



Étude physiopathologique de la myopathie auto-immune des souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL.

Gwladys Bourdenet

► To cite this version:

Gwladys Bourdenet. Étude physiopathologique de la myopathie auto-immune des souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR062 . tel-01716513

HAL Id: tel-01716513

<https://theses.hal.science/tel-01716513>

Submitted on 23 Feb 2018

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen

Etude physiopathologique de la myopathie inflammatoire chez les souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL

**Présentée et soutenue par
Gwladys BOURDENET**

**Thèse soutenue publiquement le 15 décembre 2017
devant le jury composé de**

Mme Isabelle DUBUS	PR Université de Rouen Normandie	Présidente du Jury
Mme Eliane PIAGGIO	Directeur de recherche Institut Curie, Université Paris Descartes	Rapporteur
Mme Gillian MOULY	Directeur de recherche Institut de Myologie, UPMC Paris VI	Rapporteur
M. Christian BOITARD	PU-PH Institut Cochin, Université Paris Descartes, APHP	Examineur
M. Olivier BOYER	PU-PH Université de Rouen Normandie, CHU de Rouen	Directeur de thèse
M. Jérémie MARTINET	MCU-PH Université de Rouen Normandie, CHU de Rouen	Co-encadrant de thèse

**Thèse dirigée par Olivier BOYER et co-encadrée par Jérémie MARTINET
Laboratoire INSERM U1234**

REMERCIEMENTS

A l'issu de cette thèse, je suis plus que jamais convaincue que le travail de recherche est, et doit être, un travail collaboratif qui ne peut être mené à bien sans l'aide de bien des personnes. C'est pourquoi je souhaite mettre à profit ce mémoire pour les remercier.

Au professeur Olivier Boyer :

je souhaite tout d'abord remercier le Pr Olivier Boyer de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail avec tant de ferveur et d'enthousiasme. Merci pour ces 4 ans de travail commun, durant lesquels vous m'avez permis d'apprendre et de progresser dans ce domaine parfois si complexe qu'est l'immunologie.

Au docteur Jérémie Martinet :

merci d'avoir été mon premier interlocuteur et conseillé lors de ma recherche de laboratoire et sujet de thèse, avant même le début d'internat. Merci d'avoir encadré mes premiers pas d'interne, de thésarde, d'immunologiste. Merci pour les échanges passés et à venir.

Aux docteurs Eliane Piaggio et Gillian Mouly :

merci de l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Au professeur Christian Boitard :

merci pour les divers échanges scientifiques que nous avons pu avoir au cours de cette collaboration, à l'institut Cochin ou à distance. Merci de m'avoir intégrée à ce projet fascinant. Nos discussions au cours de ces dernières années m'ont apporté l'ouverture d'esprit nécessaire pour participer à ce projet formidable.

Au professeur Isabelle Dubus :

merci pour les échanges scientifiques et pharmaceutiques que nous avons eu depuis ton arrivée au « 3^{ème} étage ». Je te suis également très reconnaissante de l'opportunité que tu m'as donnée de faire m'exercer à l'enseignement. Merci enfin de me faire l'honneur d'avoir accepté sans hésitation de présider mon jury de thèse.

A tous mes collègues de l'Inserm U1234 et du laboratoire d'immunologie :

je remercie chaleureusement tous les membres des laboratoires de recherche et hospitalier qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ce travail de thèse. Un merci tout particulier au docteur Laurent Drouot, tant pour ses conseils avisés que pour son expertise dans bien des domaines. Merci d'avoir été présents dans toutes les étapes de ce travail. Merci à Cécile Bergua pour ces 3 années passées ensemble et durant lesquelles ton soutien, ton aide et ton amitié ont été indispensables. Merci à Christophe Arnoult pour ton aide technique, tes remarques constructives, mais également pour ta bonne humeur quotidienne. Merci au docteur Laetitia Jean d'avoir été d'un grand soutien dans ce travail et d'avoir géré au mieux ces lignées pas toujours très compliantes. Merci au docteur Fabienne Jouen pour son expertise sur l'auto-immunité, pour son aide indispensable dans cette dernière ligne droite et pour ses conseils dans tous les domaines. Merci au docteur Serge Jacquot de toujours s'être rendu disponible pour un conseil, une formation, une relecture ; merci pour votre bienveillance. Merci au docteur Catalina Abad pour tous nos échanges si constructifs sur ce projet, cela a été une réelle joie pour moi de te voir intégrer ce projet passionnant. Merci au docteur Audrey Aussy pour son soutien sans faille, ses remarques médicales éclairées mais également pour ses marques d'amitiés. Merci à Gaëtan Riou et au docteur Manuel Fréret pour leur aide précieuse au cours de différentes manipulations. Merci au docteur Sahil Adriouch, tant pour son avis scientifique éclairé que pour son aide des derniers instants. Et enfin, merci aux différents membres actuels ou passés du laboratoire pour votre soutien et les échanges scientifiques du quotidien.

Aux collaborateurs de ce travail :

merci également à Chantal Bécourt de l'institut Cochin pour ses conseils et les divers échanges professionnels que nous avons pu avoir lors de ce travail collaboratif fascinant. Merci aux docteurs Benjamin Dubourg, Yves Allenbach et Werner Stenzel pour leurs avis d'expert à des périodes charnières de ce travail.

A mes proches :

à l'issu de ce parcours, je remercie toutes les personnes qui me sont chères et que j'ai un peu délaissées ces derniers mois pour achever ce travail. Leurs marques d'attentions régulières, leur soutien et leurs encouragements m'ont aidé à rester toujours motivée et concentrée dans ce projet passionnant et prenant. Merci en particulier à mes parents et à Christophe de m'avoir toujours soutenue dans cette voie mais également à mes amis les plus proches.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	6
RESUME	7
ABSTRACT	8
ABREVIATIONS	9
I. INTRODUCTION	11
1. REGENERATION MUSCULAIRE ET MUSCLE INFLAMMATOIRE	12
1.1. ANATOMIE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	12
1.1.1. Composition du muscle strié squelettique	12
1.1.2. Les différents types de fibres musculaires	13
1.2. REGENERATION DU MUSCLE	14
1.2.1. Phase dégénérative : nécrose et inflammation	15
1.2.2. Phase régénérative : rôle des cellules satellites	16
1.3. MUSCLE INFLAMMATOIRE	18
1.3.1. Rôle des cellules de l'immunité innée	18
1.3.2. Rôle des cellules de l'immunité adaptative	19
1.3.3. Muscle inflammatoire et molécules de costimulation	20
2. LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES : UN ENSEMBLE COMPLEXE D'ENTITES HETEROGENES	23
2.1. DERMATOMYOSITES	27
2.1.1. Diagnostic clinique et biologique	27
2.1.2. Autres examens complémentaires	29
2.2. MYOPATHIES NECROSANTES AUTO-IMMUNES	30
2.2.1. Diagnostic clinique et biologique	30
2.2.2. Autres examens complémentaires	31
2.3. MYOSITE A INCLUSIONS	32
2.3.1. Diagnostic clinique et biologique	32
2.3.2. Autres examens complémentaires	33
2.4. MYOSITES DE CHEVAUCHEMENT	34

2.4.1.	Diagnostic clinique et biologique	34
2.4.2.	Autres examens complémentaires	36
2.5.	POLYMYOSITE	37
2.5.1.	Diagnostic clinique et biologique	37
2.5.2.	Autres examens complémentaires	38
2.6.	PRINCIPES DU TRAITEMENT	39
3.	LES MODELES ANIMAUX DE MYOPATHIES INFLAMMATOIRES	41
3.1.	MYOSITES SPONTANÉES	41
3.2.	MYOSITES INDUITES PAR IMMUNISATION	42
3.2.1.	Immunisation contre un extrait protéique de muscle	44
3.2.2.	Immunisation contre la myosine	45
3.2.3.	Immunisation contre la protéine C	46
3.2.4.	Immunisation contre la laminine	47
3.2.5.	Immunisation contre l'histidyl-tRNA synthétase	47
3.2.6.	Immunisation par transfert de cellules dendritiques	48
3.3.	MYOSITES INFECTIEUSES	49
3.3.1.	Virus Coxsackie B	50
3.3.2.	Virus Ross River	51
3.3.3.	Autres virus	52
3.3.4.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	53
3.3.5.	<i>Leishmania infantum</i>	53
3.4.	MYOSITES INDUITES PAR TRANSFERT PASSIF D'IGG DE PATIENTS	54
3.5.	MODELES TRANSGENIQUES	55
3.5.1.	Expression musculaire forcée du CMH-I	56
3.5.2.	Expression forcée de l'IFN- γ	57
3.5.3.	Expression forcée de la protéine β -amyloïde	57
3.5.4.	Mutation de la GNE	59
3.5.5.	Invalidation de la synaptotagmine VII	60
3.5.6.	Autres modifications génétiques	60
4.	VOIES DE COSTIMULATION : DES DEFICITS IMMUNITAIRES AUX MALADIES AUTO-IMMUNES	63
4.1.	LES VOIES PRINCIPALES DE REGULATION DES LYMPHOCYTES T	63
4.1.1.	Superfamille TNF/TNFR	64
4.1.2.	Superfamille TIM	68
4.1.3.	Superfamille SLAM	69
4.1.4.	Superfamille CD28/B7	70

4.2.	CONSEQUENCES D'UN DEFICIT EN ICOS CHEZ L'HOMME	76
4.3.	CONSEQUENCES D'UN DEFICIT DE COSTIMULATION CHEZ LA SOURIS NOD	79
4.3.1.	Souris NOD	79
4.3.2.	Déficit de la voie CD28/B7	84
4.3.3.	Souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-} : un nouveau modèle de myopathie inflammatoire ?	87
II.	OBJECTIFS	90
III.	RESULTATS	92
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	147
1.	LES SOURIS NOD <i>Icos</i> ^{-/-} ET <i>IcosL</i> ^{-/-} COMME MODELE DE MYOPATHIE INFLAMMATOIRE	148
2.	IDENTIFICATION DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS	149
3.	ROLE DU STRESS OXYDATIF DANS LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES	150
4.	ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE ET THERAPEUTIQUE DES TREG	151
4.1.	ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE	152
4.2.	ROLE THERAPEUTIQUE	153
5.	HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES	155
V.	CONCLUSION	159
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
VII.	ANNEXES	188

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du muscle strié squelettique _____	12
Figure 2. Composition d'une fibre musculaire _____	13
Figure 3. Analyse histologique des types de fibres sur coupe musculaire transversale _____	14
Figure 4. Différenciation de myoblastes en myotubes _____	15
Figure 5. Différenciation des cellules satellites lors de la régénération musculaire _____	17
Figure 6. Centralisation des noyaux dans les fibres en régénération _____	18
Figure 7. Cinétique d'apparition des cellules immunitaires lors de la régénération musculaire _____	20
Figure 8. Analyse histologique de ICOS/ICOSL dans un muscle de patient atteint de myosite à inclusions _	22
Figure 9. Rôle supposé des molécules de costimulation dans l'entretien des MI _____	22
Figure 10. Cibles des auto-anticorps des myosites et leurs associations cliniques _____	25
Figure 11. Papules de Gottron et rash héliotrope du visage _____	27
Figure 12. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de dermatomyosite _____	29
Figure 13. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de myopathie nécrosante auto-immune ____	31
Figure 14. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de myosite à inclusions _____	34
Figure 15. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de syndrome des anti-tRNA synthétases ____	36
Figure 16. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de polymyosite _____	38
Figure 17. Coupe transversale d'un muscle atteint de dermatomyosite canine _____	41
Figure 18. Coupe longitudinale d'un muscle de rat immunisé contre un extrait protéique xénogénique ____	44
Figure 19. Hypothèse de pathogénicité de l'histidyl-tRNA synthétase _____	48
Figure 20. Suivi de la charge virale et du taux d'Ac neutralisants dans la myosite induite par le virus Coxsackie B1 _____	51
Figure 21. Coupe histologique de muscle de souris infectée par le virus Ross River _____	52
Figure 22. Coupe histologique de muscle de hamster infecté par <i>Leishmania infantum</i> _____	54
Figure 23. Dépôts amyloïdes chez un <i>Cænorhabditis elegans</i> transgénique _____	58
Figure 24. Coupes histologiques de muscle de souris double transgénique MCK-APP/PS1 _____	59
Figure 25. Costimulation lymphocytaire T _____	64
Figure 26. Molécules de costimulation de la superfamille CD28/B7 _____	70
Figure 27. Molécules costimulatrices appartenant à la voie CD28/B7 _____	71
Figure 28. Rôle tolérogène ou immunogène de la voie ICOS/ICOSL _____	75
Figure 29. Délétion mise en évidence chez les 4 premiers patients identifiés pour un déficit en ICOS ____	76
Figure 30. Prévention par transfert de Treg du diabète exacerbé chez les souris NOD B7 ^{-/-} _____	85
Figure 31. Analyse histologique du pancréas et d'un nerf périphérique chez les souris NOD WT et CD86KO	86
Figure 32. Rôle des L _T CD4 ⁺ dans la neuropathie périphérique auto-immune des souris NOD CD86KO ____	86
Figure 33. Absence de diabète chez les souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-} _____	87
Figure 34. Rôle de ICOS dans la physiopathologie du diabète _____	89
Figure 35. Développement d'une atteinte neuromusculaire chez les souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-} et NOD <i>Icosl</i> ^{-/-} ____	89

Figure 36. Analyse de la locomotion et de la proprioception chez les souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-}	133
Figure 37. Analyse protéomique du muscle squelettique	134
Figure 38. Traitement préventif des souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-} par faibles doses d'IL-2	135
Figure 39. Administration de complexes IL-2/anti-IL-2(JES6-1) aux souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-}	136
Figure 40. Hypothèses physiopathologiques de la myopathie inflammatoire chez les souris NOD <i>Icos</i> ^{-/-} et NOD <i>Icost</i> ^{-/-}	157
Figure 41. Déviation de l'auto-immunité lors de l'invalidation de la voie ICOS/ICOSL chez les souris NOD	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Molécules de costimulation et coinhibition exprimées dans le muscle de patients atteints de myopathies inflammatoires _____	21
Tableau 2. Principales caractéristiques des différentes entités de myopathies inflammatoires _____	26
Tableau 3. Auto-anticorps du syndrome des anti-tRNA synthétases _____	36
Tableau 4. Evolution de la classification des myopathies inflammatoires entre 1975 et 2005 _____	38
Tableau 5. Principaux modèles animaux de myosites induits par immunisation _____	43
Tableau 6. Principaux modèles animaux de myosite infectieuse _____	50
Tableau 7. Principaux modèles animaux transgéniques de myopathie inflammatoire _____	56
Tableau 8. Autres modèles de myopathie chez des animaux modifiés génétiquement _____	61
Tableau 9. Cibles antigéniques de différentes maladies à composante auto-immune chez l'homme et dans les modèles expérimentaux _____	62
Tableau 10. Fonctions des principales voies de la famille TNF/TNFR _____	65
Tableau 11. Ligand, expression cellulaire et fonctions connues des molécules TIM _____	68
Tableau 12. Principales informations cliniques des patients atteints de déficit en ICOS _____	78
Tableau 13. Cibles antigéniques des réponses immunitaires dans le diabète de type 1 _____	80

RESUME

Les myopathies inflammatoires (MI) représentent un groupe hétérogène de maladies caractérisé par une faiblesse musculaire chronique et symétrique associée à une augmentation du taux sérique de créatine phosphokinase (CPK). Les MI sont actuellement subdivisées en 5 entités : les dermatomyosites, les myopathies nécrosantes auto-immunes, la myosite à inclusion, la polymyosite et les myosites de chevauchement. A ce jour, le diagnostic des MI repose sur l'association de signes cliniques, de caractéristiques anatomopathologiques sur la biopsie musculaire et la présence d'auto-anticorps (aAc). En effet, la découverte d'aAc spécifiques et/ou associés aux myosites (MSA/MAA) a considérablement amélioré le diagnostic et le pronostic de la maladie. Cependant, un nombre non négligeable de patients atteints de MI sont séronégatifs pour les MSA/MAA connus. Par ailleurs, la biopsie musculaire nécessaire au diagnostic est parfois guidée par imagerie par résonance magnétique (IRM), bien qu'il n'ait pas été prouvé que les données d'imagerie soient corrélées aux signes histologiques. Enfin, le traitement des MI repose sur l'utilisation d'immunosuppresseurs systémiques, une approche non spécifique de la physiopathologie de la maladie. Les modèles animaux de MI les plus utilisés sont induits et non spontanés : ils reposent principalement sur l'immunisation d'animaux contre des protéines telles que la myosine, la protéine C ou l'histidyl-tRNA synthétase.

Les souris NOD (*non obese diabetic*) sont le modèle classique d'étude du diabète de type 1. Lorsque ces souris sont invalidées pour la voie de costimulation lymphocytaire ICOS/ICOSL, les souris ne développent plus de diabète mais présentent alors une atteinte musculaire. Dans ce travail, nous avons étudié le phénotype et caractérisé l'atteinte musculaire des souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icosl*^{-/-}. Nous avons ainsi établi le 1^{er} modèle murin spontané de MI, dont la physiopathologie est médiée par les lymphocytes TCD4⁺ et la sécrétion d'IFN-γ. Par ailleurs, ces souris présentent un déficit en lymphocytes T régulateurs. Nous avons également identifié 4 auto-antigènes (aAg) candidats cibles d'aAc chez ces souris. La recherche des aAc correspondants aux aAg orthologues dans le sérum des patients atteints de MI a permis d'identifier, pour l'un d'entre eux, une minorité d'individus séropositifs grâce au développement d'un nouveau test ALBIA (*addressable laser bead immunoassay*). Il pourrait donc s'agir d'un nouveau biomarqueur. Dans la perspective de nouvelles évaluations thérapeutiques, nous avons établi des données préliminaires montrant que l'interleukine 2 à faibles doses permet de retarder l'apparition de la maladie. Enfin, nous avons mis à profit ce modèle et démontré la corrélation entre les données générées par IRM et par analyse histologique de l'inflammation, confortant le rôle de cette technique d'imagerie à la fois pour le diagnostic et le suivi des MI.

ABSTRACT

Inflammatory myopathies (IM) are a heterogeneous group of diseases characterized by chronic and symmetrical muscle weakness associated to increased creatine phosphokinase (CPK) levels, according to entity concerned. Currently, IM are divided into 5 main entities: dermatomyositis, immune-mediated necrotizing myopathies, inclusion body myositis, polymyositis and overlap myositis. Nowadays, IM diagnosis is based on clinical signs associated to pathologic features on muscle biopsy and presence of auto-antibodies (aAb). Indeed, the discovery of myositis specific and/or associated auto-antibodies (MSA/MAA) had considerably improve disease diagnosis and prognosis. However, substantial proportion of IM patients do not display any known MSA/MAA. Furthermore, diagnosis requires muscle biopsy. This biopsy is sometimes guided by magnetic resonance imaging (MRI), even though correlation between MRI findings and pathological features is not established. Lastly, therapeutics used in IM treatment are systemic immunosuppressive agents, *i.e.* not specific to IM pathophysiology. Animal models of IM are mainly based on active immunization against different proteins as myosin, C protein or histidyl-tRNA synthetase, while spontaneous models are required to identify pathophysiological mechanisms that new therapeutics should target.

NOD (non obese diabetic) mice are the main model of type 1 diabetes. When invalidated for ICOS/ICOSL costimulation pathway, these mice do not develop diabetes but present muscular disorders. In this work, we study *Icos*^{-/-} and *Icosl*^{-/-} NOD mice phenotype and characterize there muscle lesion. Thus, we have established this model as the first paradigm of IM. Pathophysiological study in these mice demonstrated that disease is CD4⁺ T cell dependent and associated to IFN-γ production. Furthermore, we shown a quantitative defect in regulatory T cells. We have also identified 4 candidate autoantigens (aAg) in *Icos*^{-/-} and *Icosl*^{-/-} NOD mice. Searching for corresponding aAb against ortholog proteins in patients with IM, we identified for one of them, a low percentage of seropositive individuals using a new ALBIA (*addressable laser bead immunoassay*). It could be identified as a new biomarker. In order to evaluate new therapies, we established preliminary data showing that low dose interleukin 2 therapy allow to delay disease onset. Lastly, we took advantage of this new model to demonstrate the correlation between MRI findings and histological inflammation features, confirming the valuable role of MRI for the diagnosis and monitoring of IM.

ABREVIATIONS

-E-

β -APP : précurseur de la protéine β -amyloïde
(*β -amyloid precursor protein*)

EAM : modèle expérimental de myopathie
auto-immune
(*experimental auto-immune
myopathy*)

-A-

aAc : auto-anticorps

EMG : électromyogramme

aAg : auto-antigène

-G-

AAV : *adeno-associated virus*

GAD : *glutamic acid decarboxylase*

AcM : anticorps monoclonal

GITR : *glucocorticoid-induced TNF receptor-
related*

-C-

CFA : adjuvant complet de Freund
(*Complete Freund's Adjuvant*)

GITRL : *GITR ligand*

CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité

-H-

H&E : coloration hématoxyline éosine

CMH-I : CMH de classe I

HMGCR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-
Coenzyme A réductase

CMH-II : CMH de classe II

HRS : histidyl-tRNA synthétase

CPA : cellule présentatrice d'antigène

-I-

CPK : créatine phosphokinase

IBM : myosite à inclusions
(*inclusion body myositis*)

CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte-associated
antigen-4*

ICOS : *inducible costimulator*

-D-

ICOSL : *ICOS ligand*

DC : cellule dendritique (*dendritic cell*)

IFN : interféron

DT1 : diabète de type 1

Ig : immunoglobuline

IgIV : Ig par voie intraveineuse

IL : interleukine

IRM : imagerie par résonance magnétique

iTreg : lymphocyte T régulateur induit

-J-

Jo-1 : histidyl-tRNA synthétase

-K-

KO : *knock out*

-L-

L_B : lymphocyte B

L_T : lymphocyte T

-M-

MAA : *myositis-associated auto-antibodies*

MC : myosites de chevauchement

MI : myopathies inflammatoires

MNAI : myopathie nécrosante auto-immune

MSA : *myositis-specific auto-antibodies*

-N-

NF-κB : *nuclear factor κB*

NK : *natural killer*

nTreg : lymphocyte T régulateur naturel

NXP2 : *nuclear matrix protein 2*

-P-

PD-1 : *programmed cell death 1*

PD-L1 : ligand de PD-1

PID : pneumopathie interstitielle diffuse

-R-

ROS : *reactive oxygen species*

-S-

SAS : syndrome des anti-tRNA synthétases

SRP : *signal recognition particle*

-T-

TCR : *T cell receptor*

Tfh : Th folliculaire
(*T follicular helper*)

TGF : *transforming growth factor*

Th : lymphocyte T auxiliaire (ou *helper*)

TIM : *T-cell Ig and mucin domain*

TNF : facteur de nécrose tumorale
(*tumor necrosis factor*)

TNFR : récepteur du TNF

Treg : lymphocyte T régulateur

I. INTRODUCTION

1. Régénération musculaire et muscle inflammatoire

1.1. Anatomie du muscle strié squelettique

Comme son nom l'indique, le muscle strié squelettique se fixe aux os par l'intermédiaire d'un tendon afin de permettre les mouvements volontaires lors de la contraction. Les muscles constituent un ensemble d'organes très important, de par sa fonction mais également de par sa masse relative dans l'organisme. Le système musculaire est étroitement lié au système nerveux, indispensable à son fonctionnement.

1.1.1. Composition du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est structuré en 3 niveaux, délimités chacun par un tissu conjonctif de soutien : l'épimysium, le périmysium et l'endomysium. L'ensemble du muscle est entouré par l'épimysium qui contient les faisceaux musculaires (ou fascicules) eux-mêmes délimités par le périmysium. Enfin dans chaque fascicule, les fibres musculaires (myofibres ou myocytes) sont séparées par l'endomysium (Figure 1).

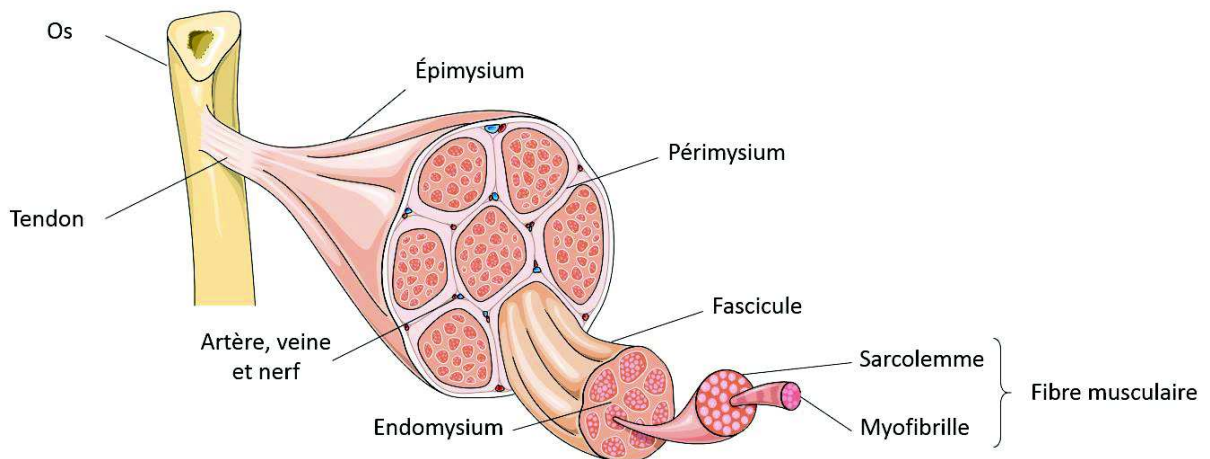


Figure 1. Anatomie du muscle strié squelettique.

Structure à 3 niveaux du muscle : l'endomysium entoure chaque fibre musculaire, le périmysium assemble les fibres musculaires en un faisceau musculaire et l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle.

Les fibres musculaires sont des cellules plurinucléées de forme polygonale dont la longueur peut atteindre plusieurs centimètres. Leurs noyaux sont situés en périphérie de la fibre, au niveau du sarcolemme (membrane cytoplasmique de la fibre musculaire). Le cytoplasme de la fibre musculaire est appelé sarcoplasme et contient les organites nécessaires à son fonctionnement, notamment les myofibrilles (éléments contractiles de la fibre musculaire) et les mitochondries (Figure 2). Selon les fibres, le sarcoplasme contient également des réserves plus ou moins importantes de glycogène et myoglobine.

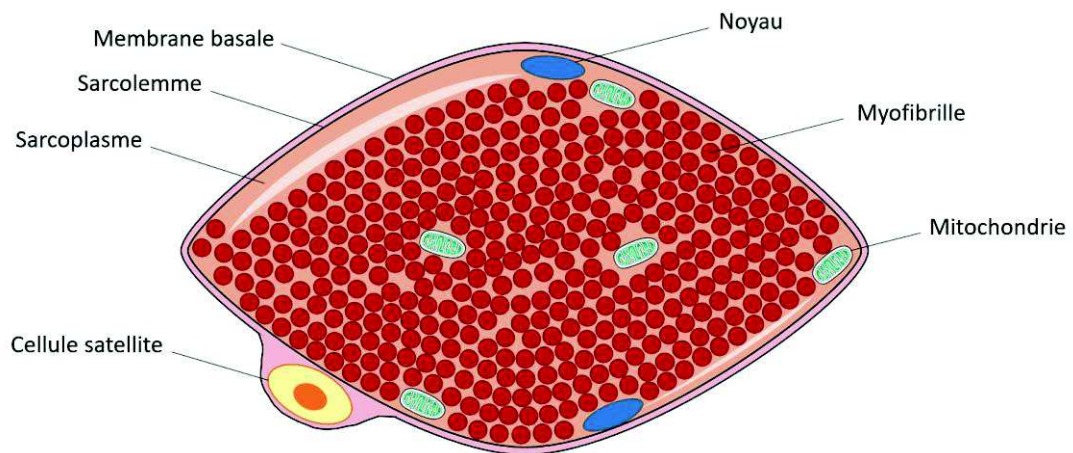


Figure 2. Composition d'une fibre musculaire.

Chaque fibre musculaire comporte plusieurs noyaux (cellule plurinucléée), ainsi qu'une ou plusieurs cellule(s) satellite(s). Elles comportent des mitochondries et une multitude de myofibrilles au sein de leur sarcoplasme, le tout étant contenu par le sarcolemme.

1.1.2. Les différents types de fibres musculaires

D'aspect homogène lors d'une coloration par hématoxyline-éosine (HE), le muscle est en réalité composé de fibres hétérogènes sur le plan histologique et fonctionnel. Ainsi, il existe 3 types de fibres musculaires, classées selon leur composition en myosine, leur capacité à métaboliser l'ATP (adénosine triphosphate) et leurs propriétés contractiles (Figure 3).

Ainsi, on peut distinguer :

- ❖ Fibres de type I : fibres de petite taille et très vascularisées. Ce sont des fibres oxydatives (génèrent de l'énergie sous forme d'ATP par une voie de synthèse aérobie) qui contiennent beaucoup de mitochondries et peu de glycogène. Elles produisent une contraction lente (due à la forme lente de myosine) et sont résistantes à la fatigue. Elles sont notamment impliquées dans le maintien des postures.

- ❖ Fibres de type IIA : fibres de plus grande taille, elles sont de type oxydatif et à vitesse de contraction intermédiaire. Elles sont résistantes à la fatigue.
- ❖ Fibres de type IIB : fibres glycolytiques (peu de mitochondries et riches en glycogène) à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Elles sont utilisées lors d'efforts brefs mais intenses (Choi and Kim, 2009).

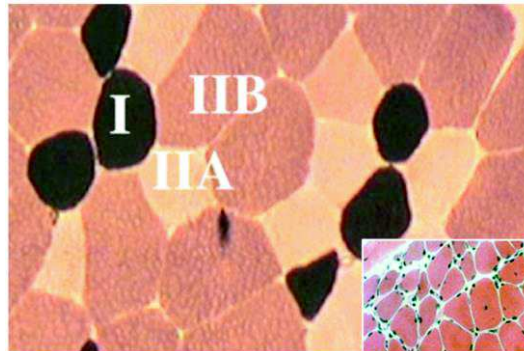


Figure 3. Analyse histologique des types de fibres sur coupe musculaire transversale.

Immunomarquage des types de fibres par technique ATPasique après incubation acide (pH 4,6). Les fibres de type I sont colorées en noir, les fibres de type IIA sont blanches et les fibres de type IIB en rouge pâle. L'encart montre l'aspect homogène des fibres en HE. Adapté de Choi et Kim, 2009.

De nombreux paramètres peuvent influencer cette composition en types de fibres et notamment le sexe, l'âge et l'activité physique.

1.2. Régénération du muscle

En cas de lésion musculaire, les acteurs cellulaires principaux permettant la régénération tissulaire sont les cellules satellites (progéniteurs musculaires), résidant sous forme quiescente à la surface des fibres musculaires. Une fois ces cellules activées, elles peuvent se différencier en myoblastes, cellules précurseurs fusiformes possédant un noyau unique. Lorsque plusieurs myoblastes fusionnent, leurs noyaux vont s'aligner en une chaîne centrale, les myofilaments se situent en périphérie, le tout formant un myotube (Figure 4). Enfin, les myotubes vont se différencier en fibres musculaires : les noyaux prennent alors leur position finale périphérique et les myofilaments sont localisés au centre de la fibre.

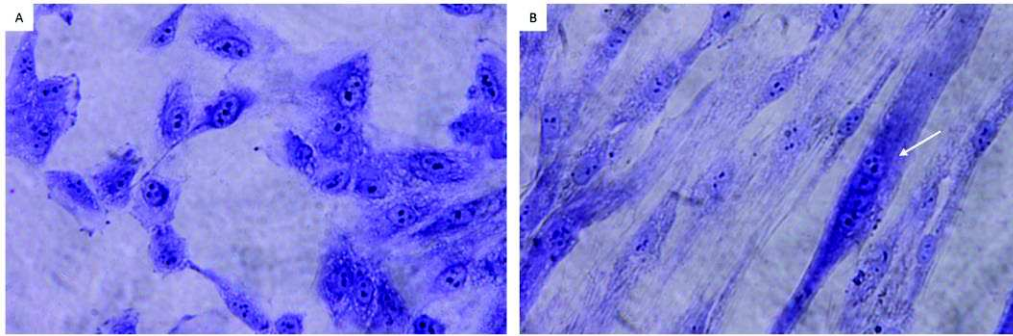


Figure 4. Différenciation de myoblastes en myotubes.

(A) Myoblastes en culture. (B) Formation d'un myotube (flèche) après ajout de facteurs de différenciation (EGF, *epidermal growth factor* ; triiodothyronine et insuline) et 7 jours de culture. On observe l'alignement de plusieurs noyaux après fusion de 4 myoblastes. Coloration au Giemsa, x 400.

Le muscle formé chez un individu (enfant ou adulte) possède une capacité de régénération remarquable pour répondre aux multiples micro-lésions qu'il subit au quotidien, mais également lors de lésions plus importantes (effort intense, choc, traumatisme). Ce processus de régénération se déroule en suivant 2 étapes successives : une phase de dégradation et une phase de régénération. La coordination de ces 2 phases ainsi que la balance entre facteurs pro- et anti-inflammatoires sont d'une importance cruciale pour la résorption de la lésion impliquant un remplacement des fibres endommagées et une reconstitution fonctionnelle du muscle. Dans le cas où la régénération n'est pas optimale, la lésion laissera place à un tissu cicatriciel et une fibrose (Chargé and Rudnicki, 2004; Karalaki et al., 2009).

1.2.1. Phase dégénérative : nécrose et inflammation

La première étape dans la régénération musculaire consiste en la nécrose des fibres endommagées ainsi qu'en l'activation d'une réponse inflammatoire. La nécrose des fibres musculaires, généralement induite par la rupture du sarcolemme, entraîne une perméabilité accrue de la fibre. Cette rupture de la fibre est d'ailleurs généralement reflétée par une augmentation sérique des enzymes musculaires, qui sont relarguées de la fibre musculaire vers le compartiment extracellulaire et notamment sérique.

Les molécules libérées par les fibres en nécrose permettent d'activer les cellules immunitaires résidentes du muscle qui, à leur tour, vont libérer des facteurs chimiotactiques pour recruter les cellules circulantes. Durant la phase inflammatoire précoce (1 à 6h après la lésion) ce sont tout d'abord les polynucléaires neutrophiles (PNN) qui envahissent le tissu lésé, suivi

(environ 48h après la lésion) par les macrophages qui deviennent alors la population prédominante (Fielding et al., 1993; Orimo et al., 1991). Les macrophages ont alors pour rôle de phagocyter les débris cellulaires mais jouent également un rôle dans l'activation des cellules myogéniques, notamment des cellules satellites (Karalaki et al., 2009; Merly et al., 1999; Robertson et al., 1993). Les macrophages ont une fonction essentielle dans la régénération musculaire puisque leur déplétion spécifique dans le muscle nuit à la différenciation et/ou la croissance des cellules musculaires (Arnold et al., 2007).

1.2.2. Phase régénérative : rôle des cellules satellites

La phase dégénérative est rapidement suivie par l'activation des cellules satellites et repose sur l'expression de gènes impliqués dans la formation embryonnaire du muscle.

Les cellules satellites constituent une population de cellules souches engagées dans la lignée myogénique et qui, à leur état basal, résident sous forme quiescente entre la membrane basale et le sarcolemme de fibres musculaires totalement différenciées. Elles peuvent être stimulées lors d'une lésion musculaire, les amenant à un état de prolifération. Parmi les cellules filles, certaines continuent à se différencier en myotubes puis en fibres musculaires, alors que d'autres redeviennent quiescentes à la surface d'une nouvelle fibre musculaire, pour reconstituer une réserve de cellules satellites. Cependant, avec l'âge cette réserve s'appauvrit. Ce phénomène a récemment été expliqué par Bigot et coll., qui ont montré que l'hyperméthylation physiologique de l'ADN qui apparaît avec l'âge est responsable de la répression de *SPRY1*, gène régulateur du phénomène de quiescence (Bigot et al., 2015).

Tout au long de la différenciation des cellules satellites en myotubes puis en fibres musculaires, chaque cellule exprime différents facteurs de transcription nécessaires à son développement et conditionnant son devenir (Figure 5). Parmi ces facteurs, notons PAX7 (*paired box 7*, exprimé par les cellules peu différenciées, nécessaire à l'auto-renouvellement), MYOD (*myogenic differentiation*, conditionnant la différenciation des cellules satellites en myotubes), MYOG (*myogenin*, facteur tardif contrôlant l'expression des gènes nécessaires à la différenciation finale des myotubes en fibres musculaires) et MYF5 (*myogenic factor 5*). Les cellules satellites peuvent également fusionner avec les fibres endommagées. Les petites fibres nouvellement formées présentent certaines caractéristiques histologiques, telles que la centralisation des noyaux due à l'alignement des noyaux après fusion des précurseurs, ainsi qu'un aspect basophile en raison d'une synthèse protéique intense (Figure 6). Lorsque ces fibres grossissent, leurs noyaux

migrent vers leur position périphérique finale (Chargé and Rudnicki, 2004; Karalaki et al., 2009; Tidball, 2017; Yin et al., 2013; Zammit et al., 2006).

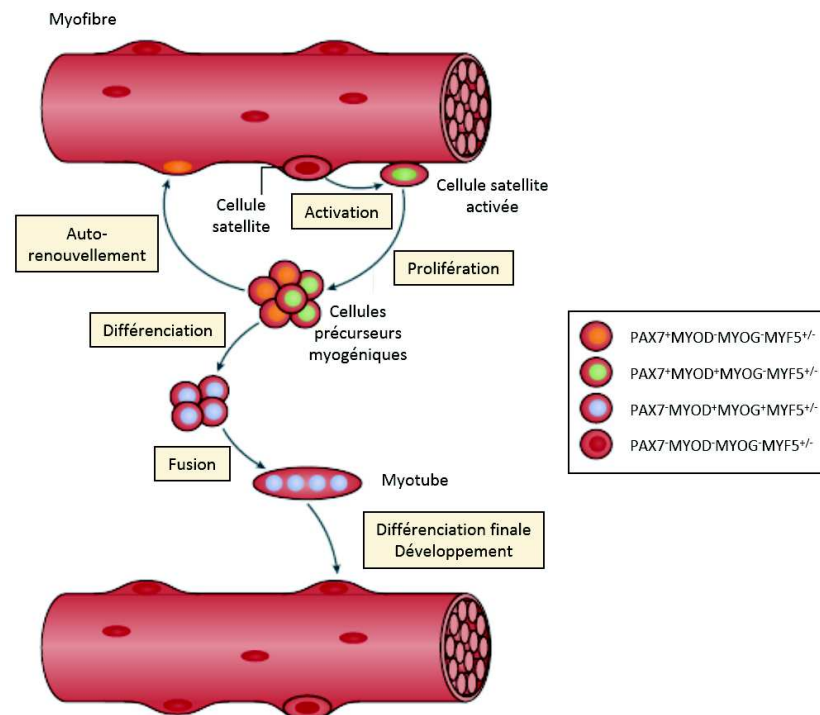


Figure 5. Différenciation des cellules satellites lors de la régénération musculaire.

Les **cellules satellites** quiescentes sont situées à la surface de myofibres totalement différenciés et expriment PAX7, parfois MYF5 mais pas MYOD et MYOG (PAX7⁺MYOD⁻MYOG⁻MYF5^{+/-}). Après activation (lésion, exercice, ou autre), la cellule satellite entre dans un cycle cellulaire pour donner des cellules filles après plusieurs mitoses. Tandis que certaines cellules retourneront au stade quiescent, la plupart des cellules filles exprimeront MYOD et continueront à se différencier. Lorsque les cellules se différencient, elles perdent peu à peu leur capacité d'auto-renouvellement, perdent l'expression de PAX7 (PAX7⁺MYOD⁺MYOG⁻MYF5^{+/-}) et acquièrent par la suite l'expression de MYOG nécessaire à leurs différenciation et survie. Les cellules PAX7⁺MYOD⁺MYOG⁺MYF5^{+/-} peuvent fusionner entre elles pour former les **myotubes** plurinucléés. Les myotubes croissent rapidement et expriment alors les gènes nécessaires à leur différenciation finale sous le contrôle de MYOG formant alors une nouvelle **myofibre**. Adapté de Tidball, 2017.

Il faut cependant noter que les cellules satellites ne constituent pas la seule source de précurseurs myogéniques. En effet, même si elles sont moins décrites que les cellules satellites, certaines cellules souches dérivées de la moelle osseuse possèdent une certaine capacité de différenciation en cellules musculaires *in vitro*. Corbel et coll. ont montré par greffe de cellules souches hématopoïétiques (GFP⁺) à des souris receveuses irradiées que ces cellules peuvent participer à la régénération musculaire *in vivo* (Corbel et al., 2003; Karalaki et al., 2009).

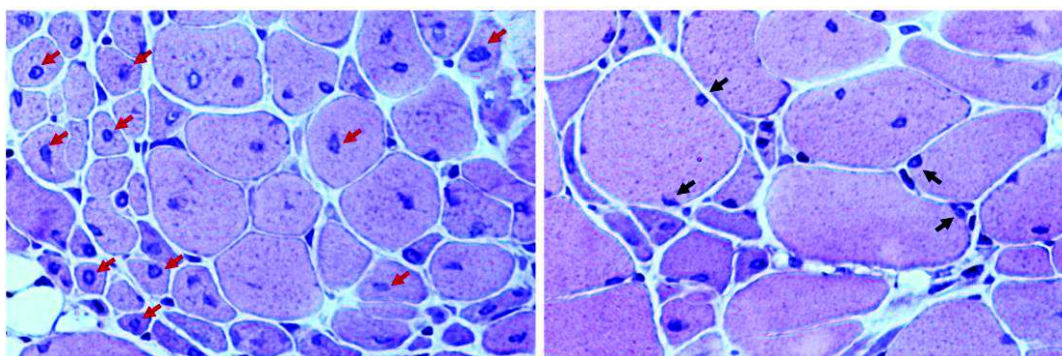


Figure 6. Centralisation des noyaux dans les fibres en régénération.

Lors de la régénération musculaire, les petites fibres nouvellement formées à partir de myotubes présentent un aspect plus basophile et des noyaux centralisés (flèches rouges). Lorsque ces fibres grossissent, l'abondance des myofibrilles en leur centre repoussent les noyaux vers leur position périphérique finale (flèches noires).

1.3. Muscle inflammatoire

1.3.1. Rôle des cellules de l'immunité innée

Durant la phase précoce inflammatoire de la régénération musculaire, le nombre de leucocytes intramusculaires augmente très rapidement. Ce sont d'abord les PNN qui envahissent le tissu musculaire, attirés par la sécrétion de molécules chimio-attractantes (CXCL1, *CXC-chemokine ligand 1* ; et CCL2, *CC-chemokine ligand 2*) par les macrophages résidents. Suite à l'invasion des PNN, les monocytes et macrophages circulants vont infiltrer le muscle après extravasation. Dans le même temps, le muscle lésé s'enrichit en cytokines pro-inflammatoires, principalement IL-1 β , facteur de nécrose tumorale α (TNF, *tumor necrosis factor*) mais également en interféron- γ (IFN- γ) qui semble, à ce stade, être sécrété par différents types cellulaires dont les cellules NK (Arnold et al., 2007; Cheng et al., 2008; Collins and Grounds, 2001; Warren et al., 2002). Ces cytokines vont à leur tour activer les macrophages M1 (macrophages pro-inflammatoires). Cette phase d'inflammation aiguë permet d'enclencher la phase de régénération par activation des cellules satellites (Cheng et al., 2008; Tidball, 2017).

Dans le phénomène de régénération musculaire physiologique, une phase anti-inflammatoire succède à cette phase d'inflammation aiguë, impliquant notamment une sécrétion importante d'IL-10 accompagnant la transition des macrophages M1 (pro-inflammatoire) vers un phénotype M2 (anti-inflammatoire) (Deng et al., 2012; Villalta et al., 2011a), sécrétant à leur tour des cytokines anti-inflammatoires, IL-10 et TGF- β (*transforming growth factor β*). Cette phase anti-inflammatoire a donc pour but de mettre fin à la phase d'inflammation aiguë et permettre ainsi la finalisation de la régénération musculaire. Dans ce contexte, les cellules satellites peuvent se différencier, fusionner pour former des myotubes puis

de nouvelles fibres musculaires. Horsley et coll. ont montré que la présence d'IL-4 est alors indispensable. En effet, l'IL-4 est sécrété par les myotubes récemment formés et se lie à son récepteur exprimé par les myoblastes, induisant la fusion des myoblastes aux myotubes pour permettre leur croissance (Horsley et al., 2003).

Finalement, la phase inflammatoire aigüe permet l'activation et la prolifération des cellules satellites, tandis que la phase anti-inflammatoire qui lui succède permet la différenciation et la croissance des fibres musculaires (Arnold et al., 2007; Kharraz et al., 2013; Tidball, 2017).

1.3.2. Rôle des cellules de l'immunité adaptative

Lors de la phase précoce de régénération musculaire, les L_T $CD4^+$ et $CD8^+$ infiltrent le muscle de façon importante, mais n'ont pas été étudiés de façon extensive. Les lymphocytes semblent néanmoins jouer un rôle important dans l'activation des cellules satellites *via* leur sécrétome. En effet, Al-Dabbagh et coll. ont montré, après avoir activé *in vitro* les lymphocytes provenant du sang total de donneurs volontaires jeunes, que les facteurs sécrétés par ces cellules favorisent la prolifération et la migration de cellules musculaires C2C12 en culture. Ils démontrent au cours de ces expériences que le sécrétome des lymphocytes provenant de donneurs jeunes (18-24 ans) promeut bien plus la prolifération et migration des cellules musculaires que celui provenant de donneurs âgés (78-85 ans) (Al-Dabbagh et al., 2015).

Au cours de la régénération musculaire, nous avons vu qu'une phase anti-inflammatoire suit la phase pro-inflammatoire. Elle implique alors ici de façon importante les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui s'accumulent dans le muscle suivant une cinétique semblable à celles des macrophages M2 (Figure 7). Il a été démontré qu'ils sont les acteurs majeurs de la potentialisation de la régénération musculaire. En effet, la déplétion des Treg pendant un phénomène de régénération musculaire entraîne un allongement de la phase inflammatoire par inhibition de la transition du phénotype macrophagique M1 vers M2 et perturbe l'expression des facteurs de transcription myogéniques. De plus, leur sécrétion d'IL-10, d'IL-33 et d'amphiréguline est importante pour la régénération musculaire *via* une action directe sur les cellules satellites (Burzyn et al., 2013; Kuswanto et al., 2016). Il est désormais admis que les Treg peuvent avoir un caractère tissulaire dans le tissu adipeux abdominal, la lamina propria colique et le muscle squelettique (Panduro et al., 2016). De façon intéressante, le séquençage des TCR (*T cell receptor*) des Treg musculaires est en faveur d'un répertoire oligoclonal associé à une spécificité antigénique identique chez plusieurs souris. Ces résultats, non retrouvés dans d'autres organes comme la rate, ouvrent l'hypothèse de l'existence de Treg musculaires mémoires qui seraient

capables de réguler les réponses immunitaires dirigées contre des aAg locaux régulièrement rencontrés lors de lésions musculaires (Burzyn et al., 2013; Panduro et al., 2016; Tidball, 2017).

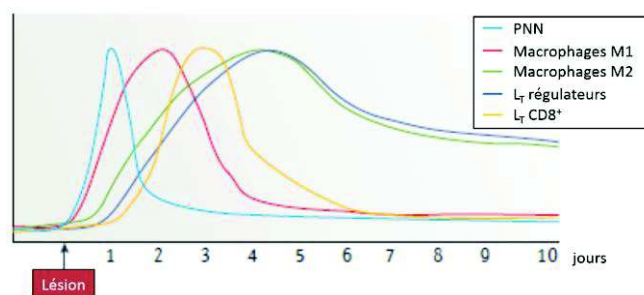


Figure 7. Cinétique d'apparition des cellules immunitaires lors de la régénération musculaire.

Transition d'une réponse précoce pro-inflammatoire impliquant les PNN, les macrophages M1 et les L_T CD8⁺ à une réponse anti-inflammatoire grâce aux macrophages M2 et L_T régulateurs. Adapté de Tidball, 2017.

1.3.3. Muscle inflammatoire et molécules de costimulation

Malgré cette capacité remarquable que possède le muscle pour la régénération, l'activation continue des cellules immunitaires, notamment des macrophages M1, peut entraîner une persistance de la phase inflammatoire associée ou non à une fibrose progressive : c'est le cas des MI.

A l'état physiologique et contrairement à la grande majorité des cellules de l'organisme, les fibres musculaires n'expriment pas à un niveau détectable les molécules du CMH-I. Cependant, lors de leur stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, et particulièrement l'IFN- γ , les fibres musculaires peuvent exprimer le CMH-I au niveau sarcolemmal (Nagaraju et al., 1998). Il s'agit d'un critère anatomopathologique des MI. Il faut cependant noter que l'expression du CMH-I peut être retrouvée lors de la biopsie musculaire chez des patients atteints d'autres maladies musculaires telles que la dystrophie. L'expression du CMH-II quant à elle peut avoir un aspect variable mais semble être un marqueur spécifique des MI (Aouizerate et al., 2014; Englund et al., 2001). De la même façon, les fibres musculaires n'expriment pas le CMH-II dans leur état sain ; mais il a été démontré *in vitro* qu'elles peuvent l'exprimer suite à une activation cytokinique, surtout par IFN- γ (Nagaraju et al., 1998). Lors de leurs expériences sur myoblastes cultivés *in vitro*, Goebels et coll. montrent que les cellules traitées par IFN- γ expriment à la fois le CMH-I et le CMH-II, qu'elles sont ainsi capables de présenter un Ag *via* le CMH-II pour induire une prolifération Ag-spécifique des L_T CD4⁺. Ces données ouvrent la voie aux hypothèses selon lesquelles les fibres musculaires peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'Ag (CPA) (Goebels et al., 1992).

C'est dans cette optique que les molécules de costimulation, que nous détaillerons dans le chapitre 4, ont été recherchées dans le muscle de patients atteints de MI par les équipes de Dalakas et de Nagaraju en 1999, puis par d'autres. Il a ainsi été montré de façon progressive que, en condition inflammatoire, les fibres musculaires sont capables d'exprimer des molécules de costimulation habituellement exprimées par les CPA (Tableau 1), tandis que leurs partenaires sont plutôt exprimés par les L_T infiltrants le muscle (Murata and Dalakas, 1999; Nagaraju et al., 1999; Schmidt, 2004; Sugiura et al., 2000; Waschbisch et al., 2008; Wiendl et al., 2003a, 2003b). Il faut noter également la présence de molécules de co-inhibition telles que CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*), PD-L1 (*ligand of programmed cell death 1*) et CD276. Des expériences de culture *in vitro* de myoblastes confirmeront que l'expression de ces voies de costimulation peut être induite par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires dans le microenvironnement cellulaire.

Tableau 1. Molécules de costimulation et co-inhibition exprimées dans le muscle de patients atteints de myopathies inflammatoires.

Fibre musculaire	Cellules immunitaires infiltrantes	Pathologie étudiée	Technique utilisée	Référence
CD80 (= BB-1)	CD28 CTLA-4	Polymyosite Myosite à inclusions	Histologie RT-PCR (sur biopsie)	Murata and Dalakas, 1999
(CD28)	CTLA-4 CD86 (CD40)	Polymyosite Dermatomyosite	Histologie Culture <i>in vitro</i> (FACS)	Nagaraju et al., 1999
CD40	CD40L (sur L _T CD4 ⁺)	Polymyosite Dermatomyosite	Histologie Culture <i>in vitro</i> (FACS)	Sugiura et al., 2000
ICOSL	ICOS (sur L _T)	Polymyosite	Histologie Culture <i>in vitro</i> (FACS+RT-PCR)	Wiendl et al., 2003a
ICOSL	ICOS (sur L _T CD8 ⁺)	Polymyosite	Histologie RT-PCR (sur biopsie)	Schmidt, 2004
PD-L1		Polymyosite	Histologie Culture <i>in vitro</i> (FACS+RT-PCR)	Wiendl et al., 2003b
B7-H3 (CD276)		Polymyosite Dermatomyosite Myosite à inclusions	Histologie Culture <i>in vitro</i> (FACS)	Waschbisch et al., 2008

Concernant plus particulièrement l'implication de la voie ICOS/ICOSL, l'expression de ICOSL a été mise en évidence à la surface des fibres musculaires de patients atteints de polymyosite (PM), de dermatomyosite (DM) et de myosite à inclusions (IBM) (Figure 8 A-C), et plus particulièrement au niveau des zones de contact entre les fibres musculaires et les cellules inflammatoires exprimant ICOS. *In vitro*, cette expression est induite par le TNF- α mais pas l'IFN- γ . Dans ce contexte de co-expression du CMH-II et de ICOSL par les fibres musculaires, les L_T CD4⁺ peuvent produire de l'IFN- γ (lymphocytes T *helper* 1, Th1) et de l'IL-4 (lymphocytes T *helper* 2, Th2) (Wiendl et al., 2003b). En conditions inflammatoires, les fibres musculaires expriment également le CMH-I et les L_T CD8⁺ infiltrants expriment ICOS pour 5 à 10% d'entre eux (Figure 8 D). Dans le muscle de patients atteints d'IBM, il a ainsi été montré que la grande majorité des

L_T $CD8^+$ $ICOS^+$ possèdent des granules de perforine (Figure 8 E-G) orientés vers les fibres musculaires, expliquant alors une partie de la physiopathologie de ces MI (Schmidt et al., 2004).

Ces résultats seront renforcés par une étude thérapeutique expérimentale chez le rat. Dans un modèle d'immunisation contre la protéine C, le blocage de ICOS par un Ac monoclonal (AcM) anti-ICOS réduit l'incidence et la sévérité de l'EAM, comme l'illustrent les nombres réduits de cellules myéloïdes et de L_T $CD8^+$ infiltrants, et les taux diminués d'immunoglobulines (Ig)G anti-protéine C (Katsumata et al., 2007a).

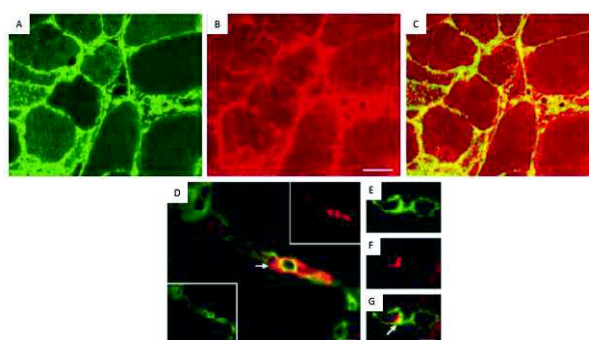


Figure 8. Analyse histologique de ICOS/ICOSL dans un muscle de patient atteint de myosite à inclusions. (A-C) Double immunomarquage du CMH-I (vert, A) et de ICOSL (rouge, B) montrant une colocalisation (jaune, C) à la surface des fibres. (D) Double immunomarquage de ICOS (rouge, encart en haut à droite) et du CD8 (vert, encart en bas à gauche). La flèche indique la colocalisation (jaune) de CD8 et ICOS sur 1 des L_T $CD8^+$ sur 9. (E-G) Double immunomarquage du CD8 (vert, E) et de la perforine (rouge, F) et leur colocalisation (jaune pointé par la flèche, G). Adapté de Schmidt et coll., 2004.

Il semblerait donc que les voies de costimulation, dont la voie ICOS/ICOSL, jouent un rôle dans la physiopathologie des MI (Figure 9) et notamment dans l'entretien de la maladie. Celui-ci reste cependant à être élucidé.

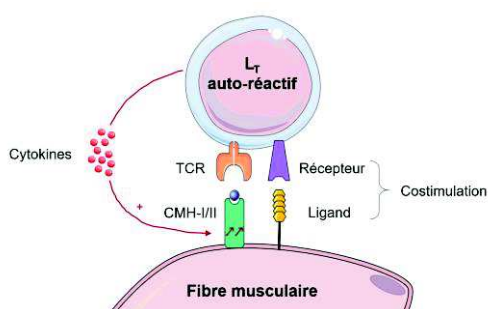


Figure 9. Rôle supposé des molécules de costimulation dans l'entretien des MI.

En condition inflammatoire, la fibre musculaire exprime les molécules du CMH-I et CMH-II ainsi que certains ligands des voies de costimulation. Ainsi, les L_T auto-réactifs ($CD8^+$ ou $CD4^+$) peuvent reconnaître un aAg présenté par une molécule de CMH (I ou II respectivement) à la surface de la fibre musculaire (signal 1) mais également reconnaître les molécules de costimulation exprimées par les fibres musculaires *via* leur récepteur spécifique (signal 2). Suite à son activation, le L_T auto-réactif produit des cytokines qui a leur tour favorisent l'expression des molécules de CMH par les fibres musculaires, créant ainsi une boucle d'amplification de l'inflammation musculaire.

2. Les myopathies inflammatoires : un ensemble complexe d'entités hétérogènes

Les myopathies inflammatoires (MI) ou myosites sont des maladies acquises touchant le muscle squelettique avec une topographie principalement proximale. Il s'agit d'un groupe hétérogène de pathologies caractérisé par des signes cliniques d'apparition subaigüe le plus souvent, comprenant une faiblesse musculaire chronique et symétrique ainsi qu'une faible endurance musculaire. Les manifestations cliniques impactent de façon importante la vie quotidienne des patients avec généralement des difficultés à se relever d'une position assise, monter des marches, se coiffer et soulever des objets (Dalakas and Hohlfeld, 2003). Les signes généraux non spécifiques peuvent comprendre de la fièvre, des malaises, une perte de poids et des arthralgies. Malgré le tropisme musculaire de la maladie, les patients présentent souvent des manifestations extra-musculaires associées, en particulier pulmonaire sous forme de pneumopathie interstitielle diffuse (PID) qui en fait la gravité (Allenbach et al., 2017; Lundberg et al., 2016).

Biologiquement, on observe une augmentation du taux de créatine phosphokinase (CPK) sérique plus ou moins importante selon l'entité considérée. On peut également observer une augmentation des taux d'aldolase, de transaminases et de lactate déshydrogénase (LDH) même si elles sont moins spécifiques. Le diagnostic de certitude est aujourd'hui encore apporté par l'analyse histopathologique d'une biopsie musculaire, rapportant un infiltrat de cellules mononucléées dans la grande majorité des cas (Hoogendijk et al., 2004). En raison de l'hétérogénéité de l'atteinte musculaire, il est important de biopsier le tissu musculaire dans une zone active de la maladie pour limiter le nombre de biopsies faussement négatives (Chahin and Engel, 2008). Dans ce contexte, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est parfois utilisée pour guider la biopsie puisque les images pondérées en séquence T1 permettent de visualiser les lésions atrophiques et la dégénérescence graisseuse (Morrow et al., 2016; Pinal-Fernandez et al., 2017) tandis qu'en T2, elles détectent l'œdème et pourraient informer sur l'activité de la maladie par détection des infiltrats inflammatoires. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude systématique dans le temps et chez la même personne évaluant l'exactitude des observations à l'IRM en comparaison aux lésions histologiques. L'électromyogramme (EMG) permet de confirmer le caractère myogène des anomalies électrophysiologiques et d'exclure une neuropathie ou une myopathie cortisonique (Dalakas and Hohlfeld, 2003).

Le diagnostic des MI a longtemps reposé sur la classification établie par Bohan et Peter en 1975, distinguant simplement les dermatomyosites (DM) des polymyosites (PM) grâce à des critères cliniques, électromyographiques et histopathologiques (Bohan and Peter, 1975a, 1975b). En 1991, les myosites à inclusions (IBM) et les myosites de chevauchement ont été ajoutées à la classification mais ne sont alors que sommairement détaillées (Dalakas, 1991). La même année, il a été montré que les auto-anticorps (aAc) associés aux MI permettent de déterminer des groupes de patients homogènes (Love et al., 1991). Par la suite, Griggs et coll. ont établi les critères diagnostiques des IBM ainsi que leurs caractéristiques anatomopathologiques, en marge des autres MI (Griggs et al., 1995; Tawil and Griggs, 2002). Lors de la 119^{ème} réunion des experts européens des MI (ENMC) en 2004, les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) ont été introduites dans la classification (Hoogendijk et al., 2004). Enfin, les myosites de chevauchement (MC) ont été plus amplement caractérisées en 2005 (Trojanov et al., 2005). Ces derniers critères permettent alors de préciser le diagnostic pour beaucoup de patients jusqu'ici mal classifiés.

Aujourd'hui la classification des MI comprend donc :

- les dermatomyosites (DM),
- les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI),
- la myosite à inclusions (IBM, *inclusion body myositis*),
- les myosites de chevauchement (MC) dont le syndrome des anti-tRNA synthétases (SAS),
- la polymyosite (PM).

La classification des MI a été révolutionnée par l'identification d'anticorps spécifiques des myosites (MSA, *myositis-specific auto-antibodies*) et d'anticorps associés aux myosites (MAA, *myositis-associated auto-antibodies*) existants dans d'autres maladies auto-immunes (Betteridge and McHugh, 2016). Ces aAc, dont l'identification progressive au cours des dernières décennies, nous permettent d'ores et déjà d'appréhender leur utilité en termes de diagnostic mais également de pronostic de la maladie (Figure 10). En effet, l'association de certains de ces aAc à des manifestations cliniques particulières (cancer, PID, SAS, connectivite, dysphagie, calcinose) est frappante et permet une meilleure prise en charge des patients et aide à déterminer le pronostic. Les MSA/MAA pourraient donc jouer un rôle physiopathologique au-delà de leur simple caractère de biomarqueur. En plus de ceux présentés dans la Figure 10, il faut noter également la découverte d'un aAc non spécifique d'une catégorie de MI, mais semblant être associé à une atteinte musculaire importante : l'anti-FHL1 (Albrecht et al., 2015).

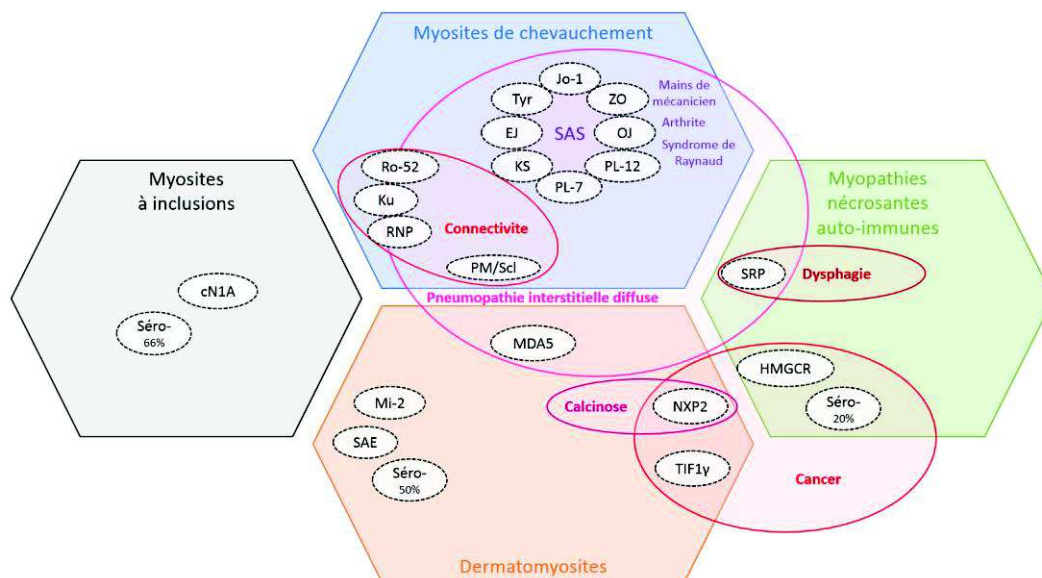


Figure 10. Cibles des auto-anticorps des myosites et leurs associations cliniques.

cN1A : *cytosolic 5'-nucleotidase 1A* ; EJ : *glycyl-tRNA synthétase* ; HMGR : *3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase* ; Jo-1 : *histidyl-tRNA synthétase* ; KS : *asparaginyl-tRNA synthétase* ; Ku, PM/Scl et Ro-52 : cibles des aAc dans la sclérodémie ; MDA5 : *melanoma differentiation-associated gene 5* ; Mi-2 : *nucleosome-remodelling deacetylase complex* ; NXP2 : *nuclear matrix protein 2* ; OJ : *isoleucyl-tRNA synthétase* ; PL-12 : *alanyl-tRNA synthétase* ; PL7 : *thréonyl-tRNA synthétase* ; RNP : *ribonucleic protein* ; SAE : *small ubiquitin-like modifier activating enzyme* ; SAS : *syndrome des anti-tRNA synthétases* ; SRP : *signal recognition particle* ; TIF1 : *transcription intermediary factor 1* ; Tyr : *tyrosyl-tRNA synthétase* ; ZO : *phénylalaninyl-tRNA synthétase*. Adapté de Benveniste et coll., 2016 et de Betteridge et McHugh, 2016.

Malgré les avancées récentes permises par ces MSA/MAA, le diagnostic de certitude est aujourd'hui encore apporté par l'analyse histologique d'une biopsie musculaire permettant d'identifier le caractère inflammatoire des lésions et d'éliminer une cause non auto-immune (génétique par exemple).

Les principales caractéristiques des différentes MI sont résumées dans le Tableau 2. Nous allons détailler par la suite ces caractéristiques pour chaque type de MI.

Tableau 2. Principales caractéristiques des différentes entités de myopathies inflammatoires.

	Dermatomyosites	Myopathies nécrosantes auto-immunes	Myosite à inclusions	Myosites de chevauchement	Polymyosite
Clinique	Faiblesse musculaire symétrique proximale Subaigüe Atteinte cutanée typique	Faiblesse musculaire +++ symétrique proximale Subaigüe Maladie potentiellement grave	Faiblesse musculaire progressive parfois asymétrique distale et proximale + doigts, pieds, face Atrophie musculaire Mauvaise réponse au ttt Evolution vers la chronicité	Faiblesse musculaire + signes d'une autre maladie systémique et/ou aAc chevauchant	Faiblesse musculaire symétrique proximale Subaigüe Diagnostic d'exclusion
aAc	Anti-Mi-2 Anti-TIF1γ Anti-MDA5 Anti-NXP2 Anti-SAE Séronégatifs : 50% environ	Anti-SRP Anti-HMGCR Séronégatifs : 20% environ	Anti-cN1A Séronégatifs : 65% environ	Anti-tRNA synthétase (anti-Jo-1++) Anti-PM/Scl Anti-RNP Anti-Ro-52 Anti-Ku	Séronégatifs : 100%
Histologie	Atrophie périfasciculaire Infiltrat périvasculaire, périmysial et périfasciculaire (L, Mono, Macro) Dépôts de complément (capillaires) Nécrose, myophagocytose Marquage CMH-I périfasciculaire	Fibres en nécroses envahies par des Macro Dépôts de complément (fibres et capillaires) Quelques cellules infiltrantes CMH-I inconstant	Vacuoles bordées Dépôts de prot. β-amyloïde Fibres <i>Ragged-Red</i> Fibres non nécrotiques envahies par L _T CD8+ CMH-I diffus	<u>SAS</u> : Nécrose périfasciculaire Myophagocytose Infiltrat périmysial endomysial (L _T , L _B , Macro) CMH-I diffus (périfasciculaire++)	Infiltrat endomysial (L _T CD8+) Envahissement de fibres non nécrotiques CMH-I diffus
IRM	Utilisation pour localiser les zones actives d'inflammation et guider la biopsie				

2.1. Dermatomyosites

La DM peut toucher les adultes ou les enfants (DM juvénile) et préférentiellement les femmes. Chez les enfants, la DM est la MI la plus fréquente. Il s'agit d'une interféronopathie acquise avec une composante microangiopathique et inflammatoire, touchant le muscle et la peau. Il existe une susceptibilité génétique à la DM juvénile qui est souvent associée au HLA DQA1 0501 (Dalakas and Hohlfeld, 2003).

2.1.1. Diagnostic clinique et biologique

❖ Signes cliniques :

Cliniquement, la DM est caractérisée par des signes cutanés précédant le plus souvent l'atteinte musculaire. Ces signes peuvent comprendre une coloration liliacée des paupières supérieures souvent associée à un œdème et des papules de Gottron (Figure 11). Un érythro-œdème photosensible et parfois prurigineux peut apparaître au niveau de la face, de la nuque, du buste ou du dos et des épaules, des genoux, des coudes ou des chevilles (Dalakas and Hohlfeld, 2003; Mammen, 2011).

L'atteinte musculaire repose sur une faiblesse musculaire symétrique, proximale et d'apparition subaigüe. Elle peut être d'intensité variable (modérée à sévère) allant jusqu'à la quadriparésie (Dalakas, 2015; Dalakas and Hohlfeld, 2003).



Figure 11. Papules de Gottron et rash héliotrope du visage.

Signes cutanés observés chez un enfant de 10 ans atteint de dermatomyosite juvénile. (A) Papules de Gottron sur les articulations métacarpo-phalangiennes et interphalangiennes. (B) Rash héliotrope du visage. D'après Garcia-Cruz et Garcia-Doval, 2010.

Les manifestations extra-musculaires sont plus fréquentes chez l'enfant que l'adulte. La DM peut être associée à une connectivite ($\pm$ syndrome de Raynaud), à la sclérodermie ou encore à des calcinose sous-cutanées (Allenbach et al., 2017) qui peuvent s'ulcérer et aboutir à des plaies infectées et douloureuses. Des manifestations cardiaques sont possibles notamment pour les patients atteints de DM aiguë avec des défauts de conduction atrio-ventriculaire, des tachyarythmies ou des myocardites (Dalakas and Hohlfeld, 2003).

La PID est la manifestation extra-musculaire entraînant le plus de complications et est plus particulièrement associée à la présence d'anti-MDA5 (Allenbach et al., 2017; Mammen, 2011).

Chez l'adulte, les DM à anti-NXP2 et anti-TIF1 γ sont fréquemment associées au cancer, avec des atteintes diverses : cancer ovarien, gastro-intestinal, pulmonaire, cancer du sein ou encore lymphome non-hodgkinien (Dalakas and Hohlfeld, 2003). Ce type de réponse auto-immune fait donc la gravité de la maladie.

❖ Signes biologiques :

Les enzymes musculaires sont élevées, notamment les CPK (> 50 fois la valeur haute de référence) qui ne reflètent cependant pas toujours l'activité de la DM (Dalakas, 2015; Dalakas and Hohlfeld, 2003).

Les aAc spécifiques retrouvés dans la DM sont :

- les anti-Mi2 : de bon pronostic (atteinte musculaire modérée, risque diminué de PID, moins d'association au cancer, meilleure réponse au traitement),
- les anti-MDA5 : de mauvais pronostic, risque accru de PID, d'atteinte cutanée importante (ulcères, mains de mécanicien, panniculites), d'arthrites ;
- les anti-NXP2 : risque accru de calcinose (chez l'enfant) et association au cancer chez l'adulte ;
- les anti-TIF1 γ : risque accru d'atteinte cutanée grave et, chez l'adulte uniquement, association au cancer ;
- les anti-SAE : association possible au risque de dysphagie (Allenbach et al., 2017; Betteridge and McHugh, 2016; Mammen, 2011).

2.1.2. Autres examens complémentaires

❖ Anatomopathologie :

Lors de l'analyse de la biopsie musculaire, il est retrouvé une atrophie périfasciculaire très évocatrice de la DM, mais d'importance variable. Elle semble être plus importante chez les enfants mais peut s'aggraver avec l'activité de la maladie. On retrouve un infiltrat inflammatoire périvasculaire, périmysial et périfasciculaire composé de lymphocytes, de monocytes et de macrophages, ainsi qu'un marquage du CMH-I à la surface des fibres périfasciculaires et des dépôts de complément au niveau du sarcolemme et des capillaires (Figure 12). Le nombre de capillaires est diminué et entraîne une hypoxie surtout dans la DM juvénile. Les signes de nécrose et myophagocytose sont peu fréquents (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015; Dalakas and Hohlfeld, 2003; Stenzel and Schoser, 2017).

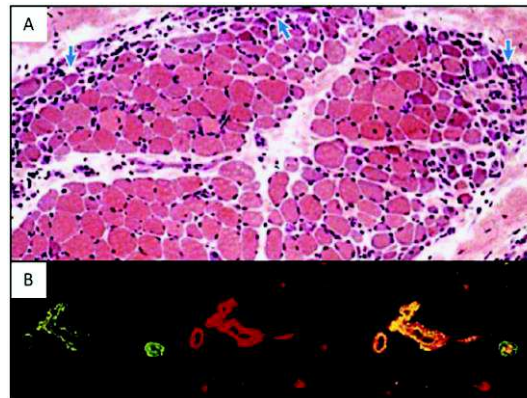


Figure 12. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de dermatomyosite.

(A) Coloration hématoxyline-éosine (H&E) montrant une atrophie périfasciculaire classique de dermatomyosite (flèches) et quelques cellules infiltrantes. (B) Dépôts de complément (complexe d'attaque membranaire, vert) au niveau des cellules endothéliales (rouge). Colocalisation en orange. Adapté de Dalakas, 2015.

❖ Imagerie :

Chez les patients atteints de DM, l'IRM montre chez environ 1/3 des patients une atteinte du quadriceps femoris, de l'ilio-psoas et du muscle pectiné (3 muscles de la cuisse) (Dalakas, 2015; Pipitone, 2016).

2.2. Myopathies nécrosantes auto-immunes

Les MNAI représentent une entité de MI décrite récemment puisqu'elles n'entreront dans la classification qu'en 2004 (Hoogendijk et al., 2004). Il s'agit cependant d'une maladie grave et qui constitue environ 20% des MI (van der Meulen et al., 2003; Simon et al., 2016). Elles peuvent apparaître à tout âge même si elles touchent principalement les adultes. D'apparition subaigüe (ou parfois aigüe), les MNAI sont associées à la présence d'aAc anti-SRP ou anti-HMGCR dans 80% des cas (Benveniste et al., 2016; Bergua et al., 2016; Dalakas, 2015).

2.2.1. Diagnostic clinique et biologique

❖ Signes cliniques :

Les MNAI sont caractérisées par une atteinte musculaire proximale et symétrique, touchant le muscle pelvien et la ceinture scapulaire et pouvant s'accompagner d'une perte de poids importante. La faiblesse musculaire est souvent très importante (surtout chez l'adulte) mais généralement peu douloureuse. Les MNAI peuvent également apparaître après la prise de statines (médicament hypocholestérolémiant). Dans ce cas, la maladie ne régresse pas à l'arrêt du traitement, contrairement aux myalgies iatrogènes d'origine toxique couramment observées avec ces traitements (Dalakas, 2015; Stenzel et al., 2012).

Les MNAI peuvent apparaître seules ou associées à des manifestations extra-musculaires diverses telles que dysphagie, dyspnée, PID ou syndrome de Raynaud. Des atteintes cardiaques ou pulmonaires peuvent également être retrouvées notamment en présence d'anti-SRP. Les MNAI peuvent également être associées à des cancers, touchant le plus souvent les appareils digestif et pulmonaire (Basharat and Christopher-Stine, 2015; Bergua et al., 2016; Dalakas, 2015; Stenzel et al., 2012).

❖ Signes biologiques :

Dans les MNAI, le taux de CPK est généralement très augmenté, souvent 50 fois supérieur à la valeur haute de référence dans les phases actives de la maladie.

Les aAc spécifiques retrouvés dans les MNAI sont les anti-SRP et les anti-HMGCR. Environ 20% des patients atteints de MNAI n'ont pas d'aAc identifié (MNAI séronégative). Il existe un faisceau d'arguments menant à penser que les anti-SRP et les anti-HMGCR sont directement pathogènes, ce qui a été montré *in vitro* sur le muscle (Arouche-Delaperche et al., 2017) et *in vivo*

chez la souris (Bergua et al., in preparation). Par rapport aux anti-HMGCR, les anti-SRP sont associés à de plus lourdes complications telles qu'une atteinte musculaire majeure, une dysphagie, une PID ou une atteinte cardiaque (Benveniste et al., 2016; Dalakas, 2015; Stenzel et al., 2012).

2.2.2. Autres examens complémentaires

❖ Anatomopathologie :

Au niveau histologique, le signe principal de MNAI est la présence de fibres en nécrose dispersées, cernées ou envahies par des macrophages et des dépôts de complexe d'attaque membranaire (composant terminal de la cascade du complément) sur les fibres, les petits vaisseaux et les capillaires. Ces dépôts peuvent parfois donner un aspect en « tuyau de pipe ». Le marquage sarcolemmal du CMH-I n'est pas constant (Figure 13). Elles ne présentent par contre pas de vacuoles ni de réel infiltrat inflammatoire mais parfois quelques cellules infiltrantes (macrophages, L_T $CD4^+$ ou $CD8^+$) dispersées ou au niveau périvasculaire (Dalakas, 2015; Hoogendijk et al., 2004; Stenzel et al., 2012).

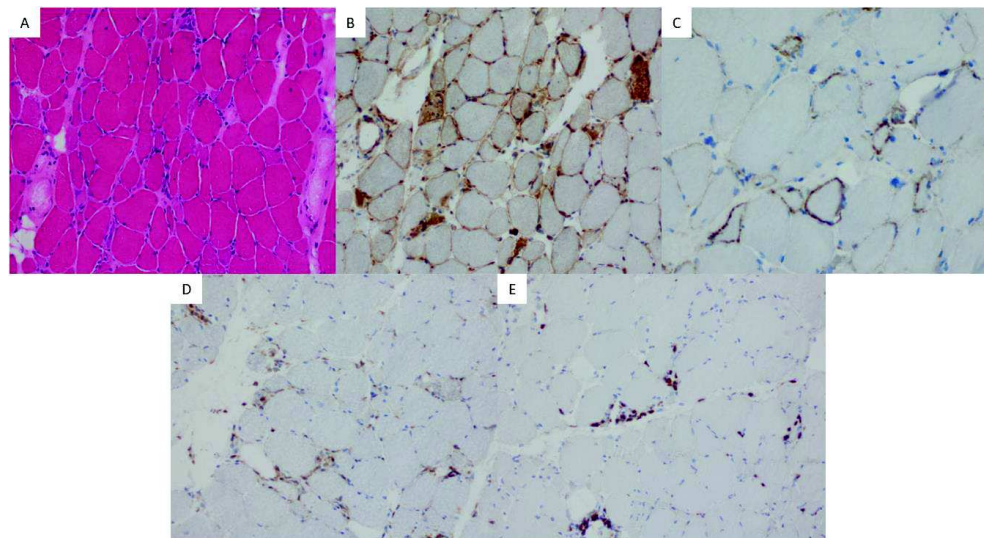


Figure 13. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de myopathie nécrosante auto-immune.

(A) Coloration H&E montrant des signes de nécrose et de régénération. Immunomarquage du CMH-I exprimé de façon variable sur différentes fibres (B), des dépôts de compléments (C5b9) au niveau du sarcolemme de plusieurs fibres (C), des macrophages $CD68^+$ (D) et des L_T $CD8^+$ (E). D'après Bergua et coll., 2016.

❖ Imagerie :

A l'IRM, les patients atteints de MNAI présentent souvent au niveau de la cuisse des signes d'œdème (non corrélés aux taux de CPK), d'atrophie et de dégénérescence graisseuse

(Dalakas, 2015; Pinal-Fernandez et al., 2017; Pipitone, 2016). Dans les MNAI, l'IRM est parfois utilisée de façon empirique pour rechercher des zones actives d'inflammation et guider la biopsie musculaire. Cependant, aucune étude n'a prouvé la corrélation entre les données générées par IRM et les atteintes histologiques observées à la biopsie.

2.3. Myosite à inclusions

L'IBM sporadique est la MI la plus fréquente chez les patients de plus de 50 ans (Dalakas, 2015). Elle est également plus fréquente chez les hommes. Le terme de myosite à inclusions est décrit en 1971 (Yunis and Samaha, 1971), mais il faudra attendre quelques années pour que la première description d'IBM en tant qu'entité distincte soit publiée. Il s'agit alors de 6 cas décrits, impliquant les muscles distaux, présentant une mauvaise réponse au traitement et caractérisés histologiquement par la présence de filaments anormaux et de vacuoles dans les fibres musculaires (Carpenter et al., 1978).

Il existe des formes familiales d'IBM, aussi appelées IBM héréditaires, présentant les mêmes caractéristiques que l'IBM sporadique, à l'exception du caractère inflammatoire de la maladie. L'aspect héréditaire de la forme familiale d'IBM a d'ailleurs été prouvé par identification de mutations dans le gène de l'UDP-N-acétylglucosamine-2-épimérase/N-acétylmannosamine kinase (GNE) en 2001 (Eisenberg et al., 2001). L'IBM héréditaire étant par conséquent une myopathie génétique et non auto-immune, nous ne considérerons dans ce travail que l'IBM sporadique.

Les critères diagnostiques de l'IBM sont déterminés en 1995 (Griggs et al., 1995).

2.3.1. Diagnostic clinique et biologique

❖ Signes cliniques :

L'IBM est une maladie d'apparition très progressive (> à 6 mois voire plusieurs années) touchant des patients de plus de 30 ans. La faiblesse musculaire est parfois asymétrique et peut toucher les muscles proximaux et distaux des bras et des jambes mais également les muscles fléchisseurs des doigts ou du poignet, les extenseurs des pieds. Il est également souvent observé une atrophie des avant-bras et des cuisses. La faiblesse musculaire touchant les cuisses, elle peut entraîner des chutes. Elle atteint couramment les muscles de la face chez les patients de plus de 50 ans et s'associe à une dysphagie dans 50% des cas. L'atteinte des muscles axiaux peut

entraîner une camptocormie (flexion antérieure du tronc) et une tête tombante. Cette MI est connue pour être de mauvaise réponse au traitement (Dalakas, 2015; Griggs et al., 1995).

❖ Signes biologiques :

Au cours des IBM, l'augmentation des taux de CPK est modérée et reste inférieure à 12 fois la valeur haute de référence.

La présence de l'aAc anti-cN1A est retrouvée chez 30-35% des patients atteints d'IBM et rarement dans les autres MI. Il s'agit du seul aAc identifié à ce jour dans les IBM. Cet aAc est peu spécifique puisqu'il peut également être retrouvé dans d'autres maladies auto-immunes (syndrome de Gougerot-Sjögren et lupus érythémateux systémique en particulier), d'où sa classification dans les MAA (Allenbach et al., 2017; Betteridge and McHugh, 2016; Dalakas, 2015; Griggs et al., 1995; Lundberg et al., 2016).

2.3.2. Autres examens complémentaires

❖ Anatomopathologie :

Au niveau histologique, l'inflammation retrouvée dans les IBM est caractérisée par une invasion de fibres non nécrotiques par des L_T CD8⁺ associée à une expression diffuse du CMH-I. La présence de fibres *ragged-red*, cytochrome oxydase (COX)-négatives, de dépôts amyloïdes intracellulaires ou de filaments anormaux dans les fibres est spécifique des IBM (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015; Griggs et al., 1995; Lundberg et al., 2016; Tawil and Griggs, 2002).

La caractéristique hitologique principale des IBM est la présence de vacuoles bordées dans les fibres (Figure 14), dans lesquelles est observée une accumulation de protéines habituellement décrites dans la maladie d'Alzheimer : protéine β -amyloïde, ainsi que son précurseur (β -APP), α 1-antichymotrypsine, protéine tau phosphorylée, apolipoprotéine E et ubiquitine. Cette caractéristique a amené plusieurs auteurs à étudier les similarités physiopathologiques entre l'IBM et la maladie d'Alzheimer (Askanas et al., 1994; Nagaraju and Plotz, 2002). Une distinction importante est que ces dépôts se font sous la forme de plaques membranaires dans la maladie d'Alzheimer, alors que l'on observe des dépôts intracellulaires dans l'IBM (Askanas et al., 1992). Il existe d'ailleurs un débat actuellement sur le caractère primitivement auto-immun ou dégénératif de l'IBM (Benveniste et al., 2015).

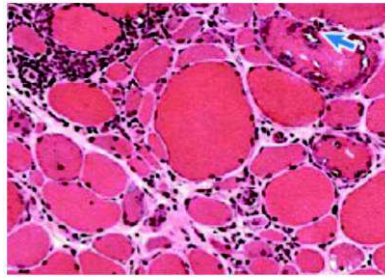


Figure 14. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de myosite à inclusions.

Coloration H&E montrant des foyers inflammatoires de lymphocytes envahissant ou entourant des fibres non nécrotiques. On peut également noter une hyperplasie du tissu conjonctif ainsi que la présence de fibres atrophiques ou hypertrophiques. La présence de vacuoles (flèche) est retrouvée dans des fibres non envahies. D'après Dalakas, 2015.

❖ Imagerie :

Dans l'IBM, l'IRM rapporte des atteintes sur certains muscles spécifiques de façon asymétrique, à l'instar de l'observation clinique. Il est retrouvé une atteinte musculaire pouvant se caractériser par des signes de dégénérescence graisseuse (inflammation chronique) ou des signes d'atrophie qui sont parfois difficiles à distinguer (Dalakas, 2015; Pipitone, 2016). L'IRM est parfois utilisée pour guider la biopsie sur des zones actives de la maladie, bien la corrélation IRM/histologie n'est pas été prouvée.

2.4. Myosites de chevauchement

D'après la définition de Troyanov et coll., les MC sont caractérisées par une myosite accompagnée d'au moins 1 autre signe clinique de maladie systémique et/ou d'au moins 1 aAc chevauchant. Sont considérés comme aAc chevauchants : les anti-tRNA synthétases (anti-Jo-1, -PL-7, -PL-12, -OJ, -EJ, -KS, -ZO, -Tyr) et les aAc associés aux maladies systémiques (dont les anti-RNP, -PM/Scl, -Ku) (Troyanov et al., 2005).

2.4.1. Diagnostic clinique et biologique

❖ Signes cliniques :

Cliniquement, les MC sont caractérisées par une atteinte musculaire chronique, telle qu'elle peut être retrouvée dans les autres MI, à laquelle s'ajoute au moins 1 atteinte extra-musculaire comme celles observées dans différentes maladies systémiques (en particulier lupus érythémateux systémique, sclérodermie systémique ou connectivites mixtes). Au sein des

myosites de chevauchement, on distingue les syndromes de chevauchement vrais, correspondant à l'association d'une maladie systémique clairement identifiée et d'une myosite ; et le SAS qui est une entité à part entière. Le SAS est la forme la plus fréquente de MC. Il est caractérisé sur le plan sérologique par la présence d'aAc anti-tRNA synthétases et sur le plan clinique, outre l'atteinte musculaire, par une atteinte articulaire (arthralgies le plus souvent), une PID, un syndrome de Raynaud et une atteinte cutanée à type de kératose fissuraire des mains dite « mains de mécanicien ». Des signes généraux peuvent être présents et en particulier une fièvre (Benveniste et al., 2016; Troyanov et al., 2005).

❖ Signes biologiques :

Comme pour les autres MI, une augmentation du taux de CPK est observée dans les MC, entre 5 et 50 fois la valeur haute de référence. Cependant, le taux de CPK peut être normal dans les formes chroniques et avancées de la maladie.

En ce qui concerne les syndromes de chevauchement vrais correspondant à l'association d'une maladie systémique et d'une myosite, les aAc retrouvés sont les anti-RNP en cas d'association avec un lupus érythémateux systémique ou une connectivite mixte, les anti-PM/Scl en cas d'association avec une sclérodermie systémique et les anti-Ku quelle que soit la maladie systémique associée.

Les anti-tRNA synthétases sont les aAc du SAS et leur découverte est d'ailleurs à l'origine de la description de ce cadre nosologique. Ils sont systématiquement retrouvés au cours de la maladie. Il en existe plusieurs correspondant chacun à une enzyme tRNA synthétase particulière spécifique d'un acide aminé. Le plus fréquent et le plus documenté est l'anti-Jo-1 (histidyl-tRNA synthétase), présent chez 30% des patients atteints de MI (Tableau 3). Les patients présentant des anti-Jo-1 ont le plus souvent une atteinte musculaire, des arthralgies importantes, une PID et une atteinte cutanée de type « mains de mécanicien ». Par ailleurs, le taux des anti-Jo-1 semble être corrélé au taux de CPK et à l'activité de la maladie. Le syndrome de Raynaud et une forme plus sévère de PID sont observés plus fréquemment chez les patients présentant des anti-PL-7 ou anti-PL-12, tandis que le rash cutané semble particulièrement associé aux anti-EJ, anti-PL-7 et anti-PL-12 (Allenbach et al., 2017; Benveniste et al., 2016; Betteridge and McHugh, 2016).

Tableau 3. Auto-anticorps du syndrome des anti-tRNA synthétases.

	Cible antigénique	Prévalence
anti-Jo-1	histidyl-tRNA synthétase	30%
anti-PL-7	thréonyl-tRNA synthétase	3-4%
anti-PL-12	alanyl-tRNA synthétase	
anti-OJ	isoleucyl-tRNA synthétase	< 2%
anti-EJ	glycyl-tRNA synthétase	
anti-KS	asparaginyln-tRNA synthétase	
anti-ZO	phénylalanine-tRNA synthétase	
anti-tyr	tyrosyl-tRNA synthétase	

Adapté de Benveniste et coll., 2016.

2.4.2. Autres examens complémentaires

❖ Anatomopathologie :

Histologiquement, le SAS est caractérisé par une atteinte périfasciculaire pouvant se rapprocher de celle de la DM. Cependant il a récemment été démontré que plusieurs caractéristiques permettent de les distinguer.

Dans le SAS, on retrouve au niveau périfasciculaire des fibres en nécrose (et non atrophiques comme dans les DM) associées à une myophagocytose et un marquage diffus du CMH-I avec renforcement dans ces zones (Figure 15). L'inflammation périmysiale et endomysiale est composée de L_T , L_B , plasmocytes et de très abondants macrophages (Allenbach et al., 2017; Benveniste et al., 2016; Mescam-Mancini et al., 2015). Des agrégats d'actine formant des bâtonnets au niveau du noyau des fibres peuvent être observés (Stenzel et al., 2015) ainsi qu'un marquage du CMH-II au niveau périfasciculaire non décrit dans les autres MI (Aouizerate et al., 2014).

Finalement, les patients atteints de SAS présentent donc des caractéristiques histologiques spécifiques les différenciant des autres MI (Allenbach et al., 2017; Benveniste et al., 2016).

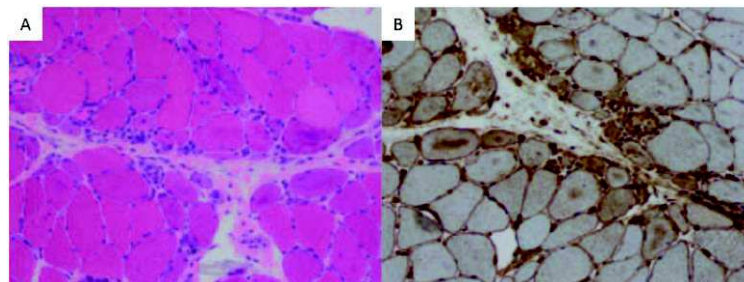


Figure 15. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de syndrome des anti-tRNA synthétases.

(A) Coloration H&E montrant des fibres en nécrose dans les régions périfasciculaires. (B) Immunomarquage du CMH-I au niveau des fibres périfasciculaires. Adapté de Benveniste et coll., 2016.

❖ Imagerie :

Au cours du SAS, des données récentes montrent que les patients présentent à l'IRM un œdème musculaire dans 38% des cas et une dégénérescence graisseuse dans 42% des cas. Ces données d'imagerie montrent également que l'œdème musculaire précède la dégénérescence graisseuse (Andersson et al., 2017).

2.5. Polymyosite

Comme nous allons le voir, la PM à proprement parler est finalement une entité rare et souvent diagnostiquée par excès. Certains experts ont même tendance à faire disparaître cette entité de leurs études (Mammen, 2011).

2.5.1. Diagnostic clinique et biologique

❖ Signes cliniques :

La PM est d'apparition subaigüe, caractérisée par une faiblesse musculaire proximale et symétrique et sans aucun signe cutané ni antécédent familiale de maladie neuromusculaire. Le diagnostic se fait après exclusion des autres causes possibles : myosites iatrogènes (pénicillamine, statines, anti-rétroviraux par exemple), myosites virales, dystrophies inflammatoires (dysferlinopathies par exemple), IBM, MNAI, MC, myopathies métaboliques ou encore fibromyalgie (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015).

L'établissement de critères diagnostiques précis ainsi que l'apport des nouveaux aAc et des techniques moléculaires et histologiques ont permis d'améliorer le diagnostic des patients et de montrer que la PM est finalement une entité rare dans laquelle beaucoup de patients ont été catégorisés en l'absence de critères assez précis (Allenbach et al., 2017; van der Meulen et al., 2003). Cette constatation fera d'ailleurs l'objet d'une publication par Amato et Griggs au titre frappant : « Licornes, dragons, polymyosite et autres créatures mythologiques » (Amato and Griggs, 2003).

Trojanov et coll. ont démontré la surestimation du nombre de PM en comparant dans une cohorte de 100 patients le diagnostic établi en suivant la classification de Bohan et Peter (1975) ou la classification clinico-sérologique qu'ils proposent en 2005 (Trojanov et al., 2005). Ils passent ainsi au sein de la même cohorte d'une incidence de 45 à 10% pour les PM (Tableau 4).

Tableau 4. Evolution de la classification des myopathies inflammatoires entre 1975 et 2005.

Classification	PM	DM	Myosite de chevauchement	Myosite associée au cancer	Total
Bohan & Peter (originale)	45	28	24	3	100
Classification clinico-sérologique	10	20	68	2	100

Adapté de Troyanov et coll., 2005.

❖ Signes biologiques :

Comme pour les autres MI, là aussi les taux de CPK sont augmentés. Cette augmentation peut être supérieure à 50 fois la valeur haute de référence lors de la phase aigüe initiale et peut ensuite se stabiliser aux alentours de 10 fois la normale (Dalakas, 2015).

2.5.2. Autres examens complémentaires

❖ Anatomopathologie :

L'analyse histologique des PM rapporte un infiltrat endomysial de L_T (CD8⁺) entourant ou envahissant des fibres non nécrotiques et une expression diffuse du CMH-I (Figure 16). Elle ne présente pas de vacuoles (Allenbach et al., 2017; Dalakas, 2015).

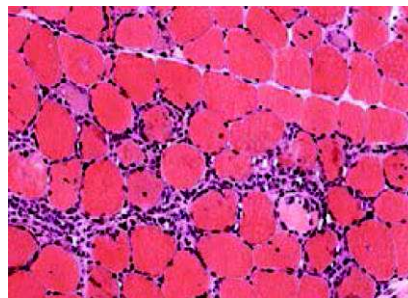


Figure 16. Aspect histologique d'un muscle de patient atteint de polymyosite.

Coloration H&E montrant un infiltrat inflammatoire endomysial de lymphocytes entourant ou envahissant des fibres non nécrotiques. D'après Dalakas, 2015.

❖ Imagerie :

Dans les PM, l'IRM pourrait permettre d'objectiver un œdème musculaire et de rechercher des zones actives d'inflammation et pourrait permettre de guider la biopsie musculaire pour établir un diagnostic de certitude (Dalakas, 2015; Pipitone, 2016).

2.6. Principes du traitement

Le traitement pharmacologique des MI repose sur l'utilisation des immunosuppresseurs avec pour objectif d'induire la rémission et de la maintenir par la suite (Carstens and Schmidt, 2014; Oldroyd et al., 2017). Il faut noter que la conduite à tenir pour la prise en charge des MI est basée sur des études de méthodologie hétérogène. La rareté de la maladie n'a permis que très peu d'essais prospectifs randomisés et les effectifs sont souvent limités. De plus, les habitudes de traitement varient d'un pays à l'autre en l'absence de consensus international ; cependant le schéma thérapeutique suivi reste sensiblement le même.

Le traitement de première ligne est la corticothérapie. L'utilisation des corticoïdes dans les MI repose historiquement sur des observations montrant un effet positif des corticoïdes sur la force musculaire (Micks and Mullaney, 1958). La corticothérapie est débutée *per os* à forte dose (1 mg/kg/j). Pour les atteintes musculaires très sévères ou en présence de signes de gravité, les corticoïdes peuvent être instaurés par bolus de 250 à 500mg en IV, pendant 3 à 5 jours, puis relayés *per os* à 1 mg/kg. Cette dose de corticoïdes est maintenue 4 à 6 semaines et suivie d'une décroissance progressive.

Un traitement par corticoïdes seuls peut être suffisant dans des formes modérées et en absence de signe de gravité (Joffe et al., 1993). Cependant, étant donné les nombreux effets indésirables des corticoïdes (notamment de myopathie cortisonique) et le risque de corticodépendance, l'association à d'autres immunosuppresseurs est souvent utilisée (Batchelor et al., 1997). Ainsi, le méthotrexate et l'azathioprine sont également efficaces pour induire la rémission (en association aux corticoides) puis pour la maintenir (Ramanan et al., 2005). En seconde intention ou en cas d'atteinte pulmonaire, le cyclophosphamide, la ciclosporine et le mycophénolate mofétil sont des traitements efficaces et relativement bien tolérés (Kotani et al., 2011; Swigris et al., 2006; Vencovský et al., 2000). Les IgIV à forte dose (1 à 2 g/kg toutes les 3 à 4 semaines) sont utilisées dans les formes résistantes à la bithérapie ou d'emblée en présence de troubles de la déglutition ou d'autres signes de gravité. Elles sont également utilisées lorsque l'immunosuppression est particulièrement risquée (en cas de cancer associé par exemple) (Elovaara et al., 2008; Kampylafka et al., 2012). Le rituximab a montré une efficacité significative mais souvent retardée, notamment dans des formes réfractaires. Quelques cas d'utilisation avec succès du tocilizumab ou du tacrolimus ont été rapportés. Le dernier semble particulièrement efficace sur la PID (Carstens and Schmidt, 2014; Oldroyd et al., 2017).

L'efficacité des échanges plasmatiques a été évaluée dans des groupes hétérogènes de malades (tout type de MI). Il est à noter que les échanges plasmatiques sont particulièrement efficaces dans certains cas particuliers de myosite à MSA lorsque l'aAc semble être responsable de la physiopathologie de la MI, notamment dans les MNAI à anti-SRP ou anti-HMGCR (Hengstman et al., 2006; Simon et al., 2016).

Comme nous venons de le voir, les thérapeutiques actuellement utilisées pour le traitement des MI sont des immunosuppresseurs systémiques non spécifiques de la physiopathologie de chaque MI. L'existence de patients réfractaires à ces traitements est un réel problème et l'immunosuppression générale occasionnée n'est pas négligeable.

Pour limiter les effets secondaires et améliorer l'efficacité thérapeutique, il serait intéressant de développer des traitements spécifiques de la physiopathologie de la maladie pour chaque patient. Pour cela, la génération de modèles expérimentaux fiables et reproductibles est nécessaire, à la fois pour les études physiopathologiques et thérapeutiques. C'est pourquoi nous allons maintenant nous intéresser aux différents modèles animaux de MI exploités dans la littérature.

3. Les modèles animaux de myopathies inflammatoires

Les modèles murins sont des outils incontournables pour l'étude physiopathologique et thérapeutique des maladies. Il existe des modèles spontanés tels que les souris *non obese diabetic* (NOD), modèle du diabète de type 1 (DT1) ; des modèles induits par immunisation active tels que l'EAE (*experimental auto-immune encephalomyelitis*), modèle de sclérose en plaque mais également des modèles transgéniques ou infectieux. Dans le domaine des MI, aucun modèle ne s'est imposé comme récapitulant de façon universelle et acceptée les caractéristiques d'un type de MI. Nous allons décrire les principales caractéristiques des modèles connus à ce jour, en tachant de mettre en avant leurs principales particularités au regard des mécanismes immunologiques et leurs limites en tant que modèles de MI.

3.1. Myosites spontanées

Seules 2 espèces animales ont été décrites pour développer spontanément une MI : le chien et la souris (Nagaraju and Plotz, 2002).

Des cas de DM canines familiales ont été décrites chez le collie et le berger Shetland, sous des formes légères à graves. Chez les chiens les plus sévèrement atteints, l'atteinte est bilatérale, symétrique et caractérisée par une atrophie généralisée du muscle. Les atteintes histologiques comprennent des signes de nécrose/régénération ainsi qu'un infiltrat cellulaire interstitiel (Figure 17) et périvasculaire composé de lymphocytes, plasmocytes, macrophages, neutrophiles et fibroblastes (Hargis et al., 1985). Cependant, l'incidence faible et la survenue aléatoire de la maladie en font un modèle d'étude complexe et peu utilisable en pratique. Par ailleurs, ces chiens n'ont été étudiés que dans le cadre des sciences vétérinaires et non dans un but de recherche à visée physiopathologique ou thérapeutique.

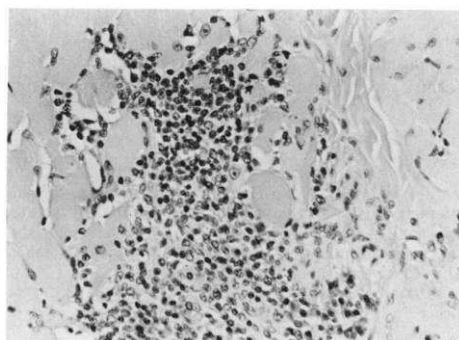


Figure 17. Coupe transversale d'un muscle atteint de dermatomyosite canine.

Coloration H&E montrant une dégénération des fibres musculaires et un infiltrat interstitiel de lymphocytes, plasmocytes et macrophages. D'après Hargis et coll., 1985.

De nombreuses études ont montré que les souris SJL/J développent tardivement une myopathie inflammatoire chronique spontanée ressemblant à la pathologie humaine puisqu'elles présentent des atteintes histologiques à type d'inflammation et des signes de nécrose/régénération (Rosenberg et al., 1987). Il sera cependant montré bien plus tard que ces souris, présentant un défaut d'expression de dysferline, semblent être un modèle bien plus approprié de myopathie génétique que de MI (Bittner et al., 1999). Nous citerons la souris SJL/J dans ce travail à plusieurs reprises pour la compréhension du sujet, tout en gardant à l'esprit cette limite majeure.

De façon similaire, les souris mdx (*x-linked muscular dystrophy*) développent une maladie musculaire caractérisée par la présence de signes de nécrose/régénération ainsi qu'un nombre important de fibres à noyaux internalisés à l'histologie (Torres and Duchen, 1987). Cependant, la physiopathologie de cette myopathie sera par la suite expliquée par un défaut de dystrophine (protéine musculaire indispensable au maintien de l'intégrité de la fibre musculaire), en faisant alors le paradigme de la myopathie de Duchenne (myopathie génétique) et non pas des MI (Hoffman et al., 1987).

Il convient donc de noter à ce stade qu'il n'existe actuellement pas de modèle spontané expérimental permettant l'étude des MI.

3.2. Myosites induites par immunisation

Les modèles induits regroupent tous les modèles dans lesquels la pathologie est provoquée de façon expérimentale, la majorité du temps par injection d'antigènes, d'homogénats de tissus ou de cellules. Afin de rendre cette préparation antigénique suffisamment immunogène, il est usuel d'ajouter un adjuvant. Le plus communément utilisé ici est l'adjuvant complet de Freund (CFA, *Complete Freund's Adjuvant*). Les modèles induits de MI que nous allons exposer maintenant reposent sur l'injection d'homogénat de muscle, d'antigènes musculaires purifiés ou encore d'ADN nu codant ces molécules. Ils sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Principaux modèles animaux de myosites induits par immunisation.

		Animal	Sexe	Phénotype	Infiltrat	Principales caractéristiques	Réf
Homogénat musculaire	Homogénat de muscle syngénique + CFA	Souris SJL/J	♀	EAM (myopathie inflammatoire)	MΦ (80%) > CD4 ⁺ (10-15%) > CD8 ⁺	1er modèle de souris nombreuses lignées testées (SJL/J, CB6F1, C57BL/6, BLAB/c, CBA/J, DBA/1, DBA/2, AKR). Lignée retenue : SJL/J.	[1 ; 2]
	Homogénat de muscle de lapin + CFA	Rat	♀	PM	<i>in vitro</i>	La sensibilisation des cellules provoque des lésions des fibres musculaires (hypersensibilité cellulaire ou retardée). Expériences <i>in vitro</i> humorale et cellulaire.	[3]
	Homogénat de muscle de lapin + CFA	Rat		Experimental myositis	Infiltrat inflammatoire de cellules mononucléées Nécrose/régénération	Transfert de la maladie par les lymphocytes mais pas par le sérum. Dosage des CPK.	[4]
	Homogénat de muscle de lapin + CFA	Cobaye		EAM (PM)		Sensibilisation contre la myosine et la tropomyosine (mais pas la troponine).	[5]
	Homogénat de muscle de lapin + CFA	Cobaye		EAM (PM)	Nécrose/régénération Phagocytose	Les protéines musculaires dénaturées ne diminuent pas l'antigénicité.	[6]
Myosine	Myosine B de lapin	Cobaye		"Myosite allergique expérimentale"	MΦ & lymphocytes	Dépôts d'IgG et de C3 sur les fibres musculaires. Affinité des IgG pour la myosine, l'actine et la troponine T.	[7]
	Myosine purifiée de lapin +/- défibrase	Cobaye		EAM (polymyosite idiopathique)	Infiltrat inflammatoire de cellules mononucléées Nécrose/régénération Phagocytose	L'ajout de défibrase augmente l'incidence de la maladie, induit des infiltrats inflammatoires étendus et de la myonécrose. Phénotype : faiblesse musculaire, voix rauque, diminution de la motilité, pattes postérieures trainantes, tête tombante, difficultés de marche et dyspnée.	[8]
	Myosine B purifiée (dont actine, myosine, tropomyosine)	Souris SJL/J	♀	EAM	MΦ+, CD4 ⁺ , CMH-I	Histologie : nécrose, phagocytose, infiltrat inflammatoire endomysial. Dépôts d'IgG et de C3 dans les régions inflammatoires. Rôle du complément dans le transfert de la maladie. IgG dirigées contre la myosine, l'actine, la protéine M, la troponine T, la desmine, la créatine kinase (et la protéine C à moindre niveau).	[9]
	Myosine B syngénique (dont actine, myosine, tropomyosine)	Souris SJL/J	♀	EAM		Maladie transférée à la fois par les IgG et les L _T .	[10]
	Myosine (purifiée ou partiellement purifiée à partir de muscles de cobayes, poulets, lapins et humains) + CFA	Rat Lewis	♂ & ♀	EAM (PM)	Cellules infiltrantes : CD8 ⁺ & CD11b ⁺ Endo- & périnysium : CD4 ⁺ , TCRαβ ⁺ , L _B & NK	Pas de différence notable entre myosine purifiée ou partiellement purifiée. La myosine provenant d'espèces différentes est capable d'induire l'EAM. La toxine pertussique semble essentielle pour induire un phénotype reproductible.	[11]
	Myosine (partiellement purifiée à partir de muscles de lapin ou de souris syngéniques) + CFA	Souris BALB/c et C57BL/6	♀	EAM (PM)	Cellules infiltrantes : CD4 ⁺ , CD8 ⁺ & CD11b ⁺ Ré-expression CMH-I Nécrose/régénération	Seul le CFA permet d'induire l'EAM (testés : CFA, IFA, Alum et CpG). Phénotype similaire chez la C57BL/6 et la BALB/c. Expérience sur les Treg dans l'EAM des BALB/c induite par myosine syngénique. Maladie transférée par les L _T CD4 ⁺ stimulés (et pas par les L _T CD8 ⁺ ni le sérum).	[12]
Protéine C	Protéine C (purifiée à partir de muscles squelettiques de cobayes) + CFA	Rat Lewis		EAM (PM)	Cellules infiltrantes : CD8 ⁺ Endomysium & tissu conjonctif : CD4 ⁺ & MΦ	EAM plus sévère que celle induite par la myosine.	[13]
	Protéine C recombinante + CFA	Rat Lewis		EAM (PM)		Etude des épitopes reconnus par les L _B et L _T .	[14]
	Protéine C recombinante humaine + CFA	Souris C57BL/6		CIM (C protein induced myositis) (PM)	Région périvasculaire & périnysium : CD4 ⁺ , L _B , MΦ Endomysium : CD8 ⁺ (perforin+), L _B , MΦ Ré-expression CMH-I	Physiopathologie médiée par les L _T CD8 ⁺ et l'IL-1. Effet thérapeutique des IGIV.	[15]
Laminine	Laminine + CFA	Rat		LIM (Laminin-induced myositis)	Fibres musculaires en nécrose envahies par des MΦ Infiltrat endomysial (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ & MΦ) Quelques L _B périnysiaux		[16]
Histidyl-tRNA-synthétase	HRS humaine ADNc (ADN nu)	Souris BALB/c	♀	Myosite	Nécrose/régénération Important infiltrats de cellules mononucléées (région périvasculaire et interstitielles avoisinant les fibres en nécrose/régénération)	Immunisation contre l'HRSrh (de cellules HeLa) ou des plasmids d'ADN nu. Les Ac sont détectés dans les 2 conditions mais la myosite ne se développe qu'avec l'ADN nu. L'inflammation induite par buvivacine dans le muscle augmente la sévérité de la maladie. Développement d'une réponse cellulaire sur le long terme chez la BALB/c mais pas la C57BL/6 (> 42j) après la dernière inoculation d'ADN).	[17]
	HRS murine (protéine) + CFA	Souris B6.G7		Inflammation musculaire et pulmonaire (SAS)	Muscle : infiltrats inflammatoires périvasculaires et endomysiaux Fibres envahies et dégénérescence Poumon : infiltrat lymphocytaire périvasculaire et périnysial	Réactions croisées humain/murin très limitées. Physiopathologie médiée par une réaction immunitaire contre des épitopes natifs. Maladie modérée au niveau musculaire et plus marquée au niveau pulmonaire. La réponse immunitaire pourrait impliquer le CMH-II (comparaison des souris B6.G7 et NOD.Idd3/5).	[18]
	HRS murine (protéine) sans adjuvant (IM)	Souris C57BL/6, B6.G7 & NOD.Idd3/5	♂ = ♀	Inflammation musculaire et pulmonaire (SAS)	Infiltrats périvasculaires, périnysiaux et endomysiaux composés de L _T CD3 ⁺ (CD4 ⁺ et CD8 ⁺) exprimant CD44 et CCR5	Immunogénicité intrinsèque de la protéine HRS. Physiopathologie médiée par les L _T , L _B et les cellules de l'immunité innée.	[19]
Pyruvate kinase	Pyruvate kinase M1/M2 (DC sensibilisés)	Souris BALB/c		Pas de signe clinique	Nécrose/régénération Variabilité taille des fibres Noyaux centraux Infiltrat principalement CD4 ⁺	Pas de signes cliniques Uniquement signes histologiques Pénétrance de la maladie 40% LT CD8 ⁺ : une activité cytolytique contre myotubes syngéniques	[20]

[1] : Rosenberg et al., 1987 [2] : Rosenberg and Kotzin, 1989 ; [3] : Kakulas, 1966 ; [4] : Esiri and MacLennan, 1974 ; [5] : Smith and Partridge, 1976 ; [6] : Dawkins, 1965 ; [7] : Matsubara and Takamori, 1987 ; [8] : Wen-Jing et al., 2015 ; [9] : Matsubara et al., 1993 ; [10] : Matsubara and Okumura, 1996 ; [11] : Kojima et al., 1997 ; [12] : Allenbach et al., 2009 ; [13] : Kohyama and Matsumoto, 1999 ; [14] : Matsumoto et al., 2007 ; [15] : Sugihara et al., 2007 ; [16] : Nakano et al., 2005 ; [17] : Blechynden et al., 1997 ; [18] : Katsumata et al., 2007b ; [19] : Soejima et al., 2011 ; [20] : Kawachi et al., 2001.
MΦ : macrophage.

3.2.1. Immunisation contre un extrait protéique de muscle

Pearson en 1956 a mentionné pour la première fois l'observation d'une myosite focale chez des rats immunisés avec un extrait protéique de muscle de lapin émulsionné en CFA (Pearson, 1956) sans pour autant s'y attarder. Ce modèle expérimental de myosite est caractérisé en histologie par un infiltrat de cellules mononucléées (Figure 18), des fibres en nécrose et des signes de régénération musculaire (Esiri and MacLennan, 1974). Il a été utilisé pour corréler l'apparition de la maladie avec le taux de CPK (Esiri and MacLennan, 1974) et démontrer le rôle pathogène des lymphocytes sensibilisés contre l'extrait protéique au cours de cette myosite expérimentale (Currie, 1971; Esiri and MacLennan, 1974; Kakulas, 1966).

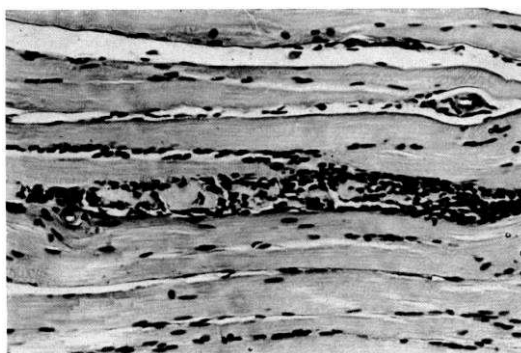


Figure 18. Coupe longitudinale d'un muscle de rat immunisé contre un extrait protéique xénogénique.

Coloration H&E montrant une fibre en nécrose visible au centre de l'image, envahie par des cellules inflammatoires mononucléées de petite taille. D'après Esiri et MacLennan, 1974.

En 1965, Dawkins a utilisé des cobayes pour reproduire cette immunisation contre extrait protéique de muscle de lapin et démontrer l'antigénicité de ces substrats grâce à des tests cutanés sur les animaux immunisés (Dawkins, 1965). Ce modèle expérimental a ensuite permis d'identifier la myosine et la tropomyosine comme cibles antigéniques (Smith and Partridge, 1976). Ici aussi, le rôle pathogène des lymphocytes a été mis en avant (Currie, 1971), tandis que la présence d'aAc spécifiques du muscle après immunisation a été montrée sans pouvoir pour autant leur attribuer de rôle cytotoxique (Dawkins et al., 1971).

Malgré les avantages indéniables de la souris en tant que modèle d'étude en immunologie, elle ne sera utilisée qu'en 1987 pour développer le premier modèle de MI induit par immunisation contre extrait syngénique de protéines musculaires. Lors de ces travaux, Rosenberg et coll. ont immunisé des souris femelles de 4 à 8 semaines issues des lignées SJL/J, CB6F1, C57BL/6, BALB/c, CBA/J, DBA/1, DBA/2 et ARK ; et déterminé que la souris SJL/J était la plus susceptible à l'induction d'une myosite (Rosenberg et al., 1987). Comme nous l'avons évoqué

précédemment, la même équipe a montré en 1997 que les souris SJL/J développaient en fait une pathologie musculaire spontanée atteignant son pic d'incidence aux alentours de 8 mois. En effet les animaux de cette lignée présentent un taux d'expression réduit de dysferline (Bittner et al., 1999), en faisant dès lors, non pas un modèle de MI, mais un modèle classique d'étude des myopathies génétiques avec déficit en dysferline : la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B ou la myopathie distale de Miyoshi.

Il faut noter que cette approche d'immunisation contre homogénat musculaire induit une myosite de façon peu reproductible. Par ailleurs, l'identification de cibles antigéniques, dans ces modèles animaux mais également dans le sérum des patients atteints de MI (Feltkamp and Feltkamp-Vroom, 1965), ont conduit par la suite à établir des modèles expérimentaux par immunisation d'animaux grâce à l'Ag ciblé et non plus un extrait protéique hétérogène.

3.2.2. Immunisation contre la myosine

Lors de l'immunisation de cobayes contre la fraction B de la myosine de lapin, les animaux développent une maladie musculaire initialement nommée « myosite allergique expérimentale » caractérisée notamment par un infiltrat musculaire composé de macrophages et de lymphocytes. La physiopathologie de cette maladie est due à la réponse immunitaire dirigée contre la myosine, mais également l'actine et la troponine T (Matsubara and Takamori, 1987). Ce modèle est aujourd'hui encore parfois utilisé et a d'ailleurs récemment été amélioré par l'injection de defibrase® (médicament utilisé à l'étranger dans l'AVC ischémique pour ses propriétés thrombolytiques), permettant d'accentuer l'intensité et l'incidence de la pathologie chez les cobayes immunisés (Wen-Jing et al., 2015).

L'immunisation de rats Lewis de 6 à 12 semaines contre la myosine, purifiée ou partiellement purifiée, permet d'induire une myopathie auto-immune expérimentale (EAM, *experimental auto-immune myopathy*) (Kojima et al., 1997). Ces animaux présentent alors un infiltrat cellulaire composé de $L_T CD4^+$, de L_B et de cellules NK dans l'endomysium et le périmysium ; tandis que les fibres musculaires sont envahies par des $L_T CD8^+$ et des cellules myéloïdes. Dans ce modèle, la maladie ne semble transférable ni par une approche cellulaire ni humorale.

Suite à ses travaux sur le cobaye mettant en évidence des réactivités antigéniques notamment contre la myosine, l'équipe de Matsubara a créé un nouveau modèle d'EAM chez la souris SJL/J par immunisation contre la fraction B de la myosine. L'analyse histologique montre un

infiltrat inflammatoire composé majoritairement de macrophages et de lymphocytes T CD4⁺ et une expression du CMH-I par les fibres musculaires environnantes (Matsubara et al., 1993). Par ailleurs, dans ce modèle induit contre la myosine, les souris présentent une certaine réactivité contre d'autres cibles antigéniques telles que la protéine C, probablement en raison d'une purification imparfaite de l'Ag. De plus, la souris SJL/J n'est pas un modèle de MI.

Cependant, l'immunisation de souris C57BL/6 et BALB/c contre myosine syngénique ou xénogénique (lapin) partiellement purifiée (Allenbach et al., 2009) induit également une myosite. Dans ce cas, la maladie des souris BALB/c est partiellement transférable par les L_T CD4⁺ stimulés *in vitro* contre la myosine (2 souris sur 5). Par ailleurs, Allenbach et coll. ont montré en 2009 la supériorité du CFA en tant qu'adjuvant pour induire l'EAM et utilisé ce modèle pour démontrer l'importance des Treg dans l'immunorégulation de la maladie. Il est cependant à noter que la répétition d'injections d'un adjuvant très immunogène tel que le CFA est de nature à provoquer en soi une réaction inflammatoire dans les muscles avoisinants.

3.2.3. Immunisation contre la protéine C

Kojima et coll. ont montré que la préparation de myosine partiellement purifiée pouvait contenir une protéine antigénique autre que la myosine (Kojima et al., 1997). Lors des purifications à partir de muscle squelettique, un contaminant a été identifié : la protéine C (Offer et al., 1973). Le rôle des modèles suivants a donc été de déterminer le rôle potentiel de la protéine C dans l'induction des pathologies musculaires auto-immunes.

L'immunisation de rats Lewis contre la protéine C purifiée à partir de muscle squelettique de cobaye induit une EAM d'incidence équivalente à celle induite contre la myosine avec des atteintes histologiques plus importantes (Kohyama and Matsumoto, 1999). Les animaux présentent alors un infiltrat inflammatoire endomysial composé de L_T CD4⁺ et de macrophages tandis que les cellules envahissant les fibres musculaires sont majoritairement des L_T CD8⁺. La maladie induite dans ce modèle est transférable par les Ac dirigés contre les peptides SC2P3 et SC2P7 de la protéine C (Matsumoto et al., 2007).

Les souris C57BL/6 immunisées contre la protéine C recombinante humaine développent également une atteinte musculaire caractérisée par un infiltrat de même type que précédemment chez les rats Lewis ainsi que par l'expression sur CMH-I à la surface de certaines fibres. Ce modèle murin, appelé myosite induite par la protéine C (CIM, *C protein-induced myositis*), a permis de démontrer le rôle pathogène des L_T CD8⁺ ainsi que de l'IL-1 (Sugihara et al., 2007).

3.2.4. Immunisation contre la laminine

Dans la continuité des modèles induits par immunisation contre des protéines musculaires, un modèle de myosite a été induit chez le rat par immunisation contre la laminine, composant majeur de la membrane basale des fibres musculaires. Histologiquement, ce modèle présente des fibres musculaires en nécrose envahies par des macrophages ainsi que des infiltrats inflammatoires composés de L_T $CD4^+$, $CD8^+$ et de macrophages dans l'endomysium (Nakano et al., 2005). Cependant, il n'existe que très peu d'études et donc peu d'informations concernant ce modèle.

3.2.5. Immunisation contre l'histidyl-tRNA synthétase

Comme nous avons pu le voir précédemment, une proportion importante de patients atteints de MI présentent des aAc (Benveniste et al., 2016), dont les plus fréquents sont les anti-tRNA synthétases. Parmi ceux-ci, les anti-Jo-1 sont dirigés contre l'histidyl-tRNA synthétase (HRS ou Jo-1) et sont détectés chez 20 à 30% des patients atteints de MI (Cruellas et al., 2013; Koenig et al., 2007; Mahler et al., 2014).

Dans un travail de 1997, Blechynden et coll. ont immunisé des souris BALB/c contre l'HRS et ainsi développé un nouveau modèle de MI. En effet, suite à l'injection d'ADN nu codant pour l'HRS, les souris développent des aAc associés à un important infiltrat inflammatoire périvasculaire et interstitiel dans les régions avoisinant les signes de nécrose/régénération (Blechynden et al., 1997).

L'immunisation de souris contre la protéine recombinante murine induit également une atteinte musculaire (infiltrat inflammatoire périvasculaire et endomysial) et pulmonaire importante (infiltrat périvasculaire et péribronchiolaire), en faisant alors un modèle de SAS (Katsumata et al., 2007b). L'immunogénicité intrinsèque de la protéine HRS a été démontrée puisque différentes lignées de souris développent la maladie après immunisation sans adjuvant (Soejima et al., 2011). Les études physiopathologiques dans ce modèle ont montré que le mécanisme pathogène repose sur l'implication concomitante des L_T , des L_B ainsi que de l'immunité innée (Figure 19).

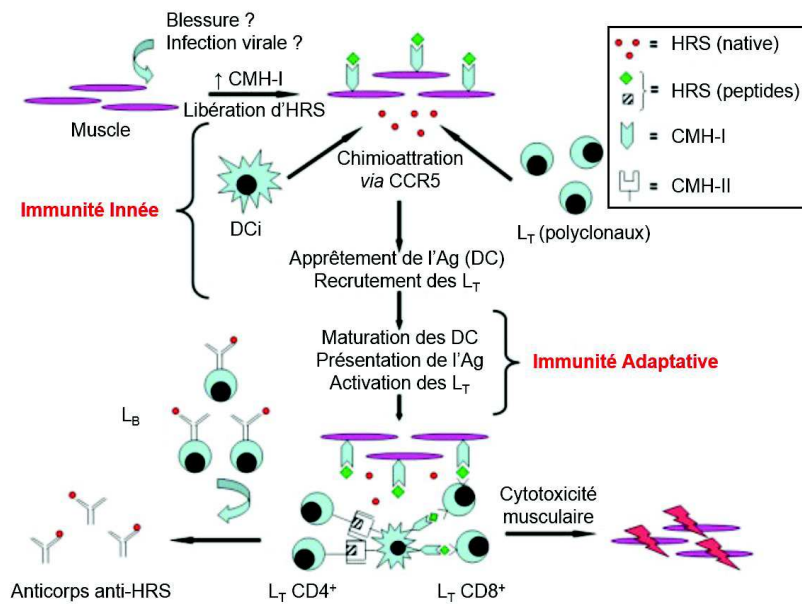


Figure 19. Hypothèse de pathogénicité de l'histidyl-tRNA synthétase.

Schéma explicatif du rôle prétendu de la protéine HRS dans la cytotoxicité musculaire, impliquant immunité innée et adaptative. Une lésion musculaire d'origine inconnue (blessure, infection virale, ...) induit d'une part la libération d'HRS à partir des fibres musculaires permettant le recrutement de cellules dendritiques (DC) immatures et de lymphocytes naïfs via CCR5 (Immunité Innée) ; et d'autre part la surexpression du CMH-I pouvant présenter les peptides de l'HRS (en haut à gauche). La maturation des DC aboutit à la présentation des peptides HRS par le CMH-II, l'activation des voies de costimulation et des L_T CD4⁺ spécifiques (*in situ* ou dans les ganglions drainants). Cette sous-population de L_T CD4⁺ peut ensuite coopérer avec les L_B et L_T CD8⁺, conduisant ainsi à la production d'aAc et à la cytotoxicité musculaire par la voie de l'immunité adaptative. Adapté de Soejima et coll., 2011.

Les modèles de MI induits par immunisation sont donc des modèles utiles qui ont permis jusqu'ici de montrer par exemple le rôle pathogène des lymphocytes, la présence d'aAc ainsi que le rôle primordial des Treg dans la régénération musculaire. Néanmoins, il faut noter qu'aucun de ces modèles ne permet d'induire une pathologie réellement reproductible d'un animal à l'autre (Nagaraju and Plotz, 2002). Par ailleurs, s'agissant de modèles induits, la maladie implique une immunisation contre un ou des Ag donnés dont il n'est pas établi qu'ils soient impliqués dans les maladies humaines (à l'exception de l'HRS). Ils ne peuvent donc être utilisés pour rechercher les aAg responsables de la maladie.

3.2.6. Immunisation par transfert de cellules dendritiques

Une approche différente a été entreprise par Kawachi et coll. en 2001 pour tenter de développer un modèle de MI. Pour cela, ils ont injecté à des souris BALB/c des DC sensibilisés par

des peptides capables d'être présentés par les molécules du CMH-I H-2K^d (CMH-I des souris BALB/c), correspondant donc à une immunisation contre le peptide présenté.

Ainsi, ils ont réussi à induire une EAM uniquement lors de l'injection de DC présentant les peptides de la pyruvate kinase M1/M2, protéine ubiquitaire nécessaire à la dernière étape de la glycolyse. En effet, 40% des souris présentent des atteintes musculaires comprenant des signes de nécrose/régénération, une variabilité dans la taille des fibres musculaires, un nombre important de fibres à noyaux internalisés ainsi qu'un infiltrat inflammatoire modéré composé de L_T (principalement CD4⁺). Il a été démontré que dans ce modèle, les L_T CD8⁺ possèdent une activité cytolytique spécifique envers des myotubes syngéniques (Kawachi et al., 2001).

Cependant il faut noter qu'aucun signe clinique n'a été observé chez ces souris et que moins de la moitié des animaux présentaient une atteinte histologique musculaire. Ce modèle apparaît donc complexe dans sa mise en œuvre et peu pertinent en termes physiopathologiques.

3.3. Myosites infectieuses

Chez l'homme, l'infection par certains virus cause de façon classique des symptômes à type de myalgies, tels que les virus de la grippe par exemple. Dans certains cas, les infections virales peuvent également provoquer de véritables myosites, comme c'est le cas pour HTLV-1 et le VIH par exemple (Ascherman, 2012; Martin et al., 2014; Viroit et al., 2017). On retrouve également impliqués les entérovirus et notamment le virus Coxsackie B. De plus, certains *picornavirus* induisent des myocardites auto-immunes chez la souris (Nagaraju and Plotz, 2002). D'autres agents pathogènes peuvent également être mis en cause : bactéries, champignons et parasites tels que *Trypanosoma cruzi* (Crum-Cianflone, 2008). Certains de ces agents infectieux ont été utilisés dans le but de créer de nouveaux modèles expérimentaux de MI (Tableau 6) : le virus Coxsackie B, le virus Ross River, le virus Influenza B, *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania infantum*.

Tableau 6. Principaux modèles animaux de myosite infectieuse.

	Animal	Sexe	Phénotype	Infiltrat	Principales caractéristiques	Réf
Virus	Virus Coxsackie B1	souris CD-1		œdème interstitiel, nécrose aiguë, infiltrat de cellules inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes entre autres), régénération, variation de la taille des fibres, remplacement des myofibres lésées par du tissu adipeux	atteinte locomotrice, faiblesse musculaire, profil myogène à l'EMG, réponse humorale persistante malgré une charge virale négative: suggère une maladie médiée par réponse auto-immune	[21]
	Virus Ross River	souris CBA/H		destruction des fibres musculaires infiltrat composé de MΦ (>90%)	pelage hérissé, cachexie, rigidité des pattes postérieures, rôle pathogène des MΦ	[22]
	Virus Ross River	souris C57BL/6 et CD-1		MΦ, NK, CD4 ⁺ , CD8 ⁺	Immunité adaptative non essentielle dans la pathogénicité	[23]
	Virus Ross River	souris C57BL/6		MΦ, NK, CD4 ⁺ , CD8 ⁺	rôle spécifique du système du complément	[24]
	Virus Influenza B	souris BALB/c	Myosite focale associée à la grippe	foyers épars d'infiltrats périnervaux de cellules mononucléées (adjacents aux fibres nécrotiques) maladie restreinte au muscle inoculé	atteinte locomotrice, augmentation du taux de CPK post-inoculation pic de la maladie : 3j post-inoculation	[25]
	Virus de l'encéphalomyocardite	souris BALB/c	♀ PM (+ autres inflammations)	infiltrats focaux de cellules mononucléées (endomysiaux et péri-fasciculaires) atrophie péri-fasciculaire signes de dégénérescence/régénération	atteinte locomotrice, pelage hérissé (quelques jours post-inoculation jusqu'à au moins 1 mois, puis spontanément résolutif) pic de la maladie 1 semaine post-inoculation + atteinte cardiaque, ascite, œdème périphérique, congestion hépatique et pulmonaire pas d'Ac anti-Jo-1	[26]
	Rétrovirus de type D	singe	PM		PM clinique, biologique et histologiques chez 50% des primates atteints d'immunodéficience acquise (due au rétrovirus de type D) virus détecté dans les muscles atteints	[27]
	Virus de l'immunodéficience féline	chat	Myosite associée au VIH	infiltrat péri-vasculaire de répartition multifocale (CD8+ > MΦ) fibres envahies nécrose & phagocytose	pas de signe clinique augmentation du taux de CPK	[28]
Parasites protozoaires	<i>Trypanosoma cruzi</i>	souris C3H/He	♀	présence du parasite (à faible taux) dans le muscle squelettique et la vessie associé à inflammation aiguë suggérant un mécanisme auto-immun	parasite intact détecté grâce au marquage du X-Gal (<i>T. cruzi</i> modifié génétiquement) parasites visibles au long terme (10 mois) dans les muscles squelettiques et la vessie	[29]
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	souris CBA/J	♀	MAI infiltrats inflammatoires chroniques et endomysiaux (& parfois péri-vasculaires) (CD8+ > MΦ) signes de dégénérescence/régénération réexpression du CMH-I	perte de poids, atteinte locomotrice	[30]
	<i>Leishmania infantum</i>	Hamster syrien	MAI	infiltrats inflammatoires focaux endomysiaux (parfois péri-vasculaire) (CD8+, CD4+ > MΦ) signes de nécrose/dégénérescence réexpression du CMH-I	perte de poids, asthénie, activité diminuée signes d'atrophie musculaire augmentation des taux de CPK, LDH & ASAT	[31]

[21] : Strongwater et al., 1984 ; [22] : Lidbury et al., 2000 ; [23] : Morrison et al., 2006 ; [24] : Morrison et al., 2007 ; [25] : Davis and Kornfeld, 2001 ; [26] : Miller et al., 1987 ; [27] : Dalakas et al., 1986 ; [28] : Podell et al., 1998 ; [29] : Buckner et al., 1999 ; [30] : Andersson et al., 2003 ; [31] : Paciello et al., 2010.

3.3.1. Virus Coxsackie B

L'une des premières évidences du rôle des virus dans le déclenchement de certaines formes de myosites est l'identification du virus Coxsackie B dans le muscle d'un enfant d'un an, décédé des suites d'une myosite diffuse (Sussman et al., 1959).

L'inoculation du virus Coxsackie B1, présentant un tropisme musculaire, à des souris CD-1 induit une atteinte musculaire caractérisée par une faiblesse musculaire, un dandinement lors de la marche et un profil myogène à l'EMG. L'analyse histologique met en évidence un œdème interstitiel, des signes de nécrose/régénération et un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes, plasmocytes et autres leucocytes. Sont également notés une variation de la taille des fibres musculaires ainsi qu'une dégénérescence grasseuse (Strongwater et al., 1984). Chez ces souris, les signes cliniques persistent dans le temps, malgré une élimination rapide du virus (environ 2 semaines post-inoculation) et tandis que les Ac neutralisants dirigés contre le virus

persistent. Les auteurs en concluent que les Ac dirigés contre le virus participent à la composante auto-immune (Figure 20).

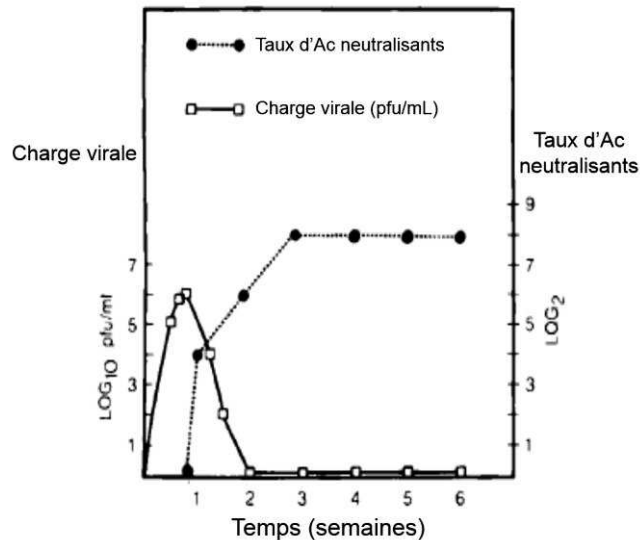


Figure 20. Suivi de la charge virale et du taux d'Ac neutralisants dans la myosite induite par le virus Coxsackie B1.

La charge virale est négativée 2 semaines après inoculation tandis que les Ac apparaissent 7 jours après inoculation et persistent plus de 5 semaines. Adapté de Strongwater et coll., 1984.

3.3.2. Virus Ross River

L'infection de souris par le virus de Ross River entraîne des atteintes musculaires. Chez la souris CBA/H, l'infection induit un phénotype alliant pelage hérissé, cachexie et rigidité des pattes postérieures. Histologiquement, ce modèle présente une destruction des fibres musculaires ainsi qu'un infiltrat inflammatoire largement composé de macrophages (Figure 21), dont le rôle pathogène a été démontré (Lidbury et al., 2000). Les souris C57BL/6 et CD-1, chez lesquelles le virus induit l'apparition d'un infiltrat inflammatoire composé de macrophages, de cellules NK mais également de L_T $CD4^+$ et $CD8^+$ ont permis de démontrer le rôle majeur mais non exclusif de l'immunité innée dans la pathogenèse (Morrison et al., 2006) mais également le rôle spécifique du complément (Morrison et al., 2007).

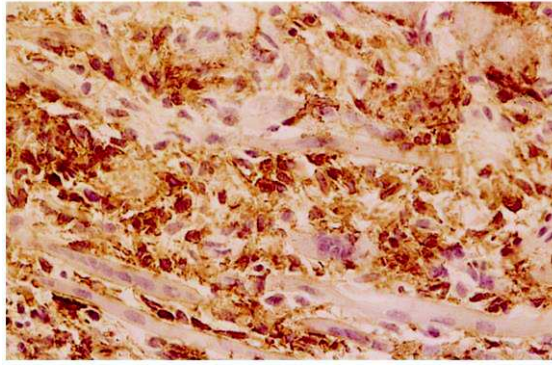


Figure 21. Coupe histologique de muscle de souris infectée par le virus Ross River.
Immunomarquage des macrophages (F4/80) 8 jours après inoculation. D'après Lidbury et coll., 2000.

3.3.3. Autres virus

D'autres virus ont été rapportés de façon plus anecdotique pour provoquer des MI plus ou moins proches de la maladie humaine.

❖ Virus Influenza B

L'inoculation du virus de la grippe Influenza B à des souris BALB/c permet d'induire dans les jours suivant l'inoculation une atteinte locomotrice et une augmentation des CPK associées à un infiltrat pérимysial inflammatoire éparé à proximité des zones de nécrose (Davis and Kornfeld, 2001). Il faut cependant noter que l'atteinte est restreinte au muscle inoculé avec le virus et qu'il semble davantage être un modèle spécifique de myosite focale associé à la grippe que de MI.

❖ Virus de l'encéphalomyocardite :

Les souris BALB/c infectées par le virus de l'encéphalomyocardite développent entre autres une atteinte musculaire à type de trouble de la marche (dandinement) quelques jours suivant l'inoculation semblant être spontanément résolutive le mois suivant. L'atteinte histologique comprend une répartition focale d'infiltrats inflammatoires de cellules mononucléées ainsi qu'une atrophie périfasciculaire et des signes de nécrose/régénération (Miller et al., 1987). Cependant, il faut noter que dans ce modèle, les animaux développent des atteintes multiviscérales (ascite, atteinte cardiaque, œdème périphérique, congestions hépatique et pulmonaire). Il ne s'agit donc pas d'un modèle spécifique de MI.

❖ Virus SAIDS :

Chez le singe, un rétrovirus de type D nommé virus SAIDS (*simian acquired immunodeficiency syndrome*) provoque une immunodéficience acquise associée dans 50% des cas à une atteinte musculaire inflammatoire semblable à la PM humaine et dans laquelle le virus semble directement lié à la pathogénicité en raison de sa persistance au niveau des tissus musculaires atteints (Dalakas et al., 1986).

❖ Virus de l'immunodéficience féline :

L'inoculation du virus de l'immunodéficience féline entraîne des atteintes musculaires chez tous les chats, sans signe clinique objectivable cependant. Les infiltrats périvasculaires et multifocaux sont composés de L_T CD8⁺ et de macrophages dans une moindre mesure et sont associés à des signes de nécrose et myophagocytose (Podell et al., 1998).

3.3.4. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi est un parasite protozoaire, agent responsable de la maladie de Chagas, classiquement associée à une cardiomyopathie et plus rarement à une myosite. Dans une première étude, Buckner et coll. ont montré que chez la souris, le parasite vivant est détectable de manière chronique (10 mois post-inoculation) dans le muscle squelettique et la vessie ; et est associé à une inflammation importante. Les souris CBA/J inoculées perdent du poids et présentent une atteinte de la locomotion (dandinement) associée à un infiltrat inflammatoire endomysial et parfois périvasculaire (L_T CD8⁺ et macrophages), des signes de nécrose/régénération ainsi que la réexpression du CMH-I à la surface des fibres musculaires (Andersson et al., 2003). La parasitémie faible associée à cette inflammation suggère alors la piste de l'inflammation auto-immune (Buckner et al., 1999).

3.3.5. *Leishmania infantum*

Leishmania infantum est également un parasite protozoaire transmis aux mammifères à l'occasion d'une piqûre par un phlébotome et responsable de la leishmaniose viscérale dans les cas les plus graves. Son réservoir est le chien, chez qui des cas de myosites ont été décrits (Paciello et al., 2009).

Son inoculation au hamster syrien (ou hamster doré) induit une perte de poids, une asthénie avec diminution de l'activité des animaux, une fonte musculaire associée à une élévation des taux de CPK, lactate déshydrogénase et ASAT (Paciello et al., 2010). L'analyse histologique des muscles squelettiques montre une ressemblance à la pathologie humaine puisque l'on peut observer un infiltrat inflammatoire composé de L_T $CD8^+$, $CD4^+$ et de macrophages, des signes de dégénération et régénération musculaire ainsi que la réexpression du CMH-I à la surface des fibres musculaires (Figure 22).

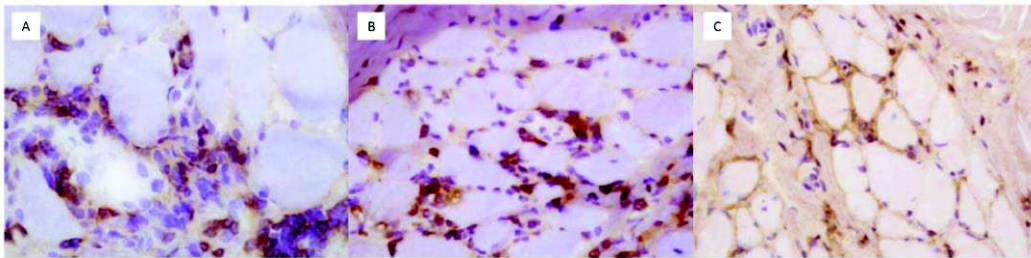


Figure 22. Coupe histologique de muscle de hamster infecté par *Leishmania infantum*.

Immunomarquage du L_T $CD8^+$ (A), $CD4^+$ (B) parmi les cellules infiltrantes et du CMH-I (C) à la surface des fibres musculaires. D'après Paciello et coll., 2010.

Ces modèles infectieux peuvent permettre d'étudier spécifiquement la physiopathologie liée aux conséquences immunopathologiques d'une réponse antivirale, mais sont peu informatifs quant aux mécanismes auto-immuns à proprement parler.

3.4. Myosites induites par transfert passif d'IgG de patients

Comme nous l'avons vu précédemment, la classification des MI a beaucoup évolué ces dernières années, notamment grâce à l'identification des MSA et MAA. Une approche intéressante pour étudier la physiopathologie de ces aAc est le transfert passif des aAc humains à la souris. Le premier modèle développé par cette technique est un modèle de myasthénie induit par injection à la souris de fractions sériques de patients malades (Toyka et al., 1977). Cette technique a par la suite été utilisée dans diverses maladies auto-immunes telles que le syndrome des anti-phospholipides, l'épidermolyse bulleuse ou encore la neuromyéélite optique (Blank et al., 1991; Kinoshita et al., 2009; Woodley et al., 2006).

A l'instar de ces modèles, des travaux sont en cours au sein du laboratoire afin d'évaluer la pathogénicité des aAc dans les MNAI. Les souris C57BL/6 ayant reçu des IgG anti-SRP ou

anti-HMGCR de patients montrent en effet une diminution de la force musculaire évaluée par grip test ou après électrostimulation du nerf sciatique. De façon intéressante, il semblerait que la pathogénicité de ces 2 aAc spécifiques des MNAI soit dépendante du système du complément, puisque les souris C3 KO (*knock out*, déficientes pour la fraction C3 du complément) ne présentent qu'une diminution faible de leur force musculaire comparées aux souris WT (*wild type*). Constitutivement, les souris ont un taux faible de complément. Lorsque les souris sont supplémentées en complément humain, l'effet pathogène des anti-SRP et anti-HMGCR est potentialisé, confirmant le rôle du complément dans les MNAI (Bergua et al., to be submitted).

3.5. Modèles transgéniques

Les modèles transgéniques ont été une réelle révolution dans le domaine de la génétique, pour comprendre la fonction d'un gène et les effets d'une mutation. Ils sont plus délicats à mettre en œuvre lorsqu'il s'agit de reproduire des maladies polygéniques comme les maladies auto-immunes (Nagaraju and Plotz, 2002). Cependant, certains de ces modèles ont contribué de façon importante à la compréhension de certains mécanismes physiopathologiques en auto-immunité. Nous nous limiterons aux caractéristiques des modèles transgéniques de myopathies à médiation immunitaire qui sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Principaux modèles animaux transgéniques de myopathie inflammatoire.

	Animal	Sexe	Phénotype	Infiltrat	Principales caractéristiques	Réf
expression forcée du CMH-I	souris C57BL/6 (MCK-tTA/TRE-H-2Kb)	♀ > ♂	myopathie inflammatoire	régénération (noyaux centraux) dégénérescence des fibres infiltrat de MΦ atrophie	sur-expression inductible du CMH-I spécifiquement musculaire faiblesse musculaire, dos voûté, faiblesse et fonte musculaire des pattes postérieures perte de poids activité locomotrice diminuée augmentation du taux de CPK lien entre lésions musculaires et stress du RE implication de la voie NFκB pathogénicité de la sur-expression du CMH-I indépendante de ses fonctions immunes	[32 ; 33 ; 34]
expression forcée de l'IFN-γ	souris		MNAl myasthénie	zones multi-focales d'inflammation endomysiale nécrose, myophagocytose, infiltrats de MΦ infiltration (quelques CD4 ⁺) dystrophie et dégénérescence des axones terminaux et adjacents aux cellules de Schwann	perte de poids, activité diminuée, dos voûté, tête et queue tombantes, défaut de toilette	[35]
expression forcée de l'Aβ (protéine β-amyloïde)	souris C57BL/6		IBM	vacuolisation & accumulation d'Aβ dans les fibres musculaires dégénérescence musculaire et vacuoles sarcoplasmiques (avec dépôts d'Aβ) atrophie & inclusions de filaments amyloïdes, nécrose/régénération, nombre de mitochondries élevé dans certaines fibres noyaux centraux, inflammation dépendante des neutrophiles, marquages de l'Aβ (dépôts et accumulation intracellulaire) nombreux noyaux centraux, L _T CD8 ⁺ entourant ou infiltrant les fibres, accumulation ou inclusions cellulaires d'Aβ	SβC (protéine de fusion contenant l'Aβ), variabilité importante entre les lignées SβC (+ mutation K612V, empêchant la protéolyse), maladie aggravée, variabilité de phénotype MCK-APP (β-APP sous promoteur muscle spécifique), atteinte locomotrice (rotarod) MCK-APP/PS1 (souris double transgénique, sur-expression du peptide Aβ42 dans le muscle squelettique), aspects cliniques et histologiques plus marqués	[36 ; 37 ; 38 ; 39]
expression forcée de l'Aβ (protéine β-amyloïde)	Nématode (<i>C. elegans</i>)		IBM	aggrégats d'Aβ dans les fibres musculaires	diminution de la motilité due à un dysfonctionnement de l'assemblage du récepteur à l'acétylcholine -> défaut de transmission neuro-musculaire modèle utile pour des études génétiques, d'interaction de protéines, de métabolisme ou de toxicité	[40]
mutation de la GNE (UDP-N-acétylglucosamine 2-épimérase/N-acétylmannosamine kinase)	souris C57BL/6		IBM héréditaire	inclusions d'Aβ dans les fibres précédant l'apparition de vacuoles bordées, vacuoles bordées marquées par la phosphatase acide autophagie	souris Gne ^{fl} /hGNE ^{D176V} hyposialylation dans le sérum, les muscles et d'autres organes maladie liée à l'âge, atteinte locomotrice augmentation des taux de CPK atrophie musculaire	[41]
Inactivation de la Syt VII (synaptotagmine VII)	souris C57BL/6		myosite	fibrose (dépôts endomysiaux de collagène) infiltrat inflammatoire composé de LT, MΦ, neutrophiles et éosinophiles	souris Syt VII ^{-/-} faiblesse musculaire progressive augmentation des taux de CPK taux d'anti-nucléaires élevés	[42]

[32] : Nagaraju et al., 2000 ; [33] : Nagaraju et al., 2005 ; [34] : Fréret et al., 2013 ; [35] : Shelton et al., 1999 ; [36] : Fukuchi et al., 1998 ; [37] : Jin et al., 1998 ; [38] : Sugarman et al., 2002 ; [39] : Kitazawa et al., 2006 ; [40] : Link, 1995 ; [41] : Malicdan et al., 2007a ; [42] : Chakrabarti et al., 2003.

3.5.1. Expression musculaire forcée du CMH-I

Une des caractéristiques communes à toutes les MI est la réexpression du CMH-I à la surface des fibres musculaires, une des rares cellules de l'organisme à ne pas l'exprimer à l'état physiologique à un niveau détectable. Un modèle inductible d'expression forcée du CMH-I a été généré par intégration d'une séquence codant pour la molécule de CMH-I (H-2K^b) sous la dépendance d'un promoteur musculaire (MCK) dans un système *Tet-off*. Cette construction permet d'induire l'expression du CMH-I spécifiquement dans le muscle squelettique lors du retrait de la doxycycline.

Ces souris développent une maladie musculaire sévère, initialement décrite comme liée à la présentation d'aAg musculaires aux L_T CD8⁺ auto-réactifs, associant une augmentation du taux

de CPK et des atteintes histologiques comprenant des signes de régénération, de dégénérescence, un infiltrat macrophagique et des signes d'atrophie (Nagaraju et al., 2000). Les signes cliniques comprennent faiblesse musculaire, dos vouté, faiblesse et fonte musculaire des pattes postérieures. Cependant, il a par la suite été montré que la maladie musculaire de ces souris se développe également chez les souris *Rag*^{-/-} et qu'elle était due primitivement à un stress du réticulum endoplasmique, à l'implication de la voie NF- κ B (*nuclear factor κ B*) et un effet pathogène du CMH-I sur le muscle indépendant de sa fonction immunologique (Fréret et al., 2013; Nagaraju et al., 2005).

3.5.2. Expression forcée de l'IFN- γ

Ce modèle a initialement été développé pour produire un modèle de myasthénie. En effet, les souris transgéniques produisent de l'IFN- γ au niveau de la jonction neuromusculaire grâce à un promoteur du récepteur epsilon à l'acétylcholine. Ces souris développent des signes cliniques traduisant une atteinte musculaire (perte de poids, diminution de l'activité, dos vouté, ...), mais sont cependant associés à des signes histologiques typiques de la myasthénie et des MNAI : dégénérescence des axones terminaux et cellules de Schwann adjacentes, infiltrat inflammatoire endomysial composé principalement de macrophages (plus rarement de L_T CD4⁺), signes de nécrose et myophagocytose (Shelton et al., 1999). Ce modèle mixte semble finalement pouvoir être un modèle de neuromyopathie nécrosante, permettant d'étudier le rôle de l'IFN- γ dans la pathogenèse musculaire.

3.5.3. Expression forcée de la protéine β -amyloïde

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la protéine β -amyloïde est surexprimée dans le muscle des patients atteints d'IBM. Les modèles d'expression forcée de la protéine β -amyloïde présentés ici sont donc avant tout des modèles d'IBM.

Un animal peu classique comme modèle d'étude en immunologie, le nématode *Cænorhabditis elegans*, a été modifié pour exprimer des protéines amyloïdes humaines. *C. elegans* exprimant la protéine β -amyloïde présente des dépôts de cette protéine (Figure 23) spécifiquement dans les cellules musculaires (Link, 1995). La motilité de ces animaux est alors diminuée. Même si *Cænorhabditis elegans* n'est pas un modèle adapté pour l'étude des mécanismes immunologiques de la maladie, il présente des avantages certains en ce qui concerne les études génétiques, l'interaction des protéines et l'altération des voies métaboliques (Rebolledo et al., 2008).

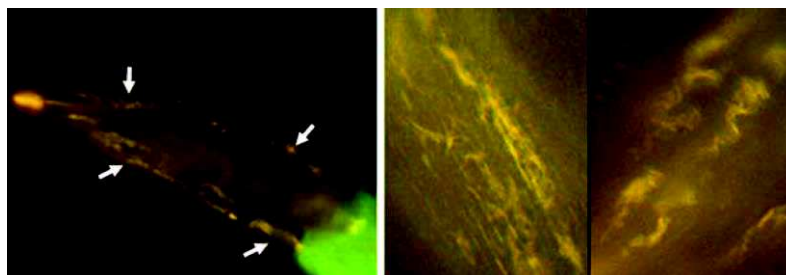


Figure 23. Dépôts amyloïdes chez un *Cænorhabditis elegans* transgénique.

Marquage des nématodes transgéniques par la thioflavine S mettant en évidence des dépôts intracellulaires de protéine β -amyloïde humaine dans les cellules musculaires. D'après Rebolledo et coll., 2008.

Par la suite, différentes techniques de transgénèse ont été utilisées pour faire surexprimer la protéine β -amyloïde chez la souris C57BL/6. Un premier modèle murin a été obtenu grâce à la surexpression de la protéine β -amyloïde provoquant la formation de fibrilles amyloïdes et l'apparition de vacuoles dans le muscle squelettique (Fukuchi et al., 1998). Le même modèle a été modifié par Jin et coll. par insertion d'une mutation (K612V), de façon à rendre le transgène résistant à la protéolyse *via* l' α -sécrétase. Ainsi, la pathologie est aggravée et sont alors observées des atteintes histologiques plus franches alliant vacuoles sarcoplasmiques et inclusions de fibrilles amyloïdes à des signes de nécrose/régénération et parfois une augmentation du nombre de mitochondries dans les fibres musculaires (Jin et al., 1998). Cependant, comme pour le modèle précédent, le phénotype observé chez les animaux est très variable.

Quelques années plus tard, le développement d'un modèle similaire a consisté à placer le transgène codant pour le précurseur de la protéine β -amyloïde (β -APP) sous le contrôle d'un promoteur musculaire (souris MCK-APP), afin d'induire l'expression de la protéine exclusivement dans le muscle. Ainsi, le modèle est amélioré et on peut observer sur le plan histologique des atteintes s'approchant de la maladie humaine : fibres en régénération avec centralisation des noyaux, accumulation de la protéine β -amyloïde de façon intracellulaire et sous forme de dépôts ainsi qu'un infiltrat inflammatoire qui, à la différence de l'atteinte humaine est ici composé principalement de polynucléaires neutrophiles (Sugarman et al., 2002).

Finalement, un modèle cliniquement et histologiquement plus grave sera obtenu chez les souris MCK-APP grâce au remplacement de la préséniline 1 (PS1) par un allèle muté PS1 (M146V) produisant une protéine β -amyloïde plus pathogène (Figure 24). Sont décrits une régénération importante avec de nombreux noyaux centraux, un infiltrat inflammatoire comportant des L_T $CD8^+$ en surface ou infiltrant les fibres musculaires, une accumulation de protéine β -amyloïde ainsi que des inclusions cellulaires (Kitazawa et al., 2006).

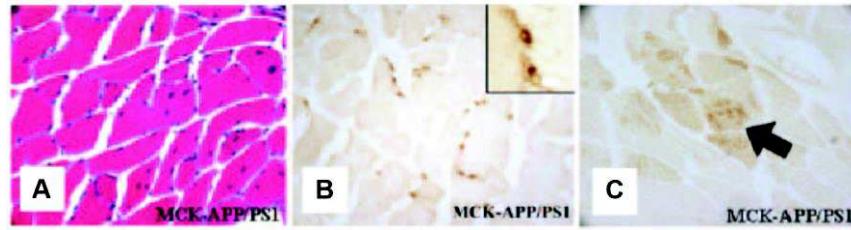


Figure 24. Coupes histologiques de muscle de souris double transgénique MCK-APP/PS1.

(A) Coloration H&E objectivant de nombreux noyaux centraux. (B) Immunomarquage des L_T CD8⁺ à proximité de fibres musculaires. (C) Immunomarquage des inclusions cellulaires constituées de protéine β-amyloïde. D'après Kitazawa et coll., 2006.

Ces modèles ont principalement permis de constituer un faisceau d'arguments suggérant l'implication d'un métabolisme défectueux du β-APP en amont des mécanismes pathologiques tardifs dans l'IBM. Il faut noter cependant que ces modèles présentent une pénétrance très variable de la maladie, aussi bien sur le plan histologique que phénotypique. Ils illustrent l'inflammation secondaire qui peut accompagner une myopathie d'étiologie initialement dégénérative, mais ne renseignent pas sur le mécanisme auto-immun à proprement parler.

3.5.4. Mutation de la GNE

Chez l'homme, des mutations spécifiques de l'UDP-N-acétylglucosamine 2-épipérase/N-acétylmannosamine kinase (GNE) ont été décrites comme étant associées à l'IBM héréditaire, la plus courante étant la *GNE* D176V (Eisenberg et al., 2001).

Afin de créer un modèle expérimental permettant l'étude physiopathologique de la maladie, Malicdan et coll. ont produit des souris invalidées pour la GNE exprimant la mutation humaine *GNE* D176V. Ces souris développent une pathologie liée à l'âge, caractérisée par une atrophie musculaire, une atteinte locomotrice et une augmentation des taux de CPK. L'examen anatomopathologique rapporte des inclusions amyloïdes dans les fibres musculaires qui, avec les signes cliniques, précèdent l'apparition de vacuoles bordées. Ces dernières sont marquées par la phosphatase acide révélant des mécanismes d'autophagie (Malicdan et al., 2007a). La physiopathologie de la maladie repose sur un mauvais apprêtement des protéines amyloïdes et un stress oxydatif précipité par des phénomènes d'hyposialylation (Malicdan et al., 2007b, 2008).

Il faut cependant noter qu'il s'agit ici d'un modèle d'IBM héréditaire peu pertinent pour l'étude des myosites en tant que maladies immunologiques.

3.5.5. Invalidation de la synaptotagmine VII

De façon fortuite, il a été montré que les souris déficientes en synaptotagmine VII (protéine impliquée dans certains phénomènes d'exocytose dépendants du calcium) développent une maladie musculaire progressive associant diminution de la force musculaire d'agrippement et augmentation des taux de CPK. Par ailleurs, le développement de la maladie chez ces souris est associé à l'apparition d'Ac anti-nucléaires (Chakrabarti et al., 2003). Sur le plan histologique, ces souris présentent une fibrose cutanée et surtout musculaire caractérisée par des dépôts endomysiaux de collagène et un infiltrat inflammatoire musculaire hétérogène composé de L_T , macrophages, neutrophiles et éosinophiles. Dans ce travail, les auteurs proposent un modèle physiopathologique lié à une immunisation vis-à-vis d'aAg musculaires libérés par le stress mécanique potentialisant une dysfonction de l'intégrité membranaire musculaire permettant une exposition des molécules intra-cytoplasmiques au système immunitaire. Cependant aucune expérience de transfert adoptif de cellules immunitaires ne permet de dire si ce modèle est réellement d'origine auto-immune.

3.5.6. Autres modifications génétiques

D'autres modèles murins impliquant des modifications génétiques induisent des atteintes musculaires. Cependant, nous ne détaillerons pas ces modèles ici soit par manque d'informations sur leur potentielle composante auto-immune soit en raison d'un phénotype où l'atteinte musculaire est au second plan. Leurs principales caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 8.

Ainsi les souris transgéniques pour la protéine prion, l'anticorps anti-NGF (*nerve growth factor*), la lipoprotéine lipase humaine, le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) murin, la protéine *tax* du virus HTLV-1, la VCP (*valosin-containing protein*), certains gènes des rétrovirus spumeux humains, le collagène de type XIII muté ou bien encore les souris SOCS-1^{-/-} IFN- γ ^{+/-} développent toutes des atteintes musculaires impliquant le plus souvent des signes de nécrose/régénération.

Tableau 8. Autres modèles de myopathie chez des animaux modifiés génétiquement.

	Animal	Sexe	Phénotype	Infiltrat	Principales caractéristiques	Réf
protéine prion (PrP)	souris C57BL/6		autre	noyaux centraux signes de nécrose/régénération variabilité de la taille des fibres	expression dans le SNC (cerveau et moelle épinière), le muscle squelettique, le cœur, les testicules effets délétères sur les neurones et cellules musculaires myopathie progressive	[43]
anti-NGF (anti-nerve growth factor)	souris Ly5.1		IBM	noyaux centraux, vacuolisation, quelques cellules infiltrantes marquage de l'APP activité ATPase diminuée	souris exprimant des Ac neutralisants contre le NGF neuropathie ++ : cerveau, nerfs périphériques myopathie : IBM-like sur-expression de p75	[44]
LPL (lipoprotéine lipase humaine)	souris C57BL/6 x CBA/J		autre	accumulation de glycogène dénégérescence musculaire atrophie, noyaux centraux augmentation du nombre de mitochondries et de peroxysomes	minigène du LPL minigène sous contrôle d'un promoteur spécifique du muscle augmentation de l'activité de la LPL dans le muscle squelettique et cardiaque diminution des taux de TG plasmatiques perte de poids (muscle et tissus adipeux) mort prématurée	[45]
GM-CSF murin	souris SJL x C57BL/6		autre	infiltrat de MΦ	augmentation des taux de GM-CSF (sérum, urine, péritoine et œil) accumulation de MΦ dans l'œil, le muscle, le péritoine et la plèvre mort (2-4 mois) avec fonte musculaire	[46]
protéine tax du virus HTLV-1	souris C57BL/6		autre	protéine tax exprimée dans les fibres musculaires atrophiques localisation cytoplasmique dégénérescence musculaire	prolifération des cellules associées aux nerfs périphériques & atrophie des fibres musculaires similitudes avec la myopathie associée aux rétrovirus humaine	[47]
VCP (valosin-containing protein)	souris		IBMPFD (IBM with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia)	vacuoles bordées monocytes infiltrants	les mutations touchent les interactions entre la région N-terminale de la VCP et les protéines adaptatrices qui modulent l'activité ATPase divers formes mutées de la VCP induisent une maladie systémique touchant le muscle, les os et le SNC	[48]
HFV (human foamy retrovirus)	souris		autre	atrophie musculaire variabilité de la taille des fibres noyaux centraux nécrose	les souris transgéniques expriment les gènes du HFV syndrome neurologique (ataxie, tétraparésie spastique, cécité) dégénérescence des cellules nerveuses atrophie dégénérescence focale musculaire similitudes avec l'atteinte neurologique associée à l'infection par les rétrovirus humains	[49]
Collagène type XIII muté	souris C57BL/6		autre	fibres anormales, membrane plasmatique & membrane basale épaissies (le long de la fibre et à la jonction musculotendineuse) myofilaments déstructurés fibres musculaires détachées de la membrane basale	adhésion fibroblastique diminuée phénotype progressif & aggravé par l'exercice myopathie progressive	[50]
SOCS-1^{-/-} IFN-γ^{-/-}	souris C57BL/6		autre	destruction des cellules musculaires infiltrats de L ₁ , MΦ, éosinophiles	<i>suppressor of cytokine signaling-1</i> (SOCS-1) mort dans les 160 jours après la naissance avec inflammations musculaire et myocardique infiltrats dans le cœur, la cornée, le poumon & les glandes salivaires similitudes avec la myocardite et la PM	[51]

[43] : Chiesa et al., 2001 ; [44] : Capsoni et al., 2000 ; [45] : Hoefler et al., 1997 ; [46] : Lang et al., 1987 ; [47] : Nerenberg and Wiley, 1989 ; [48] : Custer et al., 2010 ; [49] : Bothe et al., 1991 ; [50] : Kvist et al., 2001 ; [51] : Metcalf et al., 2000.

Au total, de nombreux efforts ont été mis en œuvre pour développer des modèles animaux de MI à des fins d'études cognitives. La plupart d'entre eux sont peu reproductibles ou limités du fait de biais tels que l'immunisation contre une protéine musculaire par exemple. Il n'existe donc aucun modèle spontané de MI permettant l'étude extensive des mécanismes physiopathologiques de nature primitivement auto-immune.

Dans le domaine des maladies à composante auto-immune, on peut noter que les modèles expérimentaux les plus utilisés, qu'ils soient induits ou spontanés, reposent sur une réponse immunitaire dirigée contre un ou des aAg partagé(s) entre la souris et l'homme (Tableau

9) (Bai et al., 2017; Burkhardt et al., 2005; Cho et al., 2007; Khare et al., 2017; Lazaridis et al., 2017; Lieberman and DiLorenzo, 2003; Mallone et al., 2011; Meriglioli and Sanders, 2012; Perry et al., 2011; Ramanathan et al., 2016). Concernant les MI, un fait notable est que les modèles utilisés reposent sur une immunisation active contre des Ag dont l'implication n'a pas été établie dans la pathologie humaine (mis à part l'HRS). L'existence d'un modèle spontané serait donc une réelle avancée pour permettre la recherche de nouveaux aAg.

Tableau 9. Cibles antigéniques de différentes maladies à composante auto-immune chez l'homme et dans les modèles expérimentaux.

Pathologie étudiée	Modèle murin	aAg cible de la réponse auto-immune	aAg partagé homme/souris ?	Référence	
Polyarthrite rhumatoïde	Induit	Arthrite induite au collagène	Collagène II	Oui (Ac + L _T spécifiques)	Burkhardt et al., 2005 Cho et al., 2007
Myasthénie		Immunisation contre RACH	RACH	Oui (Ac anti-RACH)	Lazaridis et al., 2017 Meriglioli and Sanders, 2012
Sclérose en plaques		EAE	Peptides de la myéline (MOG, PLP, MBP)	Oui (Ac anti-myéline)	Khare et al., 2017 Ramanathan et al., 2016
Lupus érythémateux systémique	Spontané	NZB/W F1	ADN	Oui (Ac anti-ADN)	Bai et al., 2017 Perry et al., 2011
Diabète de type 1		NOD	Entre autres : GAD65 HSP-60 IA-2 ICA-69 Insuline S100β	Oui (Ac + L _T spécifiques) Oui (Ac + L _T spécifiques) Oui (Ac + L _T spécifiques) Oui (Ac + L _T spécifiques) Oui (Ac + L _T spécifiques) Oui (L _T spécifiques)	Lieberman and DiLorenzo, 2003 Mallone et al., 2011

4. Voies de costimulation : des déficits immunitaires aux maladies auto-immunes

4.1. Les voies principales de régulation des lymphocytes T

L'activation des L_T ne dépend pas seulement de la signalisation engagée par la reconnaissance de l'antigène par le TCR, qui est nécessaire mais non-suffisante (Lafferty et al., 1980). Elle dépend aussi de l'engagement d'autres récepteurs membranaires qui jouent un rôle essentiel dans l'activation et la régulation des L_T (Baxter and Hodgkin, 2002). Ces molécules, qualifiées de molécules de costimulation, peuvent être engagées lors du contact entre le L_T et la CPA au niveau de la synapse immunologique et jouent un rôle déterminant dans l'activation, l'expansion et la survie des lymphocytes.

En l'absence d'engagement des molécules de costimulation, par exemple dans le contexte de la reconnaissance d'un Ag dans des conditions non-inflammatoires, la stimulation du TCR ne conduit pas à l'activation et l'acquisition des fonctions effectrices. Les travaux de Lafferty et coll., en 1980, avaient déjà montré que l'engagement du seul TCR, reconnaissant l'Ag présenté par une molécule de CMH, n'était pas suffisant pour conduire à son activation. Bien au contraire, en l'absence d'un signal de costimulation, les L_T stimulés deviennent anergiques (Schwartz et al., 1989), c'est-à-dire réfractaires à toute nouvelle stimulation par l'Ag (Figure 25A). Ce mécanisme participe, avec d'autres, au maintien de la tolérance aux Ag du soi et limite l'activation inappropriée des L_T notamment dans le contexte non-inflammatoire.

D'autre part, parallèlement à ces voies de stimulation positives de l'activation et de l'expansion des L_T , d'autres récepteurs membranaires, impliqués cette fois dans l'inhibition de ces voies, ont été découverts et ont été qualifiés de molécules de coinhibition (Boussiotis, 2016; Chen and Flies, 2013; Rudd et al., 2009). Le devenir d'une réponse T spécifique est ainsi déterminé par le nombre et la nature (activatrice ou inhibitrice) de ces molécules de régulation engagées lors du contact entre le L_T et la CPA dans le contexte de la synapse immunologique (Figure 25B). De manière plus large, ces molécules activatrices ou inhibitrices sont également qualifiées dans la littérature récente de molécules de contrôle immunitaire (*immune checkpoints*) et participent de manière prépondérante à la régulation des L_T . La compréhension fine de ces voies complexes de régulation demeure essentielle tant sur le plan de la compréhension de la physiopathologie des maladies auto-immunes que dans le domaine appliqué des biothérapies anti-cancéreuses.

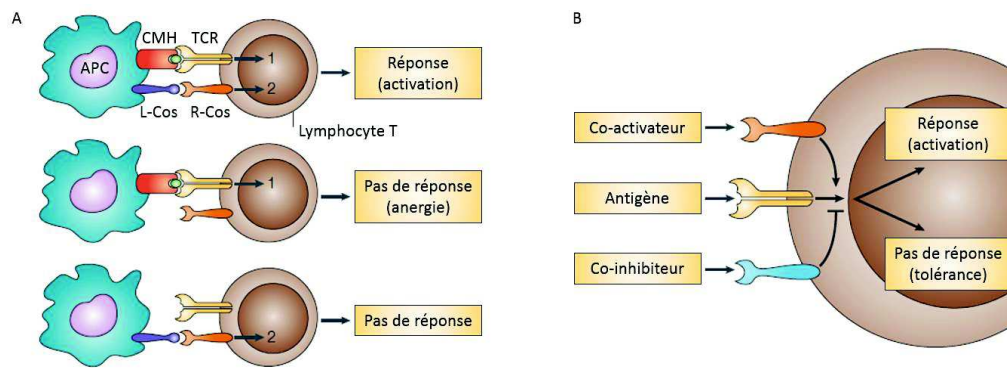


Figure 25. Costimulation lymphocytaire T.

(A) Importance de la costimulation pour l'activation des L_T : la reconnaissance par le TCR d'un Ag présenté par une molécule de CMH, à la surface d'une CPA conduit à une signalisation minimale qualifiée de manière schématique de « signal 1 ». Le « signal 2 » est quant à lui médié par l'engagement de molécules de costimulation, impliquant un récepteur de costimulation (R-Cos) et son ligand (L-Cos) exprimé par la CPA. L'engagement de ces deux voies moléculaires aboutit à l'activation du L_T . L'engagement uniquement de la voie de costimulation (signal 2 seul), en absence de reconnaissance antigénique, n'induit pas d'activation lymphocytaire. L'engagement du seul TCR (signal 1 seul) aboutit à un état d'anergie du L_T et participe à la tolérance immunitaire.

(B) Rôle des récepteurs des molécules de costimulation et de coinhibition dans la régulation des réponses lymphocytaires. L'activation du L_T est régulée par l'intégration de différentes voies moléculaires activatrices (signaux co-activateurs) ou inhibitrices (signaux co-inhibiteurs) engagés lors du contact avec la CPA. L'intensité, la qualité, et le devenir de la réponse T Ag-spécifique est ainsi déterminé par la balance entre ces signaux activateurs et inhibiteurs délivrés au L_T . Adapté de Chen, 2004.

L'expression de ces *immune checkpoints*, au moment et à l'endroit approprié, permettent ainsi de réguler positivement ou négativement l'activation, la prolifération, la différenciation et la maturation des réponses lymphocytaires T (Chen, 2004).

Les différentes voies de costimulation impliquées dans l'activation des L_T font intervenir des molécules appartenant à 4 superfamilles :

- la superfamille du TNF/récepteur du TNF (TNFR, *TNF receptor*)
- la superfamille TIM (*T-cell Ig and mucin domain*)
- la superfamille SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*)
- la superfamille CD28/B7.

4.1.1. Superfamille TNF/TNFR

La superfamille des TNF et TNFR comporte une cinquantaine de protéines (19 ligands et 29 récepteurs) ayant notamment une activité pro-inflammatoire par activation de la voie NF- κ B. Elles peuvent moduler la fonctionnalité des cellules du système immunitaire en jouant sur la

prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et la production de cytokines pro-inflammatoires. Il faut noter qu'en cas de production chronique ou non contrôlée, la plupart des membres de cette famille peuvent aussi avoir un effet délétère. Ainsi, le TNF- α joue un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire physiologique des L_B, mais joue également un rôle suite à sa surexpression dans diverses pathologies telles que les cancers, les maladies neurologiques, cardiovasculaires et auto-immunes par exemple. Les différentes activités de ces protéines peuvent être regroupées schématiquement selon 3 grands axes fonctionnels : la prolifération cellulaire, l'apoptose et la morphogenèse.

Les 19 ligands identifiés dans cette famille sont : le TNF- α , le TNF- β , la lymphotoxine- β , CD40L (CD154), FasL, CD30L (CD153), 4-1BBL, CD27L (CD70), OX40L (CD252), TRAIL (CD253, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), LIGHT (CD258), RANKL (CD254, *receptor activator of NF- κ B ligand*), TWEAK (CD255, *TNF-related weak inducer of apoptosis*), APRIL (CD256, *a proliferation-inducing ligand*), BAFF (CD257, *B-cell activating factor*), VEGI (vascular endothelial cell-growth inhibitor), EDA (ectodysplasin A) A1, EDA-A2 et GITRL (*glucocorticoid-induced TNF receptor-related ligand*) (Aggarwal et al., 2012; Croft et al., 2012). Nous ne détaillerons pas ici toutes les voies qui composent cette famille mais seulement les principales dont les fonctions sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Fonctions des principales voies de la famille TNF/TNFR.

Récepteur	Ligand	Fonction
CD40 (DC, macrophages, L _B)	CD40L (inductible L _T activés)	Activation, maturation, survie Production de cytokines pro-inflammatoires Commutation de classe et production d'IgG Présentation de l'Ag Activation cellulaire ($\uparrow$ molécules du CMH et de costimulation)
OX40 (L _T activés, NKT, NK)	OX40L (inductible CPA)	Expansion et accumulation des L _T effecteurs Production de cytokines pro-inflammatoires Production d'Ac
CD27 (L _T , certains L _B)	CD70 (inductible DC, L _T , L _B)	Accumulation, activation des L _T Activation des CPA Coopération T-B et production d'Ac
4-1BB (inductible L _T , ILC)	4-1BBL (inductible CPA professionnelles)	Accumulation et activation des L _T et ILC
HVEM (cellules activées : L _T , monocytes, DC)	LIGHT (cellules activées : L _T , monocytes, DC)	Autorégulation de l'activation des L _T
CD30 (L _T et L _B activés)	CD30L (L _B naïfs et L _T activés)	Prolifération lymphocytaire Production de cytokines pro-inflammatoires
GITR (Treg, L _T activés)	GITRL (inductible CPA professionnelles)	Stimulation des L _T , DC, L _B Production d'IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 Réponse régulatrice par stimulation des Treg

4.1.1.1. La voie CD40/CD40L

CD40 est exprimé de façon constitutive par les DC, les macrophages et les L_B ; tandis que CD40L est induit sur le L_T après activation. L'expression de CD40 sur les CPA permet d'induire leur activation, leur maturation et leur survie pour au final leur permettre de produire des cytokines pro-inflammatoires. L'expression de CD40 sur les L_B est également primordiale pour induire la commutation de classe et la production d'IgG (Allen et al., 1993; Peters et al., 2009; Splawski and Lipsky, 1994). CD40L permet également, *via* sa liaison à CD40 sur les CPA, de favoriser la présentation antigénique et l'activation cellulaire par augmentation du nombre de molécules du CMH et par induction de l'expression de molécules de costimulation comme CD86 et OX40L notamment (Blotta et al., 1996). Rappelons que CD40 est également exprimé à la surface des fibres musculaires en contexte inflammatoire (Sugiura et al., 2000).

4.1.1.2. La voie OX40/OX40L

OX40L (CD252) est exprimé de manière inductible sur diverses cellules, principalement les CPA. OX40 (CD134) est exprimé sur les L_T activés, les cellules NKT et les cellules NK. OX40L est capable d'induire divers effets par liaison à son récepteur OX40 tels que l'expansion et l'accumulation des L_T effecteurs CD4⁺ (Th1, Th2 et Th17) et CD8⁺ ainsi que la production de cytokines. En contrepartie, la signalisation *via* OX40L permet la production de cytokines inflammatoires par les CPA. Par ailleurs, les L_B activés expriment également OX40L qui participe à la production d'Ac (Croft, 2010).

4.1.1.3. La voie CD27/CD70

CD27 est exprimé constitutivement par la plupart des L_T. Son interaction avec son ligand, CD70, permet de contrôler l'accumulation et l'activation des L_T, comme précédemment la voie de OX40 (Locksley et al., 2001). De plus, CD70 est exprimé de manière inductible par les DC et les L_B, et permet un signal en retour pour l'activation des CPA, participe à la coopération entre L_T et L_B et à la production des Ac (Croft and Siegel, 2017).

4.1.1.4. La voie 4-1BB/4-1BBL

4-1BB (CD137) est un récepteur activateur exprimé de manière inductible par les L_T, les cellules lymphoïdes innées (ILC, *innate lymphoid cells*) et les cellules NK. Son ligand, 4-1BBL est également inductible et exprimé par les CPA professionnelles. Leur interaction promeut l'accumulation et l'activation des L_T et cellules lymphoïdes innées (Croft and Siegel, 2017; Croft et al., 2012; Navabi et al., 2015).

4.1.1.5. La voie HVEM/LIGHT

HVEM (CD270, *herpes virus entry mediator*) est exprimé par diverses cellules fraîchement activées telles que les L_T, les monocytes et les DC. Ce sont ces mêmes populations cellulaires qui, une fois activées, seront capable d'exprimer LIGHT (CD258, *lymphotoxin-like receptor expressed by T lymphocytes*) de façon retardée par rapport à HVEM. Quand LIGHT, sécrété ou exprimé à la membrane, se lie à HVEM, il induit alors sa disparition de la membrane cellulaire. Il s'agit donc d'un système d'autorégulation de l'activation des L_T et probablement d'autres cellules immunitaires également (Morel et al., 2000). L'activation passant par HVEM/LIGHT implique la voie NF-κB et la production de cytokines, principalement IFN-γ et GM-CSF (Granger and Rickert, 2003).

4.1.1.6. La voie CD30/CD30L

CD30 est exprimé par les L_T et les L_B après activation. En effet, son induction est largement dépendante de l'IL-4 et de l'activation de CD28. CD30L (CD153) est exprimé sur les L_B naïfs et sur les L_T activés. L'interaction du ligand avec son récepteur induit, par l'intermédiaire de la voie NF-κB, une prolifération lymphocytaire ainsi que la production de cytokines (Horie and Watanabe, 1998; Younes et al., 1996).

4.1.1.7. La voie GITR/GITRL

GITRL est exprimé de manière inductible par les CPA professionnelles et d'autres cellules comme les cellules endothéliales. GITR (CD357) est présent constitutivement à la surface des Treg et après engagement de la voie CD28 chez tous les L_T. Lorsque GITR interagit avec son ligand, GITRL, il permet l'activation de la voie NF-κB, la stimulation des L_T, des DC et des L_B ainsi que la production des cytokines suivantes : IL-2, IFN-γ, IL-4 et IL-10. Cette voie permet également de contrôler la plupart des réponses par leur action sur les Treg et la production massive d'IL-10 (Croft and Siegel, 2017; Kanamaru et al., 2004; Placke et al., 2010).

4.1.2. Superfamille TIM

La famille des gènes TIM a été découverte en 2001, dans une région génétique associée à de multiples maladies du système immunitaire chez la souris comme l'asthme, l'allergie, les maladies auto-immunes (Kuchroo et al., 2003). Chez la souris, 4 gènes codent pour les molécules TIM-1 à TIM-4. Chez l'homme, les gènes codant pour TIM-1, TIM-3 et TIM-4 sont conservés. Ces molécules ont été initialement identifiées comme spécifiquement exprimées par les L_T pour réguler leur réponse immunitaire, mais il a par la suite été découvert que ces molécules sont également exprimées par d'autres types de cellules immunitaires et possèdent des fonctions immunorégulatrices plus complexes. Ils sont en fait impliqués dans la régulation des différentes populations de L_T $CD4^+$, l'activation des CPA pour promouvoir l'inflammation, l'activation des L_T et la clairance des cellules apoptotiques (Kuchroo et al., 2008). Les principales caractéristiques de ces différentes molécules sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Ligand, expression cellulaire et fonctions connues des molécules TIM.

Protéine	Ligand	Expression	Fonction
TIM-1	Tim-4	L_T activés ; Th2 (hauts niveaux)	Promotion des réponses Th2
			Régulation des réponses pathogènes Th1 et Th17
			Diminution de la capacité de suppression des Treg
			Rôle dans la voie signalisation du TCR
TIM-2	SemaA4	Th2	Diminution des réponses Th2
TIM-3	Galectine 9	Th1 ; DC	Diminution des réponses Th1 (interaction avec la galectine 9)
			Action synergique avec les TLR pour induire l'inflammation
TIM-4	Tim-1	CPA	Promotion de la prolifération et de la survie des L_T
			Inhibition de l'activation des L_T naïfs
			Rôle possible dans la clairance des cellules apoptotiques

Adapté de Kuchroo et coll., 2008.

4.1.2.1. La voie TIM-1/TIM-4

TIM-1 (CD365), initialement décrit en tant que récepteur au virus de l'hépatite A (HAVR, *hepatitis A virus cellular receptor*), est exprimé par tous les L_T $CD4^+$ activés. Après différenciation, les Th2 continuent à exprimer TIM-1 à haut niveau alors que son expression diminue sur les Th1 et Th17. Son ligand, TIM-4 est exprimé par les CPA activées (Meyers et al., 2005; Rodriguez-Manzanet et al., 2008).

TIM-1 joue un rôle important dans la promotion des réponses Th2 par favorisation de la production d'IL-4 et d'IFN- γ (de Souza et al., 2005). De plus, TIM-1 augmente les réponses Th1 et

Th17 et diminue la capacité de suppression des Treg (Degauque et al., 2008). De façon intéressante, l'affinité de la liaison à TIM-1 semble jouer un rôle et moduler la signalisation et les réponses ainsi induites. TIM-4 agit comme une molécule costimulatrice pour la régulation de l'expansion et la survie des L_T . Lorsque TIM-1 est son ligand, il augmente l'activation cellulaire, mais il existe au moins un autre ligand encore non identifié qui inhibe l'activation cellulaire *via* TIM-4 (Kuchroo et al., 2008; Rodriguez-Manzanet et al., 2009).

4.1.2.2. La voie TIM-2/Sema4A

TIM-2 est surexprimé préférentiellement par les Th2 et semble être un régulateur diminuant spécifiquement les réponses Th2 (Chakravarti et al., 2005; Kuchroo et al., 2008). Son ligand est la sémaphorine A4 (semaA4), exprimée par les DC dérivées de la moelle osseuse (Kumanogoh et al., 2002). Cette voie n'est pas encore bien connue.

4.1.2.3. La voie TIM-3/galectine 9

TIM-3 (CD366) est exprimé par des cellules de l'immunité innée (DC principalement) et des cellules de l'immunité adaptatives différenciées (Th1) (Kuchroo et al., 2008). Son ligand est la galectine 9 exprimée par les Th activés (Th1 et Th17) et les Treg. Lorsque TIM-3 est exprimé par les DC, il a un rôle activateur en agissant en synergie avec les *toll-like receptors* (TLR) pour augmenter les phénomènes inflammatoires (Anderson et al., 2007). A l'inverse, l'action de TIM-3 sur les Th1 est inhibitrice. En effet, l'expression de TIM-3 sur les cellules différenciées en Th1 va augmenter l'expression de la galectine 9 *via* la production d'IFN- γ . Lorsque la galectine 9 se fixe sur le TIM-3 des Th1, elle induit la mort de ces cellules et inhibe donc la réponse Th1 (Zhu et al., 2005).

4.1.3. Superfamille SLAM

La superfamille SLAM est constituée de 6 récepteurs homotypiques (pouvant se lier à eux-mêmes) et exprimés exclusivement par les cellules hématopoïétiques : SLAMF1 (CD150), SLAMF3 (CD229), SLAMF4 (CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (CD352) et SLAMF7 (CD319) (Wu and Veillette, 2016). Les récepteurs SLAM ont pour particularité de se lier à des protéines adaptatrices de la famille SAP (*SLAM-associated protein*) de différents types. Ces protéines sont principalement exprimées par les L_T et les cellules NK (Veillette, 2006). Les membres de la famille SLAM ont tout

d'abord été décrits pour avoir un effet activateur. Cependant, les effets inhibiteurs de cette voie ont par la suite été mis en évidence grâce à l'identification d'une mutation inactivatrice au niveau du gène codant pour SAP (*SH2D1A*) chez des patients atteints de syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (Veillette et al., 2013). Les membres de cette famille peuvent donc avoir une double fonctionnalité passant notamment par les protéines adaptatrices SAP, permettant de réguler la voie de signalisation liée à SLAM. Ainsi, ces récepteurs peuvent médier des signaux positifs ou négatifs, notamment sur le L_T $CD8^+$, en modulant sa cytotoxicité et la formation de sa synapse immunologique avec le L_B (Dong et al., 2012; Zhao et al., 2012).

4.1.4. Superfamille CD28/B7

Cette superfamille comprend d'une part CD28 et ICOS (CD278) en tant que molécules activatrices ; et CTLA-4 et PD-1 (CD279, *programmed cell death*) d'autre part comme molécules inhibitrices (Figure 26). La famille CD28/B7, comprenant les molécules CD28, CD80/86 et CTLA-4 (CD152), est la première à avoir été caractérisée au sein de cette superfamille, avec notamment la découverte de la molécule CD28 (June et al., 1990) puis de la molécule CTLA-4 (Linsley et al., 1991).

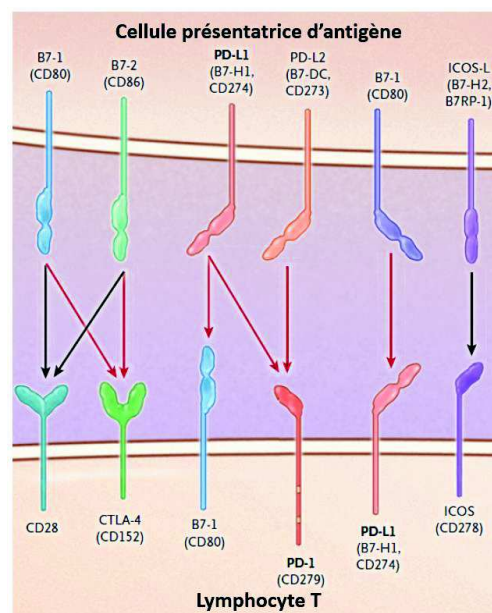


Figure 26. Molécules de costimulation de la superfamille CD28/B7.

Les flèches noires indiquent les signaux activateurs et les flèches rouges les signaux inhibiteurs. Adapté de Boussiotis, 2016.

4.1.4.1. Voie CD28/B7

La voie CD28/B7 comprend les récepteurs CD28 (activateur) et CTLA-4 (CD152, inhibiteur) et leurs ligands communs CD80 et CD86 (Figure 27). Il s'agit de la voie de costimulation principale lors de l'activation des L_T (Rudd et al., 2009).

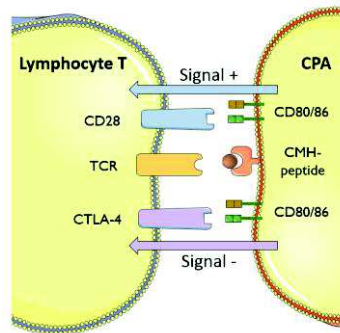


Figure 27. Molécules appartenant à la voie CD28/B7.

Lors de leur liaison à leurs ligands communs CD80/86 et après engagement du TCR, la molécule CD28 induit un signal activateur tandis que la molécule CTLA-4 induit un signal inhibiteur au lymphocyte T.

❖ Molécule CD28 :

La molécule CD28 est exprimée de manière constitutive à la surface des L_T . La liaison de CD28 à ses ligands, les molécules B7 (CD80/86), produit un signal activateur principalement par stabilisation des ARN messagers codant pour les cytokines et amplification de l'activation des voies NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) et NF- κ B (Chen and Flies, 2013; Kalli et al., 1998; Rincón and Flavell, 1994). Bien que le rôle de CD28 soit principalement décrit pour son caractère activateur des L_T , il faut noter qu'il s'agit également d'une molécule cruciale pour le développement et la fonctionnalité des Treg naturels (ou thymiques) mais pas des Treg induits en périphérie (Belghith et al., 2003; Bour-Jordan and Bluestone, 2009; Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007).

❖ Molécule CTLA-4 :

La molécule CTLA-4 est exprimée à la surface des L_T de manière inductible, après engagement du TCR et signalisation *via* CD28 (après signal 1 et 2). Il faut noter que, *a contrario*, les Treg expriment constitutivement CTLA-4 et qu'il participe à leurs fonctions immunosuppressives (Takahashi et al., 2000).

CTLA-4 se lie à CD80/86 avec une affinité plus grande que CD28 (van der Merwe et al., 1997), ce qui crée une compétition entre les 2 molécules permettant d'inhiber dans un second temps l'activation produite initialement par la liaison des ligands au récepteur CD28. Cette inhibition passe par une régulation négative de la production de cytokines et du cycle cellulaire. Ainsi, CTLA-4 inhibe l'activation lymphocytaire de manière à réduire la lymphoprolifération et les réponses auto-immunes (Chikuma and Bluestone, 2003). CTLA-4 est également capable de limiter la signalisation *via* le TCR en diminuant d'une part la force de contact entre le L_T et la CPA, et d'autre part en déstabilisant la liaison au TCR. Cette déstabilisation de la liaison au TCR passe par l'altération des fonctions de la CPA, la production de l'enzyme immunosuppressive IDO (*indoleamine 2,3 dioxygenase*) et la régulation négative des molécules de costimulations exprimées par la CPA (Bour-Jordan and Bluestone, 2009; Rudd et al., 2009; Sharpe, 2009).

Grâce à ces différents mécanismes d'action, CTLA-4 inhibe les réponses T et régule la tolérance périphérique.

❖ Molécules B7 :

Deux molécules sont comprises sous cette dénomination : la molécule B7.1 (CD80) et la molécule B7.2 (CD86). Ce sont les ligands des molécules de costimulation CD28 et CTLA-4 citées ci-avant. Ils sont exprimés par les macrophages, les DC et les L_B activés. CD80 peut également être exprimé par les L_T après activation. Les 2 ligands ont des cinétiques d'expression différentes. CD86 est exprimé constitutivement à bas niveau et est rapidement sur-exprimé, tandis que CD80 est exprimé de façon inductible et plus tardivement que CD86 (Greenwald et al., 2005; van der Merwe and Davis, 2003).

De façon intéressante, la signalisation induite est bidirectionnelle, c'est-à-dire que côté récepteur, le L_T reçoit un signal activateur ; côté ligand, le L_B par exemple reçoit un signal augmentant la production d'IgG1 et d'IgE (Podojil and Sanders, 2003; Podojil et al., 2004).

4.1.4.2. Voie PD-1/PD-L1

La voie inhibitrice composée du récepteur PD-1 (CD279) et ses 2 ligands PD-L1 (CD274, *ligand of PD-1*) et PD-L2 (CD273) joue un rôle primordial, *via* la voie NFAT (Oestreich et al., 2008), dans la prévention de l'auto-immunité et le maintien de l'état de tolérance en périphérie (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). PD-1, initialement décrit pour être préférentiellement exprimé par les cellules apoptotiques (Ishida et al., 1992), est en réalité un

récepteur délivrant des signaux inhibiteurs décrit pour avoir un rôle majeur dans la tolérance périphérique et la prévention de l'auto-immunité. Ceci a notamment été montré chez les souris BALB/c *PD-1*^{-/-} qui développent spontanément une cardiomyopathie dilatée auto-immune contrairement aux souris BALB/c WT (Nishimura et al., 2001). Les cinétiques d'expression indiquent également que la surexpression de PD-1 est une conséquence physiologique de l'activation du L_T nécessaire pour mettre fin à la réponse immunitaire.

PD-1 est exprimé par les L_T matures de façon inductible après activation par engagement du TCR et de certaines cytokines. Il est également exprimé à faible niveau par les thymocytes double négatifs (CD4⁻CD8⁻), les cellules NKT, les L_B, les monocytes et les cellules de Langerhans immatures (Boussiotis, 2016). PD-L1 est constitutivement exprimé à bas niveau par les CPA ou d'autres cellules non hématopoïétiques (cellules endothéliales, îlots pancréatiques, sites immuno-privilégiés tels que le placenta, l'œil). Par ailleurs, son expression est fortement augmentée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α ainsi que par le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Boussiotis, 2016). Rappelons que PD-L1 est exprimé par les fibres musculaires en conditions inflammatoires (Wiendl et al., 2005). PD-L2 est exprimé par les DC et les macrophages après activation et est augmenté par les mêmes cytokines que précédemment (Boussiotis, 2016). Enfin, PD-L1 peut également se lier au CD80 exprimé par les L_T pour induire un signal inhibiteur (Butte et al., 2007).

Les deux voies coinhibitrices majeures que sont CTLA-4/B7 et PD-1/PD-L1 sont les principaux *immune checkpoints* ciblés par les nouvelles biothérapies dans la lutte contre le cancer afin de promouvoir la réponse antitumorale avec des résultats thérapeutiques remarquables dans plusieurs types de cancers (Boussiotis, 2016; Topalian et al., 2012).

4.1.4.3. Voie ICOS/ICOSL

Le gène *Icos*, situé sur le chromosome 2q33-34, est constitué de 5 exons comprenant 2620 nucléotides codant pour une protéine de 199 acides aminés. Comme son nom l'indique, l'*inducible costimulator* ICOS (CD278) est exprimé à taux faible par les L_T naïfs et son expression est rapidement augmentée après activation *via* la formation du complexe TCR/CMH-peptide et la costimulation par CD28. Après activation, ICOS est donc exprimé par les L_T CD4⁺ non orientés mais également par les lymphocytes engagés dans les voies Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg. ICOS reconnaît spécifiquement ICOSL (CD275) exprimé par les APC, y compris les L_B (Akiba et al., 2005; Simpson et al., 2010; Yoshinaga et al., 1999). L'expression de ce dernier semble être modulée par ADAM10

(A Disintegrin and Metalloproteinase 10) (Lownik et al., 2017). Rappelons également que le muscle inflammatoire peut exprimer ICOSL (Schmidt et al., 2004).

Chez l'homme, ICOSL est également capable de se lier à CD28 et CTLA-4, ce qui n'est cependant pas le cas chez la souris (Yao et al., 2011).

La voie ICOS/ICOSL, passant par une signalisation impliquant la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), promeut la prolifération, la survie des T_H , la polarisation des réponses T et la production d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-21. Tout d'abord décrite pour induire des réponses Th2 (McAdam et al., 2000), il a par la suite été montré que selon le microenvironnement cytokinique, la liaison de ICOS à son ligand peut aussi orienter la réponse vers un profil Th1, Th17 ou encore Tfh. Il a été démontré que ICOS joue également un rôle dans le développement des Tfh (Bauquet et al., 2009; Choi et al., 2011). Par ce biais, la voie ICOS/ICOSL est impliquée dans la formation des centres germinatifs et la commutation de classe des Ac (Akiba et al., 2005; Simpson et al., 2010; Tafuri et al., 2001). Au total, la voie ICOS/ICOSL joue donc un rôle important dans l'activation lymphocytaire.

Cependant, ICOS peut également avoir un rôle dans l'instauration de la tolérance. Tout d'abord, des expériences d'immunisation ont montré que dans un contexte inflammatoire important, une réponse immunitaire forte peut être induite en l'absence de la voie ICOS/ICOSL. ICOS ne semble donc pas indispensable à la réponse immunitaire. Ce sont les travaux de Burmeister et coll. qui ont montré en premier que la voie ICOS/ICOSL exerce un rôle crucial pour les Treg (Burmeister et al., 2008). Comme abordé précédemment, ICOS est également exprimé par les Treg et notamment les Treg induits (iTreg). Concernant d'abord les Treg naturels (nTreg), ICOS ne semble pas impliqué dans leur génération, mais semble promouvoir leur prolifération et leur survie (Simpson et al., 2010). Il joue par contre un rôle majeur dans l'induction et l'expansion des iTreg ainsi que sur leur capacité suppressive vis-à-vis d'un Ag spécifique (Zheng et al., 2013). Ainsi, il existe des arguments indiquant que la voie ICOS/ICOSL joue un rôle primordial dans la tolérance, à la fois chez l'homme et la souris. Dans un modèle de sclérose en plaque induit chez la souris SJL par immunisation contre la protéine PLP (*proteolipid protein*), il est bien démontré la bivalence de la voie ICOS/ICOSL. Lorsque ICOS est bloqué durant la phase efférente de la réponse immunitaire, la maladie est stoppée ; tandis que le blocage de ICOS lors du *priming* exacerbe la maladie (Rottman et al., 2001). Ainsi, l'induction de la sclérose en plaque expérimentale (EAE) par immunisation (CFA + MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) chez des souris C57BL/6 *Icos*^{-/-} provoque une maladie beaucoup plus grave et avec une mortalité importante (Dong et al., 2001; Hubo et al., 2013). ICOS semble donc jouer un rôle important dans l'initiation de la tolérance

périphérique. Il a d'ailleurs été montré que les DC immatures, exprimant fortement ICOSL dans un contexte de stimulation faible par CD28, stabilisent l'expression du récepteur à l'IL-10 à la surface des L_T . Ainsi, les faibles taux d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) produits par la DC immature sont captés par le L_T , lui procurant ainsi des fonctions immunosuppressives et empêchant sa différenciation en L_T effecteur (Figure 28). Enfin, après stimulation répétée par la DC immature, le L_T se différencie en iTreg (Hubo et al., 2013; Ito et al., 2007; Jonuleit et al., 2000).

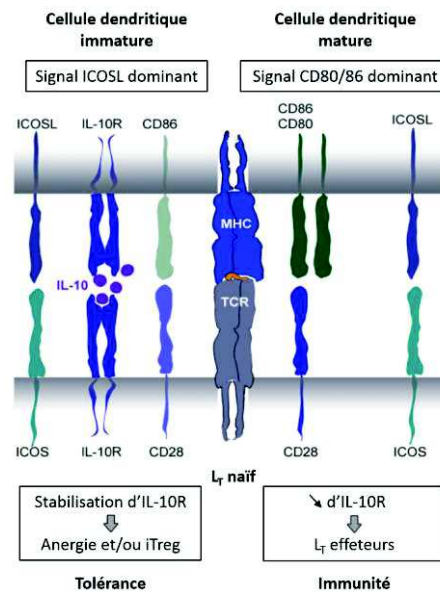


Figure 28. Rôle tolérigène ou immunogène de la voie ICOS/ICOSL selon l'état de la signalisation par CD28 : l'exemple des cellules dendritiques.

Les DC immatures expriment de faibles taux de CD86 et apportent un signal ICOS fort, aboutissant à la stabilisation d'IL-10R à la surface des L_T naïfs. Par conséquent, la production d'IL-10 par la DC induit soit un état d'anergie du L_T soit sa différenciation en iTreg. A l'inverse, la DC mature, exprimant fortement CD80 et CD86, apporte un signal CD28 fort qui dépasse la capacité tolérigène de ICOS et induit la différenciation du L_T en effecteur. Adapté de Hubo et coll., 2013.

Finalement, la voie ICOS/ICOSL possède de multiples implications dans :

- la prolifération, la survie et la polarisation des L_T effecteurs
- le maintien des L_T effecteurs mémoires
- la production d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-21
- la formation de centres germinatifs et la commutation de classe *via* les Tfh
- l'induction de la tolérance périphérique
- la survie des nTreg
- l'induction et les fonctions immunorégulatrices des iTreg.

4.2. Conséquences d'un déficit en ICOS chez l'homme

Les travaux de Grimbacher et coll., en 2003, ont identifié pour la première fois une mutation de ICOS chez des patients atteints de déficit immunitaire commun variable ; maladie définie par une diminution des taux d'IgG associée à une incapacité à monter une réponse humorale spécifique après vaccination ou infection. Ainsi, au sein d'une cohorte de 32 patients atteints de déficit immunitaire commun variable, sont identifiés 4 patients (issus de 2 familles) porteurs d'une délétion homozygote comprenant une partie de l'intron 1, la totalité de l'exon 2, de l'intron 2, de l'exon 3 et une partie de l'intron 3 du gène codant pour ICOS (Figure 29). Cette mutation, de transmission autosomique récessive, cause un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon-stop aboutissant à une protéine ICOS tronquée non fonctionnelle (Grimbacher et al., 2003).



Figure 29. Délétion mise en évidence chez les 4 premiers patients identifiés pour un déficit en ICOS.

Délétion de 1815 paires de bases (partie grisée) dans le gène *Icos* incluant une partie de l'intron 1, l'exon 2, l'intron 2, l'exon 3 et une partie de l'intron 3. D'après Grimbacher et coll., 2003.

L'année suivante, la même équipe identifie 5 nouveaux cas (issus de 2 familles) porteurs de la même mutation dans une cohorte de 213 patients (181 atteints de déficit immunitaire commun variable sporadiques et 13 atteints de la forme à transmission autosomique récessive) (Salzer et al., 2004).

En 2009, une équipe japonaise publie une étude rapportant 2 nouveaux cas au sein de la même fratrie atteints d'un déficit en ICOS issu d'une délétion différente (Takahashi et al., 2009). En 2015, 2 équipes rapportent chacune 2 cas de déficit en ICOS : un *case-report* à propos de 2 frère et sœur par une équipe anglaise (Robertson et al., 2015) et un autre concernant 2 autres frère et sœur koweïtiens par une équipe de Boston (Chou et al., 2015).

Le déficit en ICOS comprend des signes cliniques caractéristiques d'un déficit immunitaire cellulaire et humorale. Les signes cliniques associés au déficit en ICOS sont ceux d'un défaut de coopération entre les L_T et les L_B . Ils ressemblent donc à ceux du déficit plus connu en CD40L (Robertson et al., 2015). Le phénotype clinique est cependant assez variable, allant des classiques

manifestations infectieuses, à de la diarrhée réfractaire chez l'enfant en passant par la néoplasie chez l'adulte. La manifestation clinique la plus récurrente est la présence d'infections respiratoires (Yong et al., 2009). Fait important, un tableau auto-immun est parfois associé, confortant chez l'homme le rôle immunorégulateur de ICOS (Robertson et al., 2015). Le Tableau 12 répertorie les principales informations concernant les 15 patients atteints d'un déficit en ICOS identifiés dans la littérature à ce jour.

Chez ces patients, le déficit en ICOS affecte de manière importante la formation des centres germinatifs (Bossaller et al., 2006; Warnatz et al., 2006) et semble diminuer le nombre de Tfh (Ma et al., 2015; Shekhar and Yang, 2012) qui peuvent cependant se trouver dans la norme basse par rapport aux sujets sains (Robertson et al., 2015). Le taux de L_B est généralement bas chez les adultes, tandis qu'il est normal (voir élevé) chez les enfants. Quel que soit l'âge, un déficit partiel en L_B mémoires non commutés ($CD19^+CD27^+IgD^+$) et complet en L_B mémoires commutés ($CD19^+CD27^+IgD^-$) sont généralement observés. L'ensemble de ces affections est lié à un défaut de commutation de classe engendrant une hypogammaglobulinémie et expliquant l'absence de réponse vaccinale. Le déficit en IgG est souvent accompagné d'un déficit en IgA, parfois d'une augmentation du taux d'IgM (Bacchelli et al., 2007; Yong et al., 2009).

Le compartiment lymphocytaire T, quant à lui, semble peu affecté par ces mutations d'après les premières études qui ne rapportent pas de défaut majeur autre que la diminution des Tfh et un défaut de production d'IL-10 et d'IL-17. Ces premières observations vont cependant à l'encontre des données de l'équipe de Takahashi et coll. qui semblent montrer des anomalies des L_T chez leurs 2 patients, avec notamment une diminution des L_T mémoires (Robertson et al., 2015; Takahashi et al., 2009; Yong et al., 2009).

Le traitement par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques peut être envisagé pour corriger la mutation. Elle a actuellement permis de guérir un des patients koweïtiens de sa diarrhée chronique (Chou et al., 2015). Par ailleurs, le traitement de ce déficit immunitaire repose généralement sur une combinaison comprenant des IgIV, une prophylaxie antibactérienne et antivirale (Robertson et al., 2015).

Tableau 12. Principales informations cliniques des patients atteints de déficit en ICOS.

	Age de début	Signes cliniques	Traitement		
Famille A					
Patient 1 (♀)	27 ans	infections respiratoires (hautes et basses) récurrentes, y compris des pneumonies impetigo à <i>S. aureus</i> , carcinome vulvaire suite à infection à HPV à 34 ans, décès de son carcinome à 44 ans	IgIV	[51]	
Patient 2 (♂)	19 ans	infections respiratoires (hautes et basses) récurrentes, giardiases, salmonelloses et entérite à <i>C. enteritis</i> avec hyperplasie nodulaire lymphoïde, kératite herpétique récurrente	IgIV		
Famille B					
Patient 3 (♂)	6 ans (1ère pneumonie) 28 ans (infections récurrentes)	infections respiratoires hautes récurrentes	IgIV		
Patient 4 (♂)	12 ans (1ère pneumonie) 19 ans (infections récurrentes)	infections respiratoires récurrentes, y compris des pneumonies, entérite à <i>Salmonelle</i> récurrente, granulomatose cutanée inflammatoire chronique	IgIV		
Famille C					
Patient 5 (♂)	15 ans	bronchites, sinusites et pneumonies récurrentes, infections respiratoires hautes associées à des éruptions herpétiques, splénomégalie et adénopathie modérées, épisode isolé de neuroborréliose	IgIV interrompues puis reprises		
Patient 6 (♂)	12 ans	infections respiratoires hautes récurrentes et éruptions herpétiques, hépatomégalie, neutropénie auto-immune chronique	corticothérapie orale pour la neutropénie		
Famille D					
Patient 7 (♀)	8 ans	pneumonies récurrentes avec tissu cicatriciel, infections pulmonaires récurrentes entraînant une bronchectasie	antibioprophylaxie peu efficace, IgIV à partir de 15 ans		
Patient 8 (♀, jumelle dizygote)	asymptomatique à 5 ans	hypogammaglobulinémie (IgG<3g/L) asymptomatique			
Patient 9 (♂, jumeau dizygote)	18 mois	hyperplasie nodulaire lymphoïde entraînant une diarrhée aqueuse et sangulante sans pathogène identifié	IgIV		
Famille E					
Patient 10 (♂)		infections cutanées modérées, atteintes cutanées à type de psoriasis		[52]	
Patient 11 (♀)	enfance (infections virales prolongées) 34 ans (diagnostic de DICS)	déficit immunitaire associé à polyarthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire chronique de l'intestin, pneumonie interstitielle et psoriasis, diarrhée	IgIV, prednisolone, MTX		
Famille F					
Patient 12 (♀)	2 ans	diarrhée chronique de selles aqueuses, douleurs abdominales, fièvre, léthargie, perte de poids, infection à HHV6 décès suite aux complications de la GSCH	IgIV et GCSH	[53]	
Patient 13 (♂)	2 ans	diarrhée chronique	pas de traitement		
Famille G					
Patient 14 (♂)	1 mois	infection respiratoire aiguë à <i>Candida</i> , virémie à CMV, diarrhée chronique associée à une colite 2 ans : infection respiratoire à <i>P. jirovecii</i> jumelle décédée suite à un sepsis	GCSH (guérison de la diarrhée)	[54]	
Patient 15 (♀)	3 ans	diarrhée chronique, pas d'infection chronique, réponse vaccinale incomplète pour le pneumocoque mais protective pour le tétanos			

[51] : Yong et al., 2009 ; [52] : Takahashi et al., 2009 ; [53] : Robertson et al., 2015 ; [54] : Chou et al., 2015.

HPV : *human papillomavirus* ; MTX : méthotrexate ; HHV : *human herpesvirus* ; CMV : cytomégalovirus ; GCSH : greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Bien que ICOS soit une molécule exclusivement exprimée par les L_T, les patients atteints d'un déficit en ICOS présentent majoritairement un phénotype d'atteinte du compartiment B. Ce déficit touche donc principalement le phénomène de coopération entre les L_T et les L_B, dans lequel la voie ICOS/ICOSL joue un rôle particulièrement important.

4.3. Conséquences d'un déficit de costimulation chez la souris NOD

Comme indiqué précédemment, l'invalidation du gène *Icos* chez la souris de fond génétique C57BL/6 conduit à un défaut de coopération entre les L_T et les L_B ainsi qu'à un défaut qualitatif et quantitatif en Treg. Nous aborderons ici le cas particulier des souris de fond auto-immun NOD qui constituent le modèle utilisé dans cette thèse.

4.3.1. Souris NOD

❖ Généralités :

La souris NOD est le modèle classique d'étude du DT1 ou diabète auto-immun. Le DT1 est une maladie auto-immune caractérisée par une activation de L_T auto-réactifs conduisant à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans productrices d'insuline. La conséquence de cette destruction est l'absence de régulation de la glycémie. La souris NOD a la particularité d'être un modèle spontané et de développer des atteintes très similaires à celles des patients atteints de DT1 avec la présence d'aAc dirigés contre des Ag pancréatiques, de L_T $CD4^+$ et $CD8^+$ auto-réactifs ainsi qu'une susceptibilité génétique. A ce jour, ce modèle a notamment permis d'identifier de multiples aAg et biomarqueurs du DT1 (Anderson and Bluestone, 2005; Pearson et al., 2016). Il faut cependant noter que les souris NOD présentent un fond génétique très auto-immun et sont enclines à développer d'autres manifestations auto-immunes telles qu'une sialite (Hu et al., 1992), une thyroïdite (Many et al., 1996) ou encore une prostatite (Anderson and Bluestone, 2005). Ce fond auto-immun fait également de la souris NOD un modèle particulièrement sensible pour l'induction de certaines maladies expérimentales par immunisation, telles que la sclérose en plaque expérimentale (Ignatius Arokia Doss et al., 2015).

Ces souris, générées par Makino et coll. en 1980, développent un diabète caractérisé par une polyurie, une polydipsie, une glycosurie et une hyperglycémie. La maladie est d'apparition brutale et d'incidence plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Au niveau pancréatique, un infiltrat de lymphocytes est présent, entourant (péri-insulite) puis envahissant (insulite) les îlots de Langerhans et engendrant une réduction du nombre et de la taille de ces îlots (Makino et al., 1980). L'infiltrat est hétérogène et composé de L_T $CD4^+$, $CD8^+$, de cellules NK, de L_B , de DC et de macrophages.

Il a été montré par des expériences de transfert de splénocytes et de leurs sous-populations que la physiopathologie du DT1 chez la NOD repose sur la présence à la fois des L_T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Bendelac et al., 1987; Wicker et al., 1986). *A contrario*, le transfert des aAc ne déclenche pas la maladie ; cependant, les souris génétiquement déficientes en L_B ne développent pas de diabète. Les travaux de Serreze et coll. ont montré que les L_B ont en fait un rôle crucial dans la présentation antigénique pour déclencher la réponse lymphocytaire T diabétogène (Serreze et al., 1998).

De façon intéressante, certaines similitudes sont observées au niveau structural entre les molécules du CMH de la souris NOD et celles des patients atteints de DT1 (Todd et al., 1987). De plus, les Ag reconnus par le système immunitaire sont souvent les mêmes dans les 2 espèces (Tableau 13). Retenons que les 3 aAg majeurs sont l'insuline, l'enzyme GAD (*glutamic acid decarboxylase*) et la protéine IA-2 (*islet antigen 2*) (Lieberman and DiLorenzo, 2003). De plus, il a récemment été montré par Pérol et coll. qu'une réponse lymphocytaire T et B anti-IL-2 est présente à la fois chez l'homme et la souris (Pérol et al., 2016).

Tableau 13. Cibles antigéniques des réponses immunitaires dans le diabète de type 1.

Auto-antigène	Souris NOD	Patient atteint de diabète de type 1		
		Auto-anticorps	L_T $CD4^+$	L_T $CD8^+$
Insuline	+	+	+	+
GAD65	+	+	+	+
IA-2	+	+	+	+
IGRP	+		+	+
ZnT8		+	+	+
HSP-70	+	+	+	
IAPP	+			+

IGRP : *islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein* ; ZnT8 : *Zinc transporter 8* ; HSP : *heat shock protein* ; IAPP : *islet amyloid polypeptide*.

Adapté de Baker et coll., 2013; Dang et coll., 2011; Énée et coll., 2012; Kudva et coll., 2001; Mallone et coll., 2011.

❖ Génétique :

Sur le plan génétique, de multiple loci contrôlent la susceptibilité des souris NOD au diabète. Tout d'abord, le CMH joue un rôle majeur dans l'apparition du diabète. Les souris NOD expriment les molécules H-2K^d pour le CMH-I et I-A^{g7} pour le CMH-II. Habituellement, le CMH-II murin est composé de molécules I-A et I-E. Chez la souris NOD, le CMH-II n'exprime pas de molécules I-E à cause d'une délétion au niveau du locus codant pour la chaîne α de la molécule I-E. Le CMH-II est donc composé uniquement de molécules I-A, qui elles-mêmes contiennent une

mutation en leur chaîne β (Acha-Orbea and McDevitt, 1987) entraînant une modification du répertoire des Ag présentés par le CMH (Kanagawa et al., 1998).

En plus de ces spécificités au niveau du CMH, environ 20 autres loci favorisent l'apparition du diabète chez la souris NOD et sont appelés *Idd* (Todd and Wicker, 2001). Par exemple, le locus *Idd5* contenant les gènes codant pour CTLA-4 et ICOS a été identifié pour être étroitement lié à l'apparition du diabète et induit un épissage différent de CTLA-4 chez la NOD (Ueda et al., 2003).

Le locus *Idd3* (Wicker et al., 1994) également lié à l'apparition du diabète, régule la transcription de l'IL-2. Chez la souris NOD, le locus *Idd3* induit une diminution de production d'IL-2 par rapport aux autres lignées, notamment par les L_T CD8⁺. L'IL-2, initialement identifiée comme cytokine promotrice de la population T générale alors appelée *T-cell growth factor*, stimule à faible dose spécifiquement les Treg, qui expriment le récepteur de haute affinité à l'IL-2 (Malek and Bayer, 2004; Nelson, 2004; Yu et al., 2015). Cette diminution de production d'IL-2 chez la souris NOD a été identifiée comme responsable d'une diminution du recrutement des Treg ainsi que d'une diminution de leurs fonctions immunosuppressives (Pérol et al., 2016; Yamanouchi et al., 2007).

Enfin, il faut noter le rôle du microbiote intestinal, très étudié ces dernières années, sur les modifications des réponses immunitaires par diverses voies dont celle des *toll-like receptors* (TLR) (Pearson et al., 2016). Nous ne le développerons cependant pas cet aspect dans ce travail.

❖ Défaut de tolérance centrale :

La souris NOD présente un défaut de sélection thymique par différents mécanismes impliquant : la protéine Aire (*auto-immune regulator*), les molécules du CMH-II et les voies de l'apoptose.

Le thymus est le lieu de sélection (positive puis négative) des L_T permettant de créer leur répertoire de reconnaissance antigénique. Pour ce faire, les Ag de l'organisme doivent leur être présentés, y compris les Ag tissu-spécifiques tels que l'insuline. Les travaux de Thébaud-Baumont et coll. ont montré l'importance de la sélection thymique grâce aux souris NOD invalidées pour la proinsuline 2. En effet, la souris possède 2 isoformes de proinsuline avec des profils d'expression tissulaire différents : tandis que les 2 sont exprimés dans le pancréas, seule la proinsuline 2 l'est dans le thymus. L'expression de la proinsuline 2 est nécessaire pour rendre tolérants les L_T spécifiques d'un épitope commun à la proinsuline 1 et à la proinsuline 2. Les souris NOD invalidées pour la proinsuline 2 présentent par conséquent des anomalies dans la sélection du

répertoire des L_T et développent un diabète accéléré (Pearson et al., 2016; Thébault-Baumont et al., 2003).

La présentation des Ag tissu-spécifiques dans le thymus se fait grâce au gène *Aire* (Anderson et al., 2002), initialement identifié chez les patients atteints du syndrome APECED (*auto-immune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dysplasia*) provoquant des réactions d'auto-immunité spontanées dans de multiples organes endocrines (Finnish-German APECED Consortium, 1997). L'implication de ce gène a longtemps été fortement suspectée dans la physiopathologie des souris NOD et semble se confirmer puisque dans cette lignée, la présentation de l'Ag pancréatique ICA69 (*islet cell auto-antigen 69kDa*) est diminué par un mécanisme lié à *Aire* (Bonner et al., 2012; Mitre et al., 2017).

Concernant les molécules du CMH-II, hormis la modification de répertoire mentionnée auparavant, des études ont montré que la molécule I-A^{B7} exprimée par les souris NOD serait instable résultant alors en une liaison de faible affinité avec son peptide, gênant alors la sélection négative des peptides du soi dans le thymus et favorisant ainsi le développement d'auto-immunité (Kanagawa et al., 1998; Ridgway et al., 1999).

Les travaux de Kishimoto et Sprent montrent que les thymocytes des souris NOD sont moins sensibles à la sélection négative, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs montrent que cette baisse de sensibilité, non liée cette fois à l'expression de I-A^{B7}, implique les voies de l'apoptose (Kishimoto and Sprent, 2001).

❖ Défaut de tolérance périphérique :

Malgré la sélection thymique, des L_T auto-réactifs sont retrouvés en périphérie (Lohmann et al., 1996; Semana et al., 1999). D'autres mécanismes de tolérance existent donc en périphérie pour garder ces L_T auto-réactifs sous contrôle.

Parmi ces mécanismes, l'AICD (*activation-induced cell death*) est un processus selon lequel une délétion des lymphocytes activés permet de limiter une réaction immunitaire dans la durée et ainsi la préservation des tissus de l'organisme. En périphérie, les lymphocytes de la souris NOD, qui présentent une certaine résistance à ce mécanisme d'AICD, ne sont pas éliminés et favorisent l'apparition du DT1 (Garchon et al., 1994; Leijon et al., 1994).

Comme nous l'avons évoqué auparavant, les Treg jouent un rôle primordial dans le maintien de la tolérance par régulation des autres populations cellulaires en périphérie. Chez la souris NOD, des études ont montré un défaut au niveau des Treg principalement qualitatif,

puisque ces cellules expriment du TGF- β mais pas d'IL-10, affectant par conséquent leurs fonctions régulatrices ainsi que le maintien et l'expansion du pool de cellules régulatrices durant le diabète (Pop et al., 2005). Ce déficit des Treg est également expliqué par l'action des aAc anti-IL-2 de la souris NOD qui diminuent la viabilité et la fonctionnalité des Treg *in vivo* (Pérol et al., 2016).

❖ Place d'un traitement par IL-2 dans le diabète :

Comme nous l'avons vu précédemment, un des mécanismes expliquant la rupture de tolérance chez les souris NOD et favorisant l'apparition du diabète est un défaut à la fois en Treg et en IL-2, les deux pouvant être liés puisque l'IL-2 est la cytokine primordiale à faible dose dans l'homéostasie des Treg. Le traitement des souris NOD par IL-2 faible dose induit la sur-expression de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) par les Treg, permettant de bloquer leur apoptose, d'augmenter leur nombre et d'améliorer leur fonctionnalité (Spence and Tang, 2016; Tang et al., 2008). Les expériences chez les souris NOD ont permis de montrer que l'injection d'IL-2 faible dose permet le traitement préventif mais également curatif du diabète (Grinberg-Bleyer et al., 2010; Tang et al., 2008). Maintenant que la dose utilisable chez l'homme est établie, les investigations actuellement en cours permettront d'établir si les résultats obtenus chez les souris NOD sont transposables chez les patients atteints de DT1 (Hartemann et al., 2013; Yu et al., 2015; ClinicalTrials.gov NCT10862120).

Une deuxième stratégie utilisée pour la promotion des Treg *in vivo* est l'administration de complexes IL-2/anti-IL-2(JES6-1). L'intérêt de ces complexes repose sur 2 principes : (i) augmenter la demi-vie de l'IL-2 *in vivo*, qui est rapidement éliminée par voie rénale en conditions physiologiques, (ii) favoriser la fixation de l'IL-2 aux Treg et non aux autres sous-populations cellulaires. En effet, le récepteur de faible affinité à l'IL-2 est composé de la chaîne γ commune (γ c, CD132) et d'une chaîne β (CD122). Le récepteur de haute affinité est formé par ajout de la chaîne α (CD25) au complexe CD122/CD132. Ce récepteur de haute affinité est exprimé constitutivement par les Treg et de façon inductible par les L_T conventionnels activés. Lors de la formation du complexe, l'AcM anti-IL-2 (JES6-1) se fixe à l'IL-2 par son site de liaison au CD122. Par encombrement stérique, l'IL-2 ne peut donc pas se fixer sur son récepteur de faible affinité. En revanche, la haute affinité induite par la présence de CD25 au sein du récepteur permet de forcer la fixation de l'IL-2 après rupture de sa liaison à l'AcM (JES6-1), permettant ensuite d'activer la cascade de signalisation cellulaire passant par STAT5. Ainsi, l'utilisation de ces complexes permet une meilleure promotion des Treg chez la souris (Boyman and Sprent, 2012). De façon similaire, il existe une autre sorte de complexes formés par la liaison d'un autre AcM anti-IL-2

(S4B6) qui se fixe à l'IL-2 par son site de fixation au CD25. Sous cette forme, l'IL-2 cible préférentiellement les cellules exprimant le récepteur de faible affinité à l'IL-2, c'est-à-dire les L_T CD8⁺ et les cellules NK (Boyman and Sprent, 2012).

Une nouvelle stratégie a été de promouvoir l'expansion des Treg spécifiques d'Ag *in vivo*, espérant ainsi mieux cibler l'auto-immunité diabétogénique. Une étude récente a montré que cette expansion était possible et qu'elle permettait de prévenir le diabète avec une bonne efficacité (80%) chez la souris NOD (Manirarora and Wei, 2015). Cette stratégie repose sur une thérapeutique associant :

- les complexes IL-2/anti-IL-2(JES6-1),
- la rapamycine, connue pour inhiber la prolifération des L_T effecteurs et favoriser l'expansion des Treg (Battaglia et al., 2006),
- des peptides antigéniques provenant des îlots.

La stratégie thérapeutique reposant sur l'expansion des Treg pour contrer la rupture de tolérance du diabète est donc prometteuse. Il s'agit néanmoins d'une stratégie à manier avec précautions étant donné les effets graves qu'elle pourrait engendrer, notamment en regard de la dose qui, trop élevée, pourrait activer tous les L_T sans distinction.

4.3.2. Déficit de la voie CD28/B7

Nous avons vu que la voie CD28/B7 joue un rôle primordial dans l'activation, la prolifération et la différenciation des L_T. Par ailleurs, de nombreux modèles expérimentaux de maladies auto-immunes ont montré que les réponses auto-immunes à l'origine de la pathologie peuvent être réduites voire abolies lorsque l'on invalide le gène codant CD28. C'est le cas pour les modèles murins de polyarthrite rhumatoïde (Tada et al., 1999), de myocardite (Bachmaier et al., 1996) ou bien encore de myasthénie (Shi et al., 1998).

A l'opposé de tous ces modèles, chez la souris NOD, Salomon et coll. ont montré que l'invalidation de la voie de costimulation CD28/B7 (CD80/86 déficientes d'une part ou CD28 déficientes d'autre part) exacerbe le diabète auto-immun (Salomon et al., 2000), confirmant les données de Lenschow et coll. (Figure 30A et B) (Lenschow et al., 1996). Chez ces souris, la maladie n'est pas expliquée par une dérégulation de la balance Th1/Th2 mais par un défaut important en Treg. Par ailleurs, le transfert de Treg à partir de souris NOD WT aux souris CD28KO est capable de restaurer le phénotype classique (Figure 30C). Ces résultats indiquent donc que la voie CD28/B7 est essentielle pour le développement et l'homéostasie des Treg spécifiques du diabète. Ces

résultats sont renforcés par un modèle proche de la souris NOD : la souris NOD.H-2h4, modèle classique d'étude de la thyroïdite auto-immune. Dans ce modèle également, l'invalidation de CD28 induit une accélération de la maladie associée à un déficit en Treg, tandis que le transfert de Treg WT à ces souris permet de réduire la gravité de la maladie (Ellis et al., 2013).

Cependant les travaux de Salomon et coll. utilisent soit des souris CD28KO, soit des souris déficientes en CD80/86, ne permettant pas d'étudier le rôle indépendant de CD80 et de CD86. Quelques années plus tard, Yadav et coll. montrent que les 2 molécules B7 (CD80 et CD86) jouent des rôles différents dans la physiopathologie du diabète chez les souris NOD. Concernant CD86, il contrôle en fait le *priming* des L_T $CD4^+$ auto-réactifs mais pas la phase effectrice de la réponse. Ainsi, les souris CD86KO présentent une incidence du diabète moins élevée que les souris WT (Yadav et al., 2004) et une réduction du nombre de Treg, uniquement au niveau du thymus. A l'inverse, les souris CD80KO (comme les souris CD28KO ou B7 déficientes) développent un diabète accéléré. En effet, il a été démontré que CD80 régule l'auto-immunité dirigée contre le pancréas par plusieurs mécanismes incluant une diminution du nombre de Treg (thymus et ganglions pancréatiques) et une augmentation de l'expansion, de la survie et des fonctions effectrices des L_T auto-réactifs (Yadav et al., 2007).

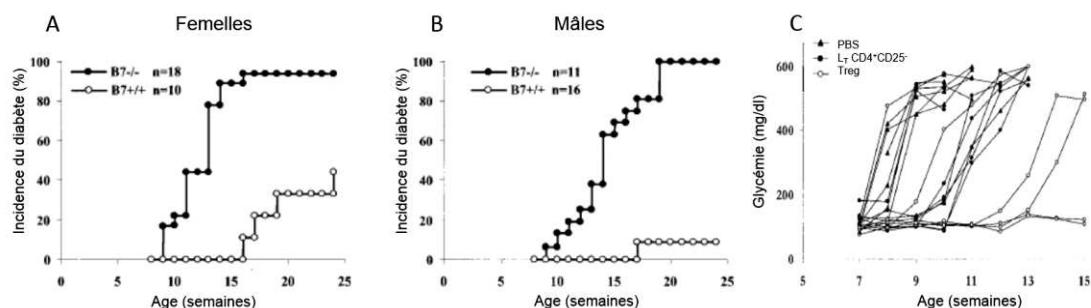


Figure 30. Prévention par transfert de Treg du diabète exacerbé chez les souris NOD $B7^{-/-}$.

Incidence du diabète chez les souris NOD femelles (A) et mâles (B). La maladie est accélérée et l'incidence augmentée chez les souris $B7KO$. (C) Evolution de la glycémie au cours du temps de souris NOD CD28KO ayant reçu du PBS (triangles noirs), 8×10^6 L_T $CD4^+CD25^-$ (cercles noirs) ou 8×10^6 Treg provenant de souris NOD WT (cercles blancs). Les Treg ont la capacité de contrôler le diabète chez les souris CD28KO. Adapté de Salomon et coll., 2000.

De manière intéressante, Salomon et coll. montreront que les souris NOD CD86KO protégées du diabète auto-immun développent spontanément une polyneuropathie périphérique auto-immune touchant principalement les femelles. En effet, aux alentours de 20 semaines, les souris développent une paralysie des pattes postérieures associée à des signes histologiques et électrophysiologiques de démyélinisation des nerfs périphériques, sans atteinte du système

nerveux central. Tandis que l'infiltrat inflammatoire pancréatique associé au diabète chez la souris NOD est absent chez la souris NOD CD86KO, les nerfs périphériques de ces dernières sont envahis par un infiltrat inflammatoire (Figure 31) composé de DC, L_T $CD4^+$ et $CD8^+$. Aucun infiltrat inflammatoire n'a été mis en évidence lors de l'analyse histologique des muscles de ces souris.

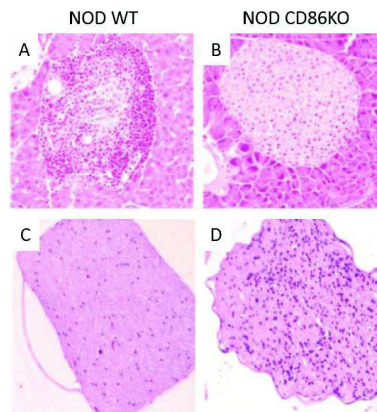


Figure 31. Analyse histologique du pancréas et d'un nerf périphérique chez les souris NOD WT et CD86KO.

Coloration H&E montrant un infiltrat inflammatoire au niveau du pancréas chez la souris NOD WT (A) absent chez la souris NOD CD86KO (B), tandis qu'un infiltrat est observé au sein du nerf sciatique chez la souris NOD CD86KO (C) mais pas chez la NOD WT (D). Adapté de Salomon et coll., 2001.

La physiopathologie de cette atteinte semble liée aux L_T $CD4^+$ qui, transférés d'une souris CD86KO à une souris NOD.*scid* immunodéficiente (ne possédant pas de lymphocytes), sont capables de reproduire la maladie (Figure 32) (Salomon et al., 2001).

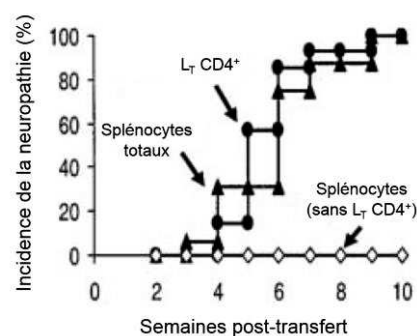


Figure 32. Rôle des L_T $CD4^+$ dans la neuropathie périphérique auto-immune des souris NOD CD86KO.

Transfert de L_T $CD4^+$, splénocytes déplétés en L_T $CD4^+$ ou splénocytes totaux d'une souris NOD CD86KO à des souris receveuses NOD.*scid* immunodéficientes, après stimulation *in vitro*. Adapté de Salomon et coll., 2001.

Il est à ce stade très intéressant d'observer que, chez la souris NOD, l'invalidation d'une voie de costimulation semble pouvoir dévier l'auto-immunité d'une cible (pancréatique) à une autre (nerveuse). Le travail présenté dans cette thèse contribuera à conforter cette hypothèse en étudiant des souris NOD invalidées pour une autre voie de costimulation.

4.3.3. Souris NOD *Icos*^{-/-} : un nouveau modèle de myopathie inflammatoire ?

Concernant maintenant le rôle de la voie de costimulation ICOS/ICOSL chez la souris NOD, une première étude de Hawiger et coll. en 2008 a montré que les souris NOD *Icos*^{-/-} ne développent pas de diabète (Figure 33) : ni d'hyperglycosurie/hyperglycémie, ni d'atteinte histologique dans les îlots pancréatiques, ainsi qu'une diminution très importante des taux d'aAc anti-GAD et anti-insuline retrouvés habituellement au cours du diabète. Lors de l'étude de la répartition de sous-populations lymphocytaires, il n'est pas rapporté de modification significative chez les souris NOD *Icos*^{-/-}.

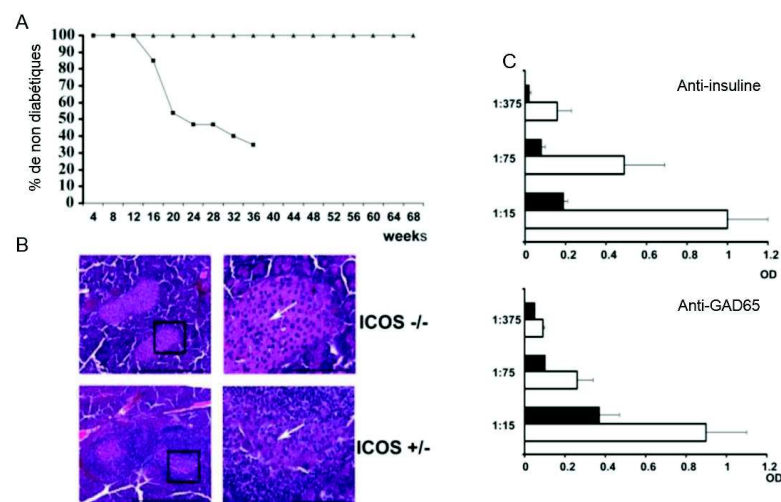


Figure 33. Absence de diabète chez les souris NOD *Icos*^{-/-}.

(A) Pourcentage de souris non diabétiques dans les lignées NOD *Icos*^{-/-} (triangles, n=30) et NOD *Icos*^{+/-} (cercles, n=20). (B) Coloration H&E de coupes de pancréas, montrant l'absence d'infiltrat inflammatoire chez les NOD *Icos*^{-/-} par rapport aux NOD *Icos*^{+/-} de 14 semaines. (C) Taux d'anticorps anti-insuline et anti-GAD65 diminués chez les souris NOD *Icos*^{-/-} sans modification des taux d'IgG totaux (non affichés ici). Adapté de Hawiger et coll., 2008.

Ce phénotype sera confirmé 2 ans plus tard par Prevot et coll. qui montrent l'absence de diabète chez les souris NOD *Icos*^{-/-}, mais également les souris NOD *Icos*^{I/-}. Sachant que le locus

Icos est situé dans une région proche d'autres gènes impliqués dans la costimulation (CD28, CTLA-4) et que chez la souris ICOS et ICOSL sont des partenaires exclusifs, l'absence de diabète chez la souris NOD *Icosl*^{-/-} indique que la réponse immunitaire diabétogène n'est imputable qu'aux gènes *Icos* et *Icosl*, et exclue la possibilité que le phénotype observé soit dû à d'autres gènes proche du locus *Icos*, notamment CD28 et CTLA-4. Des expériences de transfert de splénocytes activés *in vitro* (anti-CD3/anti-CD28) de souris NOD WT (ou NOD *Icos*^{+/+}) ou NOD *Icos*^{-/-} à des souris receveuses NOD.*scid* ont démontré le rôle pathogène des L_T dans la maladie (Figure 34A).

Plusieurs observations semblent indiquer que la voie ICOS/ICOSL joue un rôle important dans la différenciation des Treg, impliquant notamment le modèle NOD BDC2.5. Dans ce modèle, les souris possèdent les L_T exprimant un TCR transgénique généré en 1993 par Katz et coll. formé des chaînes Vα1 et Vβ4 d'un clone de L_T CD4⁺ diabétogénique appelé BDC2.5 (Katz et al., 1993). Contrairement au modèle NOD classique qui possède un répertoire T très varié, les souris NOD BDC2.5 sont capables de reconnaître et répondre à un Ag unique provenant de cellules des îlots pancréatiques. Il a été rapporté récemment que les L_T BDC2.5 reconnaissent la vasostatine 1, un peptide dérivé de la chromogranine A (Nikoopour et al., 2011). En comparaison aux souris NOD WT, les NOD BDC2.5 présentent phénotypiquement une insulite massive, cependant l'incidence du diabète à proprement parlé est faible, aux alentours de 10% (Gonzalez et al., 1997). Ces données ont renforcé la notion de nécessité d'une multitude de cibles antigéniques dans le développement des réponses immunitaires diabétogéniques. Par ailleurs, les souris double-transgéniques NOD BDC2.5 *Rag-1*^{-/-} développent un diabète accéléré. Ce phénotype observé chez des souris dans lesquelles l'absence du gène *Rag-1* empêche la recombinaison du TCR, suggère qu'il existe chez les souris NOD BDC2.5 une population de cellules protectrices (les Treg) absente sous un fond *Rag-1*^{-/-} (Gonzalez et al., 2001).

Chez ces souris, différents travaux ont montré que la voie ICOS/ICOSL joue un rôle important dans la différenciation des Treg. En effet, l'injection d'AcM anti-ICOS à des souris NOD BDC2.5 accélère l'apparition du diabète (Herman et al., 2004). L'approche développée par Prevot et coll. en 2010 pour s'affranchir des questions de saturation et d'accessibilité à l'Ac est l'étude de souris double-transgéniques NOD BDC2.5 *Icos*^{-/-} qui développent également un diabète accéléré (Figure 34B). Ces données montrent que ICOS joue un rôle sur les Treg en plus de son rôle bien établi sur les L_T effecteurs. D'ailleurs, une diminution du nombre de Treg a également été observée dans la rate et les ganglions pancréatiques de ces souris (Figure 34C). En plus de confirmer le rôle de ICOS sur les Treg, les fonctions effectrices conservées chez les L_T BDC2.5 traduites par l'apparition du diabète suggèrent que la dépendance en ICOS des L_T peut varier selon le clone considéré.



Figure 34. Rôle de ICOS dans la physiopathologie du diabète.

(A) Incidence du diabète chez des souris NOD.scid ayant reçu les splénocytes de souris NOD *Icos*^{-/-} ou NOD *Icos*^{+/+} après stimulation (anti-CD3/anti-CD28) *in vitro*. (B) Incidence du diabète chez des souris doubles transgéniques NOD BDC2.5 *Icos*^{-/-} et NOD BDC2.5 *Icos*^{+/+}. (C) Nombre de Treg (CD4⁺Foxp3⁺) parmi les L_T CD4⁺ chez les souris NOD BDC2.5 *Icos*^{-/-} et NOD BDC2.5 *Icos*^{+/+} dans la rate, les ganglions pancréatiques et axillaires. Adapté de Prevot et coll., 2010.

De manière très intéressante, bien que les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icos*^{l/-} ne développent pas de diabète, des premiers éléments suggèrent qu'elles développent de façon plus tardive une atteinte neuromusculaire, contrairement aux souris NOD WT. Cette première étude rapporte en effet des signes de paralysie symétrique et rapidement progressive au niveau des pattes postérieures, touchant principalement les souris femelles (Figure 35A). La présence d'un infiltrat inflammatoire dans les muscles (Figure 35B) suggère une myopathie auto-immune transférable par les L_T. Il a également été montré une diminution du nombre de Treg dans la rate des souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icos*^{l/-} par rapport aux NOD WT (Figure 35C).

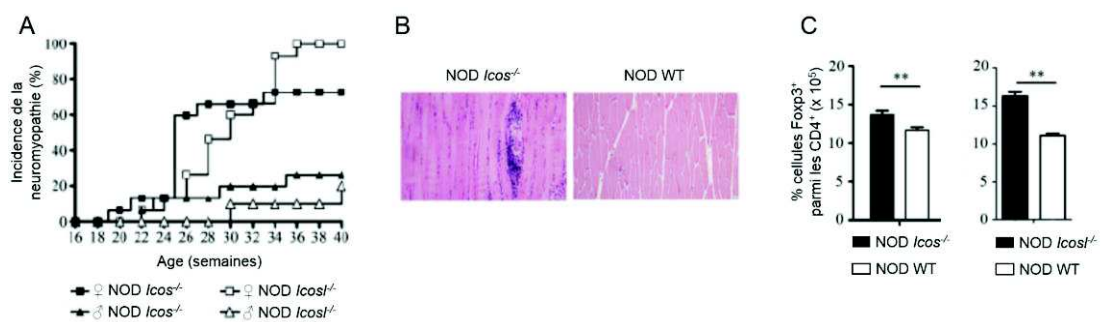


Figure 35. Développement d'une atteinte neuromusculaire chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icos*^{l/-}.

(A) Incidence de la neuromyopathie chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icos*^{l/-} mâles et femelles. (B) Coloration H&E d'une coupe longitudinale de muscle squelettique montrant un infiltrat inflammatoire de cellules mononucléées chez la souris NOD *Icos*^{-/-}. (C) Pourcentage de Treg parmi les L_T CD4⁺ dans la rate des souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icos*^{l/-}. Adapté de Prevot et coll., 2010.

Il semblerait donc que les souris NOD *Icos*^{-/-} et/ou NOD *Icos*^{l/-} puissent être un modèle spontané de MI. Cependant, il convient de mieux caractériser l'atteinte musculaire des souris et les mécanismes physiopathologiques pour pouvoir le positionner comme tel.

II. OBJECTIFS

Les MI représentent un groupe hétérogène de maladies musculaires inflammatoires. Leur classification et leurs critères diagnostiques ont largement évolué au cours de ces dernières années, mettant désormais en avant le rôle important des aAc spécifiques ou associés aux myosites. En effet, ils représentent un outil important pour le diagnostic mais également l'évaluation du pronostic et la compréhension physiopathologique de la maladie.

Plusieurs modèles expérimentaux ont été générés pour l'étude des MI, les plus couramment utilisés reposant sur l'immunisation d'animaux contre des protéines telles que la myosine, la protéine C ou encore l'HRS. Cependant, ces modèles sont relativement peu reproductibles et/ou reposent sur une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre la protéine d'intérêt conduisant dans ce sens à une physiopathologie biaisée. Nous savons depuis les travaux de Hawiger et coll., puis de Prevot et coll., que les souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL ne développent pas le DT1 habituellement déclaré par les souris NOD mais semblent présenter une atteinte neuromusculaire spontanée associée à la présence d'un infiltrat de cellules mononucléées.

Les objectifs principaux de ce travail ont été de :

1. caractériser la maladie musculaire chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icosl*^{-/-}, en établissant leur caractère auto-immun,
2. identifier des aAc chez ces souris et déterminer s'ils existent chez les patients atteints de MI,
3. préciser l'intérêt de l'IRM pour détecter et suivre l'inflammation musculaire.

Les objectifs secondaires de ce travail ont été de :

- ❖ développer un test biologique quantitatif pour un nouvel aAc candidat chez les patients atteints de MI,
- ❖ évaluer l'intérêt du modèle NOD *Icos*^{-/-} pour tester une thérapie immunologique *in vivo* en se plaçant dans le contexte de traitement par IL-2.

III. RESULTATS

Publication n°1

The spontaneous autoimmune neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD mice is CD4⁺ T-cell and Interferon- γ dependent.

Front Immunol 2017 Mar, 31;8:287

Briet C, Bourdenet G, Rogner UC, Becourt C, Tardivel I, Drouot L, Arnoult C, do Rego JC, Prevot N, Masaad C, Boyer O, Boitard C.

Dans cette étude, nous avons étudié l'atteinte neuromusculaire des souris NOD *Icosl*^{-/-}. Nous confirmons qu'elles ne développent pas de diabète et montrons qu'elles présentent une atteinte neuromusculaire d'apparition tardive (aux alentours de 25 semaines en moyenne) et lentement progressive. Cliniquement, cette atteinte est objectivable par des difficultés à la marche (notamment des difficultés d'extension des pattes), une perte de poids ainsi qu'une diminution de la force d'agrippement. L'analyse de la marche (Catwalk) a également montré que l'atteinte des pattes antérieures est plus précoce que l'atteinte des pattes postérieures. Histologiquement, la présence de cellules infiltrantes a été observée au niveau des nerfs périphériques et du muscle squelettique. Dans ce dernier, il est observé un important infiltrat inflammatoire endomysial de cellules mononucléées (majoritairement composé de macrophages et L_T CD4⁺) accompagné de signes de nécrose/régénération myocytaire. L'analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires a permis d'objectiver un déficit précoce en Treg (dès 6 semaines) chez les souris NOD *Icosl*^{-/-} par rapport aux NOD WT.

Afin d'établir le caractère auto-immun de la maladie, les sous-populations lymphocytaires T ont été transférées à des souris NOD.*scid* receveuses. Il a ainsi été montré que seuls les L_T CD4⁺ *Icosl*^{-/-} transfèrent la neuromyopathie. Ce résultat a été confirmé par croisement en retour (*backcross*) de lignées double-transgéniques pour les molécules du CMH-I ou CMH-II. Il a finalement été montré que les L_T CD4⁺ issus du muscle ou du nerf lésés produisaient de l'IFN- γ après stimulation *in vitro* et pas d'IL-4 ni d'IL-17.



The Spontaneous Autoimmune Neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD Mice Is CD4⁺ T-Cell and Interferon- γ Dependent

Claire Briet¹, Gwladys Bourdenet², Ute C. Rogner³, Chantal Becourt³, Isabelle Tardivel³, Laurent Drouot², Christophe Arnoult⁴, Jean-Claude de Rego⁵, Nicolas Prevot⁶, Charbel Massaad⁷, Olivier Boyer² and Christian Boitard^{1*}

¹INSERM U1016, Cochin Institute, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ²Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, U1234, Rouen University Hospital, Department of Immunology, Rouen, France, ³INSERM U1016, Cochin Institute, Paris, France, ⁴Normandie Université, UNIROUEN, CNRS, UMR 6270, Rouen, France, ⁵Normandie Université, UNIROUEN, SCAC, INSERM, U1234, Rouen, France, ⁶Developmental Immunology, Department of Paediatrics, and the Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK, ⁷INSERM UMR S1124, Paris Descartes University, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Karsten Kretschmer,
CRTD/DFG-Center for Regenerative
Therapies Dresden, Germany

Reviewed by:

Peter M. Van Eendert,
Institut national de la santé et de la
recherche médicale (INSERM),
France
Muriel Moser,
Université libre de Bruxelles, Belgium
Daniel Hawiger,
Saint Louis University, USA

*Correspondence:

Christian Boitard
christian.boitard@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and
Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 10 November 2016

Accepted: 28 February 2017

Published: 31 March 2017

Citation:

Briet C, Bourdenet G, Rogner UC,
Becourt C, Tardivel I, Drouot L,
Arnoult C, de Rego J-C, Prevot N,
Massaad C, Boyer O and Boitard C
(2017) The Spontaneous
Autoimmune Neuromyopathy in
ICOSL^{-/-} NOD Mice Is CD4⁺ T-Cell
and Interferon- γ Dependent.
Front. Immunol. 8:287.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00287

Abrogation of ICOS/ICOS ligand (ICOSL) costimulation prevents the onset of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse but, remarkably, yields to the development of a spontaneous autoimmune neuromyopathy. At the pathological level, ICOSL^{-/-} NOD mice show stronger protection from insulinitis than their ICOS^{-/-} counterparts. Also, the ICOSL^{-/-} NOD model carries a limited C57BL/6 region containing the *Icosl* null mutation, but, in contrast to ICOS^{-/-} NOD mice, no gene variant previously reported as associated to NOD diabetes. Therefore, we aimed at providing a detailed characterization of the ICOSL^{-/-} NOD model. The phenotype observed in ICOSL^{-/-} NOD mice is globally similar to that observed in ICOS^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double-knockout NOD mice, manifested by a progressive locomotor disability first affecting the front paws as observed by catwalk analysis and a decrease in grip test performance. The pathology remains limited to peripheral nerve and striated muscle. The muscle disease is characterized by myofiber necrosis/regeneration and an inflammatory infiltrate composed of CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, and myeloid cells, resembling human myositis. Autoimmune neuromyopathy can be transferred to NOD.scid recipients by CD4⁺ but not by CD8⁺ T-cells isolated from 40-week-old female ICOSL^{-/-} NOD mice. The predominant role of CD4⁺ T-cells is further demonstrated by the observation that neuromyopathy does not develop in CIITA^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD in contrast to β 2-microglobulin^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice. Also, the cytokine profile of CD4⁺ T-cells infiltrating muscle and nerve of ICOSL^{-/-} NOD mice is biased toward a Th1 pattern. Finally, adoptive transfer experiments show that diabetes development requires expression of ICOSL, in contrast to neuromyopathy. Altogether, the deviation of autoimmunity from the pancreas to skeletal muscles in the absence of ICOS/ICOSL signaling in NOD mice is strictly dependent on CD4⁺ T-cells, leads to myofiber necrosis and regeneration. It provides the first mouse model of spontaneous autoimmune myopathy akin to human myositis.

Keywords: autoimmunity, type 1 diabetes, neuropathy, myopathy, costimulation, ICOS, ICOSL

Abbreviations: ALN, axillary lymph nodes; β 2-m, beta-2-microglobulin; T1D, type 1 diabetes; ICOSL, ICOS ligand; MP0, myelin protein zero; PLN, pancreatic lymph nodes; PNS, peripheral nervous system; SPL, spleen; QTLs, quantitative trait loci.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the activation of autoreactive lymphocytes against pancreatic β -cell antigens. Mechanisms that initiate the failure of immune tolerance to β -cells remain elusive in common forms of T1D (1, 2).

In animal models such as the non-obese diabetic (NOD) mouse, the predominant role of T-cells is supported by experiments in which diabetes is transferred into naive recipients by T-cells from diabetic or prediabetic animals (3). Moreover, T1D is prevented by injection of antibodies (Abs) that interfere with T-cells activation and fails to develop in diabetes-prone mice in which key genes in T-cells differentiation or activation are non-functional (4, 5). Both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells are involved in diabetes development and both major histocompatibility complex (MHC) class I- and class II-knockout NOD mice fail to develop diabetes (6, 7). The activation of autoreactive T-cells in diabetes requires the recognition of auto-antigens expressed by β -cells as well as costimulatory signals (8). Membrane proteins of the *Cd28* gene family mediate costimulatory signals through their interaction with members of the B7 family expressed on antigen-presenting cells and stromal cells (9). *In vivo* deletion of the *Cd28* or B7 genes and *Icos* or *Icosl* genes profoundly affects the development of diabetes in the NOD mouse by modulating effector and/or regulatory T-cells (10–14).

NOD mice, as humans, are susceptible to the development of other forms of autoimmunity and occasionally develop infiltrates in the thyroid, the parathyroid, the adrenal, and salivary glands (4, 15–17). This predisposition to autoimmunity also sets up NOD mice as a relevant model for experimental induction of autoimmune diseases such as autoimmune prostatitis or autoimmune thyroiditis (16, 18, 19). Different NOD genes are involved in orienting the autoimmune response toward β -cells. The main region controlling the targeting of β -cells is the MHC, but other regions have been evidenced in double congenic mice (20–24). Finally, genes controlling costimulatory T-cells molecules have been shown to play a key role in directing autoimmunity, as observed in B7.2-knockout NOD mice, which fail to develop diabetes but develop autoimmune peripheral neuropathy (25, 26).

We previously reported that protection from diabetes in ICOS^{-/-} NOD mice was unexpectedly associated with the development of an autoimmune disorder of the neuro-muscular system, characterized by myositis and sensory ganglionitis. In this model, defective activation of diabetogenic effector ICOS^{-/-} T-cells and a defect in Treg cells result in the protection of ICOS^{-/-} NOD mice from diabetes (14). Here, we focused on ICOSL^{-/-} NOD mice which, in contrast to ICOS^{-/-} NOD mice, only carry in their genome a limited C57BL/6 region containing the *Icosl* null mutation but no gene variant previously reported as associated to NOD diabetes. This study describes the autoimmune neuromyopathy that predominantly occurs in females and manifests clinically by locomotor disability first affecting the front paws. We show that neuromuscular autoimmunity is associated to a CD4⁺ Th1 profile, fails to develop in mice lacking CD4⁺ but not CD8⁺ T-cells, and is transferable by CD4⁺ T-cells. This definitively demonstrates the autoimmune character and MHC class II restriction of the neuromyopathy.

ANIMALS AND METHODS

Mice

NOD mice were bred and housed in our facilities under specific pathogen-free conditions. ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice were generated as described previously (14).

ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were established by crossing ICOS^{-/-} NOD with ICOSL^{-/-} NOD mice to generate F1 mice, and F1 mice were repeatedly intercrossed together to produce homozygous mice.

CIITA^{-/-}ICOSL^{-/-} and β 2microglobulin (β 2m)^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were established similarly by crossing ICOSL^{-/-} NOD mice with CIITA^{-/-} NOD mice and β 2m^{-/-} NOD mice (Jackson laboratory, Bar Harbor, ME, USA), respectively. ICOSL^{-/-} NOD.scid mice were obtained by crossing NOD.scid mice with ICOSL^{-/-} NOD mice. The prevalence of diabetes in our NOD colony reaches 10% in males and 60% in females by 6 months of age. Animal studies were approved by institutional review.

Genetic Analysis

Genomic DNA extracted from mouse tail tips using standard protocols was processed and hybridized on Affymetrix Mouse Diversity Genotyping Arrays (Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For data extraction, genome coordinates were determined using the assemblies UCSC version mm10 and NCBI version GRCm38. Non-informative markers were manually removed for further comparative strain analysis. In all, 56,690 markers were evaluated for the ICOS^{-/-} NOD mice, 558,318 for the ICOSL^{-/-} NOD mice when compared to NOD mice.

Diabetes and Neuromyopathy Assessments

Diabetes was assessed by monitoring mice as described previously (14). Neuromyopathy was quantified using a clinical score as follows. Stage 1 is defined by asymmetric extension of back legs after tail-suspension test. Stage 2 is defined by retraction of back legs after tail-suspension test. Stage 3 is defined by flexion of front and back legs without snatching to the grid after tail-suspension test.

Weight variations were monitored longitudinally, and muscle strength was assessed by grip test performance (Bioseb) on the front paws. Locomotor activity was analyzed using a Catwalk apparatus (Noldus) comprising a high-speed color camera for accurate spatial and temporal resolution, real-time movement recording, and automated analysis of the locomotor ability.

Histological Analysis

Gastrocnemius were dissected and frozen in cold isopentane. Sections of 4 μ m from these muscles were then stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was performed on frozen muscle sections using the Vectastain elite ABC peroxidase kit (Vector). Sections were stained with primary Abs directed against CD4 (GK1.5), CD8 (53-6.7), F4/80 (BM8) from eBioscience, CD11b (M1/70) from BD Pharmingen, or MYH3 (F1.652) from Santa Cruz Biotechnology, then revealed with an

appropriate secondary antibody if necessary and streptavidin-peroxydase using amino-ethyl-carbazole (Vector) as substrate.

Alternatively, anesthetized animals were perfused with a 4% formaldehyde solution (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), then brain, spinal cord, spinal roots, spinal and trigeminal ganglia, and pieces of different skeletal muscles were dissected and embedded into paraffin. Three sections were stained with hematoxylin and eosin. Immune infiltration was estimated and graded from 0 to 3. Immunocytochemistry was performed on frozen muscle preparations. Sections were stained with primary antibody specific to: CD8 (53-6.7), CD4 (RM4-5), I-Ad (AMS-32.1), H-2Kd (SF1-1.1), CD11b (M1/70), or CD45R/B220 (RA3-6B2) from BD Bioscience. Histologic sections were labeled with a secondary antibody (Anti-rat biotin from eBioscience and/or streptavidin-594 from Invitrogen), and cell nuclei were counterstained using Hoechst.

Antibody Isotype Quantification

Maxisorp plates were coated using one of the following Abs: anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM (Southern Biotech). After incubation with mouse sera, revelation was performed using biotin-coupled anti-mouse immunoglobulin (Ig) (H + L) (Jackson IR), streptavidin HRP (ThermoFisher), TMB, and H₂SO₄. Optical densities were assessed using a ThermoScientific Multiskan FC apparatus.

Flow Cytometry Analysis

Antibodies

The following Abs were used purified or conjugated to biotin (hybridoma clone indicated in parentheses): CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), B220 (RA3-6B2), CD11b (ICRF44), CD11c from BD Bioscience and IFN- γ (4S.B3), IL-4 (B-S4), IL-17 (17B7), FOXP3 (FJK-16s), and ICOSL (HK5.3) from eBioscience. Appropriate isotype control mAbs were included. Living cells were gated on side scatter versus forward scatter density plot.

Immunofluorescence Staining

Immunofluorescence staining was performed as described previously (14). Intracellular cytokine staining was performed according to the manufacturer's instructions (staining intracellular antigens; eBioscience). Flow cytometry analyses were performed with a FACS FORTESSA (Becton Dickinson), using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Cytokine Production

5×10^4 CD4⁺ T-cells from 8-week-old ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD mice were cultured in triplicate in 96-well plates with 1×10^5 irradiated NOD splenocytes, phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA 10 ng/ml; Sigma), ionomycin (1 μ g/ml; Sigma), and brefeldin A (10 μ g/ml; Sigma). CD4⁺ T-cells were incubated 4 h at 37°C. Cells were collected and tested for IFN- γ , IL-4, and IL-17 production by flow cytometry gated on CD4⁺ T-cells.

Immunomagnetic Cell Sorting

CD4⁺ T-cells were obtained using mouse CD4⁺ Negative Selection Kit (Invitrogen Dynal AS, Carlsbad, CA, USA), according

to the manufacturer's instructions. CD8⁺ T-cells/CD4⁺ and CD8⁺ T-cells/CD4⁺CD25⁺ T-cells or CD4⁺CD25⁻ T-cells were positively selected by MACS sorting with biotinylated anti-CD4 and/or anti-CD8 Abs, biotin-anti-CD25 (BD Bioscience) Abs using LS or LD columns and streptavidin beads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Adoptive Cell Transfer

Purified CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, T-cells including CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells, splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from 8 or 40-week-old either ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD mice were selected as described above. When indicated, cells were then stimulated with 1 μ g/ml anti-CD3 (BD Bioscience) and anti-CD28 (BD Bioscience) for 48 h. IL-2 (20 U/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was added to the culture of the splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Total spleen (SPL) cells or purified T-cells, stimulated or not, were then adoptively transferred i.v. into 6- to 8-week-old ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD.scid mice as previously described (14). Ten days after transfer and up to 15 weeks post-transfer, mice were tested twice a week for glycosuria and neuromyopathy scored. Anesthetized mice were then perfused intracardially by 4% formaldehyde solution, in order to perform histological analysis (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA).

Quantitative RT-PCR Experiments

Total RNA from cultured mouse brain, spinal cord, muscle, lymphoid cells, and Schwann cell line (MSC80) were obtained using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, France). One microgram of total RNA was reverse transcribed with random primers from Promega (Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

Quantitative real-time PCR was performed with standard protocols using SYBR[®]Green ROX Mix (Thermo Scientific, France) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM[®] 7000 in a final volume of 10 μ l which also contains 300 nM primers (Operon, Germany) and 20 ng of reverse transcribed RNA in 384-well plates. To characterize the generated amplicons and to control the contamination by unspecific by-products, a melting curve analysis was employed. Each reaction was performed in triplicate, and the mean of at least three independent experiments was calculated. All results were normalized to the 26S mRNA level and calculated using the Delta Ct method. The primer sequences used in real-time qPCR are:

iCOS F = TAGGGTGTGCAGCTTTCGTT
iCOS R = AGCTTATGAGGTCACACCTGC
iCOSL F = CAGCGGCATTTCGTTTCCTTC
iCOSL R = GTCAGGCGTGGTCTGTAAGT

Statistical Analysis

Appropriate statistical tests (log rank or student *t* test) were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism Version 4.0b software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Ethics Approval

This study was carried out in accordance to the recommendations of Institutional Animal Care and Use Guidelines. The protocol was approved by the ethic committee under number CEEA34, CB.024.11.

RESULTS

Genetic Characterization of ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD Mice

To study the role of the ICOS costimulation pathway in NOD mice, we initially used ICOS^{-/-} or ICOSL^{-/-} animals that were backcrossed onto a NOD genetic background. In ICOS^{-/-} NOD mice, we detected a large interval of 39.6 Mb between the markers rs31808238 and rs36471198 almost entirely composed of SNPs of non-NOD origin (data not shown). This interval overlaps with the *Idd* regions 5.1, 5.2, and 5.3 (Table 1). However, *Idd5* has been experimentally excluded to have any effect on neuropathy (26).

In the ICOSL^{-/-} strain, we detected an interval of 1.2 Mb around the *Icosl* gene (rs51825371 to rs13471390), that was less than half, but not entirely, composed of non-NOD alleles (data not shown). In addition, two distal intervals of 1.1 Mb and 240 kb with similar composition were detected between the markers rs29371540 and rs51263527, and rs30182742 and rs30196734, respectively (Table 1). All three intervals do not overlap with any known *Idd* intervals. They do also not correspond to previous QTL locations for neuropathy on chromosome 10, e.g., *Annp9* that has been mapped further proximal at the marker rs13480629 (chr 10; 67,011,671 bp) (27). Therefore, we chose to study ICOSL^{-/-} rather than ICOS^{-/-} NOD mice in this report.

ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-}, and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} Double-Knockout NOD Mice Are Protected from T1D and Develop Neuromuscular Autoimmunity

As we previously reported, both ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice are protected from diabetes but develop a severe neuromyopathy (14). As shown in Figure 1A, diabetes developed from the age of 12 weeks in female wild-type (WT) ICOSL^{+/+} NOD

mice and reached a plateau at around 32 weeks of age with a final prevalence of diabetes of 65% at 50 weeks. At 24 weeks of age, ICOSL^{-/-} NOD mice remained free of insulinitis with very few lymphocytes seen in the periphery of the islets, in contrast with ICOS^{-/-} NOD mice in which a peri-insulinitis was still observed (data not shown). Female ICOSL^{-/-} NOD mice developed clinical neuromuscular disease from 19 weeks to reach a plateau around 34 weeks of age. Overall, the timescale of neuromyopathy onset paralleled that of diabetes with a 6–8 weeks delay ($p = 0.01$; Log-Rank Test). However, if the prevalence of diabetes reached 65% by 50 weeks of age in ICOSL^{+/+} NOD female mice, the prevalence of neuromyopathy was 100% in female ICOSL^{-/-} NOD mice (Figure 1A) and 60% in male ICOSL^{-/-} (not shown) by 50 weeks of age. We then compared female ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice and addressed whether the incidence was comparable in ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double-knockout mice. ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-}, and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were all protected from diabetes and developed neuromyopathy following similar survival curves, but median age of neuropathy was younger in ICOSL^{-/-} (22 weeks) versus ICOS^{-/-} NOD mice (30 weeks, $p = 0.008$) (Figure 1B). ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} NOD mice presented a significant loss of grip strength at 34 weeks of age as compared to ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+} NOD mice (Figure 1C) and a significant loss of weight at 43 weeks of age (Figure 1C). Locomotor disability first affected the front paws in ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} NOD mice, as manifest by reduction in print area and paw contact intensity (Figure 1D). Heterozygous ICOSL^{+/-} NOD females maintained a high prevalence of diabetes (71%, $n = 20/28$) and, when remaining diabetes-free, developed neuromyopathy (87%, $n = 7/8$ at 30 weeks) (data not shown).

On histological sections, muscle and nerve infiltrates were already present in 24-week-old female mice but were not detected in 16-week-old female mice (data not shown). The severity of the neuromuscular infiltrate was identical in female ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice (Figure 1E). High grade immune infiltration was detected in muscles and peripheral nerves of 40-week-old female ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} NOD mice (Figure 1F) but also in male ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} NOD mice despite the lower prevalence of clinical neuromuscular disease (data not shown). Muscular infiltration was associated with evidence of necrosis and regeneration and composed of CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, F4/80⁺ macrophages, and CD11b⁺ myeloid cells (Figure 1F). At 24 weeks of age, it was possible to recover infiltrating cells from muscles of ICOSL^{-/-} NOD mice and to analyze by flow cytometry the composition of the infiltrate: 31% B220⁺ cells, 26% CD8⁺ T-cells, and 54% CD4⁺ T-cells among TCR⁺T-cells, with 7% of CD4⁺Foxp3⁺ T-cells among CD4⁺ T-cells (data not shown).

Immune Phenotype of ICOSL^{-/-} NOD Mice

We further studied the CD11b⁺ cells, CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, and B220⁺ cells in axillary lymph node (ALN), pancreatic lymph node (PLN), and SPL in ICOSL^{-/-} NOD mice as compared to WT NOD mice at 6 weeks of age. These populations were comparable in ICOSL^{-/-} NOD mice and in WT NOD mice (Figure 2A). Interestingly, a reduction of 25–32% FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺ T-cells was seen in ICOSL^{-/-} mice as compared to WT mice,

TABLE 1 | Size of the non-NOD-derived genomic regions around the mutated genes expressing ICOS and ICOS/ICOS ligand in non-obese diabetic congenic mice, and comparison of these intervals to known candidate regions for type 1 diabetes (*Idd* loci) and neuropathy (QTLs).

	Base pairs		Idd/marker	
Intervals of the Idds				
chr1	60,826,239	62,793,632	Idd5.1	
	66,483,902	70,037,817	Idd5.3	
	73,937,554	75,468,438	Idd5.2	
Non-NOD interval of the Icos ^{+/+} knockout				
chr1	3,544,819	7,501,347	rs31808238	rs36471198
non-NOD SNPs containing intervals in the Icosl ^{+/+} knockout				
chr 10	74,298,599	75,507,309	rs51825371	rs13471390
	84,580,657	85,644,817	rs29371540	rs51263527
	86,197,418	86,437,612	rs30182742	rs30196734

respectively, in PLN and SPL (Figure 2A). Cytokine production by CD4⁺ T-cells was analyzed by flow cytometry following PMA-ionomycin activation. The IFN- γ , IL-4, and IL-17 production were not different in ICOSL^{-/-} NOD mice and ICOSL^{+/+} NOD mice in SPL or lymph node (Figure 2B). But strikingly muscle and nerves infiltrating T-cells from 40-week-old ICOSL^{-/-} NOD mice produced IFN- γ but not IL-4 or IL-17 after PMA-ionomycin stimulation (Figure 2C).

Because ICOS is expressed by follicular helper T-cells that are involved in the class switch from IgM to IgG subclasses, we investigated whether serum Ig isotypes could be affected in ICOSL^{-/-} NOD mice. Before neuromuscular disease onset (8 weeks), we only observed a slight decrease in total Ig amount

in ICOSL^{-/-} NOD mice sera as compared to ICOSL^{+/+} NOD mice (Figure 2D). Yet, there was no difference in Ig subclasses between ICOSL^{-/-} NOD and ICOSL^{+/+} NOD mice. Also, when disease was apparent at 25 weeks, no difference between the ICOSL^{-/-} and ICOSL^{+/+} NOD mice was either observed, except a minor variation in IgG2a levels (Figure 2E). Therefore, the neuromyopathy developed by ICOSL^{-/-} NOD mice is very unlikely to be linked to a default in Ig switch.

Because ICOSL is constitutively expressed on antigen-presenting cells, we studied its expression in B-cells, dendritic cells, and myeloid cells of our mice. ICOSL was present at the surface of about 20% of B-cells, myeloid, and dendritic cells in pancreatic and ALN cells of 6-week-old ICOSL^{+/+} NOD mice. In the SPL,

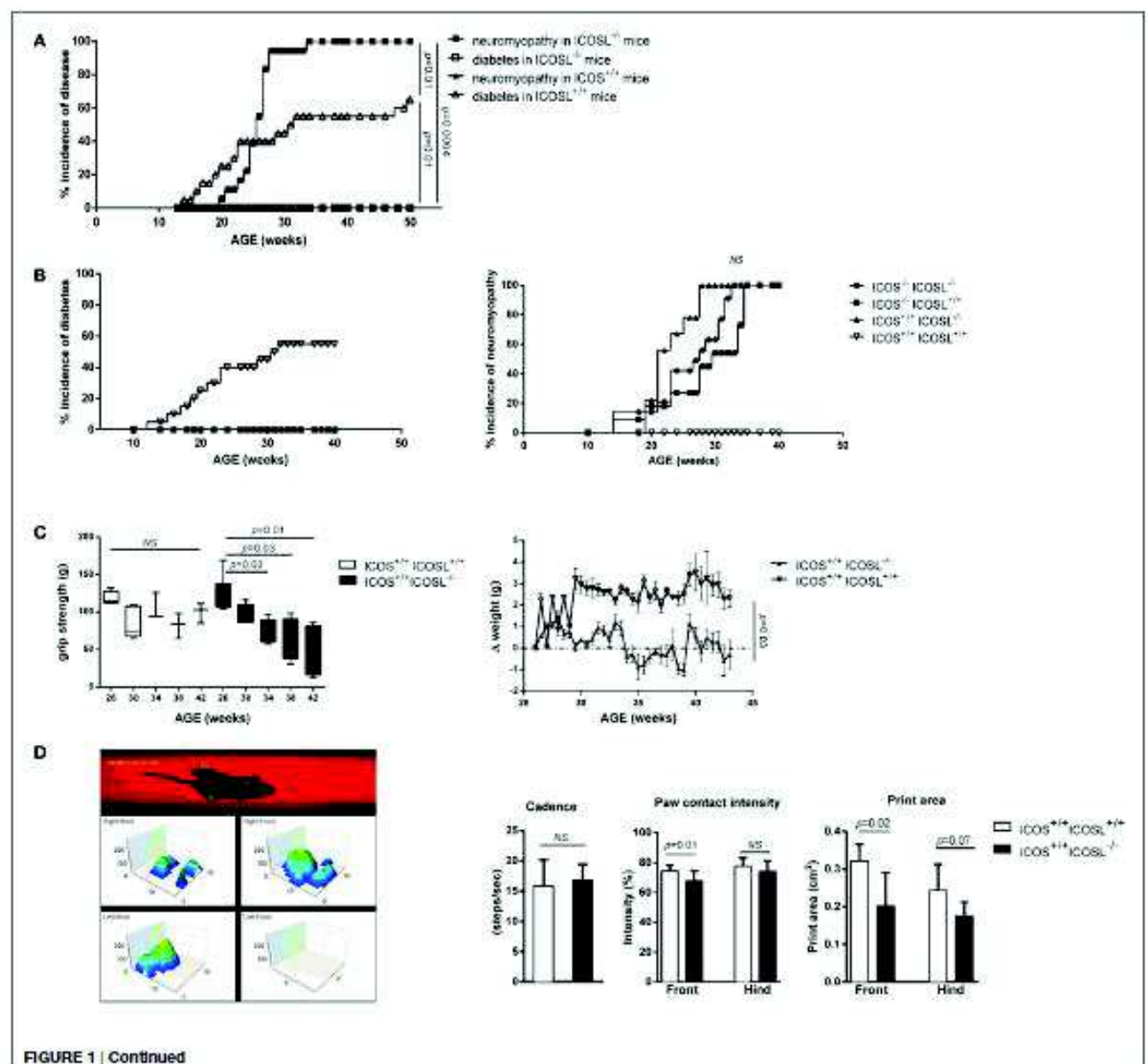
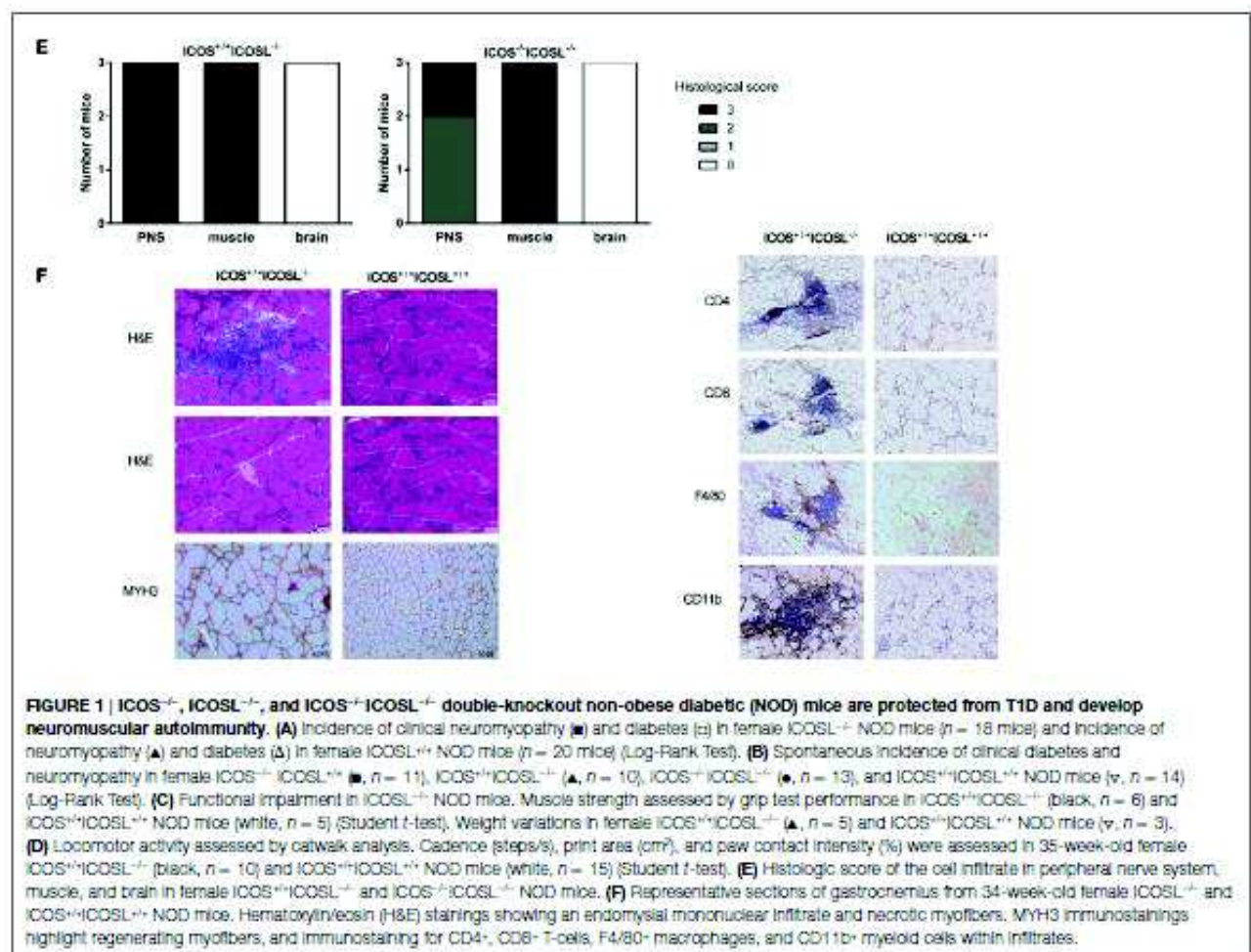


FIGURE 1 | Continued



ICOSL was expressed on almost 50% of B-cells, 40% of myeloid cells, and 21% of dendritic cells (Figure 2F). Regarding mRNA expression, *Icos* and *Icosl* were expressed in brain, in spine but not Schwann cells of control mice. In muscle, mRNA expression was found very low (Figure 2G).

The Neuromyopathy Is a CD4⁺ T Cell-Dependent Autoimmune Disease

In order to address whether the neuromuscular syndrome observed in ICOSL^{-/-} NOD mice was dependent on both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, as seen for diabetes, or on either of these two subsets, we performed adoptive transfer experiments. When CD4⁺ T-cells were transferred in association with CD8⁺ T-cells from diseased ICOSL^{-/-} NOD mice or even as a single subset into NOD.scid recipient mice, both recipient groups developed neuromyopathy but not diabetes. Development of clinical neuromyopathy was observed as early as by 25 days post-transfer and in 80–100% recipients within 50 days post-transfer. By contrast, ICOSL^{-/-} CD8⁺ T-cells alone or splenocytes depleted in CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells (CD4⁺CD8⁺ T-cells) did transfer

neither neuromyopathy nor diabetes (Figure 3A). Histological analyses of recipient mice confirmed that either CD4⁺ T-cells or CD8⁺ T-cells in association with CD8⁺ T-cells transfer a neuromuscular infiltrate in NOD.scid recipients (Figure 3B). The composition of the infiltrate observed in muscles and nerves was identical to that observed in the spontaneously diseased mice (data not shown).

To confirm that autoimmune neuromyopathy development in ICOSL^{-/-} NOD mice was CD4⁺ T cell-dependent, we studied ICOSL^{-/-} NOD mice that were further deficient in either the *C2ta* or the *β2-m* genes. These mice were deprived of either class II-restricted CD4⁺ T-cells or class I-restricted CD8⁺ T-cells, respectively. ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} NOD mice did not develop autoimmune neuromyopathy, in contrast to control ICOSL^{-/-}CIITA^{+/+} NOD mice (Figure 3C). They did not develop diabetes over 40 weeks of survey (data not shown). By contrast, ICOSL^{-/-}β2-m^{-/-} NOD mice developed a neuromyopathy, along with a neuromuscular infiltrate that was comparable to that developed by ICOSL^{-/-}β2-m^{+/+} control NOD mice (Figure 3D). Thus, both ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} and ICOSL^{-/-}β2-m^{-/-} NOD mice were protected from diabetes, but only ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} NOD mice

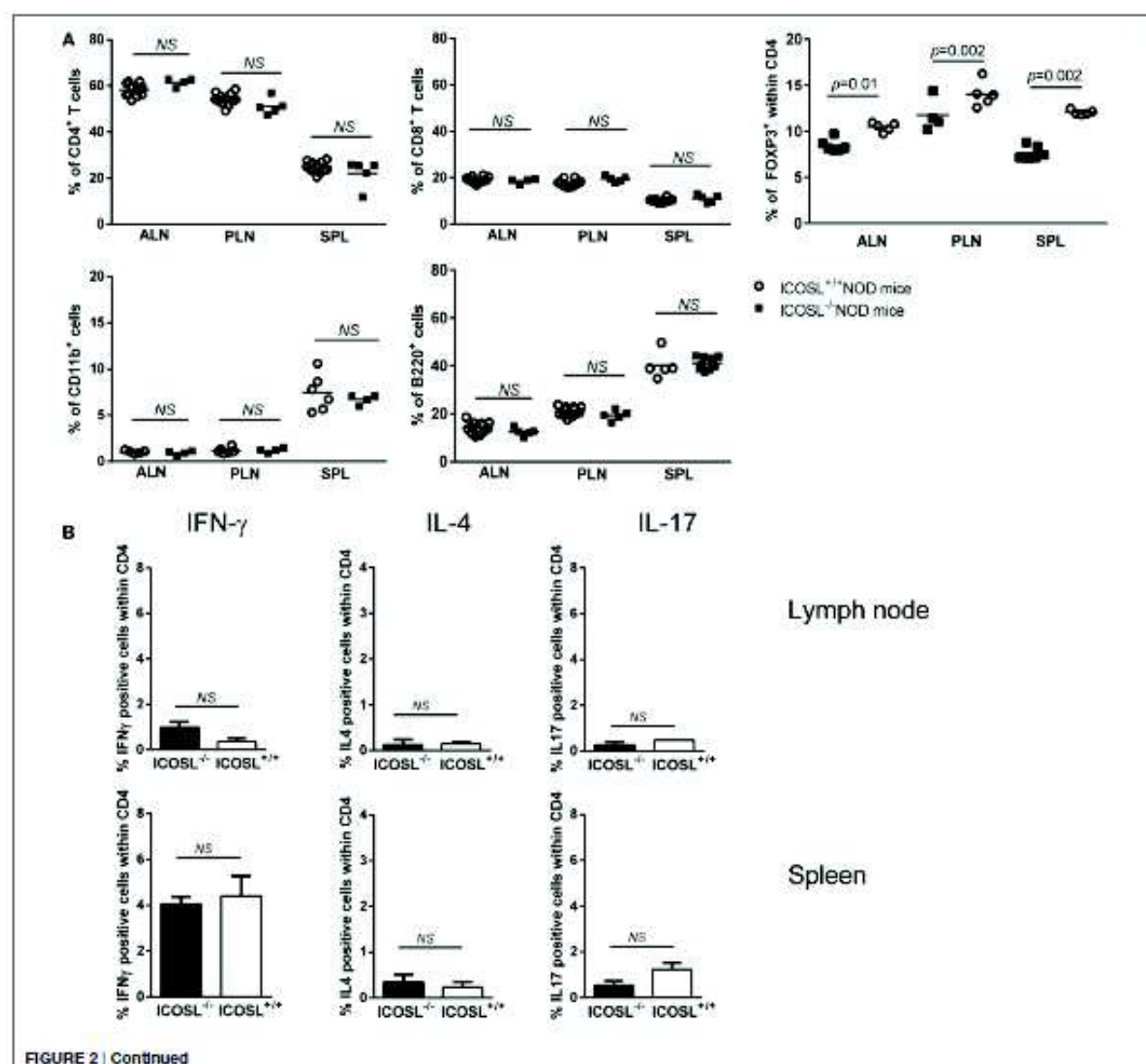
were protected from neuromuscular autoimmunity, confirming the major pathogenic role of CD4⁺ T-cells in the neuromuscular model.

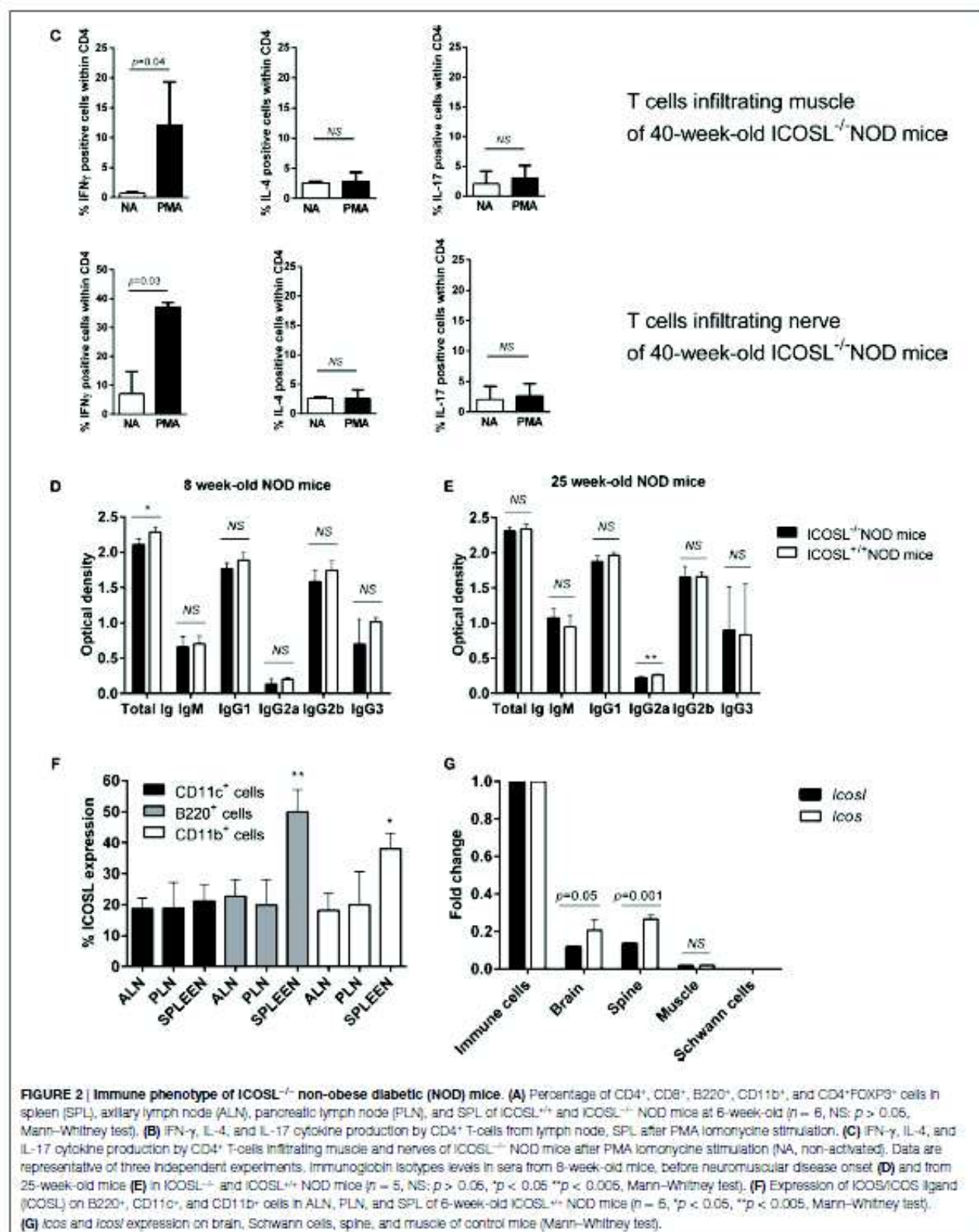
We further investigated whether muscle- and nerve-infiltrating cells were able to directly transfer nerve and/or muscle autoimmunity. We isolated muscle and nerve infiltrates and transferred them into NOD.*scid* mice. Recipients developed clinical neuromyopathy following the transfer of either nerve (two recipient mice out of three) or muscle (six recipient mice out of seven) infiltrating T-cells. Nerve-infiltrating T-cells induced nerve and muscular infiltrates in NOD.*scid* recipients, although, the number of infiltrating cells recovered from nerve, and transferred (0.2×10^6) was fivefold lower as compared to cells

recovered from infiltrated muscle and transferred into NOD.*scid* recipients (1.0×10^6) (Figure 3E).

ICOS/ICOSL Is Not Required for Efficient Transfer of Neuromyopathy

The ICOS/ICOSL pathway has been shown central in the primary activation of naive T-cells (28). Whether it is also required for activation of autoreactive effector cells remains an open issue. CD8⁺ T-cells and CD4⁺ T-cells from aging conventional or ICOSL^{+/+} NOD mice directly transfer diabetes into NOD.*scid* recipients without the need of prior *in vitro* activation. However, it has been observed that the transfer of





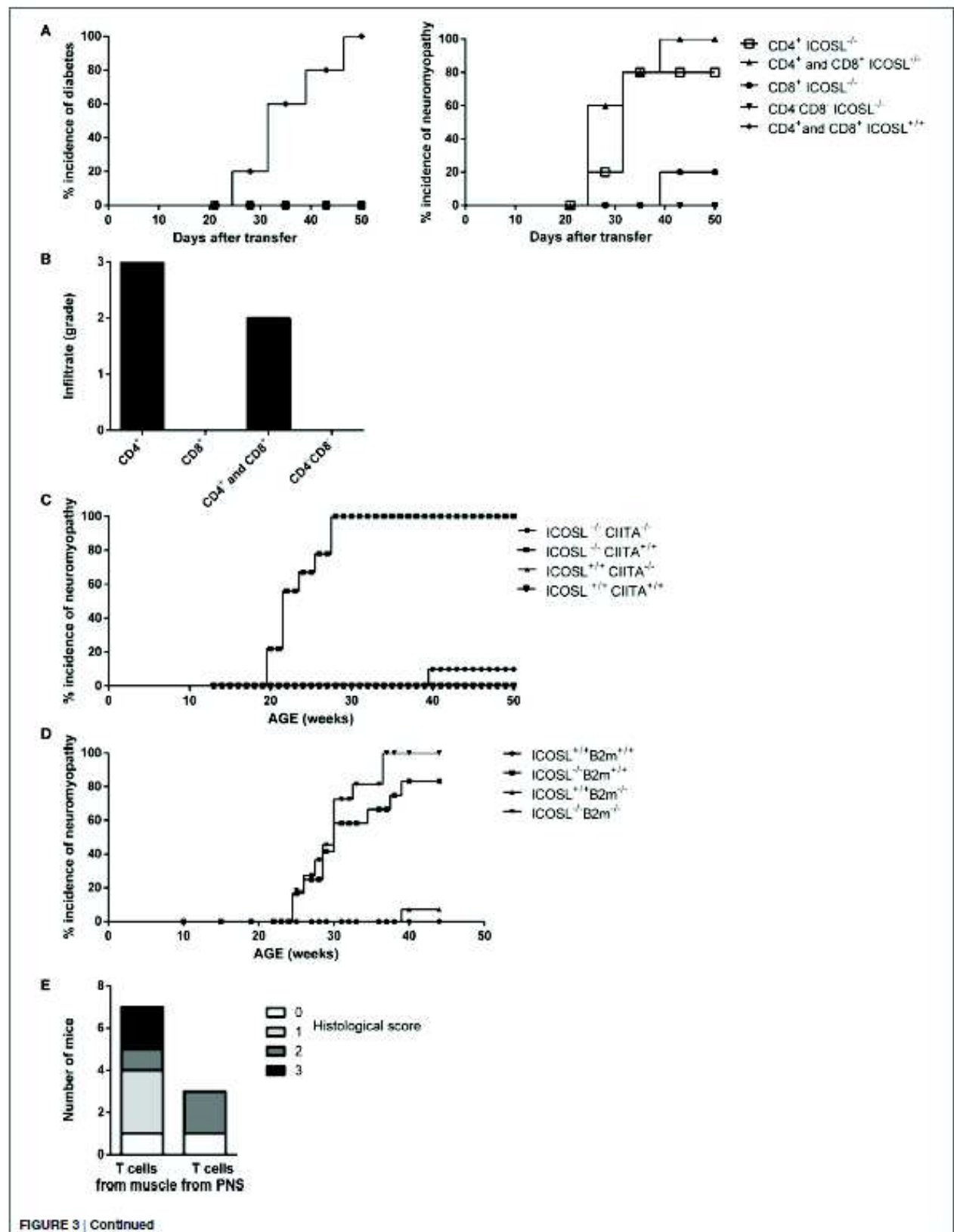


FIGURE 3 | Continued

FIGURE 3 | Continued

Neuromyopathy is CD4⁺ T cell-dependent. (A) Transfer of spleen (SPL) T-cells from ICOSL^{-/-} old mice into non-obese diabetic (NOD).scid mice. Eight-week-old female NOD.scid recipient mice were transferred with 0.8×10^6 stimulated CD4⁺ T-cells (■), 0.8×10^6 stimulated CD8⁺ T-cells (□), 0.8×10^6 purified stimulated T-cells including CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (▲), or 0.8×10^6 stimulated splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells called "CD4⁺ CD8⁺" (▼) from 40-week-old ICOSL^{-/-} NOD mice ($n = 6$, data are representative of three independent experiments). (B) Histological scores of infiltrating cells in muscle and peripheral nervous system of transferred recipients. (C) Incidence of neuromyopathy in ICOSL^{-/-}CD11a^{-/-} NOD mice. (D) Incidence of neuromyopathy in ICOSL^{-/-}beta2m^{-/-} NOD mice. (E) Histological scores of infiltrating cells in muscle and peripheral nervous system of recipient mice after transfer of T-cells isolated from muscles (10^6 cells) and nerves (0.2×10^6 cells) of 40-week-old ICOSL^{-/-} NOD mice.

diabetes is delayed by treatment of recipients mice by anti-class II monoclonal Abs (29), indicating that interactions between CD4⁺ effector T-cells and APCs through class II-mediated antigen presentation is still required for efficient transfer. In case of autoimmune neuromyopathy, the need for pre-activation of effector T-cells *in vitro* using anti-CD3 and anti-CD28-coated microplates prior to transfer has been reported when transferring autoimmune peripheral neuropathy by T lymphocytes from B7.2^{-/-} NOD donors (25). In order to address these issues in the present model, we investigated whether T-cells from ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD donors could transfer diabetes or neuromyopathy to conventional NOD.scid or ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients. As shown in **Figure 4A**, a significant delay was observed in transferring diabetes by CD4⁺ effector T-cells from 40-week-old control ICOSL^{+/+} into ICOSL^{-/-} as compared to ICOSL^{+/+} NOD.scid recipients. This was the case whatever CD4⁺T-cells were pre-activated *in vitro* by anti-CD3/anti-CD28 (**Figure 4A**) or not (**Figure 4B**). Strikingly, the transfer of diabetes by CD4⁺CD25⁻ T-cells was totally ineffective in ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients, indicating that ICOS-ICOSL interaction is a prerequisite to the transfer of diabetes by naïve effector CD4⁺ T-cells from diabetic donors (**Figure 4C**). No significant delay was observed when transferring autoimmune neuromyopathy by pre-activated CD4⁺ effector T-cells from ICOSL^{-/-} NOD mice into ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients as compared to ICOSL^{+/+} NOD.scid recipients (**Figure 4D**). We thus have evidence that ICOS⁺ T-cells from NOD ICOSL^{-/-} donors that have developed autoimmune neuromyopathy can transfer neuromyopathy into naïve ICOS^{+/+}ICOSL^{+/+} NOD.scid as well as ICOS^{+/+}ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients.

DISCUSSION

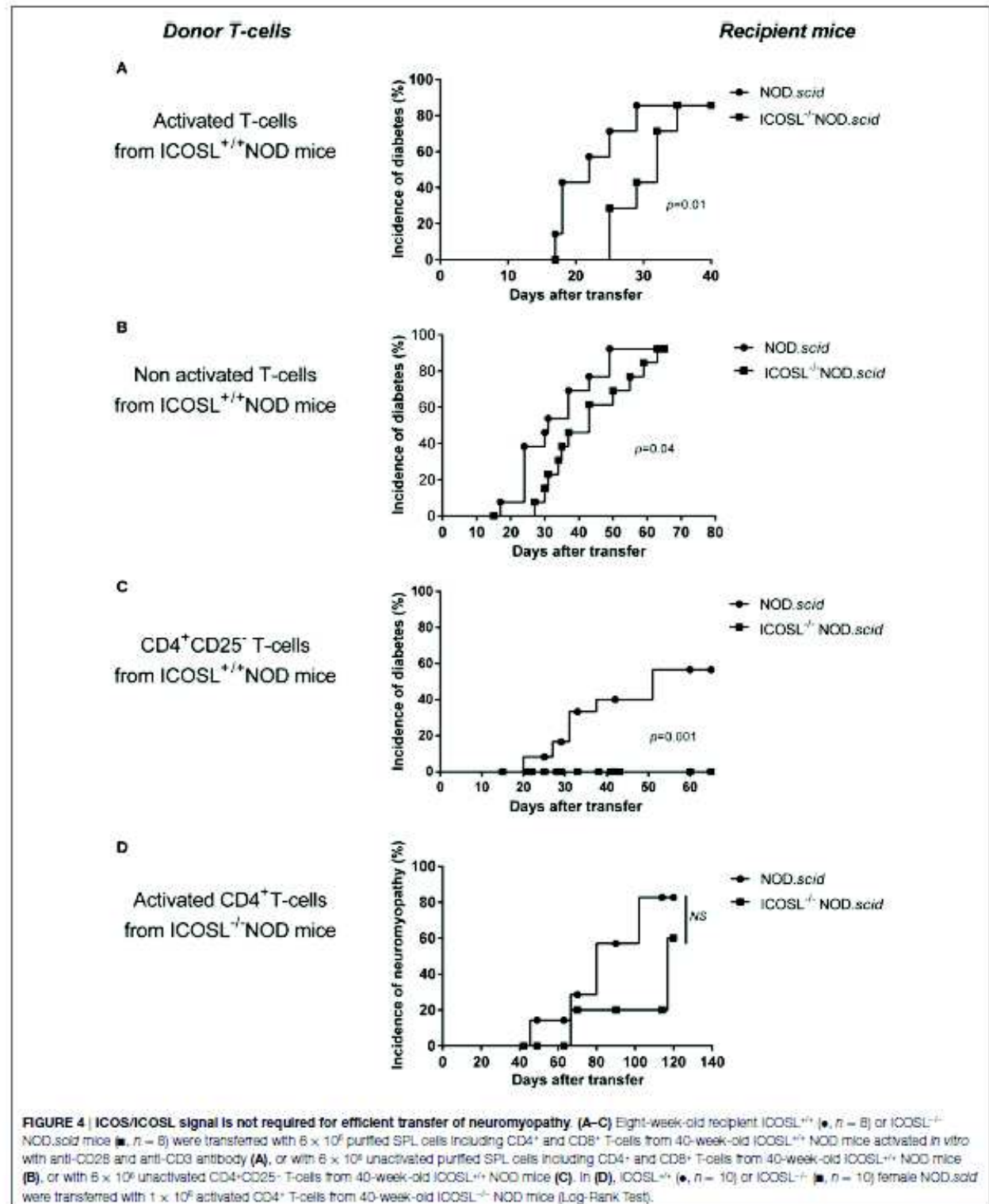
The development of diabetes onto the NOD mouse background is associated with many gene variants that are scattered through the genome. Many of these susceptibility genes affect pathways involved in controlling immune responses (30–32). Among regions harboring these genes, one has been identified as carrying genes coding for T lymphocyte costimulatory molecules. A region on mouse chromosome 1 (*Idd5*) that carries costimulatory genes has been associated to diabetes in the NOD mouse (33). While the *Icos*^{-/-} strain contains a large non-NOD-derived interval on mouse chromosome 1 containing several genes encoding costimulatory molecules genes such as *Ctla4*, *Icos*, and *Cd28*, the *Icosl*^{-/-} strain genome contains almost only NOD alleles on all chromosomes and few NOD alleles around the candidate gene locus. In addition, this region does neither overlap with known

Idd candidate regions or QTLs presently known to be involved in neuropathy (26). We therefore concentrated our phenotypic analysis on the *Icosl*^{-/-} strain rather than *Icos*^{-/-} strain.

Beyond inheritance of genes that predispose to general failure of immune-tolerance in the NOD mouse, some susceptibility regions harbour genes that control the targeting or deviation of autoimmunity toward or from β -cells, respectively (34). The MHC class II I-A^{b7} allele that is associated with diabetes is a major gene that focuses autoimmunity on the islet (20, 24, 35). Beyond class II genes, other genes and environmental factors have been shown to deviate autoimmunity from β -cells toward other tissues (21, 23, 36). However, there has been so far no example of autoimmune deviation from β -cells toward skeletal muscles.

The diabetes protective phenotype observed in ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice thus indicates that the ICOS/ICOSL pathway is directly involved in the T cell activation observed in autoimmune diabetes. ICOSL is constitutively expressed on B cells, dendritic cells, and macrophages. It is not expressed on T-cells that, however, show lasting intrinsic alterations in transfer experiments. ICOS⁺T-cells that develop in an ICOSL^{-/-} environment maintain the capacity to induce a neuromyopathy even in an ICOSL sufficient environment. As previously reported, it is likely that a turning point in autoimmune activation in the NOD mouse takes place within a narrow window around 3 weeks of age (1, 37). That may apply to the activation of nerve- and muscle-specific T lymphocytes in ICOSL^{-/-} NOD mice. A striking observation in ICOSL^{-/-}, as well as in ICOS^{-/-} NOD mice, is the deviation of autoimmunity from the islets toward muscles and peripheral nerves. T-cells are predominant among the different cell types observed within the infiltrates. Infiltrates of similar extent are observed in ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double-knockout NOD mice, which fit with previous reports of a single ICOS ligand. Finally, neuromuscular autoimmunity develops in ICOSL^{-/-} NOD mice within a time frame that is comparable to that of diabetes in conventional ICOSL^{+/+} NOD mice. However, the prevalence of neuromyopathy reaches 100% in female mice, which we never observed in case of diabetes in conventional female NOD mice.

Another example of the shift from diabetes to peripheral nerve autoimmunity has been evidenced in B7.2^{-/-} NOD mice in which myelin protein 0 has been identified as an auto-antigen (38). Autoimmune deviation in ICOSL^{-/-} NOD mice targets muscles and peripheral nerves, while it is restricted to peripheral neurons in B7.2^{-/-} NOD mice (14, 25). ICOS is expressed on T-cells after CD28/B7 engagement. We can suppose that, in absence of CD28/B7 signal, ICOS is weakly expressed in B7.2^{-/-} NOD mice



and that the phenotype is partial, as compared to ICOSL^{-/-} NOD mice or ICOS^{-/-} NOD mice. A critical point is that the CD28/B7 pathway indeed remained unaltered in ICOS^{-/-} NOD mice. Autoimmune dilated cardiomyopathy has been reported following disruption of the negative immunoregulatory receptor PD-1 in BALB/c mice along with diffuse deposition of IgG on the cardiomyocyte surface. Anti-troponin I autoantibodies have been identified as key effectors in this model (39, 40). Altogether, these observations point to local interactions of T-cells with resident cells as central in regulating organ-specific immune tolerance.

Finally, many diabetes auto-antigens that have been characterized so far are not strictly β -cell-specific and are expressed more generally in neuro-endocrine tissues. It has been reported that the glial sheath composed of peri-islet Schwann cells is destroyed in the pre-diabetic phase in the NOD mouse in which autoantibodies are detected and T-cells are activated against glial fibrillary acidic protein, which is predominantly expressed in Schwann cells and astrocytes (41). However, NOD mice do not spontaneously develop autoimmunity to nervous neuronal tissues.

Our data show that different mechanisms are involved in diabetes in NOD mice and in neuromuscular autoimmunity in ICOSL^{-/-} NOD mice. In the autoimmune neuromyopathy observed in ICOSL^{-/-} NOD mice, CD4⁺ T-cells are exclusive effectors as neuromuscular autoimmunity still develops in the absence of class I MHC molecules and thus of CD8⁺ effector T-cells. These data indicate that class I MHC molecules are not necessary for neuromyopathy development. This is in contrast with immune mechanisms involved in diabetes development in the conventional NOD mouse, in which the highest efficiency of diabetes transfer is observed when both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells are co-injected into naive NOD recipients (3). MHC class II^{-/-} NOD mice and MHC class I^{-/-} NOD mice are both protected from diabetes (42, 43). It has further been shown that diabetes is induced in β 2m^{-/-} NOD mice when class I expression is restored on β -cells (44). We previously showed in ICOS^{-/-} NOD mice that diabetes protection related with defective activation of effector T-cells. However, an accelerated form of diabetes was observed in BDC2.5 ICOS^{-/-} transgenic NOD mice, indicating both that diabetogenic BDC2.5 effectors were ICOS-independent and that the ICOS/ICOSL interaction was central in the activation of regulatory T-cells. Indeed, CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were significantly less efficient in suppressing the T cell response to a mimotope peptide than control regulatory T-cells *in vitro* (14). Similarly, we observed herein a decrease in relative and absolute numbers of CD4⁺FOXP3⁺ T-cells in SPL and pancreatic lymph nodes in ICOSL^{-/-} NOD mice. Cytokine patterns show that CD4⁺ T-cells present in muscle and nerve infiltrate of ICOSL^{-/-} NOD mice are biased toward a Th1 profile with high IFN- γ secretion. In this line, a previous study of inflammatory myopathies in patients evidenced the crucial role of ICOSL in inducing CD4⁺ T-cell responses (both Th1 and Th2), which could be suppressed *in vitro* by using an anti-ICOSL antibody (45).

Our transfer experiments show that neuromyopathy is efficiently transferred in NOD.scid recipients that express ICOSL or not. This suggests that neuromyopathogenic T-cells that have developed in the absence of ICOSL remain ICOSL-independent in the periphery, in contrast to diabetogenic T-cells that are ICOS-dependent. Therefore, naive diabetogenic T-cells need ICOS/ICOSL signal to be activated and to transfer diabetes.

Events that link muscle and nerve autoimmunity remain an open issue in ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice. We never observed mice in which autoimmune responses to muscle and nerve were dissociated. One possibility that will require further assessment is that common auto-antigens are targeted by the autoimmune response in muscle and nerve. A related possibility is that distinct isoforms of the same auto-antigen are targeted. Damage in either muscles or nerves would then develop as a spreading of autoimmunity to epitope that would be shared with the primary auto-antigen against which the autoimmune response develops. This second possibility would require determining what tissue is the primary target of the autoimmune response that develops in the absence of ICOS/ICOSL signaling.

In conclusion, while ICOS^{-/-} or ICOSL^{-/-} NOD mice are protected from T1D, they develop autoimmunity against neural and muscular tissues, indicating that ICOS-ICOSL interactions are important in polarizing NOD autoimmunity. Neuromyopathy is CD4⁺/MHC class II-dependent and show a Th1 pattern. This model should be helpful for identifying new biomarkers in idiopathic forms of peripheral nerve and muscular autoimmunity and provides the first mouse model of spontaneous autoimmune myopathy akin to human myositis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CBriet, NP, CM, OB, and CBoitard—substantial contributions to the conception and design of the work; CBriet, GB, IT, CBecourt, LD, J-CR, CM, OB, CBoitard, UR, and CA—acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; CBriet, GB, IT, CBecourt, LD, J-CR, NP, CM, OB, CBoitard, UR, and CA—drafting the work or revising it critically for important intellectual content; CBriet, GB, IT, CBecourt, LD, J-CR, NP, CM, OB, CBoitard, UR, and CA—final approval of the version to be published and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hans Lassman (Vienna) for his initial assistance with muscle and nerve histology.

FUNDING

This work was funded by AFM grant (myoAID—application number 17643), FRM grant (Fondation pour la Recherche Médicale—FDM20081114737), and "Association pour la Recherche sur le Diabète" (ARD) grant.

REFERENCES

1. Pridmore B, Langer E, Lepault F, Caryl JC, Bottard C. Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* (2005) 54(Suppl 2):S87–96. doi:10.2337/diabetes.54.supp.2.S87
2. Knip M, Simell O. Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2:a007690. doi:10.1101/cshperspect.a007690
3. Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M. Analysis of the roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* (1992) 22:2387–93. doi:10.1002/eji.1830220931
4. Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* (1992) 51:285–322. doi:10.1016/S0065-2776(08)60490-3
5. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* (2005) 23:447–85. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643
6. Kay TW, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE, Allison I. RIP-beta 2-microglobulin transgene expression restores insulinitis, but not diabetes, in beta 2-microglobulin null nonobese diabetic mice. *J Immunol* (1996) 157:3688–93.
7. Wong PS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* (1996) 183:67–76. doi:10.1084/jem.183.1.67
8. Bour-Jordan H, Bluestone JA. How suppressor cells led to anergy, costimulation, and beyond. *J Immunol* (2009) 183:4147–9. doi:10.4049/jimmunol.0990078
9. Peter HH, Warnatz K. Molecules involved in T-B co-stimulation and B cell homeostasis: possible targets for an immunological intervention in autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther* (2005) 5(Suppl 1):S61–71. doi:10.1517/14712598.5.1.S61
10. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, Qin HY, et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* (1996) 5:285–93. doi:10.1016/S1074-7613(96)80323-4
11. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* (2000) 12:431–40. doi:10.1016/S1074-7613(00)80195-8
12. Jabs C, Greve B, Chang TT, Sobel RA, Sharpe AH, Kuchroo VK. Genetic background determines the requirement for B7 costimulation in induction of autoimmunity. *Eur J Immunol* (2002) 32:2687–97. doi:10.1002/1521-4141(200209)32:9<2687::AID-IMMU2687>3.0.CO;2-I
13. Hawiger D, Tran H, Du W, Booth CJ, Wen L, Dong C, et al. ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. *J Immunol* (2008) 180:3140–7. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3140
14. Prevot N, Briet C, Lassmann H, Tardivel I, Roy E, Morin J, et al. Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur J Immunol* (2010) 40:2267–76. doi:10.1002/eji.201004016
15. Krug I, Williams AJ, Beales PE, Doniach I, Gale EA, Pozzilli P. Parathyroiditis in the non-obese diabetic mouse – a new finding. *J Endocrinol* (1991) 131:193–6. doi:10.1677/joe.0.1310193
16. Many MC, Manirattana S, Denef JE. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1996) 104(Suppl 3):17–20. doi:10.1055/s-0029-1211673
17. Beales PE, Castri F, Valiant A, Rosignoli G, Buckley L, Pozzilli P. Adrenalitis in the non-obese diabetic mouse. *Autoimmunity* (2002) 35:329–33. doi:10.1080/089169302100003189
18. Rivero VE, Cailleau C, Depiante-Depauli M, Riera CM, Carnaud C. Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP). *J Autoimmun* (1998) 11:603–10. doi:10.1006/jaut.1998.0248
19. Hutchings PR, Verma S, Phillips JM, Harach SZ, Howlett S, Cooke A. Both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells are required for iodine accelerated thyroiditis in NOD mice. *Cell Immunol* (1999) 192:113–21. doi:10.1006/cimm.1998.1446
20. Slattery RM, Kjer-Nielsen L, Allison I, Charlton B, Mandel TE, Miller JE. Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-Ak transgenic mice. *Nature* (1990) 345:724–6. doi:10.1038/345724a0
21. Lyons PA, Armitage N, Argentina E, Denny P, Hill NJ, Lord CJ, et al. Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, Idd3, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping. *Genome Res* (2000) 10:446–53. doi:10.1101/gr.10.4.446
22. Cha S, Nagashima H, Peck AB, Humphreys-Reher MG. Idd3 and Idd5 alleles from nod mice mediate Sjogren's syndrome-like autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* (2002) 506:1035–9. doi:10.1007/978-1-4615-0717-8_44
23. Koarada S, Wu Y, Fertig N, Sass DA, Nalesnik M, Todd JA, et al. Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain. *J Immunol* (2004) 173:2315–23. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2315
24. Lindqvist AK, Nakken B, Sundler M, Kjellen P, Jonsson R, Holmdahl R, et al. Influence on spontaneous tissue inflammation by the major histocompatibility complex region in the nonobese diabetic mouse. *Scand J Immunol* (2005) 61:119–27. doi:10.1111/j.0300-9475.2005.01550.x
25. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* (2001) 19:225–52. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.225
26. Bour-Jordan H, Thompson HL, Giampaolo JR, Davini D, Rosenthal W, Bluestone JA. Distinct genetic control of autoimmune neuropathy and diabetes in the non-obese diabetic background. *J Autoimmun* (2013) 45:58–67. doi:10.1016/j.jaut.2013.06.005
27. Jiang F, Yoshida T, Nakaki H, Terawaki S, Chikuma S, Kato Y, et al. Identification of QTLs that modify peripheral neuropathy in NOD.H2b-Pdcd1^{−/−} mice. *Int Immunol* (2009) 21:499–509. doi:10.1093/intimm/dxp020
28. Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* (2009) 229:41–66. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00775.x
29. Bottard C, Bendelac A, Richard MF, Carnaud C, Bach JF. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by anti-I-A monoclonal antibodies: transfer of protection by splenic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988) 85:9719–23. doi:10.1073/pnas.85.24.9719
30. Ridgway WM, Peterson LB, Todd JA, Rainbow DB, Healy B, Burren OS, et al. Gene-gene interactions in the NOD mouse model of type 1 diabetes. *Adv Immunol* (2008) 100:151–75. doi:10.1016/S0065-2776(08)00806-7
31. Yip I, Fathman CG. Type 1 diabetes in mice and men: gene expression profiling to investigate disease pathogenesis. *Immunol Res* (2014) 58:340–50. doi:10.1007/s12026-014-8501-8
32. Reed JC, Herold KC. Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM. *Nat Rev Endocrinol* (2015) 11:308–14. doi:10.1038/nrendo.2014.236
33. Colucci F, Bergman ML, Penha-Goncalves C, Cilio CM, Holmberg D. Apoptosis resistance of nonobese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:8670–4. doi:10.1073/pnas.94.16.8670
34. Johansson AC, Lindqvist AK, Johansson M, Holmdahl R. Genetic heterogeneity of autoimmune disorders in the nonobese diabetic mouse. *Scand J Immunol* (2003) 57:203–13. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01235.x
35. Chosich N, Harrison LC. Suppression of diabetes mellitus in the non-obese diabetic (NOD) mouse by an autoreactive (anti-I-Ag7) islet-derived CD4⁺ T-cell line. *Diabetologia* (1993) 36:716–21. doi:10.1007/BF00401141
36. Baxter AG, Horsfall AC, Healey D, Ozegbe P, Day S, Williams DG, et al. Mycobacteria precipitate an SLE-like syndrome in diabetes-prone NOD mice. *Immunology* (1994) 83:227–31.
37. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med* (2003) 198:1527–37. doi:10.1084/jem.20030966
38. Louvet C, Kabre BG, Davini DW, Martinier N, Su MA, Devoss JJ, et al. A novel myelin P0-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy. *J Exp Med* (2009) 206:507–14. doi:10.1084/jem.20082113

39. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* (2001) 291:319–22. doi:10.1126/science.291.5502.319
40. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* (2003) 9:1477–83. doi:10.1038/nm955
41. Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* (2003) 9:198–205. doi:10.1038/nm818
42. Katz J, Benoist C, Mathis D. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol* (1993) 23:3358–60. doi:10.1002/eji.1830231244
43. Mora C, Wong PS, Chang CH, Flavell RA. Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice. *J Immunol* (1999) 162:4576–88.
44. Faustman DL. MHC class I and autoimmune diabetes. *Biomed Pharmacother* (1993) 47:3–10. doi:10.1016/0753-3322(93)90030-O
45. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Malms A, Lochmüller H, Hohlfeld R, et al. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* (2003) 126:1026–35. doi:10.1093/brain/awg114

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Briet, Bourdenet, Rogner, Becourt, Tardivel, Drouot, Arnoult, do Rego, Prevot, Massaad, Boyer and Boitard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Conclusion de la publication n°1

Ce travail confirme l'absence de diabète chez les souris NOD invalidées pour ICOSL et permet d'établir ce modèle comme le 1^{er} modèle expérimental spontané de MI. Nous avons montré que la physiopathologie est auto-immune avec un rôle prépondérant des L_T CD4⁺ qui, issus des organes cibles de la maladie, produisent de l'IFN- γ mais pas d'IL-4 ni d'IL-17. Il semble donc que la maladie soit médiée par la sous-population Th1.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer si les souris NOD invalidées pour ICOS/ICOSL, en tant que modèle de MI, pouvaient permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs de la maladie. L'identification d'aAc permettrait de mieux préciser le caractère auto-immun dans ce modèle, ce qui a été l'objet de la publication n°2.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Les souris NOD *Icos*^{-/-} et *Icosl*^{-/-} comme modèle de myopathie inflammatoire

Les résultats obtenus pour partie dans les 2 premières publications ainsi que dans les résultats complémentaires montrent que les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icosl*^{-/-} développent une maladie musculaire d'apparition tardive (aux alentours de 23 semaines) et de progression lente (sur plusieurs mois). Les 2 lignées présentent un phénotype très semblable, cependant, les souris NOD *Icos*^{-/-} développent une maladie légèrement plus précoce ; c'est pourquoi nous les avons préférentiellement utilisées dans ce travail. Nous avons pu affirmer le caractère auto-immun de l'atteinte musculaire dans ce modèle grâce à l'association des critères suivants :

- infiltrat musculaire de cellules immunitaires,
- transfert de la maladie à des souris NOD.*scid* par transfert de splénocytes issus de souris NOD *Icos*^{-/-} ou *Icosl*^{-/-},
- amélioration de la maladie par traitement immunosuppresseur (corticoïdes).

En comparaison aux autres modèles de MI générés jusqu'alors, ce modèle présente l'avantage majeur d'être spontané. Il paraît donc tout à fait adapté à la mise en place d'études physiopathologiques et d'études thérapeutiques.

Il faut cependant noter les limites de ce modèle. Tout d'abord, et même si nous nous sommes concentrés dans ce travail sur la partie musculaire de la maladie, les souris présentent également une atteinte des nerfs périphériques et il est difficile de délimiter la part du déficit moteur qui revient au versant musculaire et au versant neurologique. De même, les tests fonctionnels sont influencés par les 2 versants de la maladie, il est donc difficile de trouver des tests ou des paramètres reflétant uniquement l'une ou l'autre des atteintes. Une difficulté supplémentaire réside dans le choix de la lignée témoin de ce modèle puisque les souris NOD, contrairement aux souris NOD déficientes pour ICOS/ICOSL, déclarent leur diabète jeune (à partir de 10-12 semaines) engendrant une mortalité importante avant même l'âge d'apparition de la MI dans les autres lignées.

Par ailleurs, il faut avoir à l'esprit qu'il s'agit d'un modèle murin nécessitant une organisation très rigoureuse dans le maintien et l'amplification des lignées, en accord avec les expériences qui doivent être prévues très en amont, puisque les souris développent leur MI aux alentours de 5 à 6 mois. Il serait de ce fait intéressant d'accélérer l'apparition de la maladie chez

les souris NOD *Icos*^{-/-}. Pour ce faire, une piste à explorer serait d'immuniser des souris NOD *Icos*^{-/-} jeunes (6-8 semaines) contre les aAg candidats identifiés dans la publication n°2. Dans cette perspective, j'ai développé les ALBIA afin de pouvoir quantifier la réponse humorale lors de ces futures expériences. La maladie étant médiée par des L_TCD4⁺ produisant de l'IFN- γ , l'immunisation devrait alors se faire à l'aide d'adjuvants tels que des CpG orientant la réponse vers un profil Th1. Si cette stratégie permet d'accélérer la maladie chez les souris déficientes, il serait également intéressant d'immuniser des souris NOD WT afin d'évaluer l'effet pathogène de l'auto-immunité en l'absence de déficit en costimulation.

2. Identification de nouveaux biomarqueurs

Comme nous l'avons vu, les MSA/MAA ont largement contribué à l'amélioration du diagnostic et du pronostic de la maladie. De plus, des travaux récents ont montré que les aAc anti-SRP et anti-HMGCR sont pathogènes pour le muscle, à la fois *in vitro* sur culture de myoblastes et *in vivo* chez la souris (Arouche-Delaperche et al., 2017; Bergua et al. submitted). Cependant, un nombre important de patients sont séronégatifs pour les MSA/MAA connus. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons donc mis à profit le modèle NOD *Icos*^{-/-} pour rechercher la présence de réactivités antigéniques contre des protéines présentes dans le muscle des souris malades.

Par une approche d'électrophorèse en 2 dimensions des protéines musculaires puis d'hybridation par le sérum des souris malades, nous avons identifié 4 aAg candidats.

Nous avons par la suite recherché la présence d'aAc ciblant les protéines orthologues humaines correspondantes aux 4 aAg identifiés chez la souris. Grâce aux tests ALBIA développés dans ce travail, nous avons identifié des patients comme positifs pour les aAc anti-MDH2, représentant environ 1,5% des individus dans une cohorte de patients adressés à l'hôpital pour suspicion de MI. Il faut noter qu'historiquement, au cours des découvertes progressives de MSA/MAA, plusieurs ont initialement été détectés chez peu de patients, à l'instar des anti-Ku (Mimori et al., 1981) et des anti-NXP2 (Ichimura et al., 2012). De plus, la cohorte étudiée dans ce travail est très hétérogène puisqu'il s'agit de patients présentant un tableau clinique faisant suspecter une MI. Or, comme nous l'avons vu, les MSA/MAA sont généralement associés à une entité de MI particulière (à l'exception des anti-FHL1). Des travaux en cours ont pour objectif de rechercher la présence d'aAc anti-MDH2 au sein de différentes cohortes au sein desquelles les

patients ont reçu le diagnostic d'une MI identifiée. Ainsi, nous pourrions déterminer si cet aAc est associé à une entité particulière.

La protéine MDH2 est une enzyme ubiquitaire d'expression mitochondriale, catalysant au sein du cycle de Krebs l'oxydation réversible du malate en oxaloacétate. Par ailleurs, nous avons observé grâce à la coloration au trichrome de Gomori une granularité au sein de certaines fibres musculaires pouvant évoquer des anomalies mitochondriales. Ces données suggèrent que la physiopathologie de la MI développée dans ce modèle pourrait comporter une part de stress oxydatif.

Nous allons maintenant approfondir cet aspect.

3. Rôle du stress oxydatif dans les myopathies inflammatoires

Il faut noter que les mécanismes physiopathologiques responsables du développement des MI reposent sur des mécanismes immunologiques mais également sur des mécanismes non-immunologiques (Coley et al., 2012). Dans notre travail, la première étude protéomique réalisée chez des souris NOD *Icos*^{-/-} et *Icosl*^{-/-} a montré que les protéines dérégulées appartenaient majoritairement aux voies métaboliques du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire, indiquant une sollicitation plus importante des voies oxydatives dans le muscle des souris malades. Les ROS (*reactive oxygen species*) sont de puissants agents oxydants, impliqués dans la signalisation cellulaire et l'homéostasie. Lorsqu'ils sont produits en excès, les ROS peuvent endommager les macromolécules par un phénomène appelé stress oxydatif. Les altérations protéiques peuvent ensuite impacter de nombreux aspects de la fonction musculaire (Westerblad and Allen, 2011).

Des travaux ont d'ores et déjà montré que certaines protéines du stress oxydatif étaient dérégulées dans l'IBM (Li et al., 2014). Dans la DM, un premier travail a montré une augmentation de la peroxydation des lipides dans le muscle (Gitiaux et al., 2013), suggérant une importante production de ROS. Ces résultats ont récemment été confirmés par une étude de Meyer et coll. à laquelle le laboratoire a contribué. Ces travaux montrent que la signature IFN de type 1 décrite dans la DM est corrélée à un dysfonctionnement mitochondrial et que l'IFN- β induit cette atteinte mitochondriale *via* la production de ROS dans les cellules musculaires (Meyer et al., 2017). Il est cependant probable que la physiopathologie impliquant les IFN de type 1 soit plus complexe

puisqu'ils ont également été décrit pour réduire l'artériogénèse (Gitiaux et al., 2013; Teunissen et al., 2015).

Bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle connu de DM dans la littérature, il a été montré que le modèle d'EAM induit par immunisation contre la myosine présente quelques-unes de ses caractéristiques telles que la signature IFN de type 1 (Meyer et al., 2017). La N-acétylcystéine est un principe actif connu pour favoriser l'élimination des ROS. De manière intéressante, Meyer et coll. ont montré dans leurs travaux que le traitement des souris par la N-acétylcystéine avant induction de l'EAM permettait de réduire le taux de ROS produits dans les muscles et de prévenir l'apparition de la faiblesse musculaire. Par ailleurs, les souris traitées ne présentaient pas de dysfonctionnement mitochondrial ni d'infiltrat inflammatoire musculaire.

Concernant notre modèle NOD *Icos*^{-/-}, des travaux préliminaires du laboratoire semblent montrer que l'administration préventive de N-acétylcystéine dans l'eau de boisson des souris pourrait prévenir l'apparition de la maladie (Abad et al., unpublished). Après confirmation de ces résultats, il serait intéressant de tester également un mode d'administration curatif, afin de déterminer si la régulation du stress oxydatif est capable d'enrayer les phénomènes inflammatoires caractéristiques de la maladie. A terme, il serait intéressant de déterminer si une thérapeutique combinée visant à normaliser à la fois l'activité des voies oxydatives et la tolérance périphérique peut avoir un effet synergique sur le traitement de la pathologie.

4. Rôle physiopathologique et thérapeutique des Treg

La tolérance centrale a pour but l'élimination des L_T auto-réactifs dans le thymus. Ce phénomène n'est cependant pas infaillible et des cellules auto-réactives sont physiologiquement retrouvées en périphérie. L'intégrité des tissus est alors maintenue grâce au phénomène de tolérance périphérique, faisant intervenir notamment les Treg, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et l'anergie. Les maladies auto-immunes sont classiquement dues à une rupture de tolérance et une dérégulation de la balance entre facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Ainsi, le rôle des Treg est étudié dans un grand nombre de ces maladies et notamment dans le DT1. Chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et *Icosl*^{-/-}, nous avons identifié un déficit en Treg.

4.1. Rôle physiopathologique

Les travaux de Burzyn et coll. ont montré que les Treg sont essentiels à la réparation d'une lésion musculaire dans un contexte aiguë et très inflammatoire après injection de cardiotoxine dans le muscle, et également dans un contexte chronique et peu inflammatoire chez la souris mdx (modèle expérimental de myopathie de Duchenne). Au total, il est démontré que les Treg influencent la réparation musculaire de plusieurs façon : (i) par régulation des cellules myéloïdes (probablement les macrophages) infiltrant le muscle lésé en favorisant leur conversion d'un phénotype pro-inflammatoire à anti-inflammatoire, (ii) par régulation des L_T effecteurs, (iii) par action directe sur les cellules satellites qui semblent posséder une plus grande capacité à former des colonies en présence de Treg (Burzyn et al., 2013).

Dans le contexte de notre travail, il est intéressant de noter que les nTreg semblent dépendre de l'activation *via* CD28 pour leur génération et leur maintien, tandis que ICOS influence leur survie (Bour-Jordan and Bluestone, 2009; Simpson et al., 2010; Takahashi et al., 2000). Inversement, les iTreg ne dépendent pas de CD28 puisque chez les souris NOD CD28KO qui développent un diabète accéléré, le traitement par AcM anti-CD3 guérit le diabète grâce à la restauration d'une tolérance associée à l'induction de iTreg (Belghith et al., 2003). Les iTreg semblent plutôt dépendre de la sécrétion d'IL-2 et de TGF- β (Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007). De plus, les souris C57BL/6 *Icos*^{-/-} et BALB/C *Icos*^{-/-} présentent un défaut quantitatif en Treg en périphérie tandis que leur taux est normal dans le thymus, suggérant qu'il ne s'agirait pas d'un défaut de génération thymique (Burmeister et al., 2008). Des travaux plus récents ont également montré l'implication de la voie ICOS/ICOSL dans l'induction des iTreg à partir de L_T CD4⁺ *via* l'expression de ICOSL par les cellules souches mésenchymateuses, l'activation de la voie PI3K-Akt et la production d'IL-1 β (Lee et al., 2017).

La voie ICOS/ICOSL semblerait donc plutôt influencer de façon plus importante l'induction des iTreg que la production des nTreg. Cependant, l'équipe de Mathis et Benoist a montré que les Treg jouant un rôle dans la réparation musculaire seraient principalement d'origine thymique (Burzyn et al., 2013; Kuswanto et al., 2016; Panduro et al., 2016).

Suite à ce travail, nous formulons l'hypothèse que le mécanisme immunomodulateur des Treg dans la réparation musculaire peut impliquer les 2 sous-populations iTreg et nTreg, selon le contexte immunitaire et/ou la cinétique du phénomène. Pour approfondir cette hypothèse dans notre modèle de souris NOD *Icos*^{-/-}, il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie le phénotype des Treg musculaires retrouvés chez nos souris en phase active de la maladie, incluant

notamment l'étude des marqueurs d'activation des Treg (CTLA-4, GITR, PD-1, CD25, CD44, CD62L par exemple) ainsi que certains autres marqueurs comme helios, la neuropiline-1, TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) ou l'amphiréguline.

4.2. Rôle thérapeutique

L'expansion des Treg par administration d'IL-2 à faibles doses est une stratégie permettant de contrôler les réponses auto-immunes grâce aux Treg sans pour autant induire d'immunosuppression. Cette stratégie est prometteuse puisque de premiers travaux cliniques suggèrent que des maladies auto-immunes comme la vascularite induite par le virus de l'hépatite C, la maladie du greffon contre l'hôte, le DT1, l'alopecia areata ou encore le lupus érythémateux systémique pourraient bénéficier d'une telle approche (Castela et al., 2014; Hartemann et al., 2013; He et al., 2016; Humrich et al., 2015; Klatzmann and Abbas, 2015; Koreth et al., 2011; Matsuoka et al., 2013; Rosenzwajg et al., 2015; Saadoun et al., 2011). Une stratégie proche est l'administration de complexes IL-2/anti-IL-2(JES6-1) décrits pour permettre une meilleure expansion des Treg que l'IL-2 à faibles doses. Ce traitement a été utilisé avec succès dans le modèle expérimental de myopathie de Duchenne, la souris *mdx* (Burzyn et al., 2013; Villalta et al., 2014) et permet une amélioration significative de la myasthénie dans son modèle murin (Liu et al., 2010) ; confirmant le rôle positif des Treg sur la réparation musculaire.

Dans notre travail, nous avons montré que le traitement par faibles doses d'IL-2 permet de décaler l'apparition de la maladie. Il faut cependant noter que les souris s'étant immunisées contre l'IL-2 recombinante humaine, l'effet n'a pas perduré dans le temps. Contrairement à ce qui était attendu, l'administration des complexes IL-2/anti-IL-2(JES6-1) a eu un effet délétère entraînant la mort de 5 souris sur 6. Nous avons vu que le mécanisme d'action de ces complexes est dû à la fixation d'un AcM à l'IL-2, sur le site de fixation du CD122, qui favorise sa fixation à son récepteur de haute affinité. Cependant, ce récepteur de haute affinité est exprimé par les Treg mais également par les L_T CD4⁺ effecteurs activés. Nous pensons que chez nos souris NOD *Icos*^{-/-}, dont la pathologie est médiée par des L_T CD4⁺CD25⁺ présents en grande quantité, l'IL-2 s'est fixée sur les L_T effecteurs de la maladie et aurait pu entraîner un orage cytokinique par sur-activation des L_T CD4⁺ responsables de la maladie. D'ailleurs, cet effet a été montré dans un modèle d'arthrite induite par le virus Chikungunya. En effet, bien qu'un traitement prophylactique dans ce modèle prévienne l'apparition de l'arthrite, lorsque les souris sont traitées selon un schéma curatif, une exacerbation de l'atteinte articulaire est observée et expliquée par l'activation des L_T CD4⁺CD25⁺ effecteurs notamment dans les ganglions drainants (Lee et al., 2016). Il faut donc

noter que ces complexes qui, en contexte immunitaire « naïf » permettent une expansion spécifique des Treg, peut se révéler d'utilisation délicate dans un contexte auto-immun chronique en présence de L_T $CD4^+CD25^+$ activés.

Dans notre modèle, bien que le décalage de la MI observé après administration de faibles doses d'IL-2 suggère que les Treg $Icos^{-/-}$ sont sensibles à l'IL-2, il serait intéressant de confirmer ce résultat par des expériences de stimulation *in vitro* et de les compléter par des études sur les voies de signalisation impliquées, notamment celle de STAT5, ainsi que des tests fonctionnels tels que des expériences de suppression par co-culture de Treg avec des L_T effecteurs ou encore par quantification d'IL-10 et/ou TGF- β après stimulation. Il faut cependant noter que dans un modèle auto-immun et chronique tel que celui-ci, il reste compliqué d'isoler les Treg des L_T $CD4^+CD25^+$ effecteurs. Pour pallier cette limite technique, il serait utile (bien que relativement complexe) de développer par *backcross* des souris doubles transgéniques NOD $Icos^{-/-}$ $Foxp3^{GFP+}$ dans lesquelles la GFP (*green fluorescent protein*) est placée sous le contrôle du promoteur endogène Foxp3.

Cette année, les travaux de Durost et coll. ont ouvert la piste d'une nouvelle stratégie pour l'expansion des Treg *in vivo* par injection d'un AAV (*adeno-associated virus*) codant pour l'IL-2 humaine. Pour ce faire, ils ont utilisé des souris NOD.scid $IL2\gamma^{null}$ (NSG), déficientes à la fois en lymphocytes (T et B) et également pour la chaîne γ commune à de multiples récepteurs de cytokines (dont l'IL-2). Ces souris ont été humanisées pour la moelle osseuse, le foie et le thymus, et ont permis de montrer que l'injection de la thérapie génique aboutit à une sécrétion d'IL-2 humaine suffisante mais contrôlée, de façon à induire l'expansion des Treg sans agir sur les L_T conventionnels (Durost et al., 2017). Cet effet immunomodulateur sur les Treg est retrouvé à partir d'un mois après injection des AAV et semble perdurer au moins jusqu'à 10 mois post-traitement (fin du suivi expérimental). Nous pourrions utiliser dans le futur une approche similaire dans notre modèle.

5. Hypothèses physiopathologiques

Le tissu musculaire est sans cesse soumis à de multiples micro-lésions auxquelles le muscle réagit par un niveau faible, mais suffisant, de régénération. Comme nous l'avons vu, le processus de régénération musculaire se déroule selon une phase de dégénération inflammatoire suivie d'une phase de régénération. La coordination de ces 2 phases ainsi que la balance entre facteurs pro- et anti-inflammatoires sont d'une importance cruciale pour la reconstruction fonctionnelle du muscle.

Le mécanisme physiopathologique observé chez les souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL est dû aux L_T $CD4^+$ produisant de l'IFN- γ . De façon très intéressante, il a été montré *in vitro* que l'IFN- γ n'était pas cytotoxique pour les myoblastes en culture, mais qu'il inhibe leur prolifération et leur différenciation (Kalovidouris et al., 1993). *In vivo*, malgré la nécessité de l'IFN- γ pour initier la phase inflammatoire de la régénération musculaire, il peut ensuite empêcher la conversion des macrophages pro-inflammatoires M1 en M2 anti-inflammatoires et joue également un rôle direct sur les cellules musculaires (*via* le facteur myogénique MyoD), affectant leurs capacités régénératrices (Villalta et al., 2011b). La présence de cette cytokine pourrait donc inhiber la régénération musculaire et favoriser le développement de la MI chez nos souris.

La maladie musculaire développée dans notre modèle murin est également associée à un défaut quantitatif en Treg ; or, la présence de ces cellules régulatrices est primordiale pour la résolution de la régénération musculaire lors de la phase anti-inflammatoire (Burzyn et al., 2013; Kuswanto et al., 2016; Tidball, 2017). De plus, nos données préliminaires sur le traitement préventif par faibles doses d'IL-2 chez les souris NOD *Icos*^{-/-} suggèrent que la restauration d'un taux normal de Treg pourrait permettre de prévenir l'apparition de la maladie. Le défaut en Treg observé dans ce modèle est donc très probablement impliqué dans la non-résolution de la phase inflammatoire de la régénération musculaire, entraînant alors une inflammation chronique au niveau musculaire associée à un défaut de tolérance périphérique et au développement de la MI.

Malgré une certaine redondance entre les voies de costimulation CD28/B7 et ICOS/ICOSL, il faut noter certaines particularités et notamment leur profil de production cytokinique. ICOS, contrairement à CD28, ne promeut pas la production d'IL-2 en grande quantité (Hutloff et al., 1999; Rudd and Schneider, 2003), mais induit une plus forte production d'IL-10 (Hutloff et al., 1999; Pot et al., 2009; Witsch et al., 2002). Bien que les Treg soient activés par de faibles quantités d'IL-2, un déficit majeur peut néanmoins avoir un effet délétère sur cette

sous-population. L'IL-10 quant à elle est une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans la régénération musculaire *via* la conversion M1/M2 (Deng et al., 2012; Villalta et al., 2011a) et la tolérance périphérique (notamment *via* la promotion des Treg). Chez nos souris déficientes en ICOS/ICOSL, nous pouvons donc formuler l'hypothèse que l'absence de signalisation par cette voie pourrait entraîner un défaut de production d'IL-10 et ainsi favoriser à la fois la persistance de la phase inflammatoire de la régénération et un défaut de tolérance périphérique. De plus, la polarisation Th1 IFN- γ^+ observée chez nos souris correspond à une orientation antagoniste de la polarisation Th2 IL-4 $^+$, cette dernière cytokine jouant un rôle dans la réparation musculaire (Horsley et al., 2003).

L'analyse histologique des lésions musculaires chez les souris NOD *Icos* $^{-/-}$ et NOD *Icost* $^{-/-}$ a montré que l'infiltrat inflammatoire est composé en grande partie de macrophages. Or ces cellules jouent un rôle très important dans la régénération musculaire et vont se convertir d'un phénotype M1 à un phénotype M2 lors du passage de la phase inflammatoire à la phase anti-inflammatoire, notamment grâce à l'IL-10 (Kharraz et al., 2013; Tidball, 2017). Il serait donc intéressant d'analyser le phénotype macrophagique dans le muscle *Icos* $^{-/-}$ et *Icost* $^{-/-}$ par cytométrie en flux ou par immunohistochimie, pour objectiver la présence ou non de cette conversion. Dans l'état actuel de nos connaissances, nous pouvons faire l'hypothèse qu'un défaut de production cytokinique anti-inflammatoire empêche la conversion des macrophages M1 en M2 et, là encore, contribue à un défaut de régénération musculaire.

Compte tenu de l'ensemble de ces données, nous formulons l'hypothèse que la physiopathologie de la MI développée par les souris NOD *Icos* $^{-/-}$ et NOD *Icost* $^{-/-}$ repose sur un mécanisme complexe, mettant en jeu à la fois l'immunité innée (notamment les macrophages), l'immunité adaptative (Treg, L γ CD4 $^+$ produisant de l'IFN- γ) ainsi que l'environnement cytokinique, aboutissant à une dérégulation de la balance entre facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, un défaut de tolérance périphérique et de réparation musculaire (Figure 40).

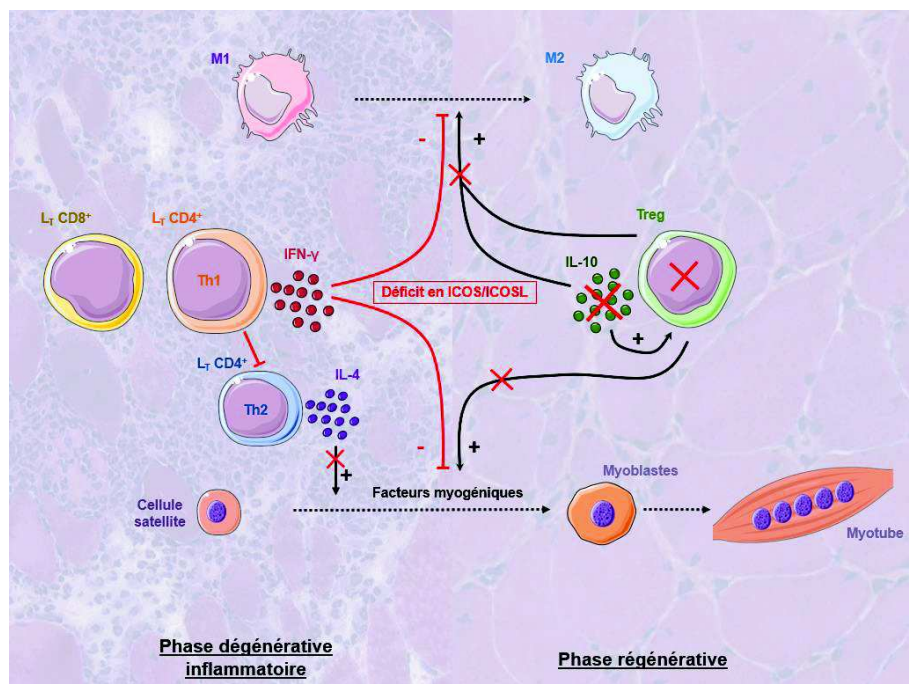


Figure 40. Hypothèses physiopathologiques de la myopathie inflammatoire chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icost*^{-/-}.

Lors de la régénération musculaire, une phase de dégénération inflammatoire est suivie d'une phase régénérative. Cette transition se fait grâce à la conversion de macrophages M1 en M2 sous l'action des Treg *via* l'IL-10 d'une part ; et de cellules satellites en myotubes d'autre part sous l'action de l'IL-4 et des Treg. Un déficit de signalisation *via* la voie ICOS/ICOSL pourrait nuire à ce processus par : (i) une sur-expression d'IFN-γ diminuant d'une part la conversion des M1 en M2 par action sur les facteurs myogéniques, et d'autre part la production d'IL-4, (ii) un déficit en Treg associé à une sous-expression d'IL-10 entravant la différenciation des cellules satellites. En plus de son action spécifique sur la régénération musculaire, le défaut d'immunorégulation *via* l'IL-10 et les Treg entraînerait également un défaut de tolérance périphérique dans le muscle.

Cependant, un défaut de tolérance périphérique ne peut expliquer à lui seul la cible de l'auto-immunité développée chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icost*^{-/-}, retrouvée uniquement au niveau musculaire ; et le défaut de régénération musculaire associé ne peut l'expliquer qu'en partie.

Rappelons que les travaux de Prevot et coll. avaient montré que les souris double transgéniques NOD BDC2.5 *Icos*^{-/-} développaient un diabète accéléré contrairement aux souris NOD *Icos*^{-/-} protégées vis-à-vis du diabète (Prevot et al., 2010). La dépendance en ICOS des L_T effecteurs semble donc varier selon le clone considéré. Dans ce travail, nous formulons finalement l'hypothèse que : (i) les L_T effecteurs diabétogènes dépendent de ICOS contrairement aux L_T effecteurs responsables de la MI ; (ii) les Treg, eux, dépendent de ICOS quelque soit le clone considéré. Selon cette hypothèse, puisque les L_T effecteurs diabétogènes dépendent de ICOS, ils n'induisent plus le diabète chez les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icost*^{-/-}. Les Treg, dépendant de ICOS, ne peuvent plus réguler les L_T effecteurs, ni dans le cas du diabète ni dans le cas de la MI.

Cependant, les L_T effecteurs diabétogènes n'étant plus fonctionnels, le diabète ne se déclare pas ; tandis que les L_T effecteurs responsables de la MI, ne dépendant pas d'ICOS et non régulés par les Treg, exercent leurs fonctions délétères dans le muscle et induisent la MI (Figure 41). Ces hypothèses, tant sur le plan mécanistique que sur le plan de la cible antigénique, restent à être confirmées.

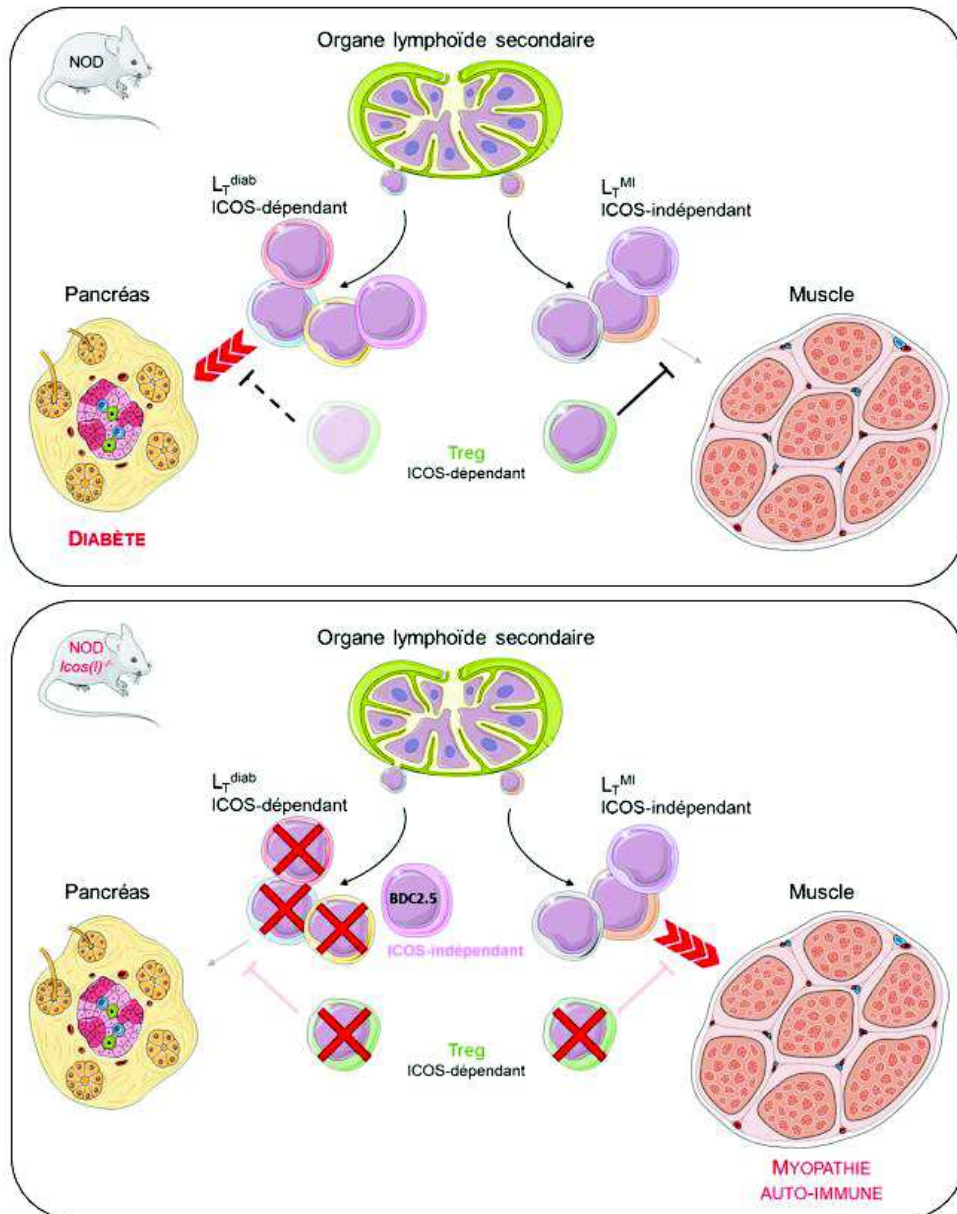


Figure 41. Déviation de l'auto-immunité lors de l'invalidation de la voie ICOS/ICOSL chez les souris NOD.

Hypothèse basée sur le fait que les Treg ainsi que les L_T effecteurs responsables du diabète (L_T^{diab}) seraient dépendants d'ICOS, contrairement à ceux responsables de la MI (L_T^{MI}). Chez la souris NOD, la présence de L_T dirigés contre les cellules β pancréatiques sont responsables de l'apparition du diabète auto-immun, tandis que la présence de Treg suffit au maintien de la tolérance dans le muscle. Chez les souris invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL, les L_T dirigés contre les épitopes pancréatiques ne sont plus fonctionnels et le diabète n'est pas déclenché. Les L_T responsables de la MI ne dépendants pas de ICOS sont toujours fonctionnels, contrairement aux Treg qui n'assurent plus le maintien de la tolérance et permettent le déclenchement de la MI.

V. CONCLUSION

Les travaux menés au cours de cette thèse ont porté sur les souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icosl*^{-/-} et ont permis de :

- caractériser la maladie musculaire de ces souris et d'en établir leur caractère auto-immun, notamment par des expériences de transfert de splénocytes,
- identifier des aAc chez ces souris et de déterminer qu'il existe des aAc anti-MDH2 chez certains patients atteints de MI,
- prouver l'intérêt de l'IRM pour détecter et suivre l'inflammation musculaire.

Par ailleurs, ce travail a également été mis à profit pour :

- ❖ développer un test biologique quantitatif (ALBIA) pour doser les aAc anti-MDH2 chez les patients atteints de MI,
- ❖ montrer l'intérêt du modèle NOD *Icos*^{-/-} pour tester de nouvelles thérapies immunologiques *in vivo*, en prenant l'exemple ici du traitement par IL-2.

Ce projet ouvre la voie à diverses études sur l'effet de la voie de costimulation ICOS/ICOSL sur les différentes sous-populations cellulaires et notamment sur la fonctionnalité des différentes populations de Treg, leur sensibilité à l'IL-2, leur potentiel de prolifération et sur les voies de signalisation impliquées notamment celle de STAT5.

En parallèle des études mécanistiques impliquant ICOS/ICOSL, ce modèle pourra permettre l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des MI : d'une part les traitements ciblant les mécanismes immuns par immunomodulation ciblée ; et d'autre part des molécules ciblant les mécanismes non-immuns de la maladie tels que le stress oxydatif.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acha-Orbea, H., and McDevitt, H.O. (1987). The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 2435–2439.

Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., and Kim, J.H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* *119*, 651–665.

Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Usui, Y., Harada, N., Yamazaki, T., Ma, J., Tezuka, K., Yagita, H., and Okumura, K. (2005). The Role of ICOS in the CXCR5+ Follicular B Helper T Cell Maintenance In Vivo. *J. Immunol.* *175*, 2340–2348.

Albrecht, I., Wick, C., Hallgren, Å., Tjärnlund, A., Nagaraju, K., Andrade, F., Thompson, K., Coley, W., Phadke, A., Diaz-Gallo, L.-M., Bottai, M., Nennesmo, I., Chemin, K., Herrath, J., Johansson, K., Wikberg, A., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., Danielsson, O., Krystufkova, O., Vencovsky, J., Landergren, N., Wahren-Herlenius, M., Padyukov, L., Kämpe, O., Lundberg, I.E. (2015). Development of autoantibodies against muscle-specific FHL1 in severe inflammatory myopathies. *J. Clin. Invest.* *125*, 4612–4624.

Al-Dabbagh, S., McPhee, J.S., Murgatroyd, C., Butler-Browne, G., Stewart, C.E., and Al-Shanti, N. (2015). The lymphocyte secretome from young adults enhances skeletal muscle proliferation and migration, but effects are attenuated in the secretome of older adults. *Physiol. Rep.* *3*.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Distech, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* *259*, 990–993.

Allenbach, Y., Solly, S., Gr?goire, S., Dubourg, O., Salomon, B., Butler-Browne, G., Musset, L., Herson, S., Klatzmann, D., and Benveniste, O. (2009). Role of Regulatory T Cells in a New Mouse Model of Experimental Autoimmune Myositis. *Am. J. Pathol.* *174*, 989–998.

Allenbach, Y., Benveniste, O., Goebel, H.-H., and Stenzel, W. (2017). Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *43*, 62–81.

Amato, A.A., and Griggs, R.C. (2003). Unicorns, dragons, polymyositis, and other mythological beasts. *Neurology* *61*, 288–289.

Anderson, M.S., and Bluestone, J.A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 447–485.

Anderson, A.C., Anderson, D.E., Bregoli, L., Hastings, W.D., Kassam, N., Lei, C., Chandwaskar, R., Karman, J., Su, E.W., Hirashima, M., Bruce, J.N., Kane, L.P., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A. (2007). Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* *318*, 1141–1143.

Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395–1401.

Andersson, H., Kirkhus, E., Garen, T., Walle-Hansen, R., Merckoll, E., and Molberg, Ø. (2017). Comparative analyses of muscle MRI and muscular function in anti-synthetase syndrome patients and matched controls: a cross-sectional study. *Arthritis Res. Ther.* *19*, 17.

Andersson, J., Englund, P., Sunnemark, D., Dahlstedt, A., Westerblad, H., Åkan, Nennesmo, I., Örn, A., and Lundberg, I.E. (2003). CBA/J mice infected with *Trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 27, 442–448.

Aouizerate, J., De Antonio, M., Bassez, G., Gherardi, R.K., Berenbaum, F., Guillemin, L., Berezné, A., Valeyre, D., Maisonobe, T., Dubourg, O., Cosnes, A., Benveniste, O., Authier, F.J. (2014). Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 154.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204, 1057–1069.

Arouche-Delaperche, L., Allenbach, Y., Amelin, D., Preusse, C., Mouly, V., Mauhin, W., Tchoupou, G.D., Drouot, L., Boyer, O., Stenzel, W., Butler-Browne, G., Benveniste, O. (2017). Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann. Neurol.* 81, 538–548.

Ascherman, D.P. (2012). Animal Models of Inflammatory Myopathy. *Curr. Rheumatol. Rep.* 14, 257–263.

Askanas, V., Engel, W.K., and Alvarez, R.B. (1992). Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am. J. Pathol.* 141, 31.

Askanas, V., Engel, W.K., Bilak, M., Alvarez, R.B., and Selkoe, D.J. (1994). Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am. J. Pathol.* 144, 177.

Bacchelli, C., Buckridge, S., Thrasher, A.J., and Gaspar, H.B. (2007). Translational Mini-Review Series on Immunodeficiency: Molecular defects in common variable immunodeficiency: Molecular defects in common CVID. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 401–409.

Bachmaier, K., Pummerer, C., Shahinian, A., Ionescu, J., Neu, N., Mak, T.W., and Penninger, J.M. (1996). Induction of autoimmunity in the absence of CD28 costimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 1752–1757.

Bai, Y., Tong, Y., Liu, Y., and Hu, H. (2017). Self-dsDNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*

Baker, R.L., DeLong, T., Barbour, G., Bradley, B., Nakayama, M., and Haskins, K. (2013). Cutting edge: CD4 T cells reactive to an islet amyloid polypeptide peptide accumulate in the pancreas and contribute to disease pathogenesis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 3990–3994.

Basharat, P., and Christopher-Stine, L. (2015). Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: Update on Diagnosis and Management. *Curr. Rheumatol. Rep.* 17.

Batchelor, T.T., Taylor, L.P., Thaler, H.T., Posner, J.B., and DeAngelis, L.M. (1997). Steroid myopathy in cancer patients. *Neurology* 48, 1234–1238.

- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., and Roncarolo, M.-G. (2006). Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 8338–8347.
- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* 10, 167–175.
- Baxter, A.G., and Hodgkin, P.D. (2002). Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 439–446.
- Belghith, M., Bluestone, J.A., Barriot, S., Mégret, J., Bach, J.-F., and Chatenoud, L. (2003). TGF- β -dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat. Med.* 9, 1202–1208.
- Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C., and Bach, J.F. (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J. Exp. Med.* 166, 823–832.
- Benveniste, O., Stenzel, W., Hilton-Jones, D., Sandri, M., Boyer, O., and van Engelen, B.G.M. (2015). Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 611–624.
- Benveniste, O., Stenzel, W., and Allenbach, Y. (2016). Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies: *Curr. Opin. Neurol.* 29, 662–673.
- Bergua, C., Chiavelli, H., Simon, J.P., Boyer, O., Jouen, F., Stenzel, W., and Martinet, J. (2016). Immune-mediated necrotizing myopathy. *Z. Rheumatol.* 75, 151–156.
- Betteridge, Z., and McHugh, N. (2016). Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J. Intern. Med.* 280, 8–23.
- Bigot, A., Duddy, W.J., Ouandaogo, Z.G., Negroni, E., Mariot, V., Ghimbovski, S., Harmon, B., Wielgosik, A., Loiseau, C., Devaney, J., Dumonceaux, J., Butler-Browne, G., Mouly, V., Duquez, S. (2015). Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle. *Cell Rep.* 13, 1172–1182.
- Bittner, R.E., Anderson, L.V., Burkhardt, E., Bashir, R., Vafiadaki, E., Ivanova, S., Raffelsberger, T., Maerk, I., Höger, H., Jung, M., Karbasiyan, M., Storch, M., Lassmann, H., Moss, J.A., Davison, K., Harrison, R., Bushby, K.M., Reis, A. (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat. Genet.* 23, 141–142.
- Blank, M., Cohen, J., Toder, V., and Shoenfeld, Y. (1991). Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3069–3073.
- Blechynden, L.M., Lawson, M.A., Tabarias, H., Garlepp, M.J., Sherman, J., Raben, N., and Lawson, C.M. (1997). Myositis induced by naked DNA immunization with the gene for histidyl-tRNA synthetase. *Hum. Gene Ther.* 8, 1469–1480.

Blotta, M.H., Marshall, J.D., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (1996). Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 3133–3140.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975a). Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 344–347.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975b). Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 403–407.

Bonner, S.M., Pietropaolo, S.L., Fan, Y., Chang, Y., Sethupathy, P., Morran, M.P., Beems, M., Giannoukakis, N., Trucco, G., Palumbo, M.O., Solimena, M., Pugliese, A., Polychronakos, C., Trucco, M., Pietropaolo, M. (2012). Sequence variation in promoter of *Ica1* gene, which encodes protein implicated in type 1 diabetes, causes transcription factor autoimmune regulator (AIRE) to increase its binding and down-regulate expression. *J. Biol. Chem.* 287, 17882–17893.

Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., Peter, H.H., Warnatez, K. (2006). ICOS Deficiency Is Associated with a Severe Reduction of CXCR5+CD4 Germinal Center Th Cells. *J. Immunol.* 177, 4927–4932.

Bothe, K., Aguzzi, A., Lassmann, H., Rethwilm, A., and Horak, I. (1991). Progressive encephalopathy and myopathy in transgenic mice expressing human foamy virus genes. *Science* 253, 555–557.

Bour-Jordan, H., and Bluestone, J.A. (2009). Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 229, 41–66.

Boussiotis, V.A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* 375, 1767–1778.

Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190.

Buckner, F.S., Wilson, A.J., and Van Voorhis, W.C. (1999). Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for β -galactosidase. *Infect. Immun.* 67, 403–409.

Burkhardt, H., Sehnert, B., Bockermann, R., Engström, A., Kalden, J.R., and Holmdahl, R. (2005). Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 35, 1643–1652.

Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.-P., Coyle, A.J., Kroczeck, R.A., and Hutloff, A. (2008). ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 180, 774–782.

Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T.G., Wagers, A.J., Benoist, C., Mathis, D. (2013). A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell* 155, 1282–1295.

Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity* 27, 111–122.

- Capsoni, S., Ruberti, F., Di Daniel, E., and Cattaneo, A. (2000). Muscular dystrophy in adult and aged anti-NGF transgenic mice resembles an inclusion body myopathy. *J. Neurosci. Res.* *59*, 553–560.
- Carpenter, S., Karpati, G., Heller, I., and Eisen, A. (1978). Inclusion body myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. *Neurology* *28*, 8–17.
- Carstens, P.-O., and Schmidt, J. (2014). Diagnosis, pathogenesis and treatment of myositis: recent advances. *Clin. Exp. Immunol.* *175*, 349–358.
- Castela, E., Le Duff, F., Butori, C., Ticchioni, M., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., and Passeron, T. (2014). Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol.* *150*, 748–751.
- Chahin, N., and Engel, A.G. (2008). Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM. *Neurology* *70*, 418–424.
- Chakrabarti, S., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Marks, C.B., Miyake, K., Liston, D.R., Fowler, K.T., Gorelick, F.S., and Andrews, N.W. (2003). Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J. Cell Biol.* *162*, 543–549.
- Chakravarti, S., Sabatos, C.A., Xiao, S., Illes, Z., Cha, E.K., Sobel, R.A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J. Exp. Med.* *202*, 437–444.
- Chargé, S.B.P., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* *84*, 209–238.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 336–347.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242.
- Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G., and Koh, T.J. (2008). Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C1183–C1191.
- Chiesa, R., Pestronk, A., Schmidt, R.E., Tourtellotte, W.G., Ghetti, B., Piccardo, P., and Harris, D.A. (2001). Primary Myopathy and Accumulation of PrPSc-Like Molecules in Peripheral Tissues of Transgenic Mice Expressing a Prion Protein Insertional Mutation. *Neurobiol. Dis.* *8*, 279–288.
- Chikuma, S., and Bluestone, J.A. (2003). CTLA-4 and Tolerance. *Immunol. Res.* *28*, 241–253.
- Cho, Y.-G., Cho, M.-L., Min, S.-Y., and Kim, H.-Y. (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* *7*, 65–70.
- Choi, Y.M., and Kim, B.C. (2009). Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livest. Sci.* *122*, 105–118.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932–946.

- Chou, J., Massaad, M.J., Cangemi, B., Bainter, W., Platt, C., Badran, Y.R., Raphael, B.P., Kamin, D.S., Goldsmith, J.D., Pai, S.Y., Al-Herz, W., Geha, R.S. (2015). A novel mutation in ICOS presenting as hypogammaglobulinemia with susceptibility to opportunistic pathogens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 794–797.
- Coley, W., Rayavarapu, S., and Nagaraju, K. (2012). Role of non-immune mechanisms of muscle damage in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 209.
- Collins, R.A., and Grounds, M.D. (2001). The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **49**, 989–1001.
- Corbel, S.Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T.R., Blau, H.M., and Rossi, F.M.V. (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* **9**, 1528–1532.
- Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 57–78.
- Croft, M., and Siegel, R.M. (2017). Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 217–233.
- Croft, M., Duan, W., Choi, H., Eun, S.-Y., Madireddi, S., and Mehta, A. (2012). TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol.* **33**, 144–152.
- Cruellas, M., Viana, V., Levy-Neto, M., Souza, F., and Shinjo, S. (2013). Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clinics* **68**, 909–914.
- Crum-Cianflone, N.F. (2008). Bacterial, Fungal, Parasitic, and Viral Myositis. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 473–494.
- Currie, S. (1971). Experimental myositis: The in-vivo and in-vitro activity of lymph-node cells. *J. Pathol.* **105**, 169–185.
- Custer, S.K., Neumann, M., Lu, H., Wright, A.C., and Taylor, J.P. (2010). Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1741–1755.
- Dalakas, M.C. (1991). Polymyositis, Dermatomyositis, and Inclusion-Body Myositis. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1487–1498.
- Dalakas, M.C. (2015). Inflammatory Muscle Diseases. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1734–1747.
- Dalakas, M.C., and Hohlfeld, R. (2003). Polymyositis and dermatomyositis. *The Lancet* **362**, 971–982.
- Dalakas, M.C., London, W.T., Gravell, M., and Sever, J.L. (1986). Polymyositis in an immunodeficiency disease in monkeys induced by a type D retrovirus. *Neurology* **36**, 569–572.
- Dang, M., Rockell, J., Wagner, R., Wenzlau, J.M., Yu, L., Hutton, J.C., Gottlieb, P.A., and Davidson, H.W. (2011). Human type 1 diabetes is associated with T cell autoimmunity to zinc transporter 8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 6056–6063.

- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **178**, 4022–4026.
- Davis, L.E., and Kornfeld, M. (2001). Experimental influenza B viral myositis. *J. Neurol. Sci.* **187**, 61–67.
- Dawkins, R.L. (1965). Experimental myositis associated with hypersensitivity to muscle. *J. Pathol.* **90**, 619–625.
- Dawkins, R.L., Eghtedari, A., and Holborow, E.J. (1971). Antibodies to skeletal muscle demonstrated by immunofluorescence in experimental autoallergic myositis. *Clin. Exp. Immunol.* **9**, 329.
- Degauque, N., Mariat, C., Kenny, J., Zhang, D., Gao, W., Vu, M.D., Alexopoulos, S., Oukka, M., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Kuchroo, V., Zheng, X.X., Strom, T.B. (2008). Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 735–741.
- Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S.A., Wang, Y., and Tidball, J.G. (2012). IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3669–3680.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* **409**, 97–101.
- Dong, Z., Davidson, D., Pérez-Quintero, L.A., Kurosaki, T., Swat, W., and Veillette, A. (2012). The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells. *Immunity* **36**, 974–985.
- Durost, P., Aryee, K.-E., Manzoor, F., Tisch, R., Mueller, C., Jurczyk, A., Shultz, L., and Brehm, M. (2017). Gene therapy with an AAV vector expressing human IL-2 alters immune system homeostasis in humanized mice. *Hum. Gene Ther.*
- Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmlevich, I., Friedmann, A., Karpati, G., Bradley, W.G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E.B., Beckmann, J.S., Argov, Z., Mitrani-Rosenbaum, S. (2001). The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat. Genet.* **29**, 83–87.
- Ellis, J.S., Hong, S.-H., Zaghouani, H., and Braley-Mullen, H. (2013). Reduced Effectiveness of CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells in CD28-Deficient NOD.H-2h4 Mice Leads to Increased Severity of Spontaneous Autoimmune Thyroiditis. *J. Immunol.* **191**, 4940–4949.
- Elovaara, I., Apostolski, S., van Doorn, P., Gilhus, N.E., Hietaharju, A., Honkaniemi, J., van Schaik, I.N., Scolding, N., Soelberg Sørensen, P., Udd, B. (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.
- Énée, É., Kratzer, R., Arnoux, J.-B., Barilleau, E., Hamel, Y., Marchi, C., Beltrand, J., Michaud, B., Chatenoud, L., Robert, J.-J., van Endert, P. (2012). ZnT8 is a major CD8⁺ T cell-recognized autoantigen in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes* **61**, 1779–1784.

Englund, P., Lindroos, E., Nennesmo, I., Klareskog, L., and Lundberg, I.E. (2001). Skeletal muscle fibers express major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies. *Am. J. Pathol.* 159, 1263–1273.

Esiri, M.M., and MacLennan, I.C.M. (1974). Experimental myositis in rats. I. Histological and creatine phosphokinase changes and passive transfer to normal syngeneic rats. *Clin. Exp. Immunol.* 17, 139–150.

Feltkamp, T.E.W., and Feltkamp-Vroom, T.M. (1965). Antibodies against the various types of skeletal muscle fibres. *Immunology* 9, 275–279.

Fielding, R.A., Manfredi, T.J., Ding, W., Fiatarone, M.A., Evans, W.J., and Cannon, J.G. (1993). Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 265, R166–172.

Finnish-German APECED Consortium (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* 17, 399–403.

Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.

Fréret, M., Drouot, L., Obry, A., Ahmed-Lacheheb, S., Dauly, C., Adriouch, S., Cosette, P., Authier, F.-J., and Boyer, O. (2013). Overexpression of MHC class I in muscle of lymphocyte-deficient mice causes a severe myopathy with induction of the unfolded protein response. *Am. J. Pathol.* 183, 893–904.

Fukuchi, K., Pham, D., Hart, M., Li, L., and Lindsey, J.R. (1998). Amyloid- β deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am. J. Pathol.* 153, 1687–1693.

Garchon, H.J., Luan, J.J., Eloy, L., Bédossa, P., and Bach, J.F. (1994). Genetic analysis of immune dysfunction in non-obese diabetic (NOD) mice: mapping of a susceptibility locus close to the Bcl-2 gene correlates with increased resistance of NOD T cells to apoptosis induction. *Eur. J. Immunol.* 24, 380–384.

Garcia-Cruz, A., and Garcia-Doval, I. (2010). Gottron's Papules and Dermatomyositis. *N. Engl. J. Med.* 363, e17.

Gitiaux, C., Kostallari, E., Lafuste, P., Authier, F.-J., Christov, C., and Gherardi, R.K. (2013). Whole microvascular unit deletions in dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 445–452.

Goebels, N., Michaelis, D., Wekerle, H., and Hohlfield, R. (1992). Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 661–667.

Gonzalez, A., Katz, J.D., Mattei, M.G., Kikutani, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Genetic control of diabetes progression. *Immunity* 7, 873–883.

Gonzalez, A., Andre-Schmutz, I., Carnaud, C., Mathis, D., and Benoist, C. (2001). Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. *Nat. Immunol.* 2, 1117–1125.

- Granger, S.W., and Rickert, S. (2003). LIGHT–HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 289–296.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.
- Griggs, R.C., Askanas, V., DiMauro, S., Engel, A., Karpati, G., Mendell, J.R., and Rowland, L.P. (1995). Inclusion body myositis and myopathies. *Ann. Neurol.* 38, 705–713.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Dräger, R., Eibel, H., Fischer, B., Schäffer, A.A., Mages, H.W., Kroczeck, R.A., Peter, H.H. (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat. Immunol.* 4, 261–268.
- Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., Chatenoud, L., Klatzmann, D., Salomon, B.L., Piaggio, E. (2010). 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.
- Hargis, A.M., Haupt, K.H., Prieur, D.J., and Moore, M.P. (1985). Animal model of human disease. Dermatomyositis. Familial canine dermatomyositis. *Am. J. Pathol.* 120, 323–325.
- Hartemann, A., Bensimon, G., Payan, C.A., Jacqueminet, S., Bourron, O., Nicolas, N., Fonfrede, M., Rosenzweig, M., Bernard, C., and Klatzmann, D. (2013). Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1, 295–305.
- Hawiger, D., Tran, E., Du, W., Booth, C.J., Wen, L., Dong, C., and Flavell, R.A. (2008). ICOS Mediates the Development of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* 180, 3140–3147.
- He, J., Zhang, X., Wei, Y., Sun, X., Chen, Y., Deng, J., Jin, Y., Gan, Y., Hu, X., Jia, R., Xu, C., Hou, Z., Leong, Y.A., Zhu, L., Feng, J., An, Y., Jia, Y., Li, C., Liu, X., Ye, H., Ren, L., Li, R., Yao, H., Li, Y., Chen, S., Zhang, X., Su, Y., Guo, J., Shen, N., Morand, E.F., Yu, D., Li, Z. (2016). Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* 22, 991–993.
- Hengstman, G.J.D., ter Laak, H.J., Vree Egberts, W.T.M., Lundberg, I.E., Moutsopoulos, H.M., Vencovsky, J., Doria, A., Mosca, M., van Venrooij, W.J., and van Engelen, B.G.M. (2006). Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1635–1638.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D., and Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* 199, 1479–1489.
- Hoefler, G., Noehammer, C., Levak-Frank, S., El-Shabrawi, Y., Schauer, S., Zechner, R., and Radner, H. (1997). Muscle-specific overexpression of human lipoprotein lipase in mice causes increased intracellular free fatty acids and induction of peroxisomal enzymes. *Biochimie* 79, 163–168.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.

Hoogendijk, J.E., Amato, A.A., Lecky, B.R., Choy, E.H., Lundberg, I.E., Rose, M.R., Vencovsky, J., de Visser, M., and Hughes, R.A. (2004). 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 337–345.

Horie, R., and Watanabe, T. (1998). CD30: expression and function in health and disease. *Semin. Immunol.* **10**, 457–470.

Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **113**, 483–494.

Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K.R., and Humphreys-Beher, M.G. (1992). Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol.* **263**, E607–614.

Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **4**, 82.

Humrich, J.Y., von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Alexander, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.-R., and Riemekasten, G. (2015). Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 791–792.

Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263–266.

Ichimura, Y., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Kaji, K., Hasegawa, M., Tanino, Y., Inokoshi, Y., Kawai, K., Kanekura, T., Habuchi, M., Igarashi, A., Sogame, R., Hashimoto, T., Koga, T., Nishino, A., Ishiguro, N., Sugimoto, N., Aoki, R., Ando, N., Abe, T., Kanda, T., Kuwana, M., Takehara, K., Fujimoto, M. (2012). Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 710–713.

Ignatius Arokia Doss, P.M., Roy, A.-P., Wang, A., Anderson, A.C., and Rangachari, M. (2015). The Non-Obese Diabetic Mouse Strain as a Model to Study CD8(+) T Cell Function in Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 541.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–3895.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10–producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* **204**, 105–115.

Jin, L.-W., Hearn, M.G., Ogburn, C.E., Dang, N., Nochlin, D., Ladiges, W.C., and Martin, G.M. (1998). Transgenic mice over-expressing the C-99 fragment of β PP with an α -secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. *Am. J. Pathol.* **153**, 1679–1686.

Joffe, M.M., Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Hicks, J.E., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1993). Drug therapy of the idiopathic inflammatory myopathies: predictors of response to prednisone, azathioprine, and methotrexate and a comparison of their efficacy. *Am. J. Med.* **94**, 379–387.

- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10–producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1213–1222.
- June, C.H., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S., and Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* *11*, 211–216.
- Kakulas, B.A. (1966). Destruction of differentiated muscle cultures by sensitised lymphoid cells. *J. Pathol.* *91*, 495–503.
- Kalli, K., Huntoon, C., Bell, M., and McKean, D.J. (1998). Mechanism responsible for T-cell antigen receptor-and CD28-or interleukin 1 (IL-1) receptor-initiated regulation of IL-2 gene expression by NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3140–3148.
- Kalovidouris, A.E., Plotkin, Z., and Graesser, D. (1993). Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. *J. Rheumatol.* *20*, 1718–1723.
- Kampylafka, E.I., Kosmidis, M.L., Panagiotakos, D.B., Dalakas, M., Moutsopoulos, H.M., and Tzioufas, A.G. (2012). The effect of intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment on patients with dermatomyositis: a 4-year follow-up study. *Clin. Exp. Rheumatol.* *30*, 397–401.
- Kanagawa, O., Martin, S.M., Vaupel, B.A., Carrasco-Marin, E., and Unanue, E.R. (1998). Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1721–1724.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., and Azuma, M. (2004). Costimulation via Glucocorticoid-Induced TNF Receptor in Both Conventional and CD25+ Regulatory CD4+ T Cells. *J. Immunol.* *172*, 7306–7314.
- Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., and Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* *23*, 779–796.
- Katsumata, Y., Harigai, M., Sugiura, T., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Matsumoto, Y., Kohyama, K., Soejima, M., Kamatani, N., and Hara, M. (2007a). Attenuation of Experimental Autoimmune Myositis by Blocking ICOS-ICOS Ligand Interaction. *J. Immunol.* *179*, 3772–3779.
- Katsumata, Y., Ridgway, W.M., Oriss, T., Gu, X., Chin, D., Wu, Y., Fertig, N., Oury, T., Vandersteen, D., Clemens, P., Camacho, C.J., Weinberg, A., Ascherman, D.P. (2007b). Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are associated with muscle and lung inflammation. *J. Autoimmun.* *29*, 174–186.
- Katz, J.D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* *74*, 1089–1100.
- Kawachi, I., Tanaka, K., Tanaka, M., and Tsuji, S. (2001). Dendritic cells presenting pyruvate kinase M1/M2 isozyme peptide can induce experimental allergic myositis in BALB/c mice. *J. Neuroimmunol.* *117*, 108–115.
- Khare, P., Challa, D.K., Devanaboyina, S.C., Velmurugan, R., Hughes, S., Greenberg, B.M., Ober, R.J., and Ward, E.S. (2017). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific antibodies from multiple sclerosis patients exacerbate disease in a humanized mouse model. *J. Autoimmun.*

- Kharraz, Y., Guerra, J., Mann, C.J., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2013). Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–9.
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Kimura, T., Moriya, M., Takata, K., Okuno, T., Kumanogoh, A., Kajiya, K., Yoshikawa, H., and Sakoda, S. (2009). Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 623–627.
- Kishimoto, H., and Sprent, J. (2001). A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat. Immunol.* 2, 1025–1031.
- Kitazawa, M., Green, K.N., Caccamo, A., and LaFerla, F.M. (2006). Genetically Augmenting A β 42 Levels in Skeletal Muscle Exacerbates Inclusion Body Myositis-Like Pathology and Motor Deficits in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* 168, 1986–1997.
- Klatzmann, D., and Abbas, A.K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 283–294.
- Koenig, M., Fritzler, M.J., Targoff, I.N., Troyanov, Y., and Senécal, J.-L. (2007). Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res. Ther.* 9, R78.
- Kohyama, K., and Matsumoto, Y. (1999). C-protein in the skeletal muscle induces severe autoimmune polymyositis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 98, 130–135.
- Kojima, T., Tanuma, N., Aikawa, Y., Shin, T., Sasaki, A., and Matsumoto, Y. (1997). Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat. *J. Neurol. Sci.* 151, 141–148.
- Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., Biefang, D.C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R.M., Avigan, D.E., Antin, J.H., Ritz, J., Soiffer, R.J. (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 2055–2066.
- Kotani, T., Takeuchi, T., Makino, S., Hata, K., Yoshida, S., Nagai, K., Wakura, D., Shoda, T., and Hanafusa, T. (2011). Combination with corticosteroids and cyclosporin-A improves pulmonary function test results and chest HRCT findings in dermatomyositis patients with acute/subacute interstitial pneumonia. *Clin. Rheumatol.* 30, 1021–1028.
- Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., and Freeman, G.J. (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 454–462.
- Kuchroo, V.K., Dardalhon, V., Xiao, S., and Anderson, A.C. (2008). New roles for TIM family members in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 577.
- Kudva, Y.C., Deng, Y.J., Govindarajan, R., Abraham, R.S., Marietta, E.V., Notkins, A.L., and David, C.S. (2001). HLA-DQ8 transgenic and NOD mice recognize different epitopes within the cytoplasmic region of the tyrosine phosphatase-like molecule, IA-2. *Hum. Immunol.* 62, 1099–1105.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., Kikutani, H. (2002). Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419, 629–633.

- Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K.K., Jang, Y.C., Wagers, A.J., Benoist, C., and Mathis, D. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* 44, 355–367.
- Kvist, A.-P., Latvanlehto, A., Sund, M., Eklund, L., Väisänen, T., Hägg, P., Sormunen, R., Komulainen, J., Fässler, R., and Pihlajaniemi, T. (2001). Lack of cytosolic and transmembrane domains of type XIII collagen results in progressive myopathy. *Am. J. Pathol.* 159, 1581–1592.
- Lafferty, K.J., Andrus, L., and Prowse, S.J. (1980). Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. *Immunol. Rev.* 51, 279–314.
- Lang, R.A., Metcalf, D., Cuthbertson, R.A., Lyons, I., Stanley, E., Kelso, A., Kannourakis, G., Williamson, D.J., Klintworth, G.K., and Gonda, T.J. (1987). Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* 51, 675–686.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourgue, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.
- Lazaridis, K., Dalianoudis, I., Baltatzidi, V., and Tzartos, S.J. (2017). Specific removal of autoantibodies by extracorporeal immunoabsorption ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 312, 24–30.
- Lee, H.-J., Kim, S.-N., Jeon, M.-S., Yi, T., and Song, S.U. (2017). ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells. *Sci. Rep.* 7, 44486.
- Lee, W.W.L., Teo, T.-H., Lum, F.-M., Andiappan, A.K., Amrun, S.N., Rénia, L., Röttschke, O., and Ng, L.F.P. (2016). Virus infection drives IL-2 antibody complexes into pro-inflammatory agonists in mice. *Sci. Rep.* 6, 37603.
- Leijon, K., Hammarström, B., and Holmberg, D. (1994). Non-obese diabetic (NOD) mice display enhanced immune responses and prolonged survival of lymphoid cells. *Int. Immunol.* 6, 339–345.
- Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H.Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5, 285–293.
- Li, K., Pu, C., Huang, X., Liu, J., Mao, Y., and Lu, X. (2014). Proteomic study of sporadic inclusion body myositis. *Proteome Sci.* 12, 45.
- Lidbury, B.A., Simeonovic, C., Maxwell, G.E., Marshall, I.D., and Hapel, A.J. (2000). Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus-infected mice. *J. Infect. Dis.* 181, 27–34.
- Lieberman, S.M., and DiLorenzo, T.P. (2003). A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62, 359–377.
- Link, C.D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9368–9372.

- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* *174*, 561–569.
- Liu, R., Zhou, Q., La Cava, A., Campagnolo, D.I., Van Kaer, L., and Shi, F.-D. (2010). Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1577–1589.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.
- Lohmann, T., Leslie, R.D., and Londei, M. (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun.* *9*, 385–389.
- Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Dalakas, M., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1991). A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* *70*, 360–374.
- Lownik, J.C., Luker, A.J., Damle, S.R., Cooley, L.F., El Sayed, R., Hutloff, A., Pitzalis, C., Martin, R.K., El Shikh, M.E.M., and Conrad, D.H. (2017). ADAM10-Mediated ICOS Ligand Shedding on B Cells Is Necessary for Proper T Cell ICOS Regulation and T Follicular Helper Responses. *J. Immunol. Baltim. Md* *199*, 2305–2315.
- Lundberg, I.E., Miller, F.W., Tjärnlund, A., and Bottai, M. (2016). Diagnosis and classification of idiopathic inflammatory myopathies. *J. Intern. Med.* *280*, 39–51.
- Ma, C.S., Wong, N., Rao, G., Avery, D.T., Torpy, J., Hambridge, T., Bustamante, J., Okada, S., Stoddard, J.L., Deenick, E.K., Pelham, S.J., Payne, K., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Kobayashi, M., Arkwright, P.D., Kilic, S.S., El Baghdadi, J., Nonoyama, S., Minegishi, Y., Mahdavian, S.A., Mansouri, D., Bousfiha, A., Blincoe, A.K., French, M.A., Hsu, P., Campbell, D.E., Stormon, M.O., Wong, M., Adelstein, S., Smart, J.M., Fulcher, D.A., Cook, M.C., Phan, T.G., Stepensky, P., Boztug, K., Kansu, A., İkinçioğullari, A., Baumann, U., Beier, R., Roscioli, T., Ziegler, J.B., Gray, P., Picard, C., Grimbacher, B., Warnatz, K., Holland, S.M., Casanova, J.L., Uzel, G., Tangye, S.G. (2015). Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 993–1006.
- Mahler, M., Miller, F.W., and Fritzler, M.J. (2014). Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* *13*, 367–371.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* *29*, 1–13.
- Malek, T.R., and Bayer, A.L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 665–674.
- Malicdan, M.C.V., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., and Nishino, I. (2007a). A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2669–2682.
- Malicdan, M.C.V., Noguchi, S., and Nishino, I. (2007b). Autophagy in a Mouse Model of Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles or Hereditary Inclusion Body Myopathy. *Autophagy* *3*, 396–398.

- Malicdan, M.C.V., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., and Nishino, I. (2008). Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol. Genomics* 35, 106–115.
- Mallone, R., Brezar, V., and Boitard, C. (2011). T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 513210.
- Mammen, A.L. (2011). Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 343–354.
- Manirarora, J.N., and Wei, C.-H. (2015). Combination Therapy Using IL-2/IL-2 Monoclonal Antibody Complexes, Rapamycin, and Islet Autoantigen Peptides Increases Regulatory T Cell Frequency and Protects against Spontaneous and Induced Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 5203–5214.
- Many, M.C., Maniratunga, S., and Denef, J.F. (1996). The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 104 Suppl 3, 17–20.
- Martin, F., Taylor, G.P., and Jacobson, S. (2014). Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10, 1531–1546.
- Matsubara, S., and Okumura, S. (1996). Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice produced by immunization with syngeneic myosin B fraction. Transfer by both immunoglobulin G and T cells. *J. Neurol. Sci.* 144, 171–175.
- Matsubara, S., and Takamori, M. (1987). Experimental allergic myositis: ultrastructural, histochemical, immunological and immunohistochemical studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 74, 151–157.
- Matsubara, S., Shima, T., and Takamori, M. (1993). Experimental allergic myositis in SJL/J mice immunized with rabbit myosin B fraction: immunohistochemical analysis and transfer. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 85, 138–144.
- Matsumoto, Y., Kohyama, K., Park, I.-K., Nakajima, M., and Hiraki, K. (2007). Characterization of pathogenic T cells and autoantibodies in C-protein-induced autoimmune polymyositis. *J. Neuroimmunol.* 190, 90–100.
- Matsuoka, K., Koreth, J., Kim, H.T., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., Murase, K., Cutler, C., Ho, V.T., Alyea, E.P., Armand, P., Blazar, B.R., Antin, J.H., Soiffer, R.J., Ritz, J. (2013). Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* 5, 179ra43.
- McAdam, A.J., Chang, T.T., Lumelsky, A.E., Greenfield, E.A., Boussiotis, V.A., Duke-Cohan, J.S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V.K., Ling, V., Collins, M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2000). Mouse Inducible Costimulatory Molecule (ICOS) Expression Is Enhanced by CD28 Costimulation and Regulates Differentiation of CD4+ T Cells. *J. Immunol.* 165, 5035–5040.
- Meriggioli, M.N., and Sanders, D.B. (2012). Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 427–438.

Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., and Gardahaut, M.F. (1999). Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22, 724–732.

van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 659–684.

van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P., and Davis, S.J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* 185, 393–404.

Mescam-Mancini, L., Allenbach, Y., Hervier, B., Devilliers, H., Mariampillay, K., Dubourg, O., Maissonobe, T., Gherardi, R., Mezin, P., Preusse, C., Stenzel, W., Benveniste, O. (2015). Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. *Brain* 138, 2485–2492.

Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Hartley, L., and Alexander, W.S. (2000). The development of fatal myocarditis and polymyositis in mice heterozygous for IFN- γ and lacking the SOCS-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9174–9179.

van der Meulen, M.F.G., Bronner, I.M., Hoogendijk, J.E., Burger, H., van Venrooij, W.J., Voskuyl, A.E., Dinant, H.J., Linssen, W.H.J.P., Wokke, J.H.J., and de Visser, M. (2003). Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61, 316–321.

Meyer, A., Laverny, G., Allenbach, Y., Grelet, E., Ueberschlag, V., Echaniz-Laguna, A., Lannes, B., Alsaleh, G., Charles, A.L., Singh, F., Zoll, J., Lonsdorfer, E., Maurier, F., Boyer, O., Gottenberg, J.E., Nicot, A.S., Laporte, J., Benveniste, O., Metzger, D., Sibilia, J., Geny, B. (2017). IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. *Acta Neuropathol.* 134, 655–666.

Meyers, J.H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S.E., Kenny, J., Zheng, X.X., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Strom, T.B., Kuchroo, V.K. (2005). TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1–TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat. Immunol.* 6, 455–464.

Micks, R.H., and Mullaney, J. (1958). Dermatomyositis successfully treated by prednisone. *Ir. J. Med. Sci.* 333–334.

Miller, F.W., Love, L.A., Biswas, T., McClintock, P.R., Notkins, A.L., and Plotz, P.H. (1987). Viral and host genetic factors influence encephalomyocarditis virus—induced polymyositis in adult mice. *Arthritis Rheumatol.* 30, 549–556.

Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S., and Homma, M. (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68, 611–620.

Mitre, T.M., Pietropaolo, M., and Khadra, A. (2017). The dual role of autoimmune regulator in maintaining normal expression level of tissue-restricted autoantigen in the thymus: A modeling investigation. *Math. Biosci.* 287, 12–23.

Morel, Y., Schiano de Colella, J.-M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.-A., Olive, D., Costello, R.T. (2000). Reciprocal Expression of the TNF Family Receptor Herpes Virus Entry Mediator and Its Ligand LIGHT on Activated T Cells: LIGHT Down-Regulates Its Own Receptor. *J. Immunol.* 165, 4397–4404.

Morrison, T.E., Whitmore, A.C., Shabman, R.S., Lidbury, B.A., Mahalingam, S., and Heise, M.T. (2006). Characterization of Ross River Virus Tropism and Virus-Induced Inflammation in a Mouse Model of Viral Arthritis and Myositis. *J. Virol.* *80*, 737–749.

Morrison, T.E., Fraser, R.J., Smith, P.N., Mahalingam, S., and Heise, M.T. (2007). Complement Contributes to Inflammatory Tissue Destruction in a Mouse Model of Ross River Virus-Induced Disease. *J. Virol.* *81*, 5132–5143.

Morrow, J.M., Sinclair, C.D., Fischmann, A., Machado, P.M., Reilly, M.M., Yousry, T.A., Thornton, J.S., and Hanna, M.G. (2016). MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol.* *15*, 65–77.

Murata, K., and Dalakas, M.C. (1999). Expression of the costimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28, and their mRNA in inflammatory myopathies. *Am. J. Pathol.* *155*, 453–460.

Nagaraju, K., and Plotz, P.H. (2002). Animal models of myositis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* *28*, 917–933.

Nagaraju, K., Raben, N., Merritt, G., Loeffler, L., Kirk, K., and Plotz, P. (1998). A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin. Exp. Immunol.* *113*, 407–414.

Nagaraju, K., Raben, N., Villalba, M.L., Danning, C., Loeffler, L.A., Lee, E., Tresser, N., Abati, A., Fetsch, P., and Plotz, P.H. (1999). Costimulatory markers in muscle of patients with idiopathic inflammatory myopathies and in cultured muscle cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *92*, 161–169.

Nagaraju, K., Raben, N., Loeffler, L., Parker, T., Rochon, P.J., Lee, E., Danning, C., Wada, R., Thompson, C., Bahtiyar, G., Craft, J., Hooft Van Huijsduijnen, R., Plotz, P. (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.* *97*, 9209–9214.

Nagaraju, K., Casciola-Rosen, L., Lundberg, I., Rawat, R., Cutting, S., Thapliyal, R., Chang, J., Dwivedi, S., Mitsak, M., Chen, Y.-W., Plotz, P., Rosen, A., Hoffman, E., Raben, N. (2005). Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: Potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum.* *52*, 1824–1835.

Nakano, J., Yoshimura, T., Okita, M., Motomura, M., Kamei, S., Matsuo, H., and Eguchi, K. (2005). Laminin-induced autoimmune myositis in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 790–796.

Navabi, S. sadat, Doroudchi, M., Tashnizi, A.H., and Habibagahi, M. (2015). Natural Killer Cell Functional Activity After 4-1BB Costimulation. *Inflammation* *38*, 1181–1190.

Nelson, B.H. (2004). IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md* *172*, 3983–3988.

Nerenberg, M.I., and Wiley, C.A. (1989). Degeneration of oxidative muscle fibers in HTLV-1 tax transgenic mice. *Am. J. Pathol.* *135*, 1025–1033.

Nikoopour, E., Sandrock, C., Huszarik, K., Krougly, O., Lee-Chan, E., Masteller, E.L., Bluestone, J.A., and Singh, B. (2011). Cutting edge: vasostatin-1-derived peptide ChgA29-42 is an antigenic epitope of diabetogenic BDC2.5 T cells in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *186*, 3831–3835.

- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319–322.
- Oestreich, K.J., Yoon, H., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2008). NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J. Immunol.* 181, 4832–4839.
- Offer, G., Moos, C., and Starr, R. (1973). A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization. *J. Mol. Biol.* 74, 653–676.
- Oldroyd, A., Lilleker, J., and Chinoy, H. (2017). Idiopathic inflammatory myopathies - a guide to subtypes, diagnostic approach and treatment. *Clin. Med. Lond. Engl.* 17, 322–328.
- Orimo, S., Hiyamuta, E., Arahata, K., and Sugita, H. (1991). Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve* 14, 515–520.
- Paciello, O., Oliva, G., Gradoni, L., Manna, L., Foglia Manzillo, V., Wojcik, S., Trapani, F., and Papparella, S. (2009). Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul. Disord. NMD* 19, 124–130.
- Paciello, O., Wojcik, S., Gradoni, L., Oliva, G., Trapani, F., Iovane, V., Politano, L., and Papparella, S. (2010). Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* : A new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 41, 355–361.
- Panduro, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2016). Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 609–633.
- Pearson, C.M. (1956). Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 91, 95–101.
- Pearson, J.A., Wong, F.S., and Wen, L. (2016). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* 66, 76–88.
- Pérol, L., Lindner, J.M., Caudana, P., Nunez, N.G., Baeyens, A., Valle, A., Sedlik, C., Loirat, D., Boyer, O., Créange, A., Cohen, J.L., Rogner, U.C., Yamanouchi, J., Marchant, M., Leber, X.C., Scharenberg, M., Gagnerault, M.C., Mallone, R., Battaglia, M., Santalaria, P., Hartemann, A., Traggiai, E., Piaggio, E. (2016). Loss of immune tolerance to IL-2 in type 1 diabetes. *Nat. Commun.* 7, 13027.
- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 271694.
- Peters, A.L., Stunz, L.L., and Bishop, G.A. (2009). CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin. Immunol.* 21, 293–300.
- Pinal-Fernandez, I., Casal-Dominguez, M., Carrino, J.A., Lahouti, A.H., Basharat, P., Albayda, J., Paik, J.J., Ahlawat, S., Danoff, S.K., Lloyd, T.E., Mammen, A.L., Christopher-Stine, L. (2017). Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 681–687.
- Pipitone, N. (2016). Value of MRI in diagnostics and evaluation of myositis: *Curr. Opin. Rheumatol.* 28, 625–630.

Placke, T., Kopp, H.-G., and Salih, H.R. (2010). Glucocorticoid-induced TNFR-related (GITR) protein and its ligand in antitumor immunity: functional role and therapeutic modulation. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, 239083.

Podell, M., Chen, E., and Shelton, G.D. (1998). Feline immunodeficiency virus associated myopathy in the adult cat. *Muscle Nerve* 21, 1680–1685.

Podojil, J.R., and Sanders, V.M. (2003). Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 5143–5151.

Podojil, J.R., Kin, N.W., and Sanders, V.M. (2004). CD86 and beta2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells. *J. Biol. Chem.* 279, 23394–23404.

Pop, S.M., Wong, C.P., Culton, D.A., Clarke, S.H., and Tisch, R. (2005). Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 201, 1333–1346.

Pot, C., Jin, H., Awasthi, A., Liu, S.M., Lai, C.-Y., Madan, R., Sharpe, A.H., Karp, C.L., Miaw, S.-C., Ho, I.-C., Kuchroo, V.K. (2009). Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 797–801.

Prevot, N., Briet, C., Lassmann, H., Tardivel, I., Roy, E., Morin, J., Mak, T.W., Tafuri, A., and Boitard, C. (2010). Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur. J. Immunol.* 40, 2267–2276.

Ramanan, A.V., Campbell-Webster, N., Ota, S., Parker, S., Tran, D., Tyrrell, P.N., Cameron, B., Spiegel, L., Schneider, R., Laxer, R.M., Silverman, E.D., Feldman, B.M. (2005). The effectiveness of treating juvenile dermatomyositis with methotrexate and aggressively tapered corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 52, 3570–3578.

Ramanathan, S., Dale, R.C., and Brilot, F. (2016). Anti-MOG antibody: The history, clinical phenotype, and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination. *Autoimmun. Rev.* 15, 307–324.

Rebolledo, D.L., Minniti, A.N., Grez, P.M., Fadic, R., Kohn, R., and Inestrosa, N.C. (2008). Inclusion Body Myositis: A View from the *Caenorhabditis elegans* Muscle. *Mol. Neurobiol.* 38, 178–198.

Ridgway, W.M., Fassò, M., and Fathman, C.G. (1999). A new look at MHC and autoimmune disease. *Science* 284, 749–751.

Rincón, M., and Flavell, R.A. (1994). AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J.* 13, 4370–4381.

Robertson, N., Engelhardt, K.R., Morgan, N.V., Barge, D., Cant, A.J., Hughes, S.M., Abinun, M., Xu, Y., Koref, M.S., Arkwright, P.D., Hambleton, S. (2015). Astute Clinician Report: A Novel 10 bp Frameshift Deletion in Exon 2 of ICOS Causes a Combined Immunodeficiency Associated with an Enteritis and Hepatitis. *J. Clin. Immunol.* 35, 598–603.

Robertson, T.A., Maley, M.A., Grounds, M.D., and Papadimitriou, J.M. (1993). The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp. Cell Res.* 207, 321–331.

Rodriguez-Manzanet, R., Meyers, J.H., Balasubramanian, S., Slavik, J., Kassam, N., Dardalhon, V., Greenfield, E.A., Anderson, A.C., Sobel, R.A., Hafler, D.A., Strom, T.B., Kuchroo, V.K. (2008). TIM-4 Expressed on APCs Induces T Cell Expansion and Survival. *J. Immunol.* **180**, 4706–4713.

Rodriguez-Manzanet, R., DeKruyff, R., Kuchroo, V.K., and Umetsu, D.T. (2009). The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol. Rev.* **229**, 259–270.

Rose, N.R., and Bona, C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* **14**, 426–430.

Rosenberg, N.L., and Kotzin, B.L. (1989). Aberrant expression of class II MHC antigens by skeletal muscle endothelial cells in experimental autoimmune myositis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **142**, 4289–4294.

Rosenberg, N.L., Ringel, S.P., and Kotzin, B.L. (1987). Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. *Clin. Exp. Immunol.* **68**, 117.

Rosenzweig, M., Churlaud, G., Mallone, R., Six, A., Dérian, N., Chacara, W., Lorenzon, R., Long, S.A., Buckner, J.H., Afonso, G., Pham, H.P., Hartemann, A., Yu, A., Pugliese, A., Malek, T.R., Klatzmann, D. (2015). Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J. Autoimmun.* **58**, 48–58.

Rottman, J.B., Smith, T., Tonra, J.R., Ganley, K., Bloom, T., Silva, R., Pierce, B., Gutierrez-Ramos, J.-C., Özkaynak, E., and Coyle, A.J. (2001). The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat. Immunol.* **2**, 605–611.

Rudd, C.E., and Schneider, H. (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 544–556.

Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* **229**, 12–26.

Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2067–2077.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440.

Salomon, B., Rhee, L., Bour-Jordan, H., Hsin, H., Montag, A., Soliven, B., Arcella, J., Girvin, A.M., Miller, S.D., and Bluestone, J.A. (2001). Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* **194**, 677–684.

Salzer, U., Maul-Pavicic, A., Cunningham-Rundles, C., Urschel, S., Belohradsky, B.H., Litzman, J., Holm, A., Franco, J.L., Plebani, A., Hammarstrom, L., Skrabl, A., Schwinger, W., Grimbacher, B. (2004). ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* **113**, 234–240.

Schmidt, J. (2004). Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8⁺ T cell cytotoxicity. *Brain* **127**, 1182–1190.

Schmidt, J., Rakocevic, G., Raju, R., and Dalakas, M.C. (2004). Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity. *Brain J. Neurol.* 127, 1182–1190.

Schwartz, R.H., Mueller, D.L., Jenkins, M.K., and Quill, H. (1989). T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 2, 605–610.

Semana, G., Gausling, R., Jackson, R.A., and Hafler, D.A. (1999). T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J. Autoimmun.* 12, 259–267.

Serreze, D.V., Fleming, S.A., Chapman, H.D., Richard, S.D., Leiter, E.H., and Tisch, R.M. (1998). B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3912–3918.

Sharpe, A.H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.* 229, 5–11.

Shekhar, S., and Yang, X. (2012). The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 380–385.

Shelton, G.D., Calcutt, N.A., Garrett, R.S., Gu, D., Sarvetnick, N., Campana, W.M., and Powell, H.C. (1999). Necrotizing myopathy induced by overexpression of interferon-gamma in transgenic mice. *Muscle Nerve* 22, 156–165.

Shi, F.D., He, B., Li, H., Matusevicius, D., Link, H., and Ljunggren, H.G. (1998). Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur. J. Immunol.* 28, 3587–3593.

Simon, J.-P., Marie, I., Jouen, F., Boyer, O., and Martinet, J. (2016). Autoimmune Myopathies: Where Do We Stand? *Front. Immunol.* 7, 234.

Simpson, T.R., Quezada, S.A., and Allison, J.P. (2010). Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr. Opin. Immunol.* 22, 326–332.

Smith, P.D., and Partridge, T.A. (1976). Macrophage migration inhibition studies of lymphocytes taken from guinea-pigs suffering from experimental polymyositis. *Clin. Exp. Immunol.* 25, 133.

Soejima, M., Kang, E.H., Gu, X., Katsumata, Y., Clemens, P.R., and Ascherman, D.P. (2011). Role of innate immunity in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1)-mediated myositis. *Arthritis Rheum.* 63, 479–487.

de Souza, A.J., Oriss, T.B., O'malley, K.J., Ray, A., and Kane, L.P. (2005). T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17113–17118.

Spence, A., and Tang, Q. (2016). Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 16, 110.

Splawski, J.B., and Lipsky, P.E. (1994). CD40-mediated regulation of human B-cell responses. *Res. Immunol.* 145, 226–234; discussion 244–249.

Stenzel, W., and Schoser, B. (2017). Inherited and Acquired Muscle Weakness: A Moving Target for Diagnostic Muscle Biopsy. *Neuropediatrics* 48, 226–232.

Stenzel, W., Goebel, H.-H., and Aronica, E. (2012). Review: Immune-mediated necrotizing myopathies - a heterogeneous group of diseases with specific myopathological features: Immune mediated necrotizing myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38, 632–646.

Stenzel, W., Preußner, C., Allenbach, Y., Pehl, D., Junckerstorff, R., Heppner, F.L., Nolte, K., Aronica, E., Kana, V., Rushing, E., Schneider, U., Claeys, K.G., Benveniste, O., Weis, J., Goebel, H.H. (2015). Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology* 84, 1346–1354.

Strongwater, S.L., Dorovini-zis, K., Ball, R.D., and Schnitzer, T.J. (1984). A murine model of polymyositis induced by coxsackievirus B1 (Tucson strain). *Arthritis Rheumatol.* 27, 433–442.

Sugarman, M.C., Yamasaki, T.R., Oddo, S., Echegoyen, J.C., Murphy, M.P., Golde, T.E., Jannatipour, M., Leissring, M.A., and LaFerla, F.M. (2002). Inclusion body myositis-like phenotype induced by transgenic overexpression of beta APP in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6334–6339.

Sugihara, T., Sekine, C., Nakae, T., Kohyama, K., Harigai, M., Iwakura, Y., Matsumoto, Y., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2007). A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis. *Arthritis Rheum.* 56, 1304–1314.

Sugiura, T., Kawaguchi, Y., Harigai, M., Takagi, K., Ohta, S., Fukasawa, C., Hara, M., and Kamatani, N. (2000). Increased CD40 Expression on Muscle Cells of Polymyositis and Dermatomyositis: Role of CD40-CD40 Ligand Interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production. *J. Immunol.* 164, 6593–6600.

Sussman, M.L., Strauss, L., and Hodes, H.L. (1959). Fatal coxsackie group B virus infection in the newborn; report of a case with necropsy findings and brief review of the literature. *AMA J. Dis. Child.* 97, 483–492.

Swigris, J.J., Olson, A.L., Fischer, A., Lynch, D.A., Cosgrove, G.P., Frankel, S.K., Meehan, R.T., and Brown, K.K. (2006). Mycophenolate mofetil is safe, well tolerated, and preserves lung function in patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease. *Chest* 130, 30–36.

Tada, Y., Nagasawa, K., Ho, A., Morito, F., Ushiyama, O., Suzuki, N., Ohta, H., and Mak, T.W. (1999). CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 203–208.

Tafari, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S.K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L.M., Bouchard, D., Chan, V.S., Duncan, G., Odermatt, B., Ho, A., Itie, A., Horan, T., Whoriskey, J.S., Paxson, T., Penninger, J.M., Ohashi, P.S., Mak, T.W. (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409, 105–109.

Takahashi, N., Matsumoto, K., Saito, H., Nanki, T., Miyasaka, N., Kobata, T., Azuma, M., Lee, S.-K., Mizutani, S., and Morio, T. (2009). Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T Cell Populations in ICOS-Deficient Patients. *J. Immunol.* 182, 5515–5527.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (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.

Tang, Q., Adams, J.Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C.A., Salomon, B.L., and Bluestone, J.A. (2008). Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28, 687–697.

Tawil, R., and Griggs, R.C. (2002). Inclusion body myositis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14, 653–657.

Teunissen, P.F.A., Boshuizen, M.C., Hollander, M.R., Biesbroek, P.S., van der Hoeven, N.W., Mol, J.-Q., Gijbels, M.J., van der Velden, S., van der Pouw Kraan, T.C., Horrevoets, A.J., de Winther, M.P., van Royen, N. (2015). MAb therapy against the IFN- α/β receptor subunit 1 stimulates arteriogenesis in a murine hindlimb ischaemia model without enhancing atherosclerotic burden. *Cardiovasc. Res.* 107, 255–266.

Thébault-Baumont, K., Dubois-Laforgue, D., Krief, P., Briand, J.-P., Halbout, P., Vallon-Geoffroy, K., Morin, J., Laloux, V., Lehuen, A., Carel, J.-C., Jami, J., Muller, S., Boitard, C. (2003). Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J. Clin. Invest.* 111, 851–857.

Tidball, J.G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 165–178.

Todd, J.A., and Wicker, L.S. (2001). Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity* 15, 387–395.

Todd, J.A., Bell, J.I., and McDevitt, H.O. (1987). HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329, 599–604.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.

Torres, L.F., and Duchon, L.W. (1987). The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain J. Neurol.* 110 (Pt 2), 269–299.

Toyka, K.V., Drachman, D.B., Griffin, D.E., Pestronk, A., Winkelstein, J.A., Fishbeck, K.H., and Kao, I. (1977). Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N. Engl. J. Med.* 296, 125–131.

Troyanov, Y., Targoff, I.N., Tremblay, J.-L., Goulet, J.-R., Raymond, Y., and Sénécal, J.-L. (2005). Novel Classification of Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Overlap Syndrome Features and Autoantibodies: Analysis of 100 French Canadian Patients. *Medicine (Baltimore)* 84, 231–249.

Ueda, H., Howson, J.M.M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D.B., Hunter, K.M.D., Smith, A.N., Di Genova, G., Herr, M.H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R.C., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H.E., Everett, V., Smink, L.J., Lam, A.C., Cordell, H.J., Walker, N.M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J.F., Metzker, M.L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadia, A., Nithiyananthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K.M., Undlien, D.E., Rønningen, K.S., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviște, C., Savage, D.A., Maxwell, A.P., Carson, D.J., Patterson, C.C., Franklyn, J.A., Clayton, D.G., Peterson, L.B., Wicker, L.S., Todd, J.A., Gough S.C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506–511.

- Veillette, A. (2006). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 56–66.
- Veillette, A., Pérez-Quintero, L.-A., and Latour, S. (2013). X-linked lymphoproliferative syndromes and related autosomal recessive disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *13*, 614–622.
- Vencovský, J., Jarosová, K., Macháček, S., Studýnková, J., Kafková, J., Bartůňková, J., Nemcová, D., and Charvát, F. (2000). Cyclosporine A versus methotrexate in the treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Scand. J. Rheumatol.* *29*, 95–102.
- Villalta, S.A., Rinaldi, C., Deng, B., Liu, G., Fedor, B., and Tidball, J.G. (2011a). Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 790–805.
- Villalta, S.A., Deng, B., Rinaldi, C., Wehling-Henricks, M., and Tidball, J.G. (2011b). IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 5419–5428.
- Villalta, S.A., Rosenthal, W., Martinez, L., Kaur, A., Sparwasser, T., Tidball, J.G., Margeta, M., Spencer, M.J., and Bluestone, J.A. (2014). Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* *6*, 258ra142-258ra142.
- Viroit, E., Duclos, A., Adelaide, L., Mialhes, P., Hot, A., Ferry, T., and Seve, P. (2017). Autoimmune diseases and HIV infection: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* *96*, e5769.
- Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J.J.M., Orlowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., Draeger, R., Schlesier, M., Peter, H.H., Grimbacher, B. (2006). Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* *107*, 3045–3052.
- Warren, G.L., Hulderman, T., Jensen, N., McKinstry, M., Mishra, M., Luster, M.I., and Simeonova, P.P. (2002). Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1630–1632.
- Waschbisch, A., Wintterle, S., Lochmüller, H., Walter, M.C., Wischhusen, J., Kieseier, B.C., and Wiendl, H. (2008). Human muscle cells express the costimulatory molecule B7-H3, which modulates muscle-immune interactions. *Arthritis Rheum.* *58*, 3600–3608.
- Wen-Jing, L., Chuan-Qiang, P., Hong-Hua, L., Xiang-Hui, L., and Jie-Xiao, L. (2015). A new modified animal model of myosin-induced experimental autoimmune myositis enhanced by defibrase. *Arch. Med. Sci.* *6*, 1272–1278.
- Westerblad, H., and Allen, D.G. (2011). Emerging roles of ROS/RNS in muscle function and fatigue. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2487–2499.
- Wicker, L.S., Miller, B.J., and Mullen, Y. (1986). Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* *35*, 855–860.
- Wicker, L.S., Todd, J.A., Prins, J.B., Podolin, P.L., Renjilian, R.J., and Peterson, L.B. (1994). Resistance alleles at two non-major histocompatibility complex-linked insulin-dependent diabetes loci on chromosome 3, Idd3 and Idd10, protect nonobese diabetic mice from diabetes. *J. Exp. Med.* *180*, 1705–1713.

Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Lochmüller, H., Melms, A., and Weller, M. (2003a). Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1892–1894.

Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Melms, A., Lochmüller, H., Hohlfeld, R., and Weller, M. (2003b). Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 126, 1026–1035.

Wiendl, H., Hohlfeld, R., and Kieseier, B.C. (2005). Muscle-derived positive and negative regulators of the immune response. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17, 714–719.

Witsch, E.J., Peiser, M., Hutloff, A., Büchner, K., Dorner, B.G., Jonuleit, H., Mages, H.W., and Kroczeck, R.A. (2002). ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 2680–2686.

Woodley, D.T., Ram, R., Doostan, A., Bandyopadhyay, P., Huang, Y., Remington, J., Hou, Y., Keene, D.R., Liu, Z., and Chen, M. (2006). Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1323–1330.

Wu, N., and Veillette, A. (2016). SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr. Opin. Immunol.* 38, 45–51.

Yadav, D., Judkowski, V., Flodstrom-Tullberg, M., Sterling, L., Redmond, W.L., Sherman, L., and Sarvetnick, N. (2004). B7-2 (CD86) Controls the Priming of Autoreactive CD4 T Cell Response against Pancreatic Islets. *J. Immunol.* 173, 3631–3639.

Yadav, D., Fine, C., Azuma, M., and Sarvetnick, N. (2007). B7-1 mediated costimulation regulates pancreatic autoimmunity. *Mol. Immunol.* 44, 2616–2624.

Yamanouchi, J., Rainbow, D., Serra, P., Howlett, S., Hunter, K., Garner, V.E.S., Gonzalez-Munoz, A., Clark, J., Veijola, R., Cubbon, R., Chen, S.L., Rosa, R., Cumiskey, A.M., Serreze, D.V., Gregory, S., Rogers, J., Lyons, P.A., Healy, B., Smink, L.J., Todd, J.A., Peterson, L.B., Wicker, L.S., Santamaria, P. (2007). Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat. Genet.* 39, 329–337.

Yao, S., Zhu, Y., Zhu, G., Augustine, M., Zheng, L., Goode, D.J., Broadwater, M., Ruff, W., Flies, S., Xu, H., Flies, D., Luo, L., Wang, S., Chen, L. (2011). B7-H2 Is a Costimulatory Ligand for CD28 in Human. *Immunity* 34, 729–740.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.

Yong, P.F., Salzer, U., and Grimbacher, B. (2009). The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol. Rev.* 229, 101–113.

Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G.S., Hui, A., McCabe, S.M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C.L., Van, G., Mak, T.W., Senaldi, G. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827–832.

- Younes, A., Consoli, U., Zhao, S., Snell, V., Thomas, E., Gruss, H.J., Cabanillas, F., and Andreeff, M. (1996). CD30 ligand is expressed on resting normal and malignant human B lymphocytes. *Br. J. Haematol.* *93*, 569–571.
- Yu, A., Snowwhite, I., Vendrame, F., Rosenzweig, M., Klatzmann, D., Pugliese, A., and Malek, T.R. (2015). Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes* *64*, 2172–2183.
- Yunis, E.J., and Samaha, F.J. (1971). Inclusion body myositis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *25*, 240–248.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.* *54*, 1177–1191.
- Zhao, F., Cannons, J.L., Dutta, M., Griffiths, G.M., and Schwartzberg, P.L. (2012). Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity. *Immunity* *36*, 1003–1016.
- Zheng, J., Chan, P.-L., Liu, Y., Qin, G., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). ICOS Regulates the Generation and Function of Human CD4⁺ Treg in a CTLA-4 Dependent Manner. *PLoS ONE* *8*, e82203.
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007). IL-2 Is Essential for TGF- β to Convert Naive CD4⁺CD25⁻ Cells to CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells. *J. Immunol.* *178*, 2018–2027.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* *6*, 1245–1252.

VII. ANNEXES

ANNEXES

Publications

Value of magnetic resonance imaging for evaluating muscle inflammation: insights from a new mouse model of myositis.

Bourdenet G, Dubourg B, Nicol L, Mulder P, Martinet J, Allenbach Y, Benveniste O, Boitard C, Boyer O, Neuropathol Appl Neurobiol, accepted (IF 2016 = 5.3)

The spontaneous autoimmune neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD Mice is CD4⁺ T-cell and Interferon- γ dependent.

Briet C, Bourdenet G, Rogner UC, Becourt C, Tardivel I, Drouot L, Arnoult C, do Rego JC, Prevot N, Masaad C, Boyer O and Boitard C, Front Immunol, 2017 March (IF 2016 = 6.4)

Induction of hematopoietic microchimerism by gene-modified BMT elicits antigen-specific B and T cell unresponsiveness toward gene therapy products.

Martinet J, Bourdenet G, Meliani A, Jean L, Adriouch S, Cohen JL, Mingozi F, Boyer O, Front Immunol, 2016 Sept (IF = 6.4)

Impact of recommendations on crushing medications in geriatrics: from prescription to administration.

Bourdenet G, Giraud S, Artur M, Dutertre S, Dufour M, Lefèbvre-Caussin M, Proux A, Philippe S, Capet C, Fontaine-Adam M, Kadri K, Landrin I, Gréboval E, Touflet M, Nanfack J, Tharasse C, Varin R, Rémy E, Daouphars M, Doucet J., Fundam Clin Pharmacol, 2015 Jun (IF = 2.1)

Communications orales

Myositis from mouse to man: new insight from a unique experimental paradigm.

1st author, FOCIS, 2017 jun

Induction of hematopoietic microchimerism by gene-modified BMT elicits immunological tolerance for factor IX gene therapy.

Speaker, SFGM-TC, 2016 nov

A new mouse model of spontaneous myositis: NOD mice with disrupted T-cell costimulatory ICOS pathway.

1st author, First international conference on myositis, 2015 may

What impact of recent recommendations for crushing drugs for elderly patients?

Speaker, P2T, 2014 april

Communications affichées

Crushing drugs in Geriatric units: impact of cleaning methods. 1st author, SFPT, 2017 april

Pathophysiology of autoimmune myopathies in a new mouse model. 1st author, SFI, 2016 nov

Induction of transgene-specific immunological tolerance by hematopoietic microchimerism using gene-modified bone marrow transplantation in a gene therapy setting. 2nd author, FOCIS, 2016 jun

Comparison of different methods for the detection of anti-HMGCR antibodies using a large cohort of patients with myopathies. AMLI, 2016 jun

Un modèle unique de myopathie inflammatoire spontanée : les souris NOD ICOS/ICOSL KO. 1^{er} auteur, Colloque jeunes chercheurs AFM-Téléthon, 2015 jun

A unique model of spontaneous myositis: NOD mice with disrupted T-cell costimulatory ICOS pathway. 1st author, Journée de l'IRIB, 2015 jun

Pharmaceutical interventions benefit: a short stay and a long stay comparison. 1st author, P2T, 2014 april

Regional comparison of biotherapeutics used for treatment of rheumatoid arthritis in health facilities between 2011 and 2012. Limits of the French medical database. P2T, 2014 april

Insidious and slowly resolved neurological disorders with valpromide treatment. P2T, 2014 april

Ecrasement des médicaments en gériatrie : l'impact des recommandations. 1^{er} auteur, SFPC, 2014 feb

Enquête régionale sur les dysfonctionnements liés aux ordonnances de sortie d'hospitalisation : vers une amélioration du lien ville-hôpital. SNFMI, 2013 dec

Signalement et analyse des erreurs médicamenteuses dans un CHU : méthodes, résultats et intérêt. SNFMI, 2013 dec

Conciliation médicamenteuse en médecine interne gériatrique : une collaboration efficace médecins-pharmaciens pour prévenir la iatrogénèse médicamenteuse. SNFMI, 2013 dec

**Etude physiopathologique de la myopathie inflammatoire
chez les souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL**

RESUME

Les myopathies inflammatoires (MI) représentent un groupe hétérogène de maladies caractérisé par une faiblesse musculaire chronique et symétrique associée à une augmentation du taux sérique de créatine phosphokinase (CPK). Les MI sont actuellement subdivisées en 5 entités : les dermatomyosites, les myopathies nécrosantes auto-immunes, la myosite à inclusion, la polymyosite et les myosites de chevauchement. A ce jour, le diagnostic des MI repose sur l'association de signes cliniques, de caractéristiques anatomopathologiques sur la biopsie musculaire et la présence d'auto-anticorps (aAc). En effet, la découverte d'aAc spécifiques et/ou associés aux myosites (MSA/MAA) a considérablement amélioré le diagnostic et le pronostic de la maladie. Cependant, un nombre non négligeable de patients atteints de MI sont séronégatifs pour les MSA/MAA connus. Par ailleurs, la biopsie musculaire nécessaire au diagnostic est parfois guidée par imagerie par résonance magnétique (IRM), bien qu'il n'ait pas été prouvé que les données d'imagerie soient corrélées aux signes histologiques. Enfin, le traitement des MI repose sur l'utilisation d'immunosuppresseurs systémiques, une approche non spécifique de la physiopathologie de la maladie. Les modèles animaux de MI les plus utilisés sont induits et non spontanés : ils reposent principalement sur l'immunisation d'animaux contre des protéines telles que la myosine, la protéine C ou l'histidyl-tRNA synthétase.

Les souris NOD (*non obese diabetic*) sont le modèle classique d'étude du diabète de type 1. Lorsque ces souris sont invalidées pour la voie de costimulation lymphocytaire ICOS/ICOSL, les souris ne développent plus de diabète mais présentent alors une atteinte musculaire. Dans ce travail, nous avons étudié le phénotype et caractérisé l'atteinte musculaire des souris NOD *Icos*^{-/-} et NOD *Icost*^{-/-}. Nous avons ainsi établi le 1er modèle murin spontané de MI, dont la physiopathologie est médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et la sécrétion d'IFN-γ. Par ailleurs, ces souris présentent un déficit en lymphocytes T régulateurs. Nous avons également identifié 4 auto-antigènes (aAg) candidats cibles d'aAc chez ces souris. La recherche des aAc correspondants aux aAg orthologues dans le sérum des patients atteints de MI a permis d'identifier, pour l'un d'entre eux, une minorité d'individus séropositifs grâce au développement d'un nouveau test ALBIA (*addressable laser bead immunoassay*). Il pourrait donc s'agir d'un nouveau biomarqueur. Dans la perspective de nouvelles évaluations thérapeutiques, nous avons établi des données préliminaires montrant que l'interleukine 2 à faibles doses permet de retarder l'apparition de la maladie. Enfin, nous avons mis à profit ce modèle et démontré la corrélation entre les données générées par IRM et par analyse histologique de l'inflammation, confortant le rôle de cette technique d'imagerie à la fois pour le diagnostic et le suivi des MI.

MOTS CLES : myopathies inflammatoires – physiopathologie – auto-anticorps – biomarqueur – costimulation – ICOS/ICOSL – IRM musculaire

JURY

Président :	Mme Isabelle DUBUS, PR	Examineurs :	M. Christian BOITARD, PU-PH
Rapporteurs :	Mme Eliane PIAGGIO, DR		M. Olivier BOYER, PU-PH
	Mme Gillian MOULY, DR		M. Jérémie MARTINET, MCU-PH

DATE DE SOUTENANCE : 15 décembre 2017