998.
- Fantuzzi JD, Gavin MA, Rudenski AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330–336.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD (2003) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15: 430–435.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057–1061.
- Darmas-Jone G, Khammann D, Charlotte F, Salomon BI, Cohen JL (2006) CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett* 102: 106–109.
- Frey O, Penrow PK, Gajek M, Siegrund K, Hachisaka J, et al. (2005) The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: suppression of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther* 7: R291–301.
- Hsu WT, Sun JJ, Chiang BL (2006) The role of CD4+CD25+ T cells in autoantibody production in murine lupus. *Clin Exp Immunol* 145: 513–519.
- Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Brynilds ML, Daksh DI (2006) Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells. *J Immunol* 177: 1451–1459.
- Ternsch C, Finon S, De Kozak Y, Kaidouri M, Lehong P, et al. (2006) Regulatory T cells control uveoretinitis induced by pathogenic Th1 cells reacting to a specific ocular antigen. *J Immunol* 176: 7171–7179.
- Sankaran RN, Metcalfe MS, Nicholson ML (2001) Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 59: 3–16.
- Dasia M, Mangano K, Amoroso A, Mazzorin MC, Imbri R, et al. (2009) Treatment with rapamycin ameliorates clinical and histological signs of protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti rats and induces expansion of peripheral CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Autoimmun* 33: 135–140.
- Eposito M, Ruffini F, Bellone M, Gagliani N, Battaglia M, et al. (2010) Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. *J Neuroimmunol* 220: 52–63.
- Lai L, Neovius P, Cimochi R, Sharp A, Sigliano E, et al. (2012) Rapamycin reduces clinical signs and neuropathic pain in a chronic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 243: 43–51.
- Conte C, Rawlins JN, Deacon RM (2001) A comparison of 129/SvEv and C57BL/6J mice on a test battery assessing sensorimotor, affective and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice. *Behav Brain Res* 124: 33–46.
- Kojima T, Tamama N, Akawa Y, Shin T, Suzuki A, et al. (1997) Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *J Neurol Sci* 151: 141–148.
- Chi H (2012) Regulation and function of mTOR signaling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* 12: 325–338.

22. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, Sieghart W, Furerer T, et al. (2010) Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 2294–2302.
23. Battaglia M, Stabile A, Draghici E, Migliorini B, Gregori S, et al. (2006) Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells. *Diabetes* 55: 1571–1580.
24. Thomson AW, Tamquist HR, Raimondi G (2009) Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9: 324–337.
25. Viola A, Molon B, Costantini RL (2008) Chemokines: coded messages for T-cell missions. *Front Biosci* 13: 6341–6353.
26. Weinreich MA, Takada K, Skon C, Reiner SL, Jameson SC, et al. (2009) KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immunity* 31: 122–130.
27. Bradley SK, Thomas SY, Luster AD (2005) Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 6: 895–901.
28. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, et al. (2005) Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol* 6: 889–894.
29. Kumbh H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohgushi I, et al. (2006) CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24: 165–177.
30. Sebasta E, Zou Z, Lee JS, Wang T, Kahn ML (2008) Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat Immunol* 9: 292–300.
31. Sinclair LV, Finlay D, Feijoo C, Comish GH, Gray A, et al. (2008) Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9: 513–521.
32. Roncarolo MG, Gregori S, Lucarelli B, Cicci F, Bacchetta R (2011) Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Rev* 241: 145–163.
33. Kaporos Z, Eberhardt WB, Kahn BD (2008) Case report: successful treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder and quiescence of dermatomyositis with rituximab and sirolimus. *Transplant Proc* 40: 1744–1746.
34. Nadinizzi U, Ashier JL (2005) Rapamycin (sirolimus) as a steroid-sparing agent in dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol* 52: 17–19.
35. Basica I, Besku A, Fittol G, Szwarc C, Ionescu R, et al. (2009) Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity* 42: 41–49.

**Intravenous immunoglobulin decreases experimental autoimmune myositis by Th2 pathway**

*Prevel Nicolas, Allenbach Yves, Louiza Arouche-Delaperche, Damien Amelin, Benveniste Olivier*

Le traitement par injection intraveineuse d'immunoglobulines humaines polyvalentes (IgIV) permet de moduler la réponse immunitaire en contrôlant la réaction auto-immune sans exposer le patient aux complications dues à l'immunosuppression. Au cours de la PM, les IgIV (Cherin et al., 2002), en particulier dans les formes réfractaires de la maladie, ont fait la preuve de leur efficacité néanmoins, les mécanismes d'action impliqués restent indéterminés.

Au cours de la PM, la présence d'auto-Ac est observée dans 60 à 80% des cas (Mammen, Nature Rev. 2009). Certains de ces auto-anticorps (auto-Ac) sont dits « spécifiques des myosites » (ASM). Les ASM de type Ac anti-synthétases sont les plus fréquemment retrouvés (Targoff, 2002). S'il existe des arguments cliniques et expérimentaux indirects pouvant suggérer l'imputabilité des ASM dans la physiopathologie de la maladie (Targoff, 2008) ; (Stone et al., 2007); (Richards et al., 2009) ;(Casciola-Rosen et al., 2005); (Levine et al., 2007), à ce jour aucune preuve formelle de leur pathogénicité n'a été faite, en particulier le transfert des ASM à l'animal ne confère pas de maladie.

Si le rôle pathogène ASM est discuté dans la physiopathologie de la PM, les IgIV peuvent théoriquement contrôler leur effet pathogène par de plusieurs manières: en favorisant élimination des auto-Ac (Bussel et al., 1993), par un effet anti-idiotypique (Kazatchkine and Kaveri, 2001), ou en permettent l'augmentation de récepteurs inhibiteurs.

Il existe peu de données publiées concernant l'effet des IgIV sur les Tregs et certaines sont contradictoires (Zhu et al., 2006) ; (Ephrem et al., 2008). Cependant, le traitement par IgIV permet une expansion significative des Tregs (Ephrem et al., 2008) et une diminution très significative de la sévérité de maladie. De plus, les propriétés immunomodulatrices des Tregs peuvent être augmentées par le traitement par IgIV. (Ephrem et al., 2008), (Kessel et al., 2007).

Nous allons étudier dans notre modèle murin, l'effet des IgIV sur la MAE. En particulier, nous étudierons l'impact de ce traitement sur les Tregs au cours de la myosite ce qui n'a, à ce jour, jamais été réalisé.

Une première série expérimentale était destinée à tester l'effet prophylactique de l'injection intra péritonéale à 1g/kg/j pendant 2 jours d'IgIV (J-2 et J-1). Avec ce traitement, nous n'observons pas d'effet bénéfique statistiquement significatif, d'un point de vue clinique et histologique. L'infiltrat reste aussi important.

A l'inverse, une deuxième série expérimentale a été effectuée, testant cette fois l'effet curatif de l'injection intra péritonéale de 1g/kg/j pendant 2 jours d'IgIV à J14 et J15 (au décours des immunisations), jusqu'à l'euthanasie à J24. A J14, toutes les souris sont malades. On remarque un effet bénéfique de ce traitement au niveau du score clinique et histologique. Ce score est corroboré par une augmentation significative du pourcentage de Tregs dans les ganglions drainant. De plus, nous observons un switch du profil Th1 vers Th2 sous IgIV

# Intravenous immunoglobulin decreases experimental autoimmune myositis by Th2 pathway

***Prevel Nicolas<sup>1</sup>, Allenbach Yves<sup>1</sup>, Louiza Arouche-Delaperche<sup>1</sup>, Damien Amelin<sup>1</sup>, Butler-Browne Gillian<sup>2</sup>, Benveniste Olivier<sup>1,3</sup>***

1: Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Inflammatory Muscle Team, Myology Research Center, UM76, INSERM U974 and CNRS FRE 3617 UMRS

974? Gill? and Institute of Myology, F-75013, Paris, France

2: Equipe 2, Remodelage, Régénération et Thérapie du muscle strié, Myology Research Center, UM76 and INSERM U974 and CNRS FRE 3617 and Institut

de Myologie, F-75013, Paris, FranceGill?

3: Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence Maladies Neuro-Musculaires Paris-Est, DHU I2B, AP-HP, Hôpital Pitié-

Salpêtrière, F-75651, Paris, France

**\*Correspondence:** Nicolas Prevel; nicolasprevel@gmail.com

## Abstract

Treatment with intravenous human polyvalent immunoglobulins (IVIg) modulates the immune response through still debated different mechanisms, but without exposing patients to complications due to immunosuppression. In a mouse model of experimental autoimmune myositis (EAM) mimicking polymyositis that we developed, our aim was to test the efficacy of IVIg *in vivo*, to investigate their effects on different immune cell sub-populations and cytokine environment. Under curative treatment (2 g/kg at day 15, once the myositis was induced), an increase of muscle strength was observed with in parallel a decrease of muscle inflammation. Among T cells, the frequency of Treg was increased in IVIg treated mice in draining lymph nodes, which were mostly activated regulatory T cells (CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>) compared to effector cells. In IVIg treated mice, inhibition of proliferation (Ki-67<sup>+</sup>) is more important in effector T cells compared to Tregs cells. Moreover, IVIg also induced a TH1 to TH2 switch. IVIg showed an efficacy as curative treatment in our murine model of experimental myositis by modifying the balance of regulatory T / T effector cells and inducing a TH1/TH2 switch.

## ***Introduction***

Idiopathic inflammatory myopathies are a heterogeneous group of different auto-immune diseases. Polymyositis (PM) which are now frequently considered as an syndrome because of extramuscular involvement (most frequently the chest) is the first cause of autoimmune myositis before 50 years (Trojanov et al., 2005). The hallmark of PM is muscle weakness leading sometimes to a severe handicap, but also other potentially life-threatening complications, in particular those due to interstitial lung disease (Banker, 1975; Dalakas, 2007; Marie et al., 2002; Trojanov et al., 2005), justifying the combined used of immunosuppressive and/or immunomodulatory therapies including IVIg. IVIg have demonstrated some efficacy in PM, and their used is recommended in refractory cases (Elovaara et al., 2008).

IVIg are a collection of IgG pooled from the plasma of over thousand healthy bloods donors. IVIg exerts a number of immunoregulatory functions through its interaction with innate and adaptive immune system (Durandy et al., 2009) and thereby imposing immune homeostasis notably during rheumatic diseases, nevertheless its precise mechanisms of action are not yet fully understood (Bayry et al., 2011). Furthermore, IVIg do not expose patients to complications due to immunosuppression (Bussel et al., 1993).

Insights in mechanisms of action of IVIg may provide the development of alternative immune targeted treatments in PM patients. However to our knowledge such mechanisms have not been yet investigated in PM patients.

Based on pathological analysis, muscular damages in PM involved auto-immune Th-1 responses with cytotoxic CD8 T cells against muscle fibers over-expressing the CMH-1 at their surface (Hoogendijk et al., 2004). Th-1 response may be controlled by regulatory T cells

or inhibited by Th-2 cytokines (Sakaguchi et al., 2008). Recently, it has been demonstrated that IVIg can induce a switch from Th-1 polarization to Th-2 (Anthony et al., 2011). Treatment with IVIg allows also an expansion of Treg (Trinath et al., 2013) and an increase of their immunomodulatory properties (Ephrem et al., 2008; Kessel et al., 2007; Tha-In et al., 2010). Treg cells are central players in the control of autoimmunity (Sakaguchi, 2000) and are playing an active role in the maintenance of peripheral tolerance (Sakaguchi et al., 2008) as demonstrated in several animal models (Darrasse-Jeze et al., 2006; Frey et al., 2005; Hsu et al., 2006; Scalapino et al., 2006; Terrada et al., 2006).

We previously develop an experimental autoimmune myositis (EAM) model of PM in mice (Allenbach et al., 2009; Prevel et al., 2013) and demonstrated that Treg can improve the disease (Allenbach et al., 2009) (Prevel et al., 2013).

The aim of this study was to test the efficacy of IVIg *in vivo* in our EAM model and to investigate the effects of this biotherapy focusing on immune adaptative system including Treg and Th-1/Th-2 balance.

## ***Methods***

### ***Mice***

Eight to ten-week-old female BALB/c mice were purchased from Janvier Laboratories. All mice were kept under specific pathogen free conditions and manipulated according to European council directive 86/609/EEC.

### ***Evaluation of Muscle Strength***

Muscle strength was evaluated using an inverted screen test as described previously (Allenbach et al., 2009; Contet et al., 2001) one day before mice sacrifice. Briefly, a mouse was placed at the center of a wire mesh screen, which was inverted horizontally and the time to fall off the screen was recorded.

### ***Preparation of Myosin***

Myosin was partially purified according to the method previously reported (Allenbach et al., 2009). Briefly, A total of 30 ml of chilled 0.3 M/L KCl–0.15 M/L sodium phosphate buffer (pH 6.5) was added to 10 g of minced muscle tissue and kept on ice for 45 minutes. This homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 30 minutes at 4°C, and the supernatant collected. The filtrate was then diluted with 15 volumes of chilled Milli-Q-filtered (Millipore, France) purified water to precipitate the myosin. The precipitated myosin was collected by centrifugation at 5000 rpm, dissolved in 0.5 M/L KCl, and stored at -80°.

### ***Mice Immunization Protocol***

Mice were immunized 3 times, at 1-week intervals, with 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mg myosin emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma) for the first immunization (day 0), followed by incomplete Freund's adjuvant (IFA, Sigma) for the second (day 7) and third ones (day 14). These emulsified preparations were injected on bilateral sides of the hind footpads (first immunization), the tail base (second immunization), and flanks (third immunization). Pertussis toxin (Sigma) was injected intra-peritoneally (500 ng in 200 µl of saline) during the first immunization. Ten days after the last immunization (day 24), muscle blocks were collected for histology.

### ***Treatments of mice***

In the preventive treatment, mice received IVIg 2 days straight (1g/kg), starting one day before the first myosin immunization. In curative treatment, Mice received IVIg 2 days straight (2x1g/kg), starting the day after the last myosin immunization (days 15-16, referred to as IVIg1x), with for some mice a second injection at days 20-21 (referred to as IVIg2x. Control animals received the same volume of PBS.

### ***Histological grading of inflammatory lesions and immunohistochemistry***

For each animal, paraffin sections from three muscles (gastrocnemius, quadriceps, and triceps) were examined histologically for the presence of mononuclear cell infiltrates and necrosis of muscle fibers. For each sample, eight groups of serial sections were cut at a 200

µm distance. From each group, one 5µm-thick section was used for hematoxylin and eosin staining. All fields of each section were analysed. The histological severity of inflammation in each muscle block was graded as previously described (Kojima et al., 1997) by Matsumoto: Grade 1 = involvement of a single muscle fiber or <5 muscle fibers; grade 2 = a lesion involving 5 to 30 muscle fibers; grade 3 = a lesion involving a muscle fasciculus; and grade 4 = diffuse, extensive lesions. When multiple lesions with the same grade were found in a single muscle block, 0.5 points were added to the grade. All slides were evaluated independently by two investigators who were blinded to the immunization protocol that had been used. For each muscle analysed, only the highest score was reported.

### ***Flow Cytometric Analysis***

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: PE-labeled anti-CD4 (RM4-5, BD Biosciences), anti-CD8 (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-CD62L (clone MEL-14, BD Biosciences), anti-FoxP3 (FJK16-second, eBioscience), anti-Ki-67 (SolA15, Ebiosciences), FITC-labeled anti-CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences), anti-CD44 (clone MEL-14, BD Biosciences), APC-labeled anti-CD25 (clone PC61, BD Biosciences), anti-CD44 (clone IM7 eBiosciences) and appropriate isotype antibody controls. At least 100,000 events were acquired on a FACS LSR II (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software.

### ***Cell sorting and Quantitative PCR***

EAM mice were sacrificed 10 days after the last immunization. Draining lymph nodes (inguinal and popliteal) were collected. After staining, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> lymphocytes were isolated by a cell sorter (Aria-II). Total RNA was extracted from purified cell populations with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's

instructions, treated with DNase using a DNA-free kit (Ambion) and subjected to reverse transcription with SuperScript III reverse transcriptase and random hexamers (both from Invitrogen). cDNA was analyzed in duplicate by QPCR amplification using Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems). Data were analyzed by comparative quantification with MxPro software (Genomics, Agilent Technologies).

### ***Primer sequences***

We looked at the expression of Tbet in different cell populations using the following primers: forward 5'-AACCAAGTATCCTGTTCCCAGC-3', reverse 5'-TGTCGCCACTGGAAGGATAG-3'; and Gata3: forward 5'-GCGGGCTCTATCACAAAATGA-3', reverse 5'-GCTCTCCTGGCTGCAGACAGC-3'.

We normalized our results with the expression of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPT) in the same cells, using the following primers: forward 5'-CTTCCTCCTCAGACCGCTTT-3', reverse 5'-ACCTGGTTCATCATCGCTAA-3'.

### ***Statistical Analysis***

Data are presented as mean ( $\pm$ SD) for continuous variables and percentage for qualitative variables. Non-parametric Mann–Whitney test was used to compare variables. A p value < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 and InStat version 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### **No beneficial effect on muscle strength and muscle inflammation with IVIg was observed after a preventive treatment**

The first step of our study was to investigate preventive effects of IVIg on EAM by injection 2 days straight (1g/kg/d), starting one day before the first myosin immunization.

Compared with controls, no increase in muscle strength was observed (time to fall: controls  $137\pm 59$  seconds, IVIg  $115\pm 60$  seconds,  $p=NS$ ; Figure 1A). This was accompanied with a similar level of muscle inflammation attested by histological score in EAM animals (controls,  $3.2\pm 0.41$ , IVIg,  $3\pm 0.56$ ,  $p=NS$  Figure 1B). At day 9, a transient increased of the peripheral blood percentage of Tregs (examined every three days) was observed in EAM mice compare to controls (controls,  $11.3\pm 0.41\%$ , IVIg,  $15.6\pm 1.56\%$ ,  $p<0.05$ , day 9). No significant differences in muscle inflammatory infiltrates was observed (controls,  $11.5\pm 3.5\%$ , IVIg,  $11.4\pm 4.1\%$ ,  $p=NS$ ).

### **Curative treatment with IVIg allowed for an increase in muscle strength and a simultaneous reduction of inflammatory infiltrates**

The second step of our study was to test the effect of a curative treatment, in mice with already established EAM. At the third immunization, all mice presented inflammatory infiltrates within muscle (data not shown (Allenbach et al., 2009)). Compared to control mice, an increase of muscle strength

was observed with IVIg (time to fall:  $105 \pm 41$  seconds vs. IVIg1x  $135 \pm 62$  seconds,  $p < 0.01$ , and IVIg2x  $128 \pm 53$  seconds,  $p < 0.01$  Figure 2A) and a decrease of muscle inflammatory infiltrates ( $3.2 \pm 0.41$  vs. IVIg1x  $2.7 \pm 0.62$ ,  $p < 0.001$ , and IVIg2x  $2.4 \pm 0.43$ ,  $p < 0.01$  Figure 2B). We did not observe any additional effect with the second series of IVIg injection on strength nor muscle infiltrates (Figure 2B).

### **IVIg inhibited effector CD4<sup>+</sup> T cells compared to Tregs cell**

In draining lymph nodes, the percentage of naïve effector T cells (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup>) was increased in IVIg treated mice compare to controls ( $46 \pm 12.1\%$  vs. IVIg1x  $66.8 \pm 9.9\%$ ,  $p < 0.05$ , and IVIg2x  $73.34 \pm 14.3\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 3C). Furthermore, the opposite result was observed with activated effector cell (CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>high</sup>) ( $52.6 \pm 10.9\%$  vs. IVIg1x  $32.1 \pm 9.3\%$ ,  $p < 0.001$ , and IVIg2x  $25.66 \pm 4.3\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 3D). A decrease of Ki-67 cells was observed ( $22.9 \pm 3.9\%$  vs. IVIg1x  $20.1 \pm 2.5$ , and IVIg2x  $15.85 \pm 3.9\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 3E) in IVIg treated mice compared to control mice only in those who received the double IVIg dose.

By the meantime, the Treg frequency in draining lymph nodes of IVIg treated mice (IVIg1x  $15.2 \pm 3.4\%$  and IVIg2x  $15.59 \pm 4.3\%$  of Tregs) was increased compared to control mice ( $11.52 \pm 3.3\%$  of Tregs;  $p < 0.01$ , Figure 4C). The percentage of activate Tregs cells (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>high</sup>) increased in IVIg treated mice compared to controls ( $58.6 \pm 8.9\%$  vs. IVIg1x  $71 \pm 10.2\%$ ,  $p < 0.01$ , IVIg2x  $78.38 \pm 7.5\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 4D). Also an increase of Ki-67 positive cells ( $35.05 \pm 7\%$  vs IVIg1x  $43.8 \pm 4.8\%$ ,  $p < 0.05$  and IVIg2x  $45.86 \pm 5.8\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 4E) was observed in IVIg treated mice compared to control mice. Conversely, the percentage of naïve Tregs cells (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup>) was decreased in IVIg treated mice compared to controls ( $40.3 \pm 9.55\%$  vs. IVIg1x  $28 \pm 13\%$ ,  $p < 0.001$ , IVIg2x  $20.62 \pm 3.6\%$ ,  $p < 0.05$ , Figure 3C).

## **IVIg permitted a TH1/TH2 switch**

Compared to control mice, IVIg treated mice have a decrease of the INF  $\gamma$  levels (the hallmark of Th-1 cytokine) in the serum ( $355\pm 124$  pg/mL vs IVIg1x  $260\pm 89$  pg/mL,  $p<0.001$  and IVIg2x  $179\pm 46$  pg/mL,  $p<0.05$ , Figure 5A). In the same way, IVIg treated mice have a decreased level of the transcription factor T-bet (the master regulator of Th-1 differentiation program) in draining lymph nodes effector T cells ( $21\pm 5.3\%$  vs. IVIg1x  $11.6\pm 3.4\%$ ,  $p<0.001$ , Figure 5B and IVIg2x  $9.8\pm 2.1\%$ ,  $p<0.05$ ).

Inversely in the serum, levels of the Th-2 cytokine IL-4 was increased in IVIg treated mice compared to control mice ( $37\pm 21$  pg/mL vs IVIg1x  $87.5\pm 14$  pg/mL,  $p<0.001$  and IVIg2x  $89.8\pm 41$  pg/mL,  $p<0.05$ , Figure 5C). In line with these results an up-regulation of the major Th-2 transcription factor GATA3 was observed in effector CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T cells in IVIg compared to control mice ( $11\pm 5.4\%$  vs. IVIg1x  $21.6\pm 3.4\%$ ,  $p<0.001$ , Figure 5B and IVIg2x  $19.8\pm 2.2\%$ ,  $p<0.05$ , Figure 5D). Finally, we observed in IVIg treated mice an increase of seric levels of the Th-2 cytokine IL-33 ( $425\pm 339$  pg/mL vs IVIg1x  $915\pm 237$  pg/mL,  $p<0.001$  and IVIg2x  $878\pm 418$  pg/mL,  $p<0.05$ , Figure 5E)

## Discussion

In this study, we showed that IVIg decreased the severity of myositis (on both clinical and pathological end points) in our model of EAM with curative treatment but not in preventive treatment. Among T cells, the frequency of Tregs and especially the activated Treg was increased in IVIg treated mice, whereas proportion of effector T cells was decreased.

In IVIg treated mice, inhibition of proliferation (Ki-67<sup>+</sup>) is more important in effector T cells compared to Tregs. Previous studies (Frey et al., 2005; Kessel et al., 2007; Scalapino et al., 2006) have shown the beneficial effect of IVIg in preventive treatment in different mouse models including improved activation of Tregs in a murine model of skin allograft, reduces disease in an asthma model with lungs infiltrate decrease. In an EAE model, near our model in terms of disease induction, IVIg treatment induces increase of Tregs in the lymphoid organs, an increase in their suppressive function *in vitro*, increased secretion of IL-10 and a decrease of inflammatory infiltrate in CNS (Ephrem et al., 2008). Similar results are observed in a model of myasthenia gravis (Zhu et al., 2006).

However, in these studies, treatment with IVIg was made every day continuously, a regimen not similar to the one used in humans. This may explain why the preventive treatment does not work in your model unlike other animal models (Ephrem et al., 2008) (Zhu et al., 2006). In mice, the effect of human IVIg is transient, probably due to a xeno-reaction of the murine immune system against humans IVIg, and in models of daily preventative treatment, this xeno-reaction may be overpassed by daily injection of important quantity of IVIg inducing an anergy. In your study, there has been a rapid increase in Tregs, with a peak at D9 but their levels becomes similar to control 5 days later. For these reasons, our study cannot be compared to others where IVIg injections were made every day.

On the other hand, we did not observe an increase of Treg percentage in muscular

compartment by immunofluorescent (data not show). This is in contrast with other models, in particular in EAE (Achiron et al., 2000; Ephrem et al., 2008), in which Tregs were strongly increased in the central nervous system and to a less extent in draining lymph nodes. Once again, this may be due to the number of injections of IVIg which differs greatly between the two protocols. Furthermore, differences in immunisation protocols, in the site of inflammation (muscles vs. central nervous system), may induce different patterns of T cells proliferation and trafficking.

Another possible action of IVIg are Tregitopes, Tregitopes are linear sequences of amino acids contained within the framework of IVIg, especially, Tregitopes 289 and 167, both in the heavy chain of IgG (De Groot et al., 2008). When added *in vitro* to a culture of PBMC cells, these Tregitopes led to an expansion of the number of Tregs and an up-regulation of FoxP3 expression in previously FoxP3- negative T cells. Moreover, T cells responding to some Tregitopes exhibit a T regulatory phenotype (CD4+CD25+FoxP3+) and secrete IL-10, TGF- $\beta$  and MCP-1 (Elyaman et al., 2011).

The reason why anti-proliferative effect of IVIg spared Treg may be also explained by the cytokine environment, which seems to be more favourable for Tregs compare to effector T cell, with a significant increase of IL-4 which is important for the proliferation of Tregs (Maerten et al., 2005). It is confirmed by the greater decrease of Ki-67<sup>+</sup> (proliferative) cells among Teff cells compared to Tregs.

In our study, we also observed an increase of IL-33. A recent study (Anthony et al., 2011)

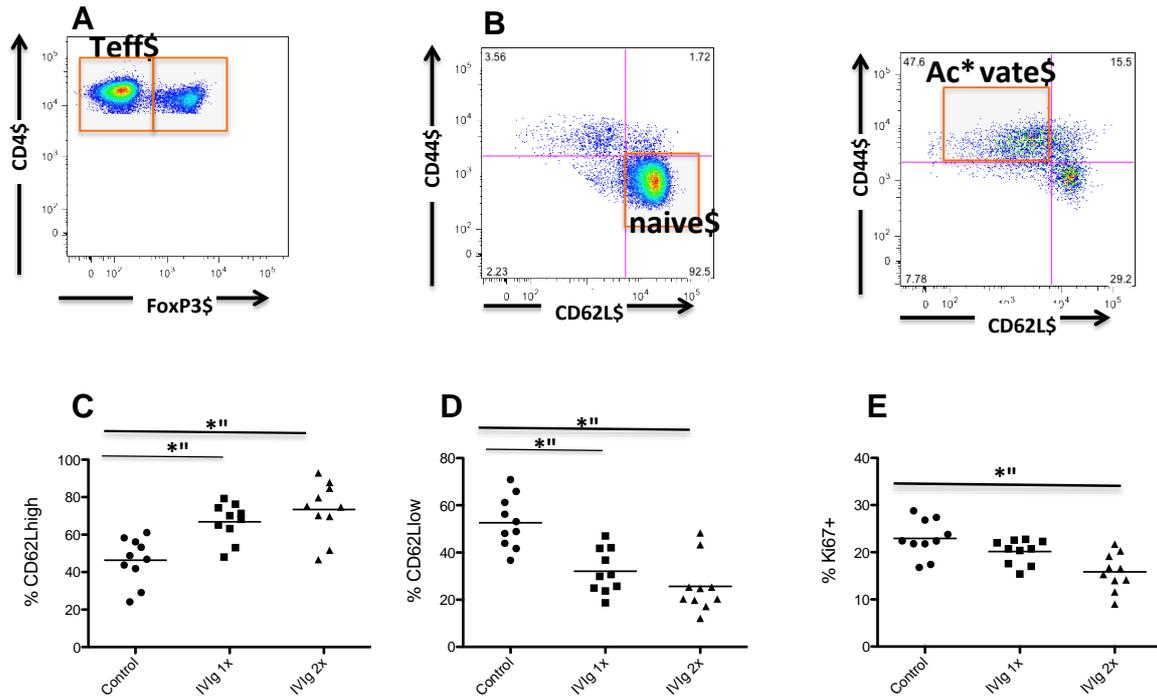
showed an effect of IVIg through IL-33. Immunoglobulins would bind on myeloid cells through their receptor CD32b. This would allow the secretion of IL-33. This cytokine promoted an anti-inflammatory response of macrophages which then secreted IL-4 and a Th2 polarized response. This mechanism is consistent with our results in this model of myositis. It would be interesting to know the levels of IL-33 in patients before and after IVIG treatment and whether this level is correlated with the beneficial effect of treatment. These observations will allow to consider IL-33 as a potential new therapeutic approach in patients with polymyositis, permitting maybe to reduce steroid administration

and administration of IVIg. This approach may be also particularly beneficial in this patient's population, since a deficit in Tregs has been reported in individuals affected by polymyositis (Banica et al., 2009).

In conclusion, IVIg is beneficial in this model for curative treatment, and it seems now important to correlate their effect in humans with IL-33 levels

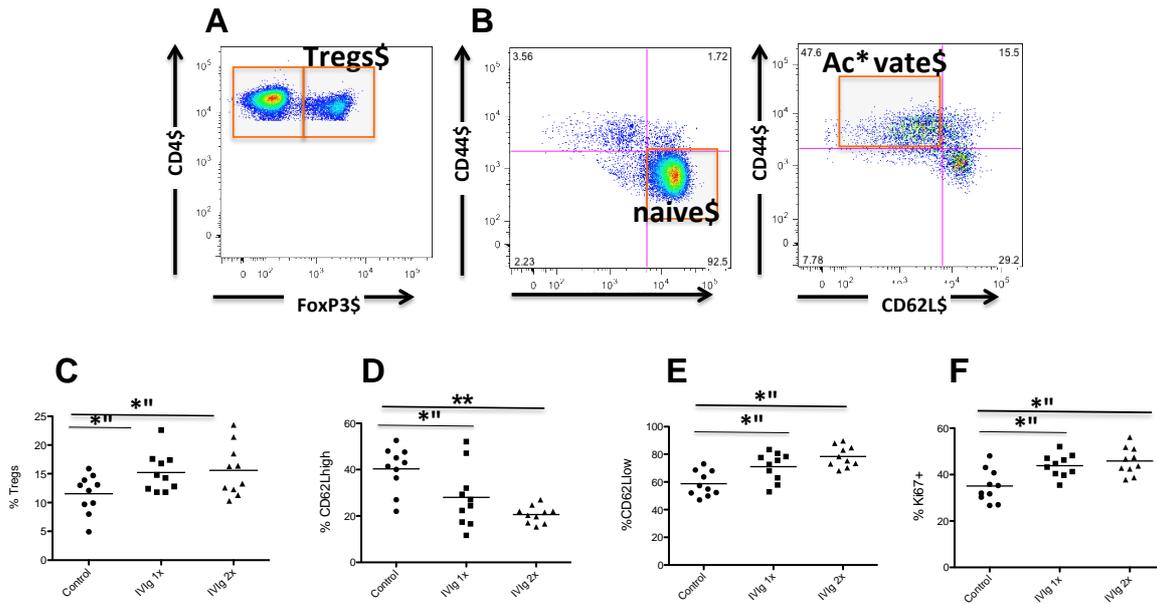






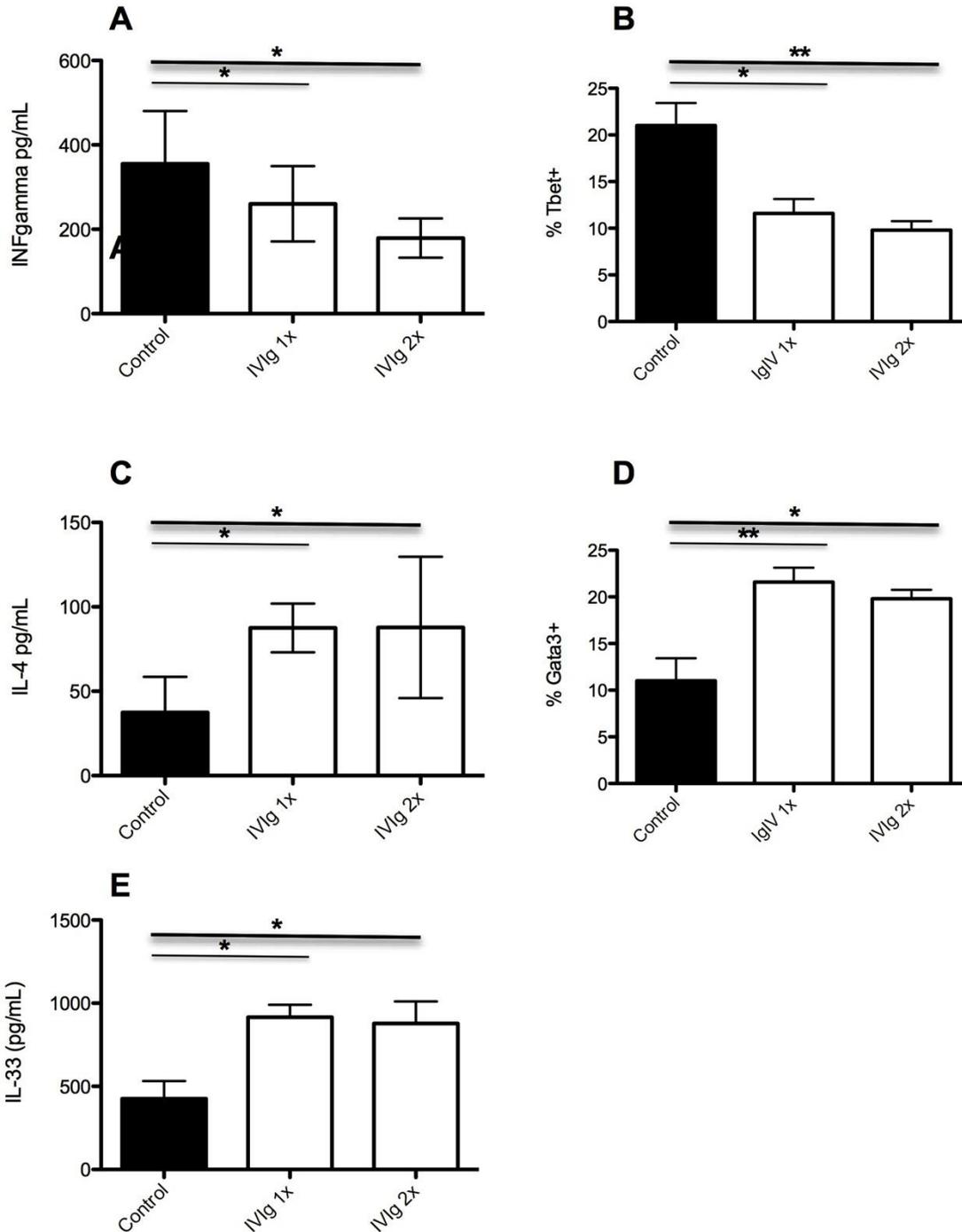
**Figure 3. Effect of IgIV on effector T cells**

Representative dot plot of flow cytometry analysis of draining lymph nodes for percentage of Teff (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>) in CD4<sup>+</sup> (A) and in CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (B) in control and IVIg treated mice. C: Percent of CD62L<sup>high</sup> cell in effector T cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes. D: Percent of CD62L<sup>low</sup> cell in effector T cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes. E: Percent of Ki67<sup>+</sup> cells (i.e. proliferative cells) in effector T cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes.



**Figure 4. Effect of IVIg on Treg cells**

Representative dot plot of flow cytometry analysis of draining lymph nodes for percentage of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in CD4<sup>+</sup> (A) and in CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (B) in control and IVIg treated mice. C: Percentage of Tregs cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes. D: Percentage of CD62L<sup>high</sup> cell in Tregs cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes. E: Percentage of CD62L<sup>low</sup> cell in Tregs cells in control and IVIg treated mice in draining lymph nodes. F: Percent of Ki-67 positive cells (i.e. proliferative cells) in Tregs cells in controls and IVIg treated mice in draining lymph nodes.



**Figure 5. IVig allows a switch Th1/Th2.**A: Levels of INFGamma in serum in controls and IgIV treated mice. B: Q-RT-PCR of Tbet in CD4 T cells in draining lymph nodes in controls and IgIV treated mice. C: Levels of IL-4 in serum in controls and IgIV treated mice. D: Q-RT-PCR of Gata3 in CD4 T cells in draining lymph nodes in controls and IgIV treated mice. E: Levels of IL-33 in serum in controls and IgIV treated mice

## References

- Achiron, A., F. Mor, R. Margalit, I.R. Cohen, O. Lider, and S. Miron. 2000. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenously administered polyclonal immunoglobulins. *Journal of autoimmunity* 15:323-330.
- Allenbach, Y., S. Solly, S. Gregoire, O. Dubourg, B. Salomon, G. Butler-Browne, L. Musset, S. Herson, D. Klatzmann, and O. Benveniste. 2009. Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis. *The American journal of pathology* 174:989-998.
- Anthony, R.M., T. Kobayashi, F. Wermeling, and J.V. Ravetch. 2011. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475:110-113.
- Banica, L., A. Besliu, G. Pistol, C. Stavaru, R. Ionescu, A.M. Forsea, C. Tanaseanu, S. Dumitrache, D. Otelea, I. Tamsulea, S. Tanaseanu, C. Chitonu, S. Paraschiv, M. Balteanu, M. Stefanescu, and C. Matache. 2009. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity* 42:41-49.
- Banker, B.Q. 1975. Dermatomyositis of childhood, ultrastructural alterations of muscle and intramuscular blood vessels. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 34:46-75.
- Bayry, J., V.S. Negi, and S.V. Kaveri. 2011. Intravenous immunoglobulin therapy in rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology* 7:349-359.
- Bussel, A., H. Boulechfar, and R. Naim. 1993. [Immunoglobulins or plasma exchange? Synchronization of plasma exchange and intravenous polyvalent immunoglobulins. A consecutive study of 11 patients]. *Annales de medecine interne* 144:532-538.
- Contet, C., J.N. Rawlins, and R.M. Deacon. 2001. A comparison of 129S2/SvHsd and C57BL/6JOLA Hsd mice on a test battery assessing sensorimotor, affective and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice. *Behav Brain Res* 124:33-46.
- Dalakas, M.C. 2007. Autoimmune inflammatory myopathies. *Handbook of clinical neurology* 86:273-301.
- Darrasse-Jeze, G., D. Klatzmann, F. Charlotte, B.L. Salomon, and J.L. Cohen. 2006. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunology letters* 102:106-109.
- De Groot, A.S., L. Moise, J.A. McMurry, E. Wambre, L. Van Overtvelt, P. Moingeon, D.W. Scott, and W. Martin. 2008. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood* 112:3303-3311.
- Durandy, A., S.V. Kaveri, T.W. Kuijpers, M. Basta, S. Miescher, J.V. Ravetch, and R. Rieben. 2009. Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clinical and experimental immunology* 158 Suppl 1:2-13.
- Elovaara, I., S. Apostolski, P. van Doorn, N.E. Gilhus, A. Hietaharju, J. Honkaniemi, I.N. van Schaik, N. Scolding, P. Soelberg Sorensen, B. Udd, and Efn. 2008. EFNS guidelines for the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases: EFNS task force on the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases. *Eur J Neurol* 15:893-908.

- Elyaman, W., S.J. Khoury, D.W. Scott, and A.S. De Groot. 2011. Potential application of tregitopes as immunomodulating agents in multiple sclerosis. *Neurology research international* 2011:256460.
- Ephrem, A., S. Chamat, C. Miquel, S. Fisson, L. Mouthon, G. Caligiuri, S. Delignat, S. Elluru, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, J.L. Cohen, B.L. Salomon, M.D. Kazatchkine, S.V. Kaveri, and N. Misra. 2008. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 111:715-722.
- Frey, O., P.K. Petrow, M. Gajda, K. Siegmund, J. Huehn, A. Scheffold, A. Hamann, A. Radbruch, and R. Brauer. 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 research & therapy* 7:R291-301.
- Hoogendijk, J.E., A.A. Amato, B.R. Lecky, E.H. Choy, I.E. Lundberg, M.R. Rose, J. Vencovsky, M. de Visser, and R.A. Hughes. 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.
- Hsu, W.T., J.L. Suen, and B.L. Chiang. 2006. The role of CD4CD25 T cells in autoantibody production in murine lupus. *Clinical and experimental immunology* 145:513-519.
- Kessel, A., H. Ammuri, R. Peri, E.R. Pavlotzky, M. Blank, Y. Shoenfeld, and E. Toubi. 2007. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *Journal of immunology* 179:5571-5575.
- Kojima, T., N. Tanuma, Y. Aikawa, T. Shin, A. Sasaki, and Y. Matsumoto. 1997. Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *Journal of the neurological sciences* 151:141-148.
- Maerten, P., C. Shen, D.M. Bullens, G. Van Assche, S. Van Gool, K. Geboes, P. Rutgeerts, and J.L. Ceuppens. 2005. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. *Journal of autoimmunity* 25:112-120.
- Marie, I., E. Hachulla, P. Cherin, S. Dominique, P.Y. Hatron, M.F. Hellot, B. Devulder, S. Herson, H. Levesque, and H. Courtois. 2002. Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism* 47:614-622.
- Prevel, N., Y. Allenbach, D. Klatzmann, B. Salomon, and O. Benveniste. 2013. Beneficial role of rapamycin in experimental autoimmune myositis. *PloS one* 8:e74450.
- Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
- Scalapino, K.J., Q. Tang, J.A. Bluestone, M.L. Bonyhadi, and D.I. Daikh. 2006. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *Journal of immunology* 177:1451-1459.
- Terrada, C., S. Fisson, Y. De Kozak, M. Kaddouri, P. Lehoang, D. Klatzmann, B.L. Salomon, and B. Bodaghi. 2006. Regulatory T cells control uveoretinitis induced by pathogenic Th1 cells reacting to a specific retinal neoantigen. *J Immunol* 176:7171-7179.
- Tha-In, T., H.J. Metselaar, A.R. Bushell, J. Kwekkeboom, and K.J. Wood. 2010. Intravenous immunoglobulins promote skin allograft acceptance by triggering functional activation of CD4+Foxp3+ T cells. *Transplantation* 89:1446-1455.

- Trinath, J., P. Hegde, M. Sharma, M.S. Maddur, M. Rabin, J.M. Vallat, L. Magy, K.N. Balaji, S.V. Kaveri, and J. Bayry. 2013. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells via induction of cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 in human dendritic cells. *Blood* 122:1419-1427.
- Troyanov, Y., I.N. Targoff, J.L. Tremblay, J.R. Goulet, Y. Raymond, and J.L. Senecal. 2005. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine* 84:231-249.
- Zhu, K.Y., T. Feferman, P.K. Maiti, M.C. Souroujon, and S. Fuchs. 2006. Intravenous immunoglobulin suppresses experimental myasthenia gravis: immunological mechanisms. *Journal of neuroimmunology* 176:187-197.

Le Trisenox (ou Arsenic trioxyde) est une forme oxydée de l'arsenic. Le trioxyde d'arsenic est très toxique, la dose mortelle étant de 0,1 g. A l'origine le trioxyde d'arsenic est un médicament de chimiothérapie utilisé pour traiter un type de leucémie myéloïde aiguë appelée leucémie aiguë promyélocytaire (Lazo et al., 2003). Il est utilisé comme premier traitement pour les personnes souffrant de leucémie aiguë promyélocytaire. Le Trisenox fonctionne en accélérant la mort des cellules leucémiques. Il a été démontré dans de nombreuses lignées tumorales que le Trisenox permettait l'arrêt en phase G1 des cellules tumorales (Chen et al., 1996), l'induction de cycline entraînant la mort par apoptose.

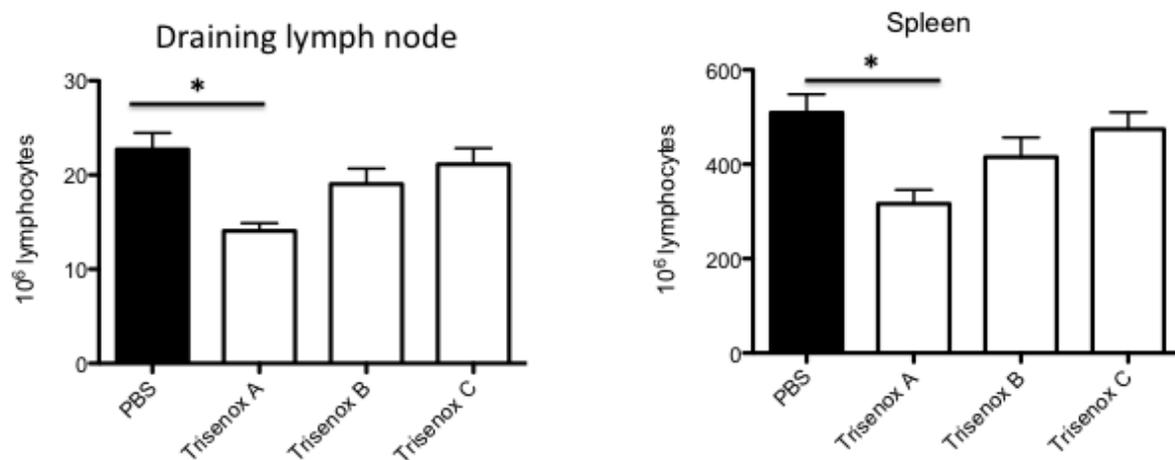
Cependant, il a été montré récemment que le Trisenox pouvait avoir un rôle bénéfique dans les maladies auto-immunes. Dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, la souris MLR/lrp (Bobe et al., 2006). Le traitement par Trisenox permet la disparition complète de la lymphoprolifération, des atteintes cutanées, pulmonaires et rénales. Les souris MLR/lrp ont de plus une durée de vie similaire aux souris sauvages. De plus, chez les souris n'ayant pas encore développé la maladie, le traitement par Trisenox empêche son apparition. Dans ce modèle, le Trisenox a un effet en préventif et en curatif.

Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés au Trisenox dans notre modèle. Ce sont des données préliminaires qu'il faudra approfondir.

Une première série expérimentale était destinée à tester l'effet prophylactique et curatif de l'injection intra-péritonéale à 5 mg/kg/j pendant toute la durée du protocole d'immunisation. Le traitement A commencera deux jours avant la première immunisation et le traitement B trois jours après. Ces deux traitements préventifs sont actuellement testés dans le modèle EAE (donné non publié). Seul le traitement A permet une amélioration dans leur modèle. Enfin, un traitement curatif, le C sera effectué en même temps dans un autre groupe de souris, il commencera à J14, après la dernière immunisation, à cette date, toutes les souris sont malades.



Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet lymphopénique du Trisenox. De façon similaire aux résultats précédent, une lymphopénie significativement différente est observé uniquement avec le traitement A dans les ganglions drainants ( $20.10^6 \pm 2,5$  vs  $13.10^6 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ) et la rate ( $480.10^6 \pm 2,5$  vs  $310.10^6 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ). Malgré une baisse avec les traitements B et C, elle n'est pas suffisante pour être significative.



**Figure 3. Trisenox treatment induced a lymphopenia in preventive treatment.** Absolute lymphocyte number in draining lymph nodes and spleen.

Tout ces résultats son préliminaire et devront être approfondi. Dans les futures expériences, nous devons analyser les causes de cette lymphopénie. Le rôle de l'apoptose sur les cellules de l'immunité sera analysé en étudiant spécifiquement le rôle de FAS et FASL comme cela fut étudié dans la souris MLR (Bobe et al., 2006).

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## LE MODELE ANIMAL

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, notre modèle animal reproduit de façon proche la physiopathologie de la PM chez l'homme et pour la partie immunitaire, de la MI aussi. On constate dans l'infiltrat inflammatoire, la présence majoritaire de macrophage et de T CD8+ qui peuvent envahir les fibres musculaires. On observe aussi, en moindre nombre des T CD4+. Cet infiltrat est en lien avec la sur-expression du CMH-I sur les fibres musculaires.

Cependant, comparé à la PM chez l'homme, l'expression du CMH-I sur les fibres musculaires est moins forte dans notre modèle animal. Dans les autres modèles de myosite développés chez la souris, notamment la CIM, l'expression du CMH-I sur les fibres musculaires n'est pas plus diffuse (Sugihara et al., 2007). Il faut donc noter ici que malgré la rupture de la tolérance due à l'immunisation par la myosine couplée au CFA, nous n'observons pas une expression forte du CMH-I dans le muscle comme chez l'homme.

Il a été démontré dans ce modèle, le rôle prépondérant joué par les Tregs (Allenbach et al., 2009). Quand ils sont détruits avant la première immunisation, la maladie est plus forte. Inversement, l'injection de Tregs polyclonaux avant chaque immunisation réduit la maladie. Cela illustre leur rôle dans le contrôle de l'auto-immunité au cours de la MAE.

De nombreuses publications ont montré chez l'animal, l'effet bénéfique des Tregs en préventif ou en curatif par le transfert des Tregs dans des modèles auto-immuns.

Il est donc logique de vouloir essayer cette stratégie chez l'homme, cependant, le passage de l'animal à l'homme pose de trop gros problèmes pour que cette stratégie soit efficace. En effet, notre tentative d'isolement des Tregs en conditions GMP de 5 patients atteints de MI a été un échec.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le nombre de Tregs doit être important pour contrer les Tconv auto-réactifs. Il est donc nécessaire de transférer un nombre important de Tregs pour observer un effet positif. Chez l'homme, les Tregs ne représentent qu'environ 4% des T CD4+ circulants dans le sang (Takahata et al., 2004), pour envisager une thérapie cellulaire, il est nécessaire d'expander leur nombre *in vitro* d'un facteur 1000, ce qui n'est pas réalisable aujourd'hui.

Il est important de souligner ici que cette stratégie de transfert de Tregs polyclonaux a des résultats variables selon les modèles animaux. Ils sont parfois inefficaces comme dans le cas de modèle spontané de diabète chez la souris NOD (Tang et al., 2004), ou à l'inverse efficaces dans un modèle de GVH (Trenado et al., 2003). Dans ce modèle, les résultats sont plus importants que dans notre modèle MAE, car ici cette thérapie cellulaire ne parvient pas à éradiquer la maladie MAE, elle permet simplement d'en diminuer l'intensité.

Cette différence d'efficacité variable peut s'expliquer par la spécificité des Tregs. Dans notre modèle, le nombre de Tregs activés par les auto-antigènes est limité, le nombre de Tregs activés, dans les cellules transférées, capables de réguler l'auto-immunité est faible, contrairement au modèle de GVH où le nombre d'antigènes mise en jeu est beaucoup plus important (Suchin et al., 2001). Par conséquent, le nombre de Tregs polyclonaux activés est plus important. Chez l'homme, pour une thérapie cellulaire efficace, la spécificité antigénique des Tregs cultivés est déterminante pour l'effet thérapeutique.

L'autre solution serait d'utiliser des Tregs spécifiques. Seulement  $10^5$  Tregs spécifiques d'îlots est nécessaire pour prévenir le diabète dans les modèles murins, la quantité est 10 fois supérieure en utilisant des Tregs polyclonaux (Jaeckel et al., 2005) (Tang et al., 2004). En fonction des modèles, l'effet bénéfique des Tregs varie mais reste assez faible, de :  $2 \cdot 10^3$  dans les études de Green (Green et al., 2002) à  $5 \cdot 10^3$  dans celle de la prévention du diabète (Tarbell et al., 2004). Pour obtenir des Tregs spécifiques, il faut les faire croître de manière préférentielle *in vitro*. Cela suppose de connaître les antigènes impliqués dans la réponse auto-immune. Dans les modèles transgéniques, leurs identifications sont faciles, mais cela devient plus problématique dans des modèles spontanés.

Chez l'homme, sans l'identification des antigènes engagés dans la réponse auto-immune dans les myosites, il est difficile de mettre en place une sélection de Tregs spécifiques.

Pour toutes ces raisons, il est difficile de mettre en place une thérapie cellulaire ciblée sur les Tregs. Les travaux de thèse ont consisté à utiliser différents agents pharmacologiques pour essayer d'augmenter le nombre de Tregs *in vivo* dans le modèle MAE afin d'arriver rapidement à une application clinique chez l'homme.

Une première approche a été d'utiliser l'IL-2 pour augmenter les Tregs. Les T ont besoin d'IL-2 pour survivre et pour leur prolifération (Smith, 1988). Des modèles ont montré que les Tconv produisaient l'IL-2 qui aurait un effet paracrine trophique sur les Tregs. En effet, les Tregs sont incapables de produire de l'IL-2 (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998) et ils utilisent l'IL-2 des Tconv. Des études récentes ont démontré que l'ajout de faible dose d'IL-2 (25 000 Unités) permettait la prolifération des Tregs préférentiellement aux Tconv du à la suppression du récepteur CD25 sur les Tregs par rapport aux Tconv (Grinberg-Bleyer et al., 2010a). Les auteurs ont démontré que ces doses faibles permettaient la régulation du diabète dans des souris NOD. Ces résultats ont depuis été reproduits chez l'homme (Saadoun et al., 2011) chez des patients ayant une vascularite. Cependant, dans notre modèle, avec un protocole similaire à la souris NOD, nous n'avons observé aucun effet bénéfique sur la maladie et les Tregs. Ceci pourrait signifier que l'IL-2 à faible dose n'est pas une solution pour tous les modèles animaux et/ou les maladies auto-immunes. Nous avons donc du tester d'autres approches.

#### L'EFFET DE LA RAPAMYCINE

A l'origine, la rapamycine fut découverte dans un champignon (*Streptomyces hygroscopicus*) (Dennis et al., 1999) et utilisée pour ces propriétés antibiotiques. Cependant, il est apparu que ces propriétés antibiotiques étaient faibles mais qu'elle avait un fort pouvoir immunosuppresseur.

La rapamycine inhibe la prolifération lymphocytaire en bloquant la voie mTOR (« *mammalian target of rapamycine* »). Cette voie est impliquée la signalisation de NF- $\kappa$ B. Elle bloque donc la prolifération cellulaire. Elle permet l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et S (phase d'activation à synthèse de l'ADN) après l'activation de la voie Akt-mTOR (*Delgoffe et al.*).

Nous avons observé dans notre modèle MAE que la rapamycine a un pouvoir lymphopénique. L'une des caractéristiques du système immunitaire est son besoin en énergie important, qui serait comparable à celui des cellules cancéreuses (Fox et al., 2005). Ces modifications métaboliques pour la recherche d'énergie est aussi sous la dépendance de la voie mTOR

(Frauwirth et al., 2002; Frauwirth and Thompson, 2004). En bloquant mTOR, même après activation des Tconv par le TCR, les cellules ne pourront pas proliférer par le blocage du métabolisme cellulaire (Jones and Thompson, 2007).

Un autre rôle important de la rapamycine est le blocage de la voie KLF2 qui est normalement inhibée par mTOR. Dans ces travaux, nous avons constaté une sur-expression de CCR7 et du facteur de transcription KLF2 qui régule CCR7 chez les souris ayant reçue la rapamycine. Ces molécules sont impliquées dans la migration lymphocytaire des organes lymphoïdes vers le tissu cible.

KLF2 régule l'expression membranaire de CCR7 et CD62L notamment (Fabre et al., 2008) par Foxo1 (« *Forkhead box protein O1* ») (Kerdiles et al., 2009). Sans rapamycine, Foxo1 reste à l'extérieur du noyau et ne peut pas activer KLF2. Sous rapamycine, comme démontré dans notre modèle MAE, le blocage de la voie mTOR permet la transcription de KLF2 et l'augmentation de CCR7 à la surface des T.

Nous avons donc émit l'hypothèse que les Tconv sous rapamycine pouvaient être séquestrés dans les ganglions drainants et ne pas migrer aux sites enflammés. En effet, chez des souris ayant des T KLF2<sup>-/-</sup>, l'expression de CD62L et CCR7 est fortement diminuée conduisant à une baisse de lymphocytes T naïfs circulants ainsi qu'une expression abusive de chimiokines comme CCR3 et CCR5 permettant leur migration dans des tissus non lymphoïdes en absence d'inflammation.

En plus du rôle de KLF2 sur CCR7 et CD62L, KLF2 régule aussi l'expression de S1P (« *Sphingosine 1-phosphate* »). Cette molécule à un rôle prépondérant dans la migration lymphocytaire (Carlson et al., 2006). Une étude a démontré que le contact entre S1P et S1P1 est indispensable pour permettre aux lymphocytes de sortir des organes lymphoïdes mais aussi du thymus (Matloubian et al., 2004);(Chi and Flavell, 2005). Cette liaison entre aussi dans l'activation de la voie Pi3K-Akt-mTOR (Ishii et al., 2004).

Il a donc été émis l'hypothèse que le blocage de la voie Pi3K-Akt-mTOR par la rapamycine permettrait aussi de maintenir les Tconv activés dans les ganglions drainants. Dans notre modèle murin, nous avons testé cette hypothèse. Des Tconv activés provenant de ganglions drainants de souris MAE traitées à la rapamycine ou avec le placebo ont été transféré à des

souris contrôles. Les résultats n'ont pas montré de différence significative dans l'apparition d'une myosite. Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce résultat négatif. La plus probable est que même si l'activation de KLF2 est clairement démontrée, son augmentation n'est peut-être pas encore suffisante pour empêcher la séquestration des Tconv dans les ganglions via S1P1.

Pour les Tregs, le rôle de mTOR est tout autre. L'expression de FoxP3 est sous la dépendance de Foxo1 qui est régulé par la voie Pi3K-Akt-mTOR. La rapamycine, par l'inactivation de mTOR, permettrait l'activation de FoxP3 (*Harada et al., 2010*) et augmenterait les fonctions suppressives des Tregs comme cela fut démontré dans l'EAE (*Esposito et al., 2010*). Dans notre modèle, les Tregs n'ont pas leurs fonctions suppressives augmentées. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons utilisé les Tregs issus des ganglions drainants et non du muscle. Dans l'EAE, les Tregs testés sont issus du compartiment malade, le système nerveux central. Il est impossible dans notre modèle, à cause de l'infiltrat péri-fasciculaire causé par le CFA, de trier spécifiquement les cellules de l'infiltrat musculaire.

Des études chez l'homme ont aussi démontré l'effet bénéfique de la rapamycine. Une étude portant sur des patients ayant subi une transplantation rénale, avec un traitement à la rapamycine montrent un taux de Tregs qui augmentent de façon significative après 1 an, passant de 5 à 20% (*Hendrikx et al., 2009*).

Ainsi, dans notre modèle, l'effet lymphopénique de la rapamycine sur les Tconv, ajouté à l'effet trophique sur les Tregs facilitent la balance Tregs/Tconv auto-réactif, et permettent d'expliquer l'effet bénéfique du traitement dans la MAE.

La rapamycine pourrait être une alternative aux traitements actuelles des myopathies inflammatoires en permettant une diminution du ratio Tconv autoréactifs/Tregs comme le montre nos résultats dans notre modèle murin.

La MAE présente tous les phénomènes immunitaires de la MI. Cependant, elle ne reproduit pas les agrégats protéiques retrouvés chez l'homme : il n'y a pas d'inclusion. Il serait intéressant de créer un modèle animal qui reproduit tous les aspects de la MI.

Des études précédentes ont essayé de reproduire un modèle de MI. Comme cela fut le cas pour la maladie d'Alzheimer, ces travaux ont sur-exprimé de façon transgénique la protéine  $\beta$ -amyloïde chez la souris. Ces études ont permis l'expression de la protéine  $\beta$ -amyloïde dans le muscle grâce à un précurseur spécifique. Même si cette expression de  $\beta$ -amyloïde est visible en immunohistochimie, il n'est pas rapporté d'infiltrat inflammatoire dans ce modèle (Fukuchi et al., 1998).

Un autre modèle est celui publié par l'équipe de Frank Laferla (Kitazawa et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs croisent des souris PS1 (pour preseniline 1 mutée) avec des souris exprimant l'A  $\beta$ -42 dans le muscle grâce à un promoteur musculaire MCK. Cette souris double transgénique exprime à des niveaux très fort l'A  $\beta$ -42 dans le muscle dû au changement de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase régulé dans des conditions normales par PS-1. Comparé au précédent modèle, on peut observer un infiltrat inflammatoire composé de CD8+ mais dans des proportions beaucoup plus faible que dans la MAE. De plus, on n'observe pas ici de sur-expression du CMH-I sur les fibres musculaires, ni de fibres tunnelliées par les infiltrats inflammatoires comme observé chez les patients MI.

Nous avons démontré que notre modèle murin est très proche de la partie auto-immune constatée chez les patients avec une MI. Il serait intéressant de combiner ces modèles transgéniques avec notre modèle. Cependant, ils sont tous réalisés avec des souris C57Black/6 alors que la MAE est faite avec la souche Balb/C. Nous avons essayé à plusieurs reprises de transférer notre modèle dans les souris C57Black/6 sans grand succès. L'hypothèse avancée est la différence de fond génétique entre les deux souris. Pour arriver à un bon modèle de MI, il faudrait créer la souris double transgénique A  $\beta$ -MCK-PS1 dans un fond Balb/C.

Cependant, même sans un modèle animal reprenant toutes les caractéristiques de la MI, on peut considérer que la rapamycine est intéressante pour les patients.

En plus de ces fonctions immunosuppressives, la rapamycine, via l'inhibition de mTOR, permet de contrôler l'autophagie. Ce phénomène peut être d'intérêt dans les maladies neuro-dégénératives mais aussi la myosite à inclusions. En effet, mTOR a de multiple rôle dans la cellule (Sarbasov et al., 2005) (Guertin et al., 2006). mTOR est en lien avec la formation de l'autophagosome indispensable à l'autophagie. Ce phénomène est indispensable pour la dégradation des protéines dans la cellule (Menzies et al., 2006). Ce phénomène est très important notamment pour la dégradation des agrégats protéiques, notamment l' $A\beta_{42}$ , qui est responsable de la cytotoxicité dans la MI et la maladie d'Alzheimer (Rubinsztein, 2007). Des études ont démontré que durant la MI, l'autophagie n'est pas optimum (Nogalska et al., 2010b) mais qu'elle peut être réactivée en bloquant la voie mTOR via la rapamycine (Diaz-Troya et al., 2008).

Dans un modèle murin où la protéine  $A\beta_{42}$  est exprimé dans le muscle grâce à un promoteur spécifique du cerveau, reproduisant les phénomènes de la maladie d'Alzheimer (Mucke et al., 2000), l'ajout de rapamycine de façon chronique permet l'inhibition de mTOR, entraîne une diminution de la maladie via une baisse du taux  $A\beta_{42}$  et une meilleure mémoire des souris. De plus, les auteurs observent dans ce modèle une croissance de l'autophagie sous rapamycine (Spilman et al., 2010)

Il est possible d'envisager que la rapamycine aura un double effet bénéfique pour les patients MI, en permettant une diminution de l'infiltrat inflammatoire et aussi une augmentation de l'autophagie.

Une des perspectives majeures de notre travail est d'avoir pu obtenir un financement par la DGOS (direction générale de l'offre de soins) et l'INSERM (appel d'offres médecine translationnelle) pour réaliser l'essai de la rapamycine contre placebo chez 44 patients atteints de MI. Cet essai va débiter à l'automne prochain.

## L'EFFET DES IMMUNOGLOBULINES INTRAVEINEUX

Dans l'article 2, nous avons montré l'effet bénéfique des IgIV dans notre modèle MAE en traitement curatif. Le traitement par IgIV induit une modulation de la réponse immunitaire mais sans exposer le patient aux complications dues à l'immunosuppression.

Les travaux déjà publiés dans d'autres modèles montrent des effets semblables des IgIV dans l'auto-immunité. Dans un modèle de greffe et d'asthme, un traitement préventif d'IgIV permet une diminution de la maladie (Frey et al., 2005; Kessel et al., 2007; Scalapino et al., 2006) grâce à une meilleure activation des Tregs et une augmentation de leur pourcentage. De même, dans le modèle EAE, un traitement préventif des IgIV permet de diminuer l'infiltrat dans le système nerveux central et d'augmenter le pourcentage de Tregs dans les ganglions drainants (Ephrem et al., 2008). Une autre étude, dans un modèle de myasthénie montre le même effet (Zhu et al., 2006).

Dans l'article 2, nous n'observons pas d'effet bénéfique des Tregs en préventif contrairement à l'article rapamycine. Il faut noter ici que nous avons utilisé une simple double dose d'IgIV (2x1g/kg) comme cela est réalisé en clinique chez l'homme. Tous les articles précédents utilisent des doses quotidiennes durant tout le développement de la maladie, ces conditions sont peu physiologiques et inapplicable chez l'homme.

A l'inverse, dans le traitement curatif, l'effet bénéfique est notable. On observe en effet, une augmentation des Tregs sous IgIV. Un mécanisme qui pourrait expliquer l'expansion des Tregs à partir d'un traitement aux IgIV sont les Tregitopes. Il y a certains épitopes conservés dans la région Fc des IgG qui seraient présentés à la surface des CPA, sur les molécules du CMH-II, et permettraient l'induction de Tregs naturel (Elyaman et al., 2011). Ces peptides nommés Tregitopes seraient conservés chez l'homme et la souris. Initialement, deux Tregitopes (289 et 167) ont été décrit (De Groot et al., 2008), ils sont capables d'activer spécifiquement les Tregs et peuvent augmenter l'expression de FoxP3 dans des cellules qui ne l'exprimaient pas au début *in vitro*. Après l'ajout de Tregitopes à une culture de cellules humaines, les Tregs nouveaux sécrètent de l'IL-10 et du TGF $\beta$  (De Groot et al., 2008).

Il serait intéressant d'étudier plus précisément le rôle des Tregitopes dans le modèle MAE. Des expériences en cours étudient maintenant l'effet des Tregitopes contenu dans un AAV dans notre modèle murin comparé aux IgIV habituelles.

Dans l'article 2, le dernier point abordé est l'augmentation de l'IL-33. Un article récent montre une possible voie d'action des IgIV (Anthony et al., 2011). Dans cet article, les auteurs démontrent que les IgIV sont capables de se fixer sur les cellules myéloïdes et les DC. Cette fixation entrainerait la sécrétion d'IL-33 qui créerait une réponse anti-inflammatoire avec notamment la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10, en polarisant la réponse vers Th2. L'IL-33 permettrait l'augmentation du récepteur CD32b sur les macrophages par rapport au CD32a entraînant une réponse anti-inflammatoire. Ce récepteur CD32b varie uniquement avec le récepteur CD32a par sa partie intra-cytoplasmique, il a une partie inhibiteur (ITIM ; « immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ») contre une partie activateur (ITAM ; « immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») pour CD32a. Malheureusement, il n'est pas encore possible de regarder chez la souris l'expression de CD32b à cause de son mimétisme avec CD32a. Cependant, il serait intéressant de regarder la sécrétion d'IL-33 après l'injection d'IgIV et voir sa corrélation ou non avec l'effet du traitement.

#### CONCLUSION

Nos travaux vont donc se poursuivre par un essai clinique sur l'effet de la rapamcyine dans les MI. Durant cette étude, un immuno-phénotypage précis sera réalisé pour caractériser la réponse immune et notamment les modifications du compartiment Tregs sous rapamcyine comparé au placebo. Ensuite, nous étudierons le rôle des Tregitopes dans notre MAE et analyserons le niveau d'IL-33 chez les patients sous IgIV.

## REFERENCES

- ACHIRON, A., F. MOR, R. MARGALIT, I.R. COHEN, O. LIDER, AND S. MIRON. 2000. SUPPRESSION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS BY INTRAVENOUSLY ADMINISTERED POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS. *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY* 15:323-330.
- ADAMS, E.M., J. KIRKLEY, G. EIDELMAN, J. DOHLMAN, AND P.H. PLOTZ. 1997. THE PREDOMINANCE OF BETA (CC) CHEMOKINE TRANSCRIPTS IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MUSCLE DISEASES. *PROC ASSOC AM PHYSICIANS* 109:275-285.
- AERTS, N.E., E.J. DOMBRECHT, D.G. EBO, C.H. BRIDTS, W.J. STEVENS, AND L.S. DE CLERCK. 2008. ACTIVATED T CELLS COMPLICATE THE IDENTIFICATION OF REGULATORY T CELLS IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *CELL IMMUNOL* 251:109-115.
- AGGARWAL, R., A. BANDOS, A.M. REED, D.P. ASCHERMAN, R.J. BAROHN, B.M. FELDMAN, F.W. MILLER, L.G. RIDER, M.O. HARRIS-LOVE, M.C. LEVESQUE, R.I.M.S. GROUP, AND C.V. ODDIS. 2014. PREDICTORS OF CLINICAL IMPROVEMENT IN RITUXIMAB-TREATED REFRACTORY ADULT AND JUVENILE DERMATOMYOSITIS AND ADULT POLYMYOSITIS. *ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY* 66:740-749.
- ALLENBACH, Y., AND O. BENVENISTE. 2013. [AUTOANTIBODY PROFILE IN MYOSITIS.]. *LA REVUE DE MEDECINE INTERNE / FONDEE ... PAR LA SOCIETE NATIONALE FRANCAISE DE MEDECINE INTERNE*
- ALLENBACH, Y., W. CHAARA, M. ROSENZWAJG, A. SIX, N. PREVEL, F. MINGOZZI, J. WANSCHITZ, L. MUSSET, J.L. CHARUEL, B. EYMARD, B. SALOMON, C. DUYSKAERTS, T. MAISONOBE, O. DUBOURG, S. HERSON, D. KLATZMANN, AND O. BENVENISTE. 2014. TH1 RESPONSE AND SYSTEMIC TREG DEFICIENCY IN INCLUSION BODY MYOSITIS. *PLOS ONE* 9:e88788.
- ALLENBACH, Y., S. SOLLY, S. GREGOIRE, O. DUBOURG, B. SALOMON, G. BUTLER-BROWNE, L. MUSSET, S. HERSON, D. KLATZMANN, AND O. BENVENISTE. 2009. ROLE OF REGULATORY T CELLS IN A NEW MOUSE MODEL OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE MYOSITIS. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 174:989-998.
- ALMEIDA, A.R., N. LEGRAND, M. PAPIERNIK, AND A.A. FREITAS. 2002. HOMEOSTASIS OF PERIPHERAL CD4+ T CELLS: IL-2R ALPHA AND IL-2 SHAPE A POPULATION OF REGULATORY CELLS THAT CONTROLS CD4+ T CELL NUMBERS. *J IMMUNOL* 169:4850-4860.
- ALUVIHARE, V.R., M. KALLIKOURDIS, AND A.G. BETZ. 2004. REGULATORY T CELLS MEDIATE MATERNAL TOLERANCE TO THE FETUS. *NAT IMMUNOL* 5:266-271.
- AMATO, A.A., AND R.C. GRIGGS. 2003. UNICORNS, DRAGONS, POLYMYOSITIS, AND OTHER MYTHOLOGICAL BEASTS. *NEUROLOGY* 61:288-289.
- ANDERSON, M.S., E.S. VENANZI, L. KLEIN, Z. CHEN, S.P. BERZINS, S.J. TURLEY, H. VON BOEHMER, R. BRONSON, A. DIERICH, C. BENOIST, AND D. MATHIS. 2002. PROJECTION OF AN IMMUNOLOGICAL SELF SHADOW WITHIN THE THYMUS BY THE AIRE PROTEIN. *SCIENCE* 298:1395-1401.
- ANDERSSON, J., D.Q. TRAN, M. PESU, T.S. DAVIDSON, H. RAMSEY, J.J. O'SHEA, AND E.M. SHEVACH. 2008. CD4+ FOXP3+ REGULATORY T CELLS CONFER

- INFECTIOUS TOLERANCE IN A TGF-BETA-DEPENDENT MANNER. *J EXP MED* 205:1975-1981.
- ANSARI, M.J., A.D. SALAMA, T. CHITNIS, R.N. SMITH, H. YAGITA, H. AKIBA, T. YAMAZAKI, M. AZUMA, H. IWAI, S.J. KHOURY, H. AUCHINCLOSS, JR., AND M.H. SAYEGH. 2003. THE PROGRAMMED DEATH-1 (PD-1) PATHWAY REGULATES AUTOIMMUNE DIABETES IN NONOBESE DIABETIC (NOD) MICE. *J EXP MED* 198:63-69.
- ANTHONY, R.M., T. KOBAYASHI, F. WERMELING, AND J.V. RAVETCH. 2011. INTRAVENOUS GAMMAGLOBULIN SUPPRESSES INFLAMMATION THROUGH A NOVEL T(H)2 PATHWAY. *NATURE* 475:110-113.
- ARAHATA, K., AND A.G. ENGEL. 1986. MONOCLONAL ANTIBODY ANALYSIS OF MONONUCLEAR CELLS IN MYOPATHIES. III: IMMUNOELECTRON MICROSCOPY ASPECTS OF CELL-MEDIATED MUSCLE FIBER INJURY. *ANN NEUROL* 19:112-125.
- ARNETT, F.C., T.J. HIRSCH, W.B. BIAS, M. NISHIKAI, AND M. REICHLIN. 1981. THE JO-1 ANTIBODY SYSTEM IN MYOSITIS: RELATIONSHIPS TO CLINICAL FEATURES AND HLA. *THE JOURNAL OF RHEUMATOLOGY* 8:925-930.
- ASCHENBRENNER, K., L.M. D'CRUZ, E.H. VOLLMANN, M. HINTERBERGER, J. EMMERICH, L.K. SWEE, A. ROLINK, AND L. KLEIN. 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.
- ASKANAS, V., AND W.K. ENGEL. 2005. MOLECULAR PATHOLOGY AND PATHOGENESIS OF INCLUSION-BODY MYOSITIS. *MICROSC RES TECH* 67:114-120.
- ASKANAS, V., AND W.K. ENGEL. 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.
- BADRISING, U.A., M. MAAT-SCHIEMAN, S.G. VAN DUINEN, F. BREEDVELD, P. VAN DOORN, B. VAN ENGELEN, F. VAN DEN HOOGEN, J. HOOGENDIJK, C. HOWELER, A. DE JAGER, F. JENNEKENS, P. KOEHLER, H. VAN DER LEEUW, M. DE VISSER, J.J. VERSCHUUREN, AND A.R. WINTZEN. 2000. EPIDEMIOLOGY OF INCLUSION BODY MYOSITIS IN THE NETHERLANDS: A NATIONWIDE STUDY. *NEUROLOGY* 55:1385-1387.
- BAECHER-ALLAN, C., J.A. BROWN, G.J. FREEMAN, AND D.A. HAFLER. 2001. CD4+CD25HIGH REGULATORY CELLS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD. *J IMMUNOL* 167:1245-1253.
- BANICA, L., A. BESLIU, G. PISTOL, C. STAVARU, R. IONESCU, A.M. FORSEA, C. TANASEANU, S. DUMITRACHE, D. OTELEA, I. TAMSULEA, S. TANASEANU, C. CHITONU, S. PARASCHIV, M. BALTEANU, M. STEFANESCU, AND C. MATACHE. 2009. QUANTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF REGULATORY T CELLS IN CONNECTIVE TISSUE DISEASES. *AUTOIMMUNITY* 42:41-49.
- BANKER, B.Q. 1975. DERMATOMYOSITIS OF CHILDHOOD, ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS OF MUSCLE AND INTRAMUSCULAR BLOOD VESSELS. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY* 34:46-75.
- BARON, P., D. GALIMBERTI, L. MEDA, E. SCARPINI, G. CONTI, F. COGIAMANIAN, AND G. SCARLATO. 2001. PRODUCTION OF IL-6 BY HUMAN MYOBLASTS STIMULATED

- WITH ABETA: RELEVANCE IN THE PATHOGENESIS OF IBM. *NEUROLOGY* 57:1561-1565.
- BARON, U., S. FLOESS, G. WIECZOREK, K. BAUMANN, A. GRUTZKAU, J. DONG, A. THIEL, T.J. BOELD, P. HOFFMANN, M. EDINGER, I. TURBACHOVA, A. HAMANN, S. OLEK, AND J. HUEHN. 2007. DNA DEMETHYLATION IN THE HUMAN FOXP3 LOCUS DISCRIMINATES REGULATORY T CELLS FROM ACTIVATED FOXP3(+) CONVENTIONAL T CELLS. *EUR J IMMUNOL* 37:2378-2389.
- BAYER, A.L., J.Y. LEE, A. DE LA BARRERA, C.D. SURH, AND T.R. MALEK. 2008. A FUNCTION FOR IL-7R FOR CD4+CD25+FOXP3+ T REGULATORY CELLS. *J IMMUNOL* 181:225-234.
- BAYRY, J., V.S. NEGI, AND S.V. KAVERI. 2011. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN THERAPY IN RHEUMATIC DISEASES. *NATURE REVIEWS. RHEUMATOLOGY* 7:349-359.
- BEDKE, T., L. PRETSCH, S. KARAKHANOVA, A.H. ENK, AND K. MAHNKE. ENDOTHELIAL CELLS AUGMENT THE SUPPRESSIVE FUNCTION OF CD4+ CD25+ FOXP3+ REGULATORY T CELLS: INVOLVEMENT OF PROGRAMMED DEATH-1 AND IL-10. *J IMMUNOL* 184:5562-5570.
- BELKAID, Y., C.A. PICCIRILLO, S. MENDEZ, E.M. SHEVACH, AND D.L. SACKS. 2002. CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS CONTROL LEISHMANIA MAJOR PERSISTENCE AND IMMUNITY. *NATURE* 420:502-507.
- BENNETT, C.L., J. CHRISTIE, F. RAMSDELL, M.E. BRUNKOW, P.J. FERGUSON, L. WHITESSELL, T.E. KELLY, F.T. SAULSBURY, P.F. CHANCE, AND H.D. OCHS. 2001. THE IMMUNE DYSREGULATION, POLYENDOCRINOPATHY, ENTEROPATHY, X-LINKED SYNDROME (IPEX) IS CAUSED BY MUTATIONS OF FOXP3. *NAT GENET* 27:20-21.
- BENSINGER, S.J., P.T. WALSH, J. ZHANG, M. CARROLL, R. PARSONS, J.C. RATHMELL, C.B. THOMPSON, M.A. BURCHILL, M.A. FARRAR, AND L.A. TURKA. 2004. DISTINCT IL-2 RECEPTOR SIGNALING PATTERN IN CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS. *J IMMUNOL* 172:5287-5296.
- BENVENISTE, O., M. GUIGUET, J. FREEBODY, O. DUBOURG, W. SQUIER, T. MAISONOBE, T. STOJKOVIC, M.I. LEITE, Y. ALLENBACH, S. HERSON, S. BRADY, B. EYMARD, AND D. HILTON-JONES. 2011. LONG-TERM OBSERVATIONAL STUDY OF SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS. *BRAIN* 134:3176-3184.
- BENVENISTE, O., S. HERSON, B. SALOMON, D. DIMITRI, H. TREBEDEN-NEGRE, L. JEAN, V. BON-DURAND, D. ANTONELLI, D. KLATZMANN, AND O. BOYER. 2004. LONG-TERM PERSISTENCE OF CLONALLY EXPANDED T CELLS IN PATIENTS WITH POLYMYOSITIS. *ANN NEUROL* 56:867-872.
- BENVENISTE, O., AND D.J. HILTON. 2011. NATURAL HISTORY OF SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS. *BRAIN* IN PRESS:
- BERNATSKY, S., L. JOSEPH, C.A. PINEAU, P. BELISLE, J.F. BOIVIN, D. BANERJEE, AND A.E. CLARKE. 2009. ESTIMATING THE PREVALENCE OF POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS FROM ADMINISTRATIVE DATA: AGE, SEX AND REGIONAL DIFFERENCES. *ANN RHEUM DIS* 68:1192-1196.
- BETTINI, M., AND D.A. VIGNALI. 2009. REGULATORY T CELLS AND INHIBITORY CYTOKINES IN AUTOIMMUNITY. *CURR OPIN IMMUNOL* 21:612-618.
- BIANCHI, T., L.B. PINCUS, M.A. WURBEL, B.E. RICH, T.S. KUPPER, R.C. FUHLBRIGGE, AND M. BOES. 2009. MAINTENANCE OF PERIPHERAL TOLERANCE THROUGH

- CONTROLLED TISSUE HOMING OF ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS IN K14-MOVA MICE. *J IMMUNOL* 182:4665-4674.
- BLANCO, P., A.K. PALUCKA, M. GILL, V. PASCUAL, AND J. BANCHEREAU. 2001. INDUCTION OF DENDRITIC CELL DIFFERENTIATION BY IFN-ALPHA IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *SCIENCE* 294:1540-1543.
- BOBE, P., D. BONARDELLE, K. BENIHOUD, P. OPOLON, AND M.K. CHELBI-ALIX. 2006. ARSENIC TRIOXIDE: A PROMISING NOVEL THERAPEUTIC AGENT FOR LYMPHOPROLIFERATIVE AND AUTOIMMUNE SYNDROMES IN MRL/LPR MICE. *BLOOD* 108:3967-3975.
- BOHAN, A., AND J.B. PETER. 1975. POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS (FIRST OF TWO PARTS). *N ENGL J MED* 292:344-347.
- BOHAN, A., J.B. PETER, R.L. BOWMAN, AND C.M. PEARSON. 1977. COMPUTER-ASSISTED ANALYSIS OF 153 PATIENTS WITH POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *MEDICINE (BALTIMORE)* 56:255-286.
- BOISSONNAS, A., A. SCHOLER-DAHIREL, V. SIMON-BLANCAL, L. PACE, F. VALET, A. KISSENPENNIG, T. SPARWASSER, B. MALISSEN, L. FETLER, AND S. AMIGORENA. 2010. FOXP3+ T CELLS INDUCE PERFORIN-DEPENDENT DENDRITIC CELL DEATH IN TUMOR-DRAINING LYMPH NODES. *IMMUNITY* 32:266-278.
- BORSELLINO, G., M. KLEINWIETFELD, D. DI MITRI, A. STERNJAK, A. DIAMANTINI, R. GIOMETTO, S. HOPNER, D. CENTONZE, G. BERNARDI, M.L. DELL'ACQUA, P.M. ROSSINI, L. BATTISTINI, O. ROTZSCHKE, AND K. FALK. 2007. EXPRESSION OF ECTONUCLEOTIDASE CD39 BY FOXP3+ TREG CELLS: HYDROLYSIS OF EXTRACELLULAR ATP AND IMMUNE SUPPRESSION. *BLOOD* 110:1225-1232.
- BOUR-JORDAN, H., AND J.A. BLUESTONE. 2009. REGULATING THE REGULATORS: COSTIMULATORY SIGNALS CONTROL THE HOMEOSTASIS AND FUNCTION OF REGULATORY T CELLS. *IMMUNOL REV* 229:41-66.
- BOYMAN, O., M. KOVAR, M.P. RUBINSTEIN, C.D. SURH, AND J. SPRENT. 2006. SELECTIVE STIMULATION OF T CELL SUBSETS WITH ANTIBODY-CYTOKINE IMMUNE COMPLEXES. *SCIENCE* 311:1924-1927.
- BROUWER, R., G.J. HENGSTMAN, W. VREE EGBERTS, H. EHRFELD, B. BOZIC, A. GHIRARDELLO, G. GRONDAL, M. HIETARINTA, D. ISENBERG, J.R. KALDEN, I. LUNDBERG, H. MOUTSOPOULOS, P. ROUX-LOMBARD, J. VENCOVSKY, A. WIKMAN, H.P. SEELIG, B.G. VAN ENGELEN, AND W.J. VAN VENROOIJ. 2001. AUTOANTIBODY PROFILES IN THE SERA OF EUROPEAN PATIENTS WITH MYOSITIS. *ANN RHEUM DIS* 60:116-123.
- BRUNKOW, M.E., E.W. JEFFERY, K.A. HJERRILD, B. PAEPER, L.B. CLARK, S.A. YASAYKO, J.E. WILKINSON, D. GALAS, S.F. ZIEGLER, AND F. RAMSDELL. 2001. DISRUPTION OF A NEW FORKHEAD/WINGED-HELIX PROTEIN, SCURFIN, RESULTS IN THE FATAL LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDER OF THE SCURFY MOUSE. *NAT GENET* 27:68-73.
- BURCHILL, M.A., J. YANG, C. VOGTENHUBER, B.R. BLAZAR, AND M.A. FARRAR. 2007. IL-2 RECEPTOR BETA-DEPENDENT STAT5 ACTIVATION IS REQUIRED FOR THE DEVELOPMENT OF FOXP3+ REGULATORY T CELLS. *J IMMUNOL* 178:280-290.
- BURMEISTER, Y., T. LISCHKE, A.C. DAHLER, H.W. MAGES, K.P. LAM, A.J. COYLE, R.A. KROCZEK, AND A. HUTLOFF. 2008. ICOS CONTROLS THE POOL SIZE OF EFFECTOR-MEMORY AND REGULATORY T CELLS. *J IMMUNOL* 180:774-782.

- BUSSEL, A., H. BOULECHFAR, AND R. NAIM. 1993.** [IMMUNOGLOBULINS OR PLASMA EXCHANGE? SYNCHRONIZATION OF PLASMA EXCHANGE AND INTRAVENOUS POLYVALENT IMMUNOGLOBULINS. A CONSECUTIVE STUDY OF 11 PATIENTS]. *ANNALES DE MEDECINE INTERNE* 144:532-538.
- 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 A ANTICORPS LES MYOPATHIES A ANTICORPS ANTI-SRP : CARACTERISATION ET SUIVI DE 24 PATIENTS ANTI-SRP : CARACTERISATION ET SUIVI DE 24 PATIENTS. IN SNFMI BORDEAUX 2008. BORDEAUX.
- CALBO, S., H. DELAGREVERIE, C. ARNOULT, F.J. AUTHIER, F. TRON, AND O. BOYER. 2008.** FUNCTIONAL TOLERANCE OF CD8+ T CELLS INDUCED BY MUSCLE-SPECIFIC ANTIGEN EXPRESSION. *J IMMUNOL* 181:408-417.
- CAO, X., S.F. CAI, T.A. FEHNIGER, J. SONG, L.I. COLLINS, D.R. PIWNICA-WORMS, AND T.J. LEY. 2007.** GRANZYME B AND PERFORIN ARE IMPORTANT FOR REGULATORY T CELL-MEDIATED SUPPRESSION OF TUMOR CLEARANCE. *IMMUNITY* 27:635-646.
- CARPENTER, S., AND G. KARPATI. 1981.** THE MAJOR INFLAMMATORY MYOPATHIES OF UNKNOWN CAUSE *PATHOL ANNU* 205-237.
- CARPENTER, S., G. KARPATI, I. HELLER, AND A. EISEN. 1978.** INCLUSION BODY MYOSITIS: A DISTINCT VARIETY OF IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY. *NEUROLOGY* 28:8-17.
- CASCIOLA-ROSEN, L., K. NAGARAJU, P. PLOTZ, K. WANG, S. LEVINE, E. GABRIELSON, A. CORSE, AND A. ROSEN. 2005.** ENHANCED AUTOANTIGEN EXPRESSION IN REGENERATING MUSCLE CELLS IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY. *J EXP MED* 201:591-601.
- CHEN, G.Q., J. ZHU, X.G. SHI, J.H. NI, H.J. ZHONG, G.Y. SI, X.L. JIN, W. TANG, X.S. LI, S.M. XONG, Z.X. SHEN, G.L. SUN, J. MA, P. ZHANG, T.D. ZHANG, C. GAZIN, T. NAOE, S.J. CHEN, Z.Y. WANG, AND Z. CHEN. 1996.** IN VITRO STUDIES ON CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF ARSENIC TRIOXIDE (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) IN THE TREATMENT OF ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA: AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> INDUCES NB4 CELL APOPTOSIS WITH DOWNREGULATION OF BCL-2 EXPRESSION AND MODULATION OF PML-RAR ALPHA/PML PROTEINS. *BLOOD* 88:1052-1061.
- CHEN, M., M.R. DAHA, AND C.G. KALLENBERG. 2010.** THE COMPLEMENT SYSTEM IN SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASE. *J AUTOIMMUN* 34:J276-286.
- CHEN, W., W. JIN, N. HARDEGEN, K.J. LEI, L. LI, N. MARINOS, G. MCGRADY, AND S.M. WAHL. 2003.** CONVERSION OF PERIPHERAL CD4+CD25- NAIVE T CELLS TO CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS BY TGF-BETA INDUCTION OF TRANSCRIPTION FACTOR FOXP3. *J EXP MED* 198:1875-1886.
- CHERIN, P., S. PELLETIER, A. TEIXEIRA, P. LAFORET, T. GENEREAU, A. SIMON, T. MAISONOBE, B. EYMARD, AND S. HERSON. 2002.** RESULTS AND LONG-TERM FOLLOWUP OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN INFUSIONS IN CHRONIC, REFRACTORY POLYMYOSITIS: AN OPEN STUDY WITH THIRTY-FIVE ADULT PATIENTS. *ARTHRITIS AND RHEUMATISM* 46:467-474.
- CHI, H., AND R.A. FLAVELL. 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., H.B. WANG, Y. ZHANG, AND W.Z. WANG. 2007. ABNORMALITY OF CIRCULATING CD4(+)CD25(+) REGULATORY T CELL IN PATIENTS WITH GUILLAIN-BARRE SYNDROME. *J NEUROIMMUNOL* 192:206-214.
- CHINOY, H., N. FERTIG, C.V. ODDIS, W.E. OLLIER, AND R.G. COOPER. 2007. THE DIAGNOSTIC UTILITY OF MYOSITIS AUTOANTIBODY TESTING FOR PREDICTING THE RISK OF CANCER-ASSOCIATED MYOSITIS. *ANN RHEUM DIS* 66:1345-1349.
- CHINOY, H., F. SALWAY, N. FERTIG, N. SHEPHARD, B.D. TAIT, W. THOMSON, D.A. ISENBERG, C.V. ODDIS, A.J. SILMAN, W.E. OLLIER, AND R.G. COOPER. 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.
- CHOY, E.H., J.E. HOOGENDIJK, B. LECKY, AND J.B. WINER. 2005. IMMUNOSUPPRESSANT AND IMMUNOMODULATORY TREATMENT FOR DERMATOMYOSITIS AND POLYMYOSITIS. *THE COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS* CD003643.
- CHRISTOPHER-STINE, L., L.A. CASCIOLA-ROSEN, G. HONG, T. CHUNG, A.M. CORSE, AND A.L. MAMMEN. 2010. A NOVEL AUTOANTIBODY RECOGNIZING 200-KD AND 100-KD PROTEINS IS ASSOCIATED WITH AN IMMUNE-MEDIATED NECROTIZING MYOPATHY. *ARTHRITIS RHEUM* 62:2757-2766.
- CID, M.C., J.M. GRAU, J. CASADEMONT, E. TOBIAS, A. PICAZO, B. COLL-VINENT, J. ESPARZA, E. PEDROL, AND A. URBANO-MARQUEZ. 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., C. BARTOLI, N. SCHLEINITZ, B. CHETAÏLLE, J.F. PELLISSIER, AND D. FIGARELLA-BRANGER. 2005. EXPRESSION OF THE BETA CHEMOKINES CCL3, CCL4, CCL5 AND THEIR RECEPTORS IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. *NEUROPATHOL APPL NEUROBIOL* 31:70-79.
- COHEN, J.L., A. TRENADO, D. VASEY, D. KLATZMANN, AND B.L. SALOMON. 2002. CD4(+)CD25(+) IMMUNOREGULATORY T CELLS: NEW THERAPEUTICS FOR GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE. *J EXP MED* 196:401-406.
- COLLISON, L.W., V. CHATURVEDI, A.L. HENDERSON, P.R. GIACOMIN, C. GUY, J. BANKOTI, D. FINKELSTEIN, K. FORBES, C.J. WORKMAN, S.A. BROWN, J.E. REHG, M.L. JONES, H.T. NI, D. ARTIS, M.J. TURK, AND D.A. VIGNALI. 2010. IL-35-MEDIATED INDUCTION OF A POTENT REGULATORY T CELL POPULATION. *NAT IMMUNOL* 11:1093-1101.
- COLLISON, L.W., C.J. WORKMAN, T.T. KUO, K. BOYD, Y. WANG, K.M. VIGNALI, R. CROSS, D. SEHY, R.S. BLUMBERG, AND D.A. VIGNALI. 2007. THE INHIBITORY CYTOKINE IL-35 CONTRIBUTES TO REGULATORY T-CELL FUNCTION. *NATURE* 450:566-569.
- CONTET, C., J.N. RAWLINS, AND R.M. DEACON. 2001. A COMPARISON OF 129S2/SvHSD AND C57BL/6JOLA<sup>HSD</sup> MICE ON A TEST BATTERY ASSESSING SENSORIMOTOR, AFFECTIVE AND COGNITIVE BEHAVIOURS: IMPLICATIONS FOR THE STUDY OF GENETICALLY MODIFIED MICE. *BEHAV BRAIN RES* 124:33-46.

- COOMBES, J.L., K.R. SIDDIQUI, C.V. ARANCIBIA-CARCAMO, J. HALL, C.M. SUN, Y. BELKAID, AND F. POWRIE. 2007. A FUNCTIONALLY SPECIALIZED POPULATION OF MUCOSAL CD103+ DCs INDUCES FOXP3+ REGULATORY T CELLS VIA A TGF-BETA AND RETINOIC ACID-DEPENDENT MECHANISM. *J EXP MED* 204:1757-1764.
- COPPO, P., J.P. CLAUVEL, D. BENGOUFA, E. OKSENHENDLER, C. LACROIX, AND K. LASSOUED. 2002. INFLAMMATORY MYOSITIS ASSOCIATED WITH ANTI-U1-SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN ANTIBODIES: A SUBSET OF MYOSITIS ASSOCIATED WITH A FAVOURABLE OUTCOME. *RHEUMATOLOGY* 41:1040-1046.
- COSGROVE, D., S.H. CHAN, C. WALTZINGER, C. BENOIST, AND D. MATHIS. 1992. THE THYMIC COMPARTMENT RESPONSIBLE FOR POSITIVE SELECTION OF CD4+ T CELLS. *INT IMMUNOL* 4:707-710.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M.A., N. KUTCHUKHIDZE, S. SHEN, Y. DING, H. YEE, AND J.J. LAFAILLE. 2008. ADAPTIVE FOXP3+ REGULATORY T CELL-DEPENDENT AND -INDEPENDENT CONTROL OF ALLERGIC INFLAMMATION. *IMMUNITY* 29:114-126.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M.A., AND J.J. LAFAILLE. 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., A.C. LINO, N. KUTCHUKHIDZE, AND J.J. LAFAILLE. 2004. CD25- T CELLS GENERATE CD25+FOXP3+ REGULATORY T CELLS BY PERIPHERAL EXPANSION. *J IMMUNOL* 173:7259-7268.
- D'CRUZ, L.M., AND L. KLEIN. 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. 2006. SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS--DIAGNOSIS, PATHOGENESIS AND THERAPEUTIC STRATEGIES. *NAT CLIN PRACT NEUROL* 2:437-447.
- DALAKAS, M.C. 2007. AUTOIMMUNE INFLAMMATORY MYOPATHIES. *HANDBOOK OF CLINICAL NEUROLOGY* 86:273-301.
- DALAKAS, M.C., AND R. HOHLFELD. 2003. POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *LANCET* 362:971-982.
- DARRASSE-JEZE, G., A.S. BERGOT, A. DURGEAU, F. BILLIARD, B.L. SALOMON, J.L. COHEN, B. BELLIER, K. PODSYPANINA, AND D. KLATZMANN. 2009A. TUMOR EMERGENCE IS SENSED BY SELF-SPECIFIC CD44<sup>HI</sup> MEMORY TREGS THAT CREATE A DOMINANT TOLEROGENTIC ENVIRONMENT FOR TUMORS IN MICE. *J CLIN INVEST*
- DARRASSE-JEZE, G., A.S. BERGOT, A. DURGEAU, F. BILLIARD, B.L. SALOMON, J.L. COHEN, B. BELLIER, K. PODSYPANINA, AND D. KLATZMANN. 2009B. TUMOR EMERGENCE IS SENSED BY SELF-SPECIFIC CD44<sup>HI</sup> MEMORY TREGS THAT CREATE A DOMINANT TOLEROGENTIC ENVIRONMENT FOR TUMORS IN MICE. *J CLIN INVEST* 119:2648-2662.
- DARRASSE-JEZE, G., D. KLATZMANN, F. CHARLOTTE, B.L. SALOMON, AND J.L. COHEN. 2006. CD4+CD25+ REGULATORY/SUPPRESSOR T CELLS PREVENT ALLOGENEIC FETUS REJECTION IN MICE. *IMMUNOL LETT* 102:106-109.

- DAVEY, G.M., C. KURTS, J.F. MILLER, P. BOUILLET, A. STRASSER, A.G. BROOKS, F.R. CARBONE, AND W.R. HEATH. 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 GROOT, A.S., L. MOISE, J.A. MCMURRY, E. WAMBRE, L. VAN OVERTVELT, P. MOINGEON, D.W. SCOTT, AND W. MARTIN. 2008. ACTIVATION OF NATURAL REGULATORY T CELLS BY IGG FC-DERIVED PEPTIDE "TREGITOPES". *BLOOD* 112:3303-3311.
- DEAGLIO, S., K.M. DWYER, W. GAO, D. FRIEDMAN, A. USHEVA, A. ERAT, J.F. CHEN, K. ENJOJI, J. LINDEN, M. OUKKA, V.K. KUCHROO, T.B. STROM, AND S.C. ROBSON. 2007. ADENOSINE GENERATION CATALYZED BY CD39 AND CD73 EXPRESSED ON REGULATORY T CELLS MEDIATES IMMUNE SUPPRESSION. *J EXP MED* 204:1257-1265.
- DELGOFFE, G.M., T.P. KOLE, Y. ZHENG, P.E. ZAREK, K.L. MATTHEWS, B. XIAO, P.F. WORLEY, S.C. KOZMA, AND J.D. POWELL. 2009. THE mTOR KINASE DIFFERENTIALLY REGULATES EFFECTOR AND REGULATORY T CELL LINEAGE COMMITMENT. *IMMUNITY* 30:832-844.
- DENNIS, P.B., S. FUMAGALLI, AND G. THOMAS. 1999. TARGET OF RAPAMYCIN (TOR): BALANCING THE OPPOSING FORCES OF PROTEIN SYNTHESIS AND DEGRADATION. *CURR OPIN GENET DEV* 9:49-54.
- DIAZ-TROYA, S., M.E. PEREZ-PEREZ, F.J. FLORENCIO, AND J.L. CRESPO. 2008. THE ROLE OF TOR IN AUTOPHAGY REGULATION FROM YEAST TO PLANTS AND MAMMALS. *AUTOPHAGY* 4:851-865.
- DOUGLAS, W.W., H.D. TAZELAAR, T.E. HARTMAN, R.P. HARTMAN, P.A. DECKER, D.R. SCHROEDER, AND J.H. RYU. 2001. POLYMYOSITIS-DERMATOMYOSITIS-ASSOCIATED INTERSTITIAL LUNG DISEASE. *AM J RESPIR CRIT CARE MED* 164:1182-1185.
- DURANDY, A., S.V. KAVERI, T.W. KUIJPERS, M. BASTA, S. MIESCHER, J.V. RAVETCH, AND R. RIEBEN. 2009. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS--UNDERSTANDING PROPERTIES AND MECHANISMS. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY* 158 SUPPL 1:2-13.
- ELOVAARA, I., S. APOSTOLSKI, P. VAN DOORN, N.E. GILHUS, A. HIETAHARJU, J. HONKANIEMI, I.N. VAN SCHAIK, N. SCOLDING, P. SOELBERG SORENSEN, B. UDD, AND EFNS. 2008. EFNS GUIDELINES FOR THE USE OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN IN TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISEASES: EFNS TASK FORCE ON THE USE OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN IN TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISEASES. *EUR J NEUROL* 15:893-908.
- ELYAMAN, W., S.J. KHOURY, D.W. SCOTT, AND A.S. DE GROOT. 2011. POTENTIAL APPLICATION OF TREGITOPES AS IMMUNOMODULATING AGENTS IN MULTIPLE SCLEROSIS. *NEUROLOGY RESEARCH INTERNATIONAL* 2011:256460.
- EPHREM, A., S. CHAMAT, C. MIQUEL, S. FISSON, L. MOUTHON, G. CALIGIURI, S. DELIGNAT, S. ELLURU, J. BAYRY, S. LACROIX-DESMAZES, J.L. COHEN, B.L. SALOMON, M.D. KAZATCHKINE, S.V. KAVERI, AND N. MISRA. 2008. EXPANSION OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS BY INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN: A CRITICAL FACTOR IN CONTROLLING EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. *BLOOD* 111:715-722.

- ERMANN, J., P. HOFFMANN, M. EDINGER, S. DUTT, F.G. BLANKENBERG, J.P. HIGGINS, R.S. NEGRIN, C.G. FATHMAN, AND S. STROBER. 2005. ONLY THE CD62L+ SUBPOPULATION OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS PROTECTS FROM LETHAL ACUTE GVHD. *BLOOD* 105:2220-2226.
- ESIRI, M.M., AND I.C. MACLENNAN. 1974. EXPERIMENTAL MYOSITIS IN RATS. I. HISTOLOGICAL AND CREATINE PHOSPHOKINASE CHANGES, AND PASSIVE TRANSFER TO NORMAL SYNGENEIC RATS. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY* 17:139-150.
- ESPOSITO, M., F. RUFFINI, M. BELLONE, N. GAGLIANI, M. BATTAGLIA, G. MARTINO, AND R. FURLAN. 2010. RAPAMYCIN INHIBITS RELAPSING EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS BY BOTH EFFECTOR AND REGULATORY T CELLS MODULATION. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY* 220:52-63.
- FABRE, S., F. CARRETTE, J. CHEN, V. LANG, M. SEMICHON, C. DENOYELLE, V. LAZAR, N. CAGNARD, A. DUBART-KUPPERSCHMITT, M. MANGENEY, D.A. FRUMAN, AND G. BISMUTH. 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., S. READ, L. GORELIK, S.D. HURST, R.L. COFFMAN, R.A. FLAVELL, AND F. POWRIE. 2005. T CELLS THAT CANNOT RESPOND TO TGF-BETA ESCAPE CONTROL BY CD4(+)/CD25(+) REGULATORY T CELLS. *J EXP MED* 201:737-746.
- FIGARELLA-BRANGER, D., M. CIVATTE, C. BARTOLI, AND J.F. PELLISSIER. 2003. CYTOKINES, CHEMOKINES, AND CELL ADHESION MOLECULES IN INFLAMMATORY MYOPATHIES. *MUSCLE NERVE* 28:659-682.
- FISSON, S., G. DARRASSE-JEZE, E. LITVINOVA, F. SEPTIER, D. KLATZMANN, R. LIBLAU, AND B.L. SALOMON. 2003. CONTINUOUS ACTIVATION OF AUTOREACTIVE CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS IN THE STEADY STATE. *J EXP MED* 198:737-746.
- FONTENOT, J.D., J.L. DOOLEY, A.G. FARR, AND A.Y. RUDENSKY. 2005. DEVELOPMENTAL REGULATION OF FOXP3 EXPRESSION DURING ONTOGENY. *J EXP MED* 202:901-906.
- FONTENOT, J.D., M.A. GAVIN, AND A.Y. RUDENSKY. 2003. FOXP3 PROGRAMS THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS. *NATURE IMMUNOLOGY* 4:330-336.
- FOX, C.J., P.S. HAMMERMAN, AND C.B. THOMPSON. 2005. FUEL FEEDS FUNCTION: ENERGY METABOLISM AND THE T-CELL RESPONSE. *NAT REV IMMUNOL* 5:844-852.
- FRAUWIRTH, K.A., J.L. RILEY, M.H. HARRIS, R.V. PARRY, J.C. RATHMELL, D.R. PLAS, R.L. ELSTROM, C.H. JUNE, AND C.B. THOMPSON. 2002. THE CD28 SIGNALING PATHWAY REGULATES GLUCOSE METABOLISM. *IMMUNITY* 16:769-777.
- FRAUWIRTH, K.A., AND C.B. THOMPSON. 2004. REGULATION OF T LYMPHOCYTE METABOLISM. *J IMMUNOL* 172:4661-4665.
- FRAZIER, A.R., AND R.D. MILLER. 1974. INTERSTITIAL PNEUMONITIS IN ASSOCIATION WITH POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *CHEST* 65:403-407.
- FRERET, M., L. DROUOT, A. OBRY, S. AHMED-LACHEHEB, C. DAULY, S. ADRIOUCH, P. COSETTE, F.J. AUTHIER, AND O. BOYER. 2013. OVEREXPRESSION OF MHC CLASS I IN MUSCLE OF LYMPHOCYTE-DEFICIENT MICE CAUSES A SEVERE

- MYOPATHY WITH INDUCTION OF THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 183:893-904.
- FREY, O., P.K. PETROW, M. GAJDA, K. SIEGMUND, J. HUEHN, A. SCHEFFOLD, A. HAMANN, A. RADBRUCH, AND R. BRAUER. 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 RESEARCH & THERAPY* 7:R291-301.
- FRITZSCHING, B., M. KORPORAL, J. HAAS, P.H. KRAMMER, E. SURI-PAYER, AND B. WILDEMANN. 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., N. OBERLE, N. EBERHARDT, S. QUICK, J. HAAS, B. WILDEMANN, P.H. KRAMMER, AND E. SURI-PAYER. 2005. IN CONTRAST TO EFFECTOR T CELLS, CD4+CD25+FOXP3+ REGULATORY T CELLS ARE HIGHLY SUSCEPTIBLE TO CD95 LIGAND- BUT NOT TO TCR-MEDIATED CELL DEATH. *J IMMUNOL* 175:32-36.
- FRITZSCHING, B., N. OBERLE, E. PAULY, R. GEFFERS, J. BUER, J. POSCHL, P. KRAMMER, O. LINDERKAMP, AND E. SURI-PAYER. 2006B. NAIVE REGULATORY T CELLS: A NOVEL SUBPOPULATION DEFINED BY RESISTANCE TOWARD CD95L-MEDIATED CELL DEATH. *BLOOD* 108:3371-3378.
- FUJIMOTO, M., Y. HAMAGUCHI, K. KAJI, T. MATSUSHITA, Y. ICHIMURA, M. KODERA, N. ISHIGURO, I. UEDA-HAYAKAWA, Y. ASANO, F. OGAWA, K. FUJIKAWA, T. MIYAGI, E. MABUCHI, K. HIROSE, N. AKIMOTO, N. HATTA, K. TSUTSUI, A. HIGASHI, A. IGARASHI, M. SEISHIMA, M. HASEGAWA, AND K. TAKEHARA. 2012. MYOSITIS-SPECIFIC ANTI-155/140 AUTOANTIBODIES TARGET TRANSCRIPTION INTERMEDIARY FACTOR 1 FAMILY PROTEINS. *ARTHRITIS AND RHEUMATISM* 64:513-522.
- FUKUCHI, K., D. PHAM, M. HART, L. LI, AND J.R. LINDSEY. 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 M.J. BEVAN. 2004. CENTRAL TOLERANCE TO TISSUE-SPECIFIC ANTIGENS MEDIATED BY DIRECT AND INDIRECT ANTIGEN PRESENTATION. *J EXP MED* 200:1039-1049.
- GARIN, M.I., C.C. CHU, D. GOLSHAYAN, E. CERNUDA-MOROLLON, R. WAIT, AND R.I. LECHLER. 2007. GALECTIN-1: A KEY EFFECTOR OF REGULATION MEDIATED BY CD4+CD25+ T CELLS. *BLOOD* 109:2058-2065.
- GARZA, K.M., S.M. CHAN, R. SURI, L.T. NGUYEN, B. ODERMATT, S.P. SCHOENBERGER, AND P.S. OHASHI. 2000. ROLE OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN MEDIATING TOLERANCE AND AUTOIMMUNITY. *J EXP MED* 191:2021-2027.
- GERSHON, R.K., AND K. KONDO. 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., J.E. WILKINSON, E.M. RINCHIK, AND L.B. RUSSELL. 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.

- GORDON, P.A., J.B. WINER, J.E. HOOGENDIJK, AND E.H. CHOY. 2012. IMMUNOSUPPRESSANT AND IMMUNOMODULATORY TREATMENT FOR DERMATOMYOSITIS AND POLYMYOSITIS. *COCHRANE DATABASE SYST REV* 8:CD003643.
- GOES, P.F., D.H. HAYES, M.J. COPELAND, G.S. KORBUTT, C. HALBERSTADT, S.A. KIRKPATRICK, AND R.V. RAJOTTE. 2003. LONG-TERM SURVIVAL OF INTRATESTICULAR PORCINE ISLETS IN NONIMMUNOSUPPRESSED BEAGLES. *TRANSPLANTATION* 75:613-618.
- GREEN, E.A., Y. CHOI, AND R.A. FLAVELL. 2002. PANCREATIC LYMPH NODE-DERIVED CD4(+)CD25(+) TREG CELLS: HIGHLY POTENT REGULATORS OF DIABETES THAT REQUIRE TRANCE-RANK SIGNALS. *IMMUNITY* 16:183-191.
- GREEN, E.A., L. GORELIK, C.M. MCGREGOR, E.H. TRAN, AND R.A. FLAVELL. 2003. CD4+CD25+ T REGULATORY CELLS CONTROL ANTI-ISLET CD8+ T CELLS THROUGH TGF-BETA-TGF-BETA RECEPTOR INTERACTIONS IN TYPE 1 DIABETES. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 100:10878-10883.
- GREENBERG, S.A., G.S. PINKUS, A.A. AMATO, AND J.L. PINKUS. 2007. MYELOID DENDRITIC CELLS IN INCLUSION-BODY MYOSITIS AND POLYMYOSITIS. *MUSCLE NERVE* 35:17-23.
- GREENBERG, S.A., J.L. PINKUS, G.S. PINKUS, T. BURLSON, D. SANODOU, R. TAWIL, R.J. BAROHN, D.S. SAPERSTEIN, H.R. BRIEMBERG, M. ERICSSON, P. PARK, AND A.A. AMATO. 2005. INTERFERON-ALPHA/BETA-MEDIATED INNATE IMMUNE MECHANISMS IN DERMATOMYOSITIS. *ANN NEUROL* 57:664-678.
- GRIGGS, R.C., V. ASKANAS, S. DIMAURO, A. ENGEL, G. KARPATI, J.R. MENDELL, AND L.P. ROWLAND. 1995. INCLUSION BODY MYOSITIS AND MYOPATHIES. *ANN NEUROL* 38:705-713.
- GRINBERG-BLEYER, Y., A. BAEYENS, S. YOU, R. ELHAGE, G. FOURCADE, S. GREGOIRE, N. CAGNARD, W. CARPENTIER, Q. TANG, J. BLUESTONE, L. CHATENOD, D. KLATZMANN, B.L. SALOMON, AND E. PIAGGIO. 2010A. IL-2 REVERSES ESTABLISHED TYPE 1 DIABETES IN NOD MICE BY A LOCAL EFFECT ON PANCREATIC REGULATORY T CELLS. *J EXP MED* 207:1871-1878.
- GRINBERG-BLEYER, Y., D. SAADOUN, A. BAEYENS, F. BILLIARD, J.D. GOLDSTEIN, S. GREGOIRE, G.H. MARTIN, R. ELHAGE, N. DERIAN, W. CARPENTIER, G. MARODON, D. KLATZMANN, E. PIAGGIO, AND B.L. SALOMON. 2010B. PATHOGENIC T CELLS HAVE A PARADOXICAL PROTECTIVE EFFECT IN MURINE AUTOIMMUNE DIABETES BY BOOSTING TREGS. *J CLIN INVEST* 120:4558-4568.
- GROSSMAN, W.J., J.W. VERBSKY, B.L. TOLLEFSEN, C. KEMPER, J.P. ATKINSON, AND T.J. LEY. 2004. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF GRANZYMES A AND B IN HUMAN CYTOTOXIC LYMPHOCYTE SUBSETS AND T REGULATORY CELLS. *BLOOD* 104:2840-2848.
- GROUX, H., A. O'GARRA, M. BIGLER, M. ROULEAU, S. ANTONENKO, J.E. DE VRIES, AND M.G. RONCAROLO. 1997. A CD4+ T-CELL SUBSET INHIBITS ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSES AND PREVENTS COLITIS. *NATURE* 389:737-742.
- GUERTIN, D.A., K.V. GUNTUR, G.W. BELL, C.C. THOREEN, AND D.M. SABATINI. 2006. FUNCTIONAL GENOMICS IDENTIFIES TOR-REGULATED GENES THAT CONTROL GROWTH AND DIVISION. *CURR BIOL* 16:958-970.
- GUILLOT-DELOST, M., M. CHERAI, Y. HAMEL, M. ROSENZWAJG, C. BAILLOU, G. SIMONIN, V. LECLERCQ, M.E. MARIOTTI-FERRANDIZ, A. SIX, V. BON-DURAND,

- S. MAURY, B.L. SALOMON, J.L. COHEN, D. KLATZMANN, AND F.M. LEMOINE. 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.**
- HAMAGUCHI, Y., M. KUWANA, K. HOSHINO, M. HASEGAWA, K. KAJI, T. MATSUSHITA, K. KOMURA, M. NAKAMURA, M. KODERA, N. SUGA, A. HIGASHI, K. OGUSU, K. TSUTSUI, A. FURUSAKI, H. TANABE, S. SASAOKA, Y. MURO, M. YOSHIKAWA, N. ISHIGURO, M. AYANO, E. MUROI, K. FUJIKAWA, Y. UMEDA, M. KAWASE, E. MABUCHI, Y. ASANO, K. SODEMOTO, M. SEISHIMA, H. YAMADA, S. SATO, K. TAKEHARA, AND M. FUJIMOTO. 2011. CLINICAL CORRELATIONS WITH DERMATOMYOSITIS-SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN ADULT JAPANESE PATIENTS WITH DERMATOMYOSITIS: A MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY. *ARCH DERMATOL* 147:391-398.**
- HAMANN, A., K. KLUGEWITZ, F. AUSTRUP, AND D. JABLONSKI-WESTRICH. 2000. ACTIVATION INDUCES RAPID AND PROFOUND ALTERATIONS IN THE TRAFFICKING OF T CELLS. *EUR J IMMUNOL* 30:3207-3218.**
- HAMANO, T., T.F. GENDRON, E. CAUSEVIC, S.H. YEN, W.L. LIN, C. ISIDORO, M. DETURE, AND L.W. KO. 2008. AUTOPHAGIC-LYSOSOMAL PERTURBATION ENHANCES TAU AGGREGATION IN TRANSFECTANTS WITH INDUCED WILD-TYPE TAU EXPRESSION. *EUR J NEUROSCI* 27:1119-1130.**
- HARADA, Y., C. ELLY, G. YING, J.H. PAIK, R.A. DEPINHO, AND Y.C. LIU. 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., H. HENGARTNER, M.L. HUANG, Y.H. KANG, R. ABE, R.W. MOREADITH, H. PIRCHER, G.S. GRAY, P.S. OHASHI, G.J. FREEMAN, AND 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 G.M. HUTCHINS. 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., D. MATHIS, AND C. BENOIST. 2008. THE AKT-MTOR AXIS REGULATES DE NOVO DIFFERENTIATION OF CD4+FOXP3+ CELLS. *J EXP MED* 205:565-574.**
- HENDRIKX, T.K., J.H. VELTHUIS, M. KLEPPER, E. VAN GURP, A. GEEL, W. SCHOORDIJK, C.C. BAAN, AND W. WEIMAR. 2009. MONOTHERAPY RAPAMYCIN ALLOWS AN INCREASE OF CD4 CD25 FoxP3 T CELLS IN RENAL RECIPIENTS. *TRANSPL INT* 22:884-891.**
- HILTON-JONES, D. 2001. INFLAMMATORY MUSCLE DISEASES. *CURR OPIN NEUROL* 14:591-596.**
- HOFFMANN, P., J. ERMANN, M. EDINGER, C.G. FATHMAN, AND S. STROBER. 2002. DONOR-TYPE CD4(+)CD25(+) REGULATORY T CELLS SUPPRESS LETHAL ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AFTER ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION. *J EXP MED* 196:389-399.**

- HOHLFELD, R., AND A.G. ENGEL. 1991. COCULTURE WITH AUTOLOGOUS MYOTUBES OF CYTOTOXIC T CELLS ISOLATED FROM MUSCLE IN INFLAMMATORY MYOPATHIES. *ANN NEUROL* 29:498-507.
- HOOGENDIJK, J.E., A.A. AMATO, B.R. LECKY, E.H. CHOY, I.E. LUNDBERG, M.R. ROSE, J. VENCovsky, M. DE VISSER, AND R.A. HUGHES. 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., T. NOMURA, AND S. SAKAGUCHI. 2003. CONTROL OF REGULATORY T CELL DEVELOPMENT BY THE TRANSCRIPTION FACTOR FOXP3. *SCIENCE* 299:1057-1061.
- HOWARD, O.M., H.F. DONG, D. YANG, N. RABEN, K. NAGARAJU, A. ROSEN, L. CASCIOLA-ROSEN, M. HARTLEIN, M. KRON, K. YIADOM, S. DWIVEDI, P.H. PLOTZ, AND J.J. OPPENHEIM. 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.
- HSU, W.T., J.L. SUEN, AND B.L. CHIANG. 2006. THE ROLE OF CD4CD25 T CELLS IN AUTOANTIBODY PRODUCTION IN MURINE LUPUS. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY* 145:513-519.
- HUEHN, J., K. SIEGMUND, J.C. LEHMANN, C. SIEWERT, U. HAUBOLD, M. FEUERER, G.F. DEBES, J. LAUBER, O. FREY, G.K. PRZYBYLSKI, U. NIESNER, M. DE LA ROSA, C.A. SCHMIDT, R. BRAUER, J. BUER, A. SCHEFFOLD, AND A. HAMANN. 2004. DEVELOPMENTAL STAGE, PHENOTYPE, AND MIGRATION DISTINGUISH NAIVE- AND EFFECTOR/MEMORY-LIKE CD4+ REGULATORY T CELLS. *J EXP MED* 199:303-313.
- HUTLOFF, A., A.M. DITTRICH, K.C. BEIER, B. ELJASCHWITSCH, R. KRAFT, I. ANAGNOSTOPOULOS, AND R.A. KROCZEK. 1999. ICOS IS AN INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY RELATED TO CD28. *NATURE* 397:263-266.
- INUKAI, A., S. KURU, Y. LIANG, A. TAKANO, Y. KOBAYASHI, M. SAKAI, M. DOYU, AND G. SOBUE. 2000. EXPRESSION OF HLA-DR AND ITS ENHANCING MOLECULES IN MUSCLE FIBERS IN POLYMYOSITIS. *MUSCLE NERVE* 23:385-392.
- ISHII, I., N. FUKUSHIMA, X. YE, AND J. CHUN. 2004. LYSOPHOSPHOLIPID RECEPTORS: SIGNALING AND BIOLOGY. *ANNU REV BIOCHEM* 73:321-354.
- ITO, T., S. HANABUCHI, Y.H. WANG, W.R. PARK, K. ARIMA, L. BOVER, F.X. QIN, M. GILLIET, AND Y.J. LIU. 2008. TWO FUNCTIONAL SUBSETS OF FOXP3+ REGULATORY T CELLS IN HUMAN THYMUS AND PERIPHERY. *IMMUNITY* 28:870-880.
- ITOH, M., T. TAKAHASHI, N. SAKAGUCHI, Y. KUNYASU, J. SHIMIZU, F. OTSUKA, AND S. SAKAGUCHI. 1999. THYMUS AND AUTOIMMUNITY: PRODUCTION OF CD25+CD4+ NATURALLY ANERGIC AND SUPPRESSIVE T CELLS AS A KEY FUNCTION OF THE THYMUS IN MAINTAINING IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE. *J IMMUNOL* 162:5317-5326.

- JAECKEL, E., H. VON BOEHMER, AND M.P. MANNS. 2005. ANTIGEN-SPECIFIC FOXP3-TRANSDUCED T-CELLS CAN CONTROL ESTABLISHED TYPE 1 DIABETES. *DIABETES* 54:306-310.**
- JOFFRE, O., T. SANTOLARIA, D. CALISE, T. AL SAATI, D. HUDRISIER, P. ROMAGNOLI, AND J.P. VAN MEERWIJK. 2008. PREVENTION OF ACUTE AND CHRONIC ALLOGRAFT REJECTION WITH CD4+CD25+FOXP3+ REGULATORY T LYMPHOCYTES. *NAT MED* 14:88-92.**
- JOHNSON, L.G., K.E. COLLIER, D.J. EDWARDS, D.L. PHILIPPE, P.R. EASTWOOD, S.E. WALTERS, G.W. THICKBROOM, AND F.L. MASTAGLIA. 2009. IMPROVEMENT IN AEROBIC CAPACITY AFTER AN EXERCISE PROGRAM IN SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS. *J CLIN NEUROMUSCUL DIS* 10:178-184.**
- JONES, R.G., AND C.B. THOMPSON. 2007. REVVING THE ENGINE: SIGNAL TRANSDUCTION FUELS T CELL ACTIVATION. *IMMUNITY* 27:173-178.**
- JONULEIT, H., E. SCHMITT, M. STASSEN, A. TUETTENBERG, J. KNOP, AND A.H. ENK. 2001. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUMAN CD4(+)CD25(+) T CELLS WITH REGULATORY PROPERTIES ISOLATED FROM PERIPHERAL BLOOD. *J EXP MED* 193:1285-1294.**
- JORDAN, M.S., A. BOESTEANU, A.J. REED, A.L. PETRONE, A.E. HOLENBECK, M.A. LERMAN, A. NAJI, AND A.J. CATON. 2001. THYMIC SELECTION OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS INDUCED BY AN AGONIST SELF-PEPTIDE. *NAT IMMUNOL* 2:301-306.**
- KATSUMATA, Y., W.M. RIDGWAY, T. ORISS, X. GU, D. CHIN, Y. WU, N. FERTIG, T. OURY, D. VANDERSTEEN, P. CLEMENS, C.J. CAMACHO, A. WEINBERG, AND D.P. ASCHERMAN. 2007. SPECIES-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES GENERATED BY HISTIDYL-tRNA SYNTHETASE IMMUNIZATION ARE ASSOCIATED WITH MUSCLE AND LUNG INFLAMMATION. *J AUTOIMMUN* 29:174-186.**
- KAZATCHKINE, M.D., AND S.V. KAVERI. 2001. IMMUNOMODULATION OF AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISEASES WITH INTRAVENOUS IMMUNE GLOBULIN. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* 345:747-755.**
- KERDILES, Y.M., D.R. BEISNER, R. TINOCO, A.S. DEJEAN, D.H. CASTRILLON, R.A. DEPINHO, AND S.M. HEDRICK. 2009. FOXO1 LINKS HOMING AND SURVIVAL OF NAIVE T CELLS BY REGULATING L-SELECTIN, CCR7 AND INTERLEUKIN 7 RECEPTOR. *NAT IMMUNOL* 10:176-184.**
- KESSEL, A., H. AMMURI, R. PERI, E.R. PAVLOTZKY, M. BLANK, Y. SHOENFELD, AND E. TOUBI. 2007. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN THERAPY AFFECTS T REGULATORY CELLS BY INCREASING THEIR SUPPRESSIVE FUNCTION. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* 179:5571-5575.**
- KIM, J., K. LAHL, S. HORI, C. LODDENKEMPER, A. CHAUDHRY, P. DEROOS, A. RUDENSKY, AND T. SPARWASSER. 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.**
- KITAZAWA, M., K.N. GREEN, A. CACCAMO, AND F.M. LAFERLA. 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., U. SAHIN, B. KYEWSKI, J. SCHWENDEMANN, K. DHAENE, AND O. TURECI. 2006. EXPRESSION PROFILING OF AUTOIMMUNE REGULATOR AIRE mRNA IN A COMPREHENSIVE SET OF HUMAN NORMAL AND NEOPLASTIC TISSUES. *IMMUNOL LETT* 106:172-179.
- KOENIG, M., M.J. FRITZLER, I.N. TARGOFF, Y. TROYANOV, AND J.L. SENEAL. 2007. HETEROGENEITY OF AUTOANTIBODIES IN 100 PATIENTS WITH AUTOIMMUNE MYOSITIS: INSIGHTS INTO CLINICAL FEATURES AND OUTCOMES. *ARTHRITIS RES THER* 9:R78.
- KOFFMAN, B.M., K. SIVAKUMAR, T. SIMONIS, D. STRONCEK, AND M.C. DALAKAS. 1998. HLA ALLELE DISTRIBUTION DISTINGUISHES SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS FROM HEREDITARY INCLUSION BODY MYOPATHIES. *J NEUROIMMUNOL* 84:139-142.
- KOJIMA, T., N. TANUMA, Y. AIKAWA, T. SHIN, A. SASAKI, AND Y. MATSUMOTO. 1997. MYOSIN-INDUCED AUTOIMMUNE POLYMYOSITIS IN THE RAT. *J NEUROL SCI* 151:141-148.
- KUHN, R., J. LOHLER, D. RENNICK, K. RAJEWSKY, AND W. MULLER. 1993. INTERLEUKIN-10-DEFICIENT MICE DEVELOP CHRONIC ENTEROCOLITIS. *CELL* 75:263-274.
- KUNIYASU, Y., T. TAKAHASHI, M. ITOH, J. SHIMIZU, G. TODA, AND S. SAKAGUCHI. 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., W.R. HEATH, H. KOSAKA, J.F. MILLER, AND F.R. CARBONE. 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.
- LARMAN, H.B., M. SALAJEGHEH, R. NAZARENO, T. LAM, J. SAULD, H. STEEN, S.W. KONG, J.L. PINKUS, A.A. AMATO, S.J. ELLEDGE, AND S.A. GREENBERG. 2013. CYTOSOLIC 5'-NUCLEOTIDASE 1A AUTOIMMUNITY IN SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS. *ANN NEUROL* 73:408-418.
- LAZO, G., H. KANTARJIAN, E. ESTEY, D. THOMAS, S. O'BRIEN, AND J. CORTES. 2003. USE OF ARSENIC TRIOXIDE (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA: THE M. D. ANDERSON EXPERIENCE. *CANCER* 97:2218-2224.
- LEE, J.H., S.G. KANG, AND C.H. KIM. 2007. FOXP3+ T CELLS UNDERGO CONVENTIONAL FIRST SWITCH TO LYMPHOID TISSUE HOMING RECEPTORS IN THYMUS BUT ACCELERATED SECOND SWITCH TO NONLYMPHOID TISSUE HOMING RECEPTORS IN SECONDARY LYMPHOID TISSUES. *J IMMUNOL* 178:301-311.
- LEHMAN, N.L. 2009. THE UBIQUITIN PROTEASOME SYSTEM IN NEUROPATHOLOGY. *ACTA NEUROPATHOL* 118:329-347.
- LEPIDI, H., V. FRANCES, D. FIGARELLA-BRANGER, C. BARTOLI, A. MACHADO-BAETA, AND J.F. PELLISSIER. 1998. LOCAL EXPRESSION OF CYTOKINES IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. *NEUROPATHOL APPL NEUROBIOL* 24:73-79.
- LEVINE, S.M., N. RABEN, D. XIE, F.B. ASKIN, R. TUDER, M. MULLINS, A. ROSEN, AND L.A. CASCIOLA-ROSEN. 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.

- LEVINGS, M.K., R. SANGREGORIO, F. GALBIATI, S. SQUADRONE, R. DE WAAL MALEFYT, AND M.G. RONCAROLO. 2001. IFN-ALPHA AND IL-10 INDUCE THE DIFFERENTIATION OF HUMAN TYPE 1 T REGULATORY CELLS. *J IMMUNOL* 166:5530-5539.
- LIM, H.W., P. HILLSAMER, AND C.H. KIM. 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.
- LIU, V.C., L.Y. WONG, T. JANG, A.H. SHAH, I. PARK, X. YANG, Q. ZHANG, S. LONNING, B.A. TEICHER, AND C. LEE. 2007. TUMOR EVASION OF THE IMMUNE SYSTEM BY CONVERTING CD4+CD25- T CELLS INTO CD4+CD25+ T REGULATORY CELLS: ROLE OF TUMOR-DERIVED TGF-BETA. *J IMMUNOL* 178:2883-2892.
- LIU, W., A.L. PUTNAM, Z. XU-YU, G.L. SZOT, M.R. LEE, S. ZHU, P.A. GOTTLIEB, P. KAPRANOV, T.R. GINGERAS, B. FAZEKAS DE ST GROTH, C. CLAYBERGER, D.M. SOPER, S.F. ZIEGLER, AND J.A. BLUESTONE. 2006. CD127 EXPRESSION INVERSELY CORRELATES WITH FOXP3 AND SUPPRESSIVE FUNCTION OF HUMAN CD4+ T REG CELLS. *J EXP MED* 203:1701-1711.
- LIU, Y., P. ZHANG, J. LI, A.B. KULKARNI, S. PERRUCHE, AND W. CHEN. 2008. A CRITICAL FUNCTION FOR TGF-BETA SIGNALING IN THE DEVELOPMENT OF NATURAL CD4+CD25+FOXP3+ REGULATORY T CELLS. *NAT IMMUNOL* 9:632-640.
- LOVE, L.A., R.L. LEFF, D.D. FRASER, I.N. TARGOFF, M. DALAKAS, P.H. PLOTZ, AND F.W. MILLER. 1991. A NEW APPROACH TO THE CLASSIFICATION OF IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY: MYOSITIS-SPECIFIC AUTOANTIBODIES DEFINE USEFUL HOMOGENEOUS PATIENT GROUPS. *MEDICINE (BALTIMORE)* 70:360-374.
- LUND, J.M., L. HSING, T.T. PHAM, AND A.Y. RUDENSKY. 2008. COORDINATION OF EARLY PROTECTIVE IMMUNITY TO VIRAL INFECTION BY REGULATORY T CELLS. *SCIENCE* 320:1220-1224.
- MAEDA, M.H., S. TSUJI, AND J. SHIMIZU. 2012. INFLAMMATORY MYOPATHIES ASSOCIATED WITH ANTI-MITOCHONDRIAL ANTIBODIES. *BRAIN* 135:1767-1777.
- MAERTEN, P., C. SHEN, D.M. BULLENS, G. VAN ASSCHE, S. VAN GOOL, K. GEBOES, P. RUTGEERTS, AND J.L. CEUPPENS. 2005. EFFECTS OF INTERLEUKIN 4 ON CD25+CD4+ REGULATORY T CELL FUNCTION. *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY* 25:112-120.
- MALEK, T.R., A. YU, V. VINCEK, P. SCIBELLI, AND L. KONG. 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.
- MAMMEN, A.L. 2011. AUTOIMMUNE MYOPATHIES: AUTOANTIBODIES, PHENOTYPES AND PATHOGENESIS. *NATURE REVIEWS. NEUROLOGY* 7:343-354.
- MAMMEN, A.L., T. CHUNG, L. CHRISTOPHER-STINE, P. ROSEN, A. ROSEN, K.R. DOERING, AND L.A. CASCIOLA-ROSEN. 2011. AUTOANTIBODIES AGAINST 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE IN PATIENTS WITH STATIN-ASSOCIATED AUTOIMMUNE MYOPATHY. *ARTHRITIS RHEUM* 63:713-721.
- MAMMEN, A.L., K. PAK, E.K. WILLIAMS, D. BRISSON, J. CORESH, E. SELVIN, AND D. GAUDET. 2012. RARITY OF ANTI-3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE ANTIBODIES IN STATIN USERS, INCLUDING THOSE WITH SELF-

- LIMITED MUSCULOSKELETAL SIDE EFFECTS. *ARTHRITIS CARE RES (HOBOKEN)* 64:269-272.
- MARIE, I., E. HACHULLA, P. CHERIN, S. DOMINIQUE, P.Y. HATRON, M.F. HELLOT, B. DEVULDER, S. HERSON, H. LEVESQUE, AND H. COURTOIS. 2002. INTERSTITIAL LUNG DISEASE IN POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *ARTHRITIS RHEUM* 47:614-622.
- MARINO, M., F. SCUDERI, F. MANNELLA, AND E. BARTOCCIONI. 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., F. SCUDERI, P. MAZZARELLI, F. MANNELLA, C. PROVENZANO, AND E. BARTOCCIONI. 2001. CONSTITUTIVE AND CYTOKINE-INDUCED EXPRESSION OF MHC AND INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1 (ICAM-1) ON HUMAN MYOBLASTS. *J NEUROIMMUNOL* 116:94-101.
- MARODON, G., S. FISSON, B. LEVACHER, M. FABRE, B.L. SALOMON, AND D. KLATZMANN. 2006. INDUCTION OF ANTIGEN-SPECIFIC TOLERANCE BY INTRATHYMIC INJECTION OF LENTIVIRAL VECTORS. *BLOOD* 108:2972-2978.
- MASTAGLIA, F.L. 2008. INFLAMMATORY MUSCLE DISEASES. *NEUROL INDIA* 56:263-270.
- MASTAGLIA, F.L., AND B.A. PHILLIPS. 2002. IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES: EPIDEMIOLOGY, CLASSIFICATION, AND DIAGNOSTIC CRITERIA. *RHEUM DIS CLIN NORTH AM* 28:723-741.
- MASTELLER, E.L., M.R. WARNER, Q. TANG, K.V. TARBELL, H. MCDEVITT, AND J.A. BLUESTONE. 2005. EXPANSION OF FUNCTIONAL ENDOGENOUS ANTIGEN-SPECIFIC CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS FROM NONOBESE DIABETIC MICE. *J IMMUNOL* 175:3053-3059.
- MATLOUBIAN, M., C.G. LO, G. CINAMON, M.J. LESNESKI, Y. XU, V. BRINKMANN, M.L. ALLENDE, R.L. PROIA, AND J.G. CYSTER. 2004. LYMPHOCYTE EGRESS FROM THYMUS AND PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS IS DEPENDENT ON S1P RECEPTOR 1. *NATURE* 427:355-360.
- MAZZUCHELLI, R., AND S.K. DURUM. 2007. INTERLEUKIN-7 RECEPTOR EXPRESSION: INTELLIGENT DESIGN. *NAT REV IMMUNOL* 7:144-154.
- MAZZUCHELLI, R., J.A. HIXON, R. SPOLSKI, X. CHEN, W.Q. LI, V.L. HALL, J. WILLETTE-BROWN, A.A. HURWITZ, W.J. LEONARD, AND S.K. DURUM. 2008. DEVELOPMENT OF REGULATORY T CELLS REQUIRES IL-7/RALPHA STIMULATION BY IL-7 OR TSLP. *BLOOD* 112:3283-3292.
- MCGEACHY, M.J., L.A. STEPHENS, AND S.M. ANDERTON. 2005. NATURAL RECOVERY AND PROTECTION FROM AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS: CONTRIBUTION OF CD4+CD25+ REGULATORY CELLS WITHIN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *J IMMUNOL* 175:3025-3032.
- MENDELL, J.R., Z. SAHENK, T. GALES, AND L. PAUL. 1991. AMYLOID FILAMENTS IN INCLUSION BODY MYOSITIS. NOVEL FINDINGS PROVIDE INSIGHT INTO NATURE OF FILAMENTS. *ARCH NEUROL* 48:1229-1234.
- MENZIES, F.M., B. RAVIKUMAR, AND D.C. RUBINSZTEIN. 2006. PROTECTIVE ROLES FOR INDUCTION OF AUTOPHAGY IN MULTIPLE PROTEINOPATHIES. *AUTOPHAGY* 2:224-225.
- MILLER, T., M.T. AL-LOZI, G. LOPATE, AND A. PESTRONK. 2002A. MYOPATHY WITH ANTIBODIES TO THE SIGNAL RECOGNITION PARTICLE: CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES. *J NEUROL NEUROSURG PSYCHIATRY* 73:420-428.

- MILLER, T., Y. WALSH, S. SAMINADEN, J. WINER, AND 2002B. RANDOMIZED DOUBLE TRIAL OF METHOTREXATE AND STEROID COMPARE TO AZATHIOPRINE AND STEROID IN THE TREATMENT OD IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY. *J NEUROL SCI* 199 S53.
- MIN, B., A. THORNTON, S.M. CAUCHETEUX, S.A. YOUNES, K. OH, J. HU-LI, AND W.E. PAUL. 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., Y. YOSHIOKA, A. KITO, T. SHIMA, K. WING, A. NIWA, C. PARIZOT, C. TAFLIN, T. HEIKE, D. VALEYRE, A. MATHIAN, T. NAKAHATA, T. YAMAGUCHI, T. NOMURA, M. ONO, Z. AMOURA, G. GOROCHOV, AND S. SAKAGUCHI. 2009. FUNCTIONAL DELINEATION AND DIFFERENTIATION DYNAMICS OF HUMAN CD4+ T CELLS EXPRESSING THE FOXP3 TRANSCRIPTION FACTOR. *IMMUNITY* 30:899-911.
- MOSSER, D.M., AND X. ZHANG. 2008. INTERLEUKIN-10: NEW PERSPECTIVES ON AN OLD CYTOKINE. *IMMUNOL REV* 226:205-218.
- MUCKE, L., E. MASLIAH, G.Q. YU, M. MALLORY, E.M. ROCKENSTEIN, G. TATSUNO, K. HU, D. KHOLODENKO, K. JOHNSON-WOOD, AND L. MCCONLOGUE. 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.
- MURAWSKI, M.R., S.A. LITHERLAND, M.J. CLARE-SALZLER, AND A. DAVOODI-SEMIROMI. 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.
- MURO, Y., A. ISHIKAWA, K. SUGIURA, AND M. AKIYAMA. 2012. CLINICAL FEATURES OF ANTI-TIF1-ALPHA ANTIBODY-POSITIVE DERMATOMYOSITIS PATIENTS ARE CLOSELY ASSOCIATED WITH COEXISTENT DERMATOMYOSITIS-SPECIFIC AUTOANTIBODIES AND ANTI-TIF1-GAMMA OR ANTI-MI-2 AUTOANTIBODIES. *RHEUMATOLOGY* 51:1508-1513.
- MURO, Y., K. SUGIURA, K. HOSHINO, M. AKIYAMA, AND K. TAMAKOSHI. 2011. EPIDEMIOLOGIC STUDY OF CLINICALLY AMYOPATHIC DERMATOMYOSITIS AND ANTI-MELANOMA DIFFERENTIATION-ASSOCIATED GENE 5 ANTIBODIES IN CENTRAL JAPAN. *ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY* 13:R214.
- NAGARAJU, K., N. RABEN, L. LOEFFLER, T. PARKER, P.J. ROCHON, E. LEE, C. DANNING, R. WADA, C. THOMPSON, G. BAHTIYAR, J. CRAFT, R. HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, AND P. PLOTZ. 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., N. RABEN, G. MERRITT, L. LOEFFLER, K. KIRK, AND P. PLOTZ. 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.
- NAKAMURA, K., A. KITANI, AND W. STROBER. 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., T. YOSHIMURA, M. OKITA, M. MOTOMURA, S. KAMEI, H. MATSUO, AND K. EGUCHI. 2005. LAMININ-INDUCED AUTOIMMUNE MYOSITIS IN RATS. *J NEUROPATHOL EXP NEUROL* 64:790-796.
- NEEDHAM, M., AND F.L. MASTAGLIA. 2007. INCLUSION BODY MYOSITIS: CURRENT PATHOGENETIC CONCEPTS AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACHES. *LANCET NEUROL* 6:620-631.
- NISHIKAWA, H., T. KATO, I. TAWARA, T. TAKEMITSU, K. SAITO, L. WANG, Y. IKARASHI, H. WAKASUGI, T. NAKAYAMA, M. TANIGUCHI, K. KURIBAYASHI, L.J. OLD, AND H. SHIKU. 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.
- NISHIKAWA, H., AND S. SAKAGUCHI. 2010. REGULATORY T CELLS IN TUMOR IMMUNITY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 127:759-767.
- NISHIMURA, H., M. NOSE, H. HIAI, N. MINATO, AND T. HONJO. 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., T. OKAZAKI, Y. TANAKA, K. NAKATANI, M. HARA, A. MATSUMORI, S. SASAYAMA, A. MIZOGUCHI, H. HIAI, N. MINATO, AND T. HONJO. 2001. AUTOIMMUNE DILATED CARDIOMYOPATHY IN PD-1 RECEPTOR-DEFICIENT MICE. *SCIENCE* 291:319-322.
- NISHIO, J., M. SUZUKI, N. MIYASAKA, AND H. KOHSAKA. 2001. CLONAL BIASES OF PERIPHERAL CD8 T CELL REPERTOIRE DIRECTLY REFLECT LOCAL INFLAMMATION IN POLYMYOSITIS. *J IMMUNOL* 167:4051-4058.
- NISHIZUKA, Y., AND T. SAKAKURA. 1969. THYMUS AND REPRODUCTION: SEX-LINKED DYSGENESIS OF THE GONAD AFTER NEONATAL THYMECTOMY IN MICE. *SCIENCE* 166:753-755.
- NOGALSKA, A., C. D'AGOSTINO, W.K. ENGEL, W.L. KLEIN, AND V. ASKANAS. 2010A. NOVEL DEMONSTRATION OF AMYLOID-BETA OLIGOMERS IN SPORADIC INCLUSION-BODY MYOSITIS MUSCLE FIBERS. *ACTA NEUROPATHOL* 120:661-666.
- NOGALSKA, A., C. D'AGOSTINO, C. TERRACCIANO, W.K. ENGEL, AND V. ASKANAS. 2010B. IMPAIRED AUTOPHAGY IN SPORADIC INCLUSION-BODY MYOSITIS AND IN ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-PROVOKED CULTURED HUMAN MUSCLE FIBERS. *AM J PATHOL* 177:1377-1387.
- ODDIS, C.V., A.M. REED, R. AGGARWAL, L.G. RIDER, D.P. ASCHERMAN, M.C. LEVESQUE, R.J. BAROHN, B.M. FELDMAN, M.O. HARRIS-LOVE, D.C. KOONTZ, N. FERTIG, S.S. KELLEY, S.L. PRYBER, F.W. MILLER, H.E. ROCKETTE, AND R.I.M.S. GROUP. 2013. RITUXIMAB IN THE TREATMENT OF REFRACTORY ADULT AND JUVENILE DERMATOMYOSITIS AND ADULT POLYMYOSITIS: A RANDOMIZED, PLACEBO-PHASE TRIAL. *ARTHRITIS RHEUM* 65:314-324.
- ONIZUKA, S., I. TAWARA, J. SHIMIZU, S. SAKAGUCHI, T. FUJITA, AND E. NAKAYAMA. 1999. TUMOR REJECTION BY IN VIVO ADMINISTRATION OF ANTI-CD25 (INTERLEUKIN-2 RECEPTOR ALPHA) MONOCLONAL ANTIBODY. *CANCER RES* 59:3128-3133.

- PACIELLO, O., S. WOJCIK, L. GRADONI, G. OLIVA, F. TRAPANI, V. IOVANE, L. POLITANO, AND S. PAPPARELLA. 2010. SYRIAN HAMSTER INFECTED WITH LEISHMANIA INFANTUM: A NEW EXPERIMENTAL MODEL FOR INFLAMMATORY MYOPATHIES. *MUSCLE NERVE* 41:355-361.
- PAGE, G., G. CHEVREL, AND P. MIOSSEC. 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.
- PANDIYAN, P., AND M.J. LENARDO. 2008. THE CONTROL OF CD4+CD25+FOXP3+ REGULATORY T CELL SURVIVAL. *BIOL DIRECT* 3:6.
- PANDIYAN, P., L. ZHENG, S. ISHIHARA, J. REED, AND M.J. LENARDO. 2007. CD4+CD25+FOXP3+ REGULATORY T CELLS INDUCE CYTOKINE DEPRIVATION-MEDIATED APOPTOSIS OF EFFECTOR CD4+ T CELLS. *NAT IMMUNOL* 8:1353-1362.
- PATWA, H.S., V. CHAUDHRY, H. KATZBERG, A.D. RAE-GRANT, AND Y.T. SO. 2012. EVIDENCE-BASED GUIDELINE: INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN IN THE TREATMENT OF NEUROMUSCULAR DISORDERS: REPORT OF THE THERAPEUTICS AND TECHNOLOGY ASSESSMENT SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY. *NEUROLOGY* 78:1009-1015.
- PAUST, S., L. LU, N. MCCARTY, AND H. CANTOR. 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.
- PICCIRILLO, C.A., J.J. LETTERIO, A.M. THORNTON, R.S. MCHUGH, M. MAMURA, H. MIZUHARA, AND E.M. SHEVACH. 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.
- PLOTZ, P.H. 2003. THE AUTOANTIBODY REPERTOIRE: SEARCHING FOR ORDER. *NAT REV IMMUNOL* 3:73-78.
- PREVEL, N., Y. ALLENBACH, D. KLATZMANN, B. SALOMON, AND O. BENVENISTE. 2013. BENEFICIAL ROLE OF RAPAMYCIN IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE MYOSITIS. *PLOS ONE* 8:E74450.
- QIN, S., S.P. COBBOLD, H. POPE, J. ELLIOTT, D. KIOUSSIS, J. DAVIES, AND H. WALDMANN. 1993. "INFECTIOUS" TRANSPLANTATION TOLERANCE. *SCIENCE* 259:974-977.
- REED, A.M., AND S.R. YTTERBERG. 2002. GENETIC AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS FOR IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. *RHEUM DIS CLIN NORTH AM* 28:891-916.
- REEVES, W.H., S.K. NIGAM, AND G. BLOBEL. 1986. HUMAN AUTOANTIBODIES REACTIVE WITH THE SIGNAL-RECOGNITION PARTICLE. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 83:9507-9511.
- REN, X., F. YE, Z. JIANG, Y. CHU, S. XIONG, AND Y. WANG. 2007. INVOLVEMENT OF CELLULAR DEATH IN TRAIL/DR5-DEPENDENT SUPPRESSION INDUCED BY CD4(+)/CD25(+) REGULATORY T CELLS. *CELL DEATH DIFFER* 14:2076-2084.

- RICHARDS, T.J., A. EGGEBEEN, K. GIBSON, S. YOUSEM, C. FUHRMAN, B.R. GOCHUICO, N. FERTIG, C.V. ODDIS, N. KAMINSKI, I.O. ROSAS, AND D.P. ASCHERMAN. 2009. CHARACTERIZATION AND PERIPHERAL BLOOD BIOMARKER ASSESSMENT OF ANTI-JO-1 ANTIBODY-POSITIVE INTERSTITIAL LUNG DISEASE. *ARTHRITIS RHEUM* 60:2183-2192.**
- RIGOLET, A., L. MUSSET, O. DUBOURG, T. MAISONOBE, P. GRENIER, J.L. CHARUEL, A. BEHIN, S. HERSON, Z. AMOURA, AND O. BENVENISTE. 2012. INFLAMMATORY MYOPATHIES WITH ANTI-KU ANTIBODIES: A PROGNOSIS DEPENDENT ON ASSOCIATED LUNG DISEASE. *MEDICINE (BALTIMORE)* 91:95-102.**
- ROJANA-UDOMSART, A., C. BUNDELL, I. JAMES, A. CASTLEY, P. MARTINEZ, F. CHRISTIANSEN, P. HOLLINGSWORTH, AND F. MASTAGLIA. 2012. FREQUENCY OF AUTOANTIBODIES AND CORRELATION WITH HLA-DRB1 GENOTYPE IN SPORADIC INCLUSION BODY MYOSITIS (S-IBM): A POPULATION CONTROL STUDY. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY* 249:66-70.**
- RONNELID, J., S. BARBASSO HELMERS, H. STORFORS, K. GRIP, L. RONNBLOM, K. FRANCK-LARSSON, G. NORDMARK, AND I.E. LUNDBERG. 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.**
- SAADOUN, D., M. ROSENZWAJG, F. JOLY, A. SIX, F. CARRAT, V. THIBAUT, D. SENE, P. CACOUB, AND D. KLATZMANN. 2011. REGULATORY T-CELL RESPONSES TO LOW-DOSE INTERLEUKIN-2 IN HCV-INDUCED VASCULITIS. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* 365:2067-2077.**
- SAITO, E., T. KOIKE, H. HASHIMOTO, N. MIYASAKA, Y. IKEDA, M. HARA, H. YAMADA, T. YOSHIDA, M. HARIGAI, AND Y. ICHIKAWA. 2008. EFFICACY OF HIGH-DOSE INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN THERAPY IN JAPANESE PATIENTS WITH STEROID-RESISTANT POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *MOD RHEUMATOL* 18:34-44.**
- SAKAGUCHI, S. 2000. REGULATORY T CELLS: KEY CONTROLLERS OF IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE. *CELL* 101:455-458.**
- SAKAGUCHI, S., K. FUKUMA, K. KURIBAYASHI, AND T. MASUDA. 1985. ORGAN-SPECIFIC AUTOIMMUNE DISEASES INDUCED IN MICE BY ELIMINATION OF T CELL SUBSET. I. EVIDENCE FOR THE ACTIVE PARTICIPATION OF T CELLS IN NATURAL SELF-TOLERANCE; DEFICIT OF A T CELL SUBSET AS A POSSIBLE CAUSE OF AUTOIMMUNE DISEASE. *J EXP MED* 161:72-87.**
- SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, M. ASANO, M. ITOH, AND M. TODA. 1995. IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE MAINTAINED BY ACTIVATED T CELLS EXPRESSING IL-2 RECEPTOR ALPHA-CHAINS (CD25). BREAKDOWN OF A SINGLE MECHANISM OF SELF-TOLERANCE CAUSES VARIOUS AUTOIMMUNE DISEASES. *J IMMUNOL* 155:1151-1164.**
- SAKAGUCHI, S., T. YAMAGUCHI, T. NOMURA, AND M. ONO. 2008. REGULATORY T CELLS AND IMMUNE TOLERANCE. *CELL* 133:775-787.**
- SALAJEGHEH, M., T. LAM, AND S.A. GREENBERG. 2011. AUTOANTIBODIES AGAINST A 43 KDA MUSCLE PROTEIN IN INCLUSION BODY MYOSITIS. *PLOS ONE* 6:e20266.**
- SALAMA, A.D., T. CHITNIS, J. IMITOLA, M.J. ANSARI, H. AKIBA, F. TUSHIMA, M. AZUMA, H. YAGITA, M.H. SAYEGH, AND S.J. KHOURY. 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., D.J. LENSCHOW, L. RHEE, N. ASHOURIAN, B. SINGH, A. SHARPE, AND J.A. BLUESTONE. 2000. B7/CD28 COSTIMULATION IS ESSENTIAL FOR THE HOMEOSTASIS OF THE CD4+CD25+ IMMUNOREGULATORY T CELLS THAT CONTROL AUTOIMMUNE DIABETES. *IMMUNITY* 12:431-440.
- SANTMYIRE-ROSENBERGER, B., AND E.M. DUGAN. 2003. SKIN INVOLVEMENT IN DERMATOMYOSITIS. *CURR OPIN RHEUMATOL* 15:714-722.
- SARBASSOV, D.D., D.A. GUERTIN, S.M. ALI, AND D.M. SABATINI. 2005. PHOSPHORYLATION AND REGULATION OF AKT/PKB BY THE RICTOR-MTOR COMPLEX. *SCIENCE* 307:1098-1101.
- SARWEEN, N., A. CHODOS, C. RAYKUNDALIA, M. KHAN, A.K. ABBAS, AND L.S. WALKER. 2004. CD4+CD25+ CELLS CONTROLLING A PATHOGENIC CD4 RESPONSE INHIBIT CYTOKINE DIFFERENTIATION, CXCR-3 EXPRESSION, AND TISSUE INVASION. *J IMMUNOL* 173:2942-2951.
- SAUER, S., L. BRUNO, A. HERTWECK, D. FINLAY, M. LELEU, M. SPIVAKOV, Z.A. KNIGHT, B.S. COBB, D. CANTRELL, E. O'CONNOR, K.M. SHOKAT, A.G. FISHER, AND M. MERKENSCHLAGER. 2008. T CELL RECEPTOR SIGNALING CONTROLS FOXP3 EXPRESSION VIA PI3K, AKT, AND MTOR. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 105:7797-7802.
- SCALAPINO, K.J., Q. TANG, J.A. BLUESTONE, M.L. BONYHADI, AND D.I. DAIKH. 2006. SUPPRESSION OF DISEASE IN NEW ZEALAND BLACK/NEW ZEALAND WHITE LUPUS-PRONE MICE BY ADOPTIVE TRANSFER OF EX VIVO EXPANDED REGULATORY T CELLS. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* 177:1451-1459.
- SCHMIDT, J., K. BARTHEL, A. WREDE, M. SALAJEGHEH, M. BAHR, AND M.C. DALAKAS. 2008. INTERRELATION OF INFLAMMATION AND APP IN SIBM: IL-1 BETA INDUCES ACCUMULATION OF BETA-AMYLOID IN SKELETAL MUSCLE. *BRAIN* 131:1228-1240.
- SCHNEIDER, M.A., J.G. MEINGASSNER, M. LIPP, H.D. MOORE, AND A. ROT. 2007. CCR7 IS REQUIRED FOR THE IN VIVO FUNCTION OF CD4+ CD25+ REGULATORY T CELLS. *J EXP MED* 204:735-745.
- SCOTT-BROWNE, J.P., S. SHAFIANI, G. TUCKER-HEARD, K. ISHIDA-TSUBOTA, J.D. FONTENOT, A.Y. RUDENSKY, M.J. BEVAN, AND K.B. URDAHL. 2007. EXPANSION AND FUNCTION OF FOXP3-EXPRESSING T REGULATORY CELLS DURING TUBERCULOSIS. *J EXP MED* 204:2159-2169.
- SEDDIKI, N., B. SANTNER-NANAN, J. MARTINSON, J. ZAUNDERS, S. SASSON, A. LANDAY, M. SOLOMON, W. SELBY, S.I. ALEXANDER, R. NANAN, A. KELLEHER, AND B. FAZEKAS DE ST GROTH. 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., B. SANTNER-NANAN, S.G. TANGYE, S.I. ALEXANDER, M. SOLOMON, S. LEE, R. NANAN, AND B. FAZEKAS DE SAINT GROTH. 2006B. PERSISTENCE OF NAIVE CD45RA+ REGULATORY T CELLS IN ADULT LIFE. *BLOOD* 107:2830-2838.
- SELVA-O'CALLAGHAN, A., M. LABRADOR-HORRILLO, R. SOLANS-LAQUE, C.P. SIMEON-AZNAZ, X. MARTINEZ-GOMEZ, AND M. VILARDELL-TARRES. 2006. MYOSITIS-SPECIFIC AND MYOSITIS-ASSOCIATED ANTIBODIES IN A SERIES OF

- EIGHTY-EIGHT MEDITERRANEAN PATIENTS WITH IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY. *ARTHRITIS AND RHEUMATISM* 55:791-798.
- SELVA-O'CALLAGHAN, A., E. TRALLERO-ARAGUAS, J.M. GRAU-JUNYENT, AND M. LABRADOR-HORRILLO. 2010. MALIGNANCY AND MYOSITIS: NOVEL AUTOANTIBODIES AND NEW INSIGHTS. *CURR OPIN RHEUMATOL* 22:627-632.
- SETOGUCHI, R., S. HORI, T. TAKAHASHI, AND S. SAKAGUCHI. 2005. HOMEOSTATIC MAINTENANCE OF NATURAL FOXP3(+) CD25(+) CD4(+) REGULATORY T CELLS BY INTERLEUKIN (IL)-2 AND INDUCTION OF AUTOIMMUNE DISEASE BY IL-2 NEUTRALIZATION. *J EXP MED* 201:723-735.
- SHAMIM, E.A., L.G. RIDER, AND F.W. MILLER. 2000. UPDATE ON THE GENETICS OF THE IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. *CURR OPIN RHEUMATOL* 12:482-491.
- SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI, AND S. SAKAGUCHI. 1999. INDUCTION OF TUMOR IMMUNITY BY REMOVING CD25+CD4+ T CELLS: A COMMON BASIS BETWEEN TUMOR IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. *J IMMUNOL* 163:5211-5218.
- SHULL, M.M., I. ORMSBY, A.B. KIER, S. PAWLOWSKI, R.J. DIEBOLD, M. YIN, R. ALLEN, C. SIDMAN, G. PROETZEL, D. CALVIN, AND ET AL. 1992. TARGETED DISRUPTION OF THE MOUSE TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1 GENE RESULTS IN MULTIFOCAL INFLAMMATORY DISEASE. *NATURE* 359:693-699.
- SIGURGEIRSSON, B., B. LINDELOF, O. EDHAG, AND E. ALLANDER. 1992. RISK OF CANCER IN INDIOPAHTIC INFLAMMATORY MYOPAHTY. *N ENGL J MED* 326:363-367.
- SIMONS, D.M., C.C. PICCA, S. OH, O.A. PERNG, M. AITKEN, J. ERIKSON, AND A.J. CATON. 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 J.E. MAGUIRE. 1990. REGULATION OF THE EXPRESSION OF CLASS I MHC GENES. *CRIT REV IMMUNOL* 10:235-257.
- SINGER, D.S., E. MOZES, S. KIRSHNER, AND L.D. KOHN. 1997. ROLE OF MHC CLASS I MOLECULES IN AUTOIMMUNE DISEASE. *CRIT REV IMMUNOL* 17:463-468.
- SITKOVSKY, M.V., D. LUKASHEV, S. APASOV, H. KOJIMA, M. KOSHIBA, C. CALDWELL, A. OHTA, AND M. THIEL. 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. 1980. T-CELL GROWTH FACTOR. *IMMUNOL REV* 51:337-357.
- SOEJIMA, M., E.H. KANG, X. GU, Y. KATSUMATA, P.R. CLEMENS, AND D.P. ASCHERMAN. 2011. ROLE OF INNATE IMMUNITY IN A MURINE MODEL OF HISTIDYL-TRANSFER RNA SYNTHETASE (JO-1)-MEDIATED MYOSITIS. *ARTHRITIS RHEUM* 63:479-487.
- SONTHEIMER, R.D. 2002. DERMATOMYOSITIS: AN OVERVIEW OF RECENT PROGRESS WITH EMPHASIS ON DERMATOLOGIC ASPECTS. *DERMATOL CLIN* 20:387-408.
- SPILMAN, P., N. PODLUTSKAYA, M.J. HART, J. DEBNATH, O. GOROSTIZA, D. BREDESEN, A. RICHARDSON, R. STRONG, AND V. GALVAN. 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.
- STANCIU, R., M. GUIGUET, L. MUSSET, D. TOUITOU, C. BEIGELMAN, A. RIGOLET, N. COSTEDOAT-CHALUMEAU, Y. ALLENBACH, B. HERVIER, O. DUBOURG, T. MAISONOBE, J.L. CHARUEL, A. BEHIN, S. HERSON, Z. AMOURA, P. GRENIER,

- AND O. BENVENISTE. 2012. ANTISYNTHEASE SYNDROME WITH ANTI-JO1 ANTIBODIES IN 48 PATIENTS: PULMONARY INVOLVEMENT PREDICTS DISEASE-MODIFYING ANTIRHEUMATIC DRUG USE. *J RHEUMATOL* 39:1835-1839.
- STEINERT, W. 1903. DERMATOMYOSITIS, WITH REPORT OF CASE WHICH PRESENTED A RARE MUSCLE ANOMALY BUT ONCE DESCRIBES IN MAN. *J EX MED* 6:
- STONE, K.B., C.V. ODDIS, N. FERTIG, Y. KATSUMATA, M. LUCAS, M. VOGT, R. DOMSIC, AND D.P. ASCHERMAN. 2007. ANTI-JO-1 ANTIBODY LEVELS CORRELATE WITH DISEASE ACTIVITY IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHY. *ARTHRITIS AND RHEUMATISM* 56:3125-3131.
- STRAUSS, L., C. BERGMANN, M. SZCZEPANSKI, W. GOODING, J.T. JOHNSON, AND T.L. WHITESIDE. 2007. A UNIQUE SUBSET OF CD4+CD25<sup>HIGH</sup>FOXP3+ 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., P.B. LANGMUIR, E. PALMER, M.H. SAYEGH, A.D. WELLS, AND L.A. TURKA. 2001. QUANTIFYING THE FREQUENCY OF ALLOREACTIVE T CELLS IN VIVO: NEW ANSWERS TO AN OLD QUESTION. *J IMMUNOL* 166:973-981.
- SUDA, T., T. TAKAHASHI, P. GOLSTEIN, AND S. NAGATA. 1993. MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF THE FAS LIGAND, A NOVEL MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY. *CELL* 75:1169-1178.
- SUGIHARA, T., N. OKIYAMA, M. SUZUKI, K. KOHYAMA, Y. MATSUMOTO, N. MIYASAKA, AND H. KOHSAKA. 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., C. SEKINE, T. NAKAE, K. KOHYAMA, M. HARIGAI, Y. IWAKURA, Y. MATSUMOTO, N. MIYASAKA, AND H. KOHSAKA. 2007. A NEW MURINE MODEL TO DEFINE THE CRITICAL PATHOLOGIC AND THERAPEUTIC MEDIATORS OF POLYMYOSITIS. *ARTHRITIS RHEUM* 56:1304-1314.
- SUVAS, S., A.K. AZKUR, B.S. KIM, U. KUMARAGURU, AND B.T. ROUSE. 2004. CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS CONTROL THE SEVERITY OF VIRAL IMMUNOINFLAMMATORY LESIONS. *J IMMUNOL* 172:4123-4132.
- SZANYA, V., J. ERMANN, C. TAYLOR, C. HOLNESS, AND C.G. FATHMAN. 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.
- TAKAHASHI, T., Y. KUNIASU, M. TODA, N. SAKAGUCHI, M. ITOH, M. IWATA, J. SHIMIZU, AND S. SAKAGUCHI. 1998. IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE MAINTAINED BY CD25+CD4+ NATURALLY ANERGIC AND SUPPRESSIVE T CELLS: INDUCTION OF AUTOIMMUNE DISEASE BY BREAKING THEIR ANERGIC/SUPPRESSIVE STATE. *INT IMMUNOL* 10:1969-1980.
- TAKAHASHI, T., T. TAGAMI, S. YAMAZAKI, T. UEDE, J. SHIMIZU, N. SAKAGUCHI, T.W. MAK, AND S. SAKAGUCHI. 2000. IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE MAINTAINED BY CD25(+)CD4(+) REGULATORY T CELLS CONSTITUTIVELY EXPRESSING CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE-ASSOCIATED ANTIGEN 4. *J EXP MED* 192:303-310.
- TAKAHATA, Y., A. NOMURA, H. TAKADA, S. OHGA, K. FURUNO, S. HIKINO, H. NAKAYAMA, S. SAKAGUCHI, AND T. HARA. 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.
- TAKIZAWA, H., J. SHIGA, Y. MOROI, S. MIYACHI, M. NISHIWAKI, AND T. MIYAMOTO. 1987. INTERSTITIAL LUNG DISEASE IN DERMATOMYOSITIS: CLINICOPATHOLOGICAL STUDY. *J RHEUMATOL* 14:102-107.
- TANAKA, K., M.J. ALBIN, X. YUAN, K. YAMAURA, A. HABICHT, T. MURAYAMA, M. GRIMM, A.M. WAAGA, T. UENO, R.F. PADERA, H. YAGITA, M. AZUMA, T. SHIN, B.R. BLAZAR, D.M. ROTHSTEIN, M.H. SAYEGH, AND N. NAJAFIAN. 2007. PDL1 IS REQUIRED FOR PERIPHERAL TRANSPLANTATION TOLERANCE AND PROTECTION FROM CHRONIC ALLOGRAFT REJECTION. *J IMMUNOL* 179:5204-5210.
- TANG, Q., J.Y. ADAMS, C. PENARANDA, K. MELLI, E. PIAGGIO, E. SGOUROUDIS, C.A. PICCIRILLO, B.L. SALOMON, AND J.A. BLUESTONE. 2008. CENTRAL ROLE OF DEFECTIVE INTERLEUKIN-2 PRODUCTION IN THE TRIGGERING OF ISLET AUTOIMMUNE DESTRUCTION. *IMMUNITY* 28:687-697.
- TANG, Q., K.J. HENRIKSEN, M. BI, E.B. FINGER, G. SZOT, J. YE, E.L. MASTELLER, H. MCDEVITT, M. BONYHADI, AND J.A. BLUESTONE. 2004. IN VITRO-EXPANDED ANTIGEN-SPECIFIC REGULATORY T CELLS SUPPRESS AUTOIMMUNE DIABETES. *J EXP MED* 199:1455-1465.
- TANG, Q., K.J. HENRIKSEN, E.K. BODEN, A.J. TOOLEY, J. YE, S.K. SUBUDHI, X.X. ZHENG, T.B. STROM, AND J.A. BLUESTONE. 2003. CUTTING EDGE: CD28 CONTROLS PERIPHERAL HOMEOSTASIS OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS. *J IMMUNOL* 171:3348-3352.
- TARBELL, K.V., S. YAMAZAKI, K. OLSON, P. TOY, AND R.M. STEINMAN. 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.
- TAYLOR, M.D., L. LEGOFF, A. HARRIS, E. MALONE, J.E. ALLEN, AND R.M. MAIZELS. 2005. REMOVAL OF REGULATORY T CELL ACTIVITY REVERSES HYPORESPONSIVENESS AND LEADS TO FILARIAL PARASITE CLEARANCE IN VIVO. *J IMMUNOL* 174:4924-4933.
- TAYLOR, P.A., R.J. NOELLE, AND B.R. BLAZAR. 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., A. NOGALSKA, W.K. ENGEL, AND V. ASKANAS. 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., S. FISSON, Y. DE KOZAK, M. KADDOURI, P. LEHOANG, D. KLATZMANN, B.L. SALOMON, AND B. BODAGHI. 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 H.H. GOEBEL. 1996. INFLAMMATORY MYOPATHIES. *CURR OPIN NEUROL* 9:375-379.
- THA-IN, T., H.J. METSELAAR, A.R. BUSHELL, J. KWEKKEBOOM, AND K.J. WOOD. 2010. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS PROMOTE SKIN ALLOGRAFT ACCEPTANCE BY TRIGGERING FUNCTIONAL ACTIVATION OF CD4+FOXP3+ T CELLS. *TRANSPLANTATION* 89:1446-1455.
- THORNTON, A.M., AND E.M. SHEVACH. 1998. CD4+CD25+ IMMUNOREGULATORY T CELLS SUPPRESS POLYCLONAL T CELL ACTIVATION IN VITRO BY INHIBITING INTERLEUKIN 2 PRODUCTION. *J EXP MED* 188:287-296.
- TILBURGS, T., D.L. ROELEN, B.J. VAN DER MAST, G.M. DE GROOT-SWINGS, C. KLEIJBURG, S.A. SCHERJON, AND F.H. CLAAS. 2008. EVIDENCE FOR A SELECTIVE MIGRATION OF FETUS-SPECIFIC CD4+CD25BRIGHT REGULATORY T CELLS FROM THE PERIPHERAL BLOOD TO THE DECIDUA IN HUMAN PREGNANCY. *J IMMUNOL* 180:5737-5745.
- TIVOL, E.A., F. BORRIELLO, A.N. SCHWEITZER, W.P. LYNCH, J.A. BLUESTONE, AND A.H. SHARPE. 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.
- TOURNADRE, A., V. LENIEF, AND P. MIOSSEC. 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 P. MIOSSEC. 2009. CHEMOKINES AND DENDRITIC CELLS IN INFLAMMATORY MYOPATHIES. *ANN RHEUM DIS* 68:300-304.
- TRALLERO-ARAGUAS, E., M. LABRADOR-HORRILLO, A. SELVA-O'CALLAGHAN, M.A. MARTINEZ, X. MARTINEZ-GOMEZ, E. PALOU, J.L. RODRIGUEZ-SANCHEZ, AND M. VILARDELL-TARRES. 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., H. RAMSEY, AND E.M. SHEVACH. 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., B. REIZIS, A.C. MELTON, E. MASTELLER, Q. TANG, J.M. PROCTOR, Y. WANG, X. BERNSTEIN, X. HUANG, L.F. REICHARDT, J.A. BLUESTONE, AND D. SHEPPARD. 2007. LOSS OF INTEGRIN ALPHA(V)BETA8 ON DENDRITIC CELLS CAUSES AUTOIMMUNITY AND COLITIS IN MICE. *NATURE* 449:361-365.
- TRENADO, A., F. CHARLOTTE, S. FISSON, M. YAGELLO, D. KLATZMANN, B.L. SALOMON, AND J.L. COHEN. 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.
- TRINATH, J., P. HEGDE, M. SHARMA, M.S. MADDUR, M. RABIN, J.M. VALLAT, L. MAGY, K.N. BALAJI, S.V. KAVERI, AND J. BAYRY. 2013. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN EXPANDS REGULATORY T CELLS VIA INDUCTION OF

- CYCLOOXYGENASE-2-DEPENDENT PROSTAGLANDIN E2 IN HUMAN DENDRITIC CELLS. *BLOOD* 122:1419-1427.
- TROYANOV, Y., I.N. TARGOFF, J.L. TREMBLAY, J.R. GOULET, Y. RAYMOND, AND J.L. SENEAL. 2005. NOVEL CLASSIFICATION OF IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES BASED ON OVERLAP SYNDROME FEATURES AND AUTOANTIBODIES: ANALYSIS OF 100 FRENCH CANADIAN PATIENTS. *MEDICINE* 84:231-249.
- TSANG, J.Y., Y. TANRIVER, S. JIANG, E. LEUNG, K. RATNASOTHY, G. LOMBARDI, AND R. LECHLER. 2009. INDEFINITE MOUSE HEART ALLOGRAFT SURVIVAL IN RECIPIENT TREATED WITH CD4(+)CD25(+) REGULATORY T CELLS WITH INDIRECT ALLOSPECIFICITY AND SHORT TERM IMMUNOSUPPRESSION. *TRANSPL IMMUNOL* 21:203-209.
- UHLIG, H.H., J. COOMBES, C. MOTTET, A. IZCUE, C. THOMPSON, A. FANGER, A. TANNAPFEL, J.D. FONTENOT, F. RAMSDELL, AND F. POWRIE. 2006. CHARACTERIZATION OF FOXP3+CD4+CD25+ AND IL-10-SECRETING CD4+CD25+ T CELLS DURING CURE OF COLITIS. *J IMMUNOL* 177:5852-5860.
- VAN DER PAS, J., G.J. HENGSTMAN, H.J. TER LAAK, G.F. BORM, AND B.G. VAN ENGELEN. 2004. DIAGNOSTIC VALUE OF MHC CLASS I STAINING IN IDIOPATHIC INFLAMMATORY MYOPATHIES. *J NEUROL NEUROSURG PSYCHIATRY* 75:136-139.
- VAN MAREN, W.W., J.F. JACOBS, I.J. DE VRIES, S. NIERKENS, AND G.J. ADEMA. 2008. TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALLING ON TREGS: TO SUPPRESS OR NOT TO SUPPRESS? *IMMUNOLOGY* 124:445-452.
- VANG, K.B., J. YANG, S.A. MAHMUD, M.A. BURCHILL, A.L. VEGOE, AND M.A. FARRAR. 2008. IL-2, -7, AND -15, BUT NOT THYMIC STROMAL LYMPHOPOEITIN, REDUNDANTLY GOVERN CD4+FOXP3+ REGULATORY T CELL DEVELOPMENT. *J IMMUNOL* 181:3285-3290.
- VATTEMI, G., W.K. ENGEL, J. MCFERRIN, AND V. ASKANAS. 2004. ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND UNFOLDED PROTEIN RESPONSE IN INCLUSION BODY MYOSITIS MUSCLE. *AM J PATHOL* 164:1-7.
- VENTURI, G.M., R.M. CONWAY, D.A. STEEBER, AND T.F. TEDDER. 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., J.R. CHRISTENSEN, S. MINAEE, E.J. O'NEILL, F.J. BARRAT, A. BOONSTRA, T. BARTHLOTT, B. STOCKINGER, D.C. WRAITH, AND A. O'GARRA. 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., C. BAECHER-ALLAN, H.L. WEINER, AND D.A. HAFLER. 2004. LOSS OF FUNCTIONAL SUPPRESSION BY CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS. *J EXP MED* 199:971-979.
- WAGNER, E. 1863. FALL EINER SELTENEN MUSCKELKANHEIT. *ARCH D. HEILK*. IV:
- WAGNER, E. 1886-7. EIN FALL VON ACUTER POLYMYOSITIS. *DEUTSCHES ARCHIV. F. KLIN. MED. LEIPZ* XL:
- WALKER, L.S., A. CHODOS, M. EGGENA, H. DOOMS, AND A.K. ABBAS. 2003. ANTIGEN-DEPENDENT PROLIFERATION OF CD4+ CD25+ REGULATORY T CELLS IN VIVO. *J EXP MED* 198:249-258.

- WALSH, P.T., J.L. BUCKLER, J. ZHANG, A.E. GELMAN, N.M. DALTON, D.K. TAYLOR, S.J. BENSINGER, W.W. HANCOCK, AND L.A. TURKA. 2006. PTEN INHIBITS IL-2 RECEPTOR-MEDIATED EXPANSION OF CD4+ CD25+ TREGS. *J CLIN INVEST* 116:2521-2531.
- WALSH, R.J., S.W. KONG, Y. YAO, B. JALLAL, P.A. KIENER, J.L. PINKUS, A.H. BEGGS, A.A. AMATO, AND S.A. GREENBERG. 2007. TYPE I INTERFERON-INDUCIBLE GENE EXPRESSION IN BLOOD IS PRESENT AND REFLECTS DISEASE ACTIVITY IN DERMATOMYOSITIS AND POLYMYOSITIS. *ARTHRITIS RHEUM* 56:3784-3792.
- WALUNAS, T.L., C.Y. BAKKER, AND J.A. BLUESTONE. 1996. CTLA-4 LIGATION BLOCKS CD28-DEPENDENT T CELL ACTIVATION. *J EXP MED* 183:2541-2550.
- WANG, R., L. KOZHAYA, F. MERCER, A. KHAITAN, H. FUJII, AND D. UNUTMAZ. 2009A. EXPRESSION OF GARP SELECTIVELY IDENTIFIES ACTIVATED HUMAN FOXP3+ REGULATORY T CELLS. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 106:13439-13444.
- WANG, W., R. LAU, D. YU, W. ZHU, A. KORMAN, AND J. WEBER. 2009B. PD1 BLOCKADE REVERSES THE SUPPRESSION OF MELANOMA ANTIGEN-SPECIFIC CTL BY CD4+ CD25(HI) REGULATORY T CELLS. *INT IMMUNOL* 21:1065-1077.
- WEBSTER, K.E., S. WALTERS, R.E. KOHLER, T. MRKVAN, O. BOYMAN, C.D. SURH, S.T. GREY, AND J. SPRENT. 2009. IN VIVO EXPANSION OF T REG 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.
- WERTH, V.P., J.P. CALLEN, G. ANG, AND K.E. SULLIVAN. 2002. ASSOCIATIONS OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND HLA POLYMORPHISMS WITH ADULT DERMATOMYOSITIS: IMPLICATIONS FOR A UNIQUE PATHOGENESIS. *J INVEST DERMATOL* 119:617-620.
- WING, K., Y. ONISHI, P. PRIETO-MARTIN, T. YAMAGUCHI, M. MIYARA, Z. FEHERVARI, T. NOMURA, AND S. SAKAGUCHI. 2008. CTLA-4 CONTROL OVER FOXP3+ REGULATORY T CELL FUNCTION. *SCIENCE* 322:271-275.
- WOLF, A.M., D. WOLF, M. STEURER, G. GASTL, E. GUNSILIUS, AND B. GRUBECK-LOEBENSTEIN. 2003. INCREASE OF REGULATORY T CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF CANCER PATIENTS. *CLIN CANCER RES* 9:606-612.
- YAGI, H., T. NOMURA, K. NAKAMURA, S. YAMAZAKI, T. KITAWAKI, S. HORI, M. MAEDA, M. ONODERA, T. UCHIYAMA, S. FUJII, AND S. SAKAGUCHI. 2004. CRUCIAL ROLE OF FOXP3 IN THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF HUMAN CD25+CD4+ REGULATORY T CELLS. *INT IMMUNOL* 16:1643-1656.
- YAMAZAKI, S., T. IYODA, K. TARBELL, K. OLSON, K. VELINZON, K. INABA, AND R.M. STEINMAN. 2003. DIRECT EXPANSION OF FUNCTIONAL CD25+ CD4+ REGULATORY T CELLS BY ANTIGEN-PROCESSING DENDRITIC CELLS. *J EXP MED* 198:235-247.
- YAO, Z., Y. KANNO, M. KERENYI, G. STEPHENS, L. DURANT, W.T. WATFORD, A. LAURENCE, G.W. ROBINSON, E.M. SHEVACH, R. MORIGGL, L. HENNIGHAUSEN, C. WU, AND J.J. O'SHEA. 2007. NONREDUNDANT ROLES FOR STAT5A/B IN DIRECTLY REGULATING FOXP3. *BLOOD* 109:4368-4375.
- YOKOYAMA, T., M. SHIMIZU, S. ISHIKAWA, K. UENO, Y. HAMAGUCHI, K. TAKEHARA, AND A. YACHIE. 2013. ACCUMULATION OF MATURE B CELLS IN THE INFLAMED MUSCLE TISSUE OF A PATIENT WITH ANTI-155/140 ANTIBODY-POSITIVE JUVENILE

- DERMATOMYOSITIS. *MODERN RHEUMATOLOGY / THE JAPAN RHEUMATISM ASSOCIATION* 23:167-171.
- YOSHINAGA, S.K., J.S. WHORISKEY, S.D. KHARE, U. SARMIENTO, J. GUO, T. HORAN, G. SHIH, M. ZHANG, M.A. COCCIA, T. KOHNO, A. TAFURI-BLADT, D. BRANKOW, P. CAMPBELL, D. CHANG, L. CHIU, T. DAI, G. DUNCAN, G.S. ELLIOTT, A. HUI, S.M. MCCABE, S. SCULLY, A. SHAHINIAN, C.L. SHAKLEE, G. VAN, T.W. MAK, AND G. SENALDI. 1999. T-CELL CO-STIMULATION THROUGH B7RP-1 AND ICOS. *NATURE* 402:827-832.
- YU, P., R.K. GREGG, J.J. BELL, J.S. ELLIS, R. DIVEKAR, H.H. LEE, R. JAIN, H. WALDNER, J.C. HARDAWAY, M. COLLINS, V.K. KUCHROO, AND H. ZAGHOUBANI. 2005. SPECIFIC T REGULATORY CELLS DISPLAY BROAD SUPPRESSIVE FUNCTIONS AGAINST EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS UPON ACTIVATION WITH COGNATE ANTIGEN. *J IMMUNOL* 174:6772-6780.
- ZANTOS, D., Y. ZHANG, D. FELSON, AND 1994;. THE OVERALL AND TEMPORAL ASSOCIATION OF CANCER WITH POLYMYOSITIS AND DERMATOMYOSITIS. *J. RHEUMATOL* 1855-1859.
- ZEISER, R., D.B. LEVESON-GOWER, E.A. ZAMBRICKI, N. KAMBHAM, A. BEILHACK, J. LOH, J.Z. HOU, AND R.S. NEGRIN. 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., X. ZHANG, F. TANG, L. ZHU, AND Y. LIU. 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.
- ZHAO, J.X., Y.Y. ZENG, AND Y. LIU. 2007. FETAL ALLOANTIGEN IS RESPONSIBLE FOR THE EXPANSION OF THE CD4(+)CD25(+) REGULATORY T CELL POOL DURING PREGNANCY. *J REPROD IMMUNOL* 75:71-81.
- ZHU, K.Y., T. FEFERMAN, P.K. MAITI, M.C. SOUROUJON, AND S. FUCHS. 2006. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN SUPPRESSES EXPERIMENTAL MYASTHENIA GRAVIS: IMMUNOLOGICAL MECHANISMS. *JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY* 176:187-197.
- ZORN, E., E.A. NELSON, M. MOHSENI, F. PORCHERAY, H. KIM, D. LITSA, R. BELLUCCI, E. RADERSCHALL, C. CANNING, R.J. SOIFFER, D.A. FRANK, AND J. RITZ. 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.

## RESUME

Les myopathies inflammatoires sont des maladies acquises caractérisées par un déficit moteur impliquant une atteinte musculaire auto-immune. Elles sont responsables d'un handicap invalidant et peuvent s'accompagner de complications engageant le pronostic vital. Les traitements, quand ils existent, reposent sur l'utilisation de corticoïdes à fortes doses et au long cours. Cependant, 60% des patients rechutent et 20 à 30 % sont d'emblée corticorésistants. D'autres traitements immunosuppresseurs sont alors nécessaires (méthothrexate, azathioprine, cyclosporine). Les effets secondaires de ces traitements sont inévitables et parfois sévères, c'est pourquoi l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques est essentielle. Afin de tester ces nouvelles approches, le laboratoire a développé un modèle murin de Myosite Auto-immune Expérimentale dont les caractéristiques cliniques et histologiques sont similaires à celles de la polymyosite.

Dans ce modèle nous avons étudié l'importance d'une population aux capacités immunosuppressives, appelée les lymphocytes T régulateurs, ayant un rôle primordial dans la tolérance périphérique. Afin de contrôler les manifestations auto-immunes, ne pouvant reproduire les mécanismes d'action des Tregs, nous avons cherché à les amplifier *in vivo*, pharmacologiquement.

Dans un premier temps, nous avons constaté la baisse de la sévérité de la maladie, notamment une baisse de l'infiltrat inflammatoire avec la rapamycine ainsi qu'une forte diminution du ratio Tconv/Tregs en faveur des Tregs.

Dans un second temps, nous avons montré le rôle bénéfique des immunoglobulines en intraveineux dans ce même modèle en traitement curatif.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'arsenic trioxyde (Trisenox) dans ce modèle animal.

Ainsi, ces résultats ont permis d'améliorer nos connaissances sur le rôle des IgIV dans les myopathies inflammatoires et d'envisager un essai clinique chez les patients avec la rapamycine.

### Mots-clés

Lymphocyte T régulateurs ; myopathie inflammatoire idiopathique ; auto-immunité ; rapamycine, immunoglobulines intraveineux.