



**HAL**  
open science

# Etude statique et dynamique de l'immunome dans les pathologies autoimmunes et inflammatoires chroniques

Roberta Lorenzon

► **To cite this version:**

Roberta Lorenzon. Etude statique et dynamique de l'immunome dans les pathologies autoimmunes et inflammatoires chroniques. Immunologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS142 . tel-03252546

**HAL Id: tel-03252546**

**<https://theses.hal.science/tel-03252546v1>**

Submitted on 7 Jun 2021

**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.

SORBONNE UNIVERSITÉ

**Ecole Doctorale Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique ED394**

*Laboratoire Immunologie Immunopathologie Immunothérapeutique UMRS959 INSERM*

**“Etude statique et dynamique de l’immunome dans les pathologies autoimmunes et inflammatoires chroniques”**

Présentée par

**Roberta Lorenzon**

THÈSE DE DOCTORAT D’IMMUNOLOGIE

Dirigée par

Prof. David KLATZMANN, Prof Patrice CACOUB

Présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 2020 devant un jury composé de :

Christian FUNCK-BRENTANO, PUPH	Président du Jury
Laurent CHICHE, MD PhD	Rapporteur
Thierry MARTIN, PUPH	Rapporteur
Seiamak BAHRAM, PUPH	Examineur
Patrice CACOUB, PUPH	Directeur de thèse
David KLATZMANN, PUPH	Directeur de thèse

***A Livia***

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Christian FUNCK-BRENTANO qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ma thèse, ainsi que Monsieur le Professeur Thierry MARTIN et le Docteur Laurent CHICHE qui ont accepté d'être rapporteurs. Je remercie vivement également Monsieur le Professeur Seiamak BAHRAM qui a accepté d'être examinateur.

Je souhaite remercier mes directeurs de thèse, le Professeur David KLATZMANN et le Professeur Patrice CACOUB qui m'ont suivie, encadrée et soutenue au cours de cette thèse.

Un grand merci à mes encadrants le Dr Michelle ROSENZWAIG et le Dr Encarnita MARIOTTI-FERRANDIZ. Merci à Nicolas TCHITCHEK, qui s'est proposé de m'entendre répéter ma présentation.

Merci à tous les cliniciens qui ont participé aux études, à toute l'équipe du laboratoire i3, au personnel du CIC et de l'URC de Lariboisière.

Merci à Signe pour son important investissement dans la curation des données, à Federica, qui est capable d'expliquer et rendre simples les analyses les plus compliquées et à Paul pour sa gentillesse et son aide informatique.

Un grand merci à Claire et Caroline, pour toutes ces années de travail ensemble, et pour votre profonde amitié (sans vous, tout cela n'aurait pas été possible, merci !).

Merci à Damiano, Antonio et Laura pour votre amitié, votre soutien et votre encouragement.

## RÉSUMÉ

Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires (MAI) représentent un problème scientifique extraordinaire dû à leur hétérogénéité génétique, leur physiopathologie multifactorielle et à leur hétérogénéité dans leur présentation clinique. Étant donné la complexité des maladies auto-immunes et la nécessité de disposer de marqueurs de diagnostic, de pronostic, d'activité de la maladie et de réponse à la thérapie, il est nécessaire d'avoir une approche holistique qui prend en compte tous les acteurs de ce processus.

Nous avons appliqué cette approche holistique à une étude observationnelle (TRANSIMMUNOM), ainsi qu'à des études interventionnelles (DF-IL2 et TRANSREG).

L'objectif principal du projet TRANSIMMUNOM est de revisiter la nosologie de plusieurs MAI avec une approche « atlas » : une cartographie multi-pathologies avec des analyses comparatives. L'étude TRANSIMMUNOM prévoit de croiser le phénotype de 1000 participants affectés par un ensemble de 19 MAI, 5 maladies contrôles et des volontaires sains par une approche d'immunologie des systèmes. Un effort important a été apporté pour concevoir un CRF approprié capable de couvrir tous ces aspects pour 19 maladies et 5 maladies contrôles. Nous avons sélectionné, organisé et harmonisé plus de 5000 variables multiparamétriques codées à partir de 865 paramètres cliniques et biologiques dans un eCRF intégré à l'aide de la plateforme OpenClinica. Ce panel de variables est aussi large que possible pour pouvoir identifier le profil de la maladie, sa sévérité et les caractéristiques éventuellement partagées entre ces maladies. Notre CRF couvre un large éventail de données cliniques et biologiques d'intérêt pour la plupart des MAI, et propose un ensemble pré-conçu de CRF qui peuvent être utilisés ensemble ou individuellement pour d'autres études cliniques.

Les cellules Treg ont un rôle central dans le maintien de la tolérance et leur activation et expansion, avec des faibles doses d'IL-2 (fd d'IL-2), est d'un grand intérêt dans le traitement des MAI. Nous avons appliqué une approche holistique, d'intégration des données clinico-biologiques à 2 études visant à tester de faibles doses d'IL-2 : DF-IL-2, étude de « recherche de dose » chez les patients atteints de diabète de type 1, et TRANSREG, étude de « sélection de maladie » dans différentes MAI. Nous avons constaté, dans ces 2 études, qu'il y a non seulement une augmentation du nombre de cellules Treg, mais également une activation accrue. A partir de l'analyse des données de DF-IL-2, nous avons obtenu des marqueurs précoces de dose maximale, et les données nécessaires pour modéliser le schéma thérapeutique optimal de fd d'IL-2. A partir de l'analyse des données de TRANSREG, nous avons obtenu : des marqueurs précoces de l'effet hautement sélectif des fd d'IL-2 sur les Treg, des données montrant la sécurité « universelle » des fd d'IL-2 dans diverses MAI associé à différents traitements de fond et des données montrant l'efficacité clinique possible de fd d'IL-2 dans un groupe de patients très hétérogènes.

Nous avons démontré que l'intégration de ce type d'approche holistique est très utile dans des essais de phase précoce. La conception et la méthodologie de nos essais peuvent être appliquées en pratique clinique courante pour étudier la population des patients « tout-venant » et pour tester de nombreux médicaments en cours de développement dans les MAI.

## ABRÉVIATIONS

AA : *alopecia areata*

AAV : vascularites associées aux auto-anticorps ANCA

BCR : B cell receptor

CAPS : syndromes périodiques associés à la cryopyrine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices de l'antigène

CRP : C-réactive protéine

DM : dermatopolymyosite

DT1 : diabète de type 1

Fc : fragment constant

FMF : fièvre méditerranéenne familiale

GEPA : granulomatose éosinophilique avec polyangéite

GITR : glucocorticoid induced TNFR

GPA : granulomatose avec polyangéite

GS : syndrome de Gougerot-Sjögren

GVHD : maladie du greffon contre l'hôte

HAI : hépatite autoimmune

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

LES : lupus érythémateux systémique

MB : maladie de Behçet

MC : maladie de Crohn

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MT : maladie de Takayasu

NK : Natural Killer

NLR: NOD-like receptors

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PM : polymyosite

PNN : polynucléaires neutrophiles

PR : polyarthrite rhumatoïde

RCH : rectocolite hémorragique

RLR : RIG-like receptors

SAPL : syndrome des antiphospholipides

SEP : sclérose en plaque

SpA : spondylite ankylosante

SS : sclérodermie systémique

TCR : T cell receptor

Teff : lymphocytes T effecteurs

TFH : T folliculaire helper

TLR : Toll like receptors

TRAPS : syndrome périodique associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1

Treg : lymphocytes T régulateurs

## Table des matières

1	INTRODUCTION	9
1.1	Généralités sur l'immunité et le système immunitaire	9
1.1.1	La réponse immunitaire innée	9
1.1.2	La réponse immunitaire adaptative	11
1.1.3	Les lymphocytes T régulateurs dans les MAI	16
1.1.4	Tolérance immunologique et théories du développement de l'auto-immunité	17
	Tolérance immunologique	17
	Théories sur la perte de tolérance au soi	18
1.2	Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires (MAI)	20
	Association génétique des MAI	23
	Facteurs hormonaux des MAI	25
	Facteurs infectieux des MAI	25
	Facteurs environnementaux des MAI	27
	Autres facteurs des MAI	28
	Le concept pathogénique "step by step"	28
1.3	Critères de classification des MAI	29
1.4	La thérapie des MAI	32
	Approche thérapeutique « classique » des MAI	32
	Nouvelle approche thérapeutique dans les MAI: l'interleukine-2 faible dose	35
1.5	Données massives et biologie des systèmes	42
1.5.1	Données massives : l'origine historique « d'une vision réductionniste à une vision holistique du corps humain »	42
1.5.2	Données massives : définition et méthodologie d'analyse	43
1.5.3	Méthodologie des études cliniques avec des données massives	44
1.5.4	Données massives dans les MAI	45
	Données massives dans le diagnostic des MAI	45
	Diagnostic précoce	45
	Diagnostic différentiel	47
	Données massives dans le pronostic des MAI	47
	Données massives dans l'activité des MAI	48
	Données massives dans la réponse aux traitements des MAI	48
	Données massives et repositionnement des médicaments (Drug repositioning)	50
1.5.5	Nouvelles classifications des MAI : l'apport de l'approche de biologie des systèmes à la classification des MAI	51
1.1	Données cliniques	52

1.5.1	Recueil des données cliniques dans les études cliniques	52
1.5.2	Outils pour les systèmes de gestion de données cliniques	54
1.5.3	Plateforme d'intégration des données dans les essais cliniques	54
2	HYPOTHÈSE DE LA RECHERCHE : l'IMMUNOME dans les études cliniques	56
3	OBJECTIFS	59
4	RÉSULTATS	60
4.1	Investigations statiques de l'immunome dans les MAI	60
4.1.1	Méthodologie d'un essai multi-omiques et multi-pathologies	60
4.1.2	Clinical coding et Intégration des données	63
	Résultats supplémentaires à ceux publiés dans les articles 1 et 2	67
	Inclusions des patients et plan de gestion des données	67
	Intégration des données sur la plateforme transSMART	69
4.1.3	Article 1 « Clinical and multi-omics cross-phenotyping of patients with autoimmune and autoinflammatory diseases: the observational TRANSIMMUNOM protocol »	74
4.1.4	Article 2 « Clinical data specification and coding for cross-analyses with omics data in autoimmune disease trials »	83
4.2	Investigations dynamiques de l'immunome dans les MAI	102
4.2.1	Faibles doses d'IL-2 dans le diabète de type 1	104
4.2.2	Article 3 « Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients »	107
4.2.3	Approche Transnosographique d'un essai clinique interventionnel	124
	Résultats supplémentaires à ceux publiés dans l'article 4	128
	Article 4 « Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial »	137
5	DISCUSSION	168
5.1	Investigations statiques de l'immunome dans les MAI	168
5.2	Investigations dynamiques de l'immunome dans les MAI	170
	Les fd IL-2 induit un milieu régulateur chez les patients DT1	170
	L'effet hautement sélectif trans-pathologies des fd d'IL-2	172
5.3	Discussion finale et perspectives	175
6	CONCLUSION	180
7	RÉFÉRENCE	181

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Généralités sur l'immunité et le système immunitaire

L'immunité est définie comme l'ensemble des mécanismes qui permettent à un organisme de se défendre contre les éléments qui lui sont étrangers. Cette réaction peut être non spécifique « réponse innée », ou spécifique « réponse adaptative » (Abbas and Lichtman 2008).

### 1.1.1 La réponse immunitaire innée

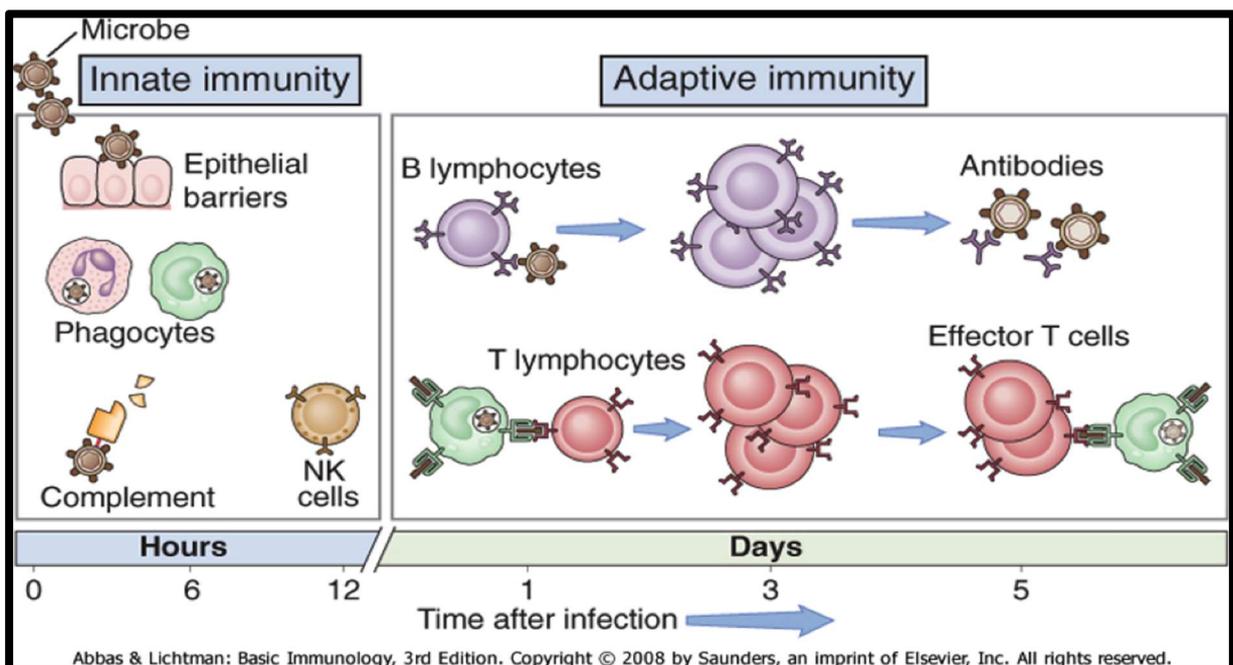
La première ligne de défense de l'organisme contre tous signaux de danger (infection par exemple) est assurée par une réponse non spécifique la « réponse innée » (Figure 1). Les cellules de l'immunité innée sont les phagocytes mononuclés, les cellules dendritiques, les granulocytes, les mastocytes et les cellules Natural killer (NK). Les facteurs solubles sont les protéines du système du complément et les cytokines pro inflammatoires.

La réponse innée met en jeu :

- des barrières cutané-muqueuses qui constituent des barrières physiques contre les microorganismes ainsi que chimiques (peptides antimicrobiens)
- les leucocytes, composés des macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles (PNN) et Natural Killer (NK). La principale fonction de ces cellules est la reconnaissance des signaux de danger *via* des récepteurs non spécifiques d'un antigène. Ces récepteurs sont : 1) les Toll Like Receptors (TLR) (extra et intracellulaires reconnaissant différents types de composants bactériens ou viraux), 2) les « sensors » cytoplasmiques, comme la famille des NOD-like receptors (NLR) (reconnaissant les peptidoglycanes) ou les flagellines bactériens ou les RIG-like receptors (RLR) (reconnaissent l'ARN viral), et 3) les récepteurs membranaires de la famille des lectines (reconnaissant les glycanes d'origine fongique).

L'activation des leucocytes induit :

- I. la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN de type 1) avec une action antivirale, et de chemokines (IL-8, CCL-2, CCL-3) permettant le recrutement leucocytaire sur le site infecté
  - II. l'expression de molécules de costimulation (CD80-CD86)
  - III. la phagocytose et la destruction des micro-organismes par les neutrophiles et les macrophages
  - IV. l'initiation d'une réponse adaptative via la présentation des antigènes microbiens aux lymphocytes B et T par les cellules présentatrices d'antigène (notamment les cellules dendritiques)
- les anticorps naturels et protéines du complément reconnaissant les pathogènes et ayant deux rôles principaux : favoriser l'opsonisation des pathogènes par les cellules phagocytaires et permettre la destruction du microorganisme *via* l'activation du complément induisant la formation d'un complexe d'attaque membranaire.



**Figure 1 :** Immunité innée et immunité adaptative (issue Abbas et Lichtman, 2008)

### 1.1.2 La réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes et les anticorps sont les composants principaux de l'immunité adaptative (Figure 1). Les substances étrangères capables d'induire une réponse immunitaire sont appelées antigènes. Ainsi, une fois qu'un antigène est entré en contact avec les cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes B ou lymphocytes T), les défenses immunitaires répondent de manière plus efficace et rapide lors des rencontres ultérieures avec le même antigène (mémoire immunologique).

Il existe deux populations principales de lymphocytes T : les lymphocytes T helper (Th) et les lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes Th expriment la glycoprotéine CD4 et, lorsqu'ils sont activés, sécrètent des protéines de faible poids moléculaire appelées cytokines, qui ont divers effets sur d'autres cellules du système immunitaire. Les lymphocytes T cytotoxiques expriment la glycoprotéine CD8 et, lorsqu'ils sont activés, se différencient en lymphocytes effecteurs qui peuvent détruire les cellules autologues altérées (y compris les cellules infectées par un virus et les cellules cancéreuses).

La réponse adaptative est caractérisée par : (i) son temps plus long de mise en place, (ii) sa spécificité face aux différents pathogènes, et (iii) sa grande diversité liée à la multitude de pathogènes potentiels. La réponse adaptative est initiée au niveau du ganglion. Pour l'assurer, les lymphocytes expriment à leur surface un récepteur spécifique d'un antigène donné.

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), notamment les cellules dendritiques, présentent le peptide antigénique aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *via* les interactions entre récepteur des lymphocytes T (TCR) et le complexe Ag-molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II présent à la surface des CPA. La reconnaissance de l'antigène par le TCR (signal 1) n'est efficace que si elle s'accompagne en parallèle d'une interaction entre les différentes molécules de costimulation présentes à la fois sur le lymphocyte T et sur la CPA (signal 2).

Grâce à ces différents signaux, le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> est activé, exprime CXCR5 (ligand de CXCL13 sécrété par les cellules dendritiques folliculaires en zone B du ganglion) et perd celle de CCR7 (ligand de CCL19 et CCL21 sécrétés par les cellules stromales en zone T du ganglion), permettant sa migration dans la zone B-T et ainsi la coopération B/T qui induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. La coopération B-T induit donc : 1) la prolifération clonale lymphocytaire B et T et 2) la différenciation finale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, notamment en « T Follicular Helper » (TFH) 3) la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) du lymphocyte B qui conduit à la sécrétion d'anticorps.

L'antigène est reconnu par l'anticorps avec lequel ils forment un complexe qui se fixe au récepteur du fragment constant (Fc) des immunoglobulines à la surface des cellules phagocytaires et active le complément ce qui entraîne la destruction du pathogène.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se différencient en des sous-populations spécifiques en fonction du type de pathogène et de l'environnement cytokinique (Figure 2).

Les microorganismes intracellulaires induisent une polarisation Th1. Les Th1 induisent la phagocytose par les macrophages grâce à la sécrétion d'IFN $\gamma$  et à l'interaction des molécules de costimulation (CD40-CD40L). La sécrétion d'IFN $\gamma$  induit également la sécrétion d'IgG par les plasmocytes qui favorise la phagocytose du pathogène opsonisé.

Les parasites induisent une polarisation Th2 qui sécrètent l'IL-4 et favorisent la commutation isotypique en IgE. La réponse Th2 aboutit à la dégranulation des mastocytes et à la sécrétion d'IL-13 et d'IL-5 activant les éosinophiles.

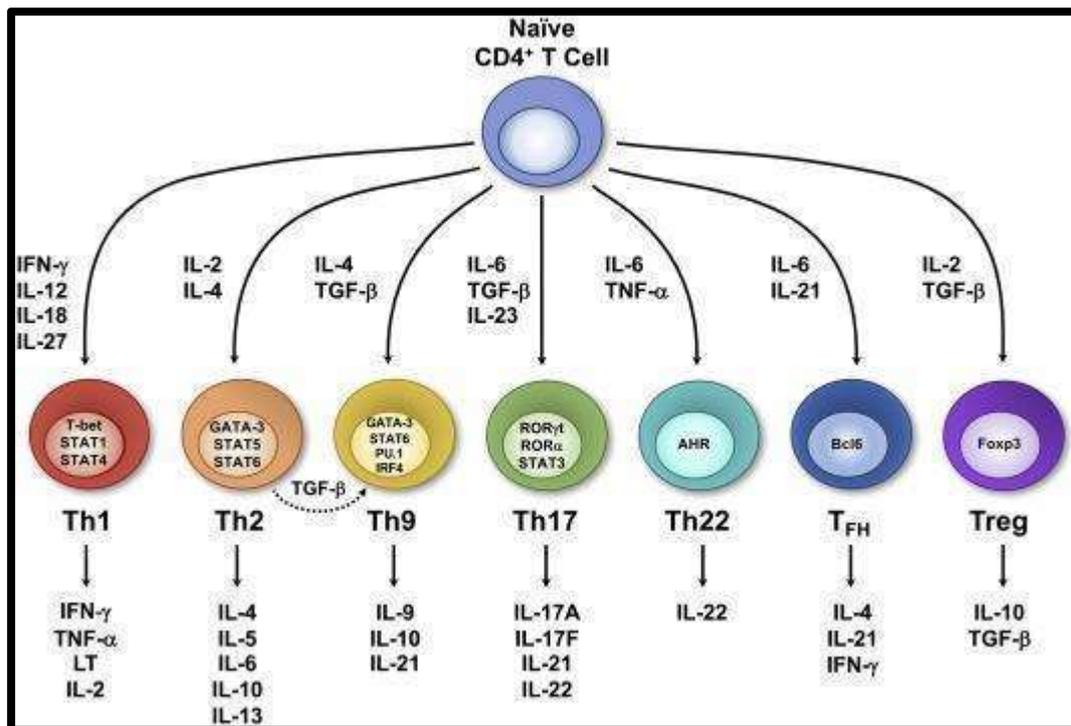
En présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 pendant leur activation, les lymphocytes T CD4 naïfs se différencient en Th9 (caractérisés par la production d'IL-9). La différenciation cellulaire Th9 résulte de l'équilibre entre les voies de signalisation induites par l'IL-4 et celles induites par le

TGF- $\beta$ . Ils sont considérés comme des lymphocytes inflammatoires, ils contribuent à la réponse contre les parasites et interviennent dans les maladies atopiques et auto-immunes.

Les organismes extracellulaires, type bactéries ou champignons, induisent une polarisation Th17. Les Th17 exercent leur action par la sécrétion d'IL-17, IL-21 et IL-22. Les lymphocytes Th17 contribuent également au recrutement des polynucléaires neutrophiles. De ce fait, ils sont impliqués dans les processus inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé), le cancer, l'allergie et le rejet de greffes allogéniques.

Dans certaines maladies cutanées, comme les dermatites atopiques, ou certaines maladies autoimmunes (psoriasis, lupus, sclérose en plaques) ont été mis en évidence des lymphocytes Th22 caractérisés par la sécrétion d'IL-22 et d'IL-13.

Les cellules T auxiliaires folliculaires (TFH) résident à la périphérie des follicules des cellules B des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les plaques de Peyer. Ils ont un rôle essentiel dans la sélection et la survie des cellules B qui se différencient ensuite soit en plasmocytes capables de produire des anticorps de haute affinité contre un antigène, soit en cellules B mémoires capables de réactiver rapidement le système immunitaire.



**Figure 2 :** Phénotype des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et sous-populations

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont la propriété d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et participent au maintien de l'homéostasie.

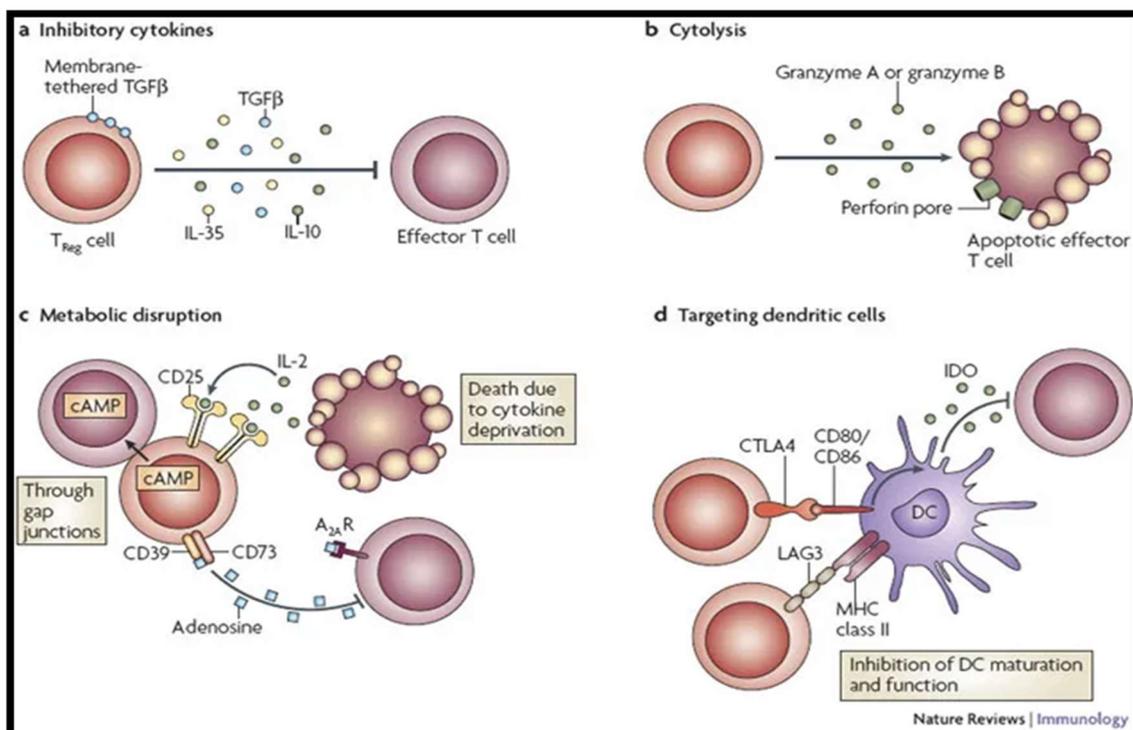
Les lymphocytes T régulateurs sont divisés en deux populations : les CD4<sup>+</sup> Treg et les CD8<sup>+</sup> Treg.

Les CD4<sup>+</sup> Treg représentent entre 5 et 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques. Les CD4<sup>+</sup>Treg périphériques sont définis par l'expression du facteur de transcription FOXP3, une forte expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) et une faible expression de CD127. Le phénotype activé de ces cellules exprime également le CTLA-4 et le GITR (glucocorticoid induced TNFR). Ils sont caractérisés par la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10 (Maynard et al. 2007). La prolifération, la stabilité et la survie des Treg dépend de l'IL-2.

Les CD4<sup>+</sup> Treg exercent leur fonction suppressive par différents mécanismes (Vignali, Collison, and Workman 2008) (Figure 3): (a) inhibition par des cytokines immunorégulatrices telles que

TGF $\beta$ , IL-10 et IL-35; (b) inhibition par cytolysse des cellules effectrices en produisant du granzyme et de la perforine; (c) interruption métabolique, y compris une inhibition de la réponse proliférative *via* le récepteur IL-2, une inhibition métabolique médiée par l'AMPc et une immunomodulation médiée par le récepteur A<sub>2</sub> de l'adénosine; (d) interaction avec les cellules dendritiques qui modulent leur fonction et leur maturation.

Les CD8<sup>+</sup> Treg représentent un très faible pourcentage (environ 0-1%) des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> périphériques. Les Treg CD8<sup>+</sup> périphériques sont définis par l'expression du facteur de transcription FOXP3, une forte expression du CD25, le CTLA-4 et le GITR (glucocorticoid induced TNFR) (Dinesh et al. 2010; Y. Yu et al. 2018). Les CD8<sup>+</sup> Treg exercent leur fonction suppressive par différents mécanismes (Y. Yu et al. 2018) : a) inhibition par des cytokines immunorégulatrices telles que IL-10, TGF- $\beta$ , IL-16, IFN- $\gamma$  and CCL4; b) inhibition des APC ; c) inhibition par des mécanismes d'interaction cellulaire ; et d) par cytotoxicité directe *via* le lien avec le CMH Ib.



**Figure 3 :** Principaux mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs (issue Vignali et al, 2008)

### 1.1.3 Les lymphocytes T régulateurs dans les MAI

De nombreux travaux publiés dans la littérature ont montré que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Treg sont essentiels au maintien de la tolérance au soi et à l'homéostasie immunitaire. La majorité des MAI est associée à un déficit quantitatif et/ou fonctionnel des Treg (Miyara et al. 2011); (Todd M. Brusko, Putnam, and Bluestone 2008b), se traduisant par un déséquilibre de la balance T effectrice / T régulatrice (Teff / Treg) (S. Sakaguchi et al. 1995).

En effet, l'homme et les souris présentant un déficit génétique en Treg développent plusieurs maladies auto-immunes spécifiques d'organes (Moraes-Vasconcelos et al. 2008); un défaut quantitatif ou qualitatif des cellules Treg est présent dans de nombreuses maladies auto-immunes murines et humaines (Noack and Miossec 2014; Todd M. Brusko, Putnam, and Bluestone 2008b; Miyara et al. 2011), et la déplétion des cellules Treg chez les individus en bonne santé à tout moment de la vie, induit une réponse auto-immune et inflammatoire rapide conduisant à une auto-immunité à plusieurs organes (J. M. Kim, Rasmussen, and Rudensky 2007). Ces observations ont conduit à la notion d'équilibre entre les cellules Treg et les cellules T effectrices dans le sujet sain. Cet équilibre est dérégulé dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, qui présentent une insuffisance en cellules Treg.

C'est le cas aussi bien des maladies dites inflammatoires dont les MICI (Eastaff-Leung et al. 2010);(Himmel et al. 2008), la maladie de Behçet (Nanke et al. 2008); (Geri et al. 2011) et la spondylarthrite ankylosante (Appel et al. 2011), le psoriasis (Sugiyama et al. 2005), que des maladies auto-immunes dont la polyarthrite rhumatoïde (Xiao et al. 2011); (W. Wang et al. 2012); (Niu et al. 2012); (Sempere-Ortells et al. 2009), le lupus érythémateux disséminé (Crispin, Martínez, and Alcocer-Varela 2003; Li et al. 2019); (Baráth et al. 2007); (Valencia et al. 2007); (J.-H. Lee et al. 2006) (H.-Y. Lee et al. 2008); (Mellor-Pita et al. 2006), (B. Zhang et al. 2008)), la granulomatose avec polyangéite (ex maladie de Wegener) (M. D. Morgan et al.

2010), l'hépatite auto-immune seule (Longhi et al. 2004, 2005), ou en combinaison avec une cholangite sclérosante (Longhi et al. 2006), le syndrome de Gougerot Sjögren (Li, 2007), la Sclérodémie systémique (Banica et al. 2009; Cordiali-Fei et al. 2013; Fenoglio et al. 2011);(Papp et al. 2011), le diabète de type 1 (Todd M. Brusko et al. 2005) ; (Lindley et al. 2005), la sclérose en plaques (Viglietta et al. 2004; Haas et al. 2005) et d'autres.

Pour ce qui concerne les lymphocytes CD8<sup>+</sup> Treg, il y a moins de travaux publiés dans la littérature chez l'homme. Ils ont été étudiés en particulier chez les patients lupiques, pour lesquels un déficit quantitatif et/ou fonctionnel des CD8<sup>+</sup> Treg a été rapporté (Filaci et al. 2001; Tulunay et al. 2008).

#### **1.1.4 Tolérance immunologique et théories du développement de l'auto-immunité**

##### ***Tolérance immunologique***

La tolérance immunologique est un processus acquis se déroulant au niveau des organes lymphatiques primaires (tolérance centrale) ou à la périphérie (tolérance périphérique), et conduisant à l'élimination ou à l'inactivation fonctionnelle du clone T autoréactif. En effet dans des conditions de normale homéostasie du système immunitaire, les lymphocytes auto réactifs sont supprimés au niveau central (*via* la tolérance centrale par délétion des clones autoréactifs) et au niveau périphérique par les cellules Treg (Shimon Sakaguchi, Powrie, and Ransohoff 2012); (Shevach and Thornton 2014), selon les mécanismes d'actions des lymphocytes Treg déjà décrit précédemment.

Une réponse immune efficace repose sur des systèmes de régulation efficaces capables de prévenir la survenue d'une réponse immune auto-réactive.

Des anomalies dans l'induction ou le maintien de la tolérance envers soi-même peuvent provoquer l'apparition de maladies auto-immunes caractérisées par une réponse plus ou moins prononcée aux structures propres de l'individu.

### *Théories sur la perte de tolérance au soi*

Il existe plusieurs théories sur la perte de tolérance au soi.

- I. La théorie « du soi et du non soi » Burnet (1899-1985) statuant que toute entité qui provient du « soi » va être acceptée par le système immunitaire de l'organisme et à l'inverse, toute entité qui n'est pas issue du « soi » va être rejetée. La théorie du « soi » et du « non soi » explique mal les phénomènes d'auto-réactivité « physiologique », tels que la phagocytose des cellules mortes ou le rôle des lymphocytes T régulateurs et des auto-anticorps naturels. En effet, un certain « degré » d'auto-immunité est considéré comme physiologique.
- II. La théorie du « horror autotoxicus » a été développée par Paul Ehrlich qui décrit la peur d'une attaque du système immunitaire dirigée contre nos propres tissus aboutissant à l'autodestruction de l'organisme (Ehrlich 1906).
- III. La théorie « du danger » a été développée par P. Matzinger (Matzinger 1994) selon laquelle la fonction principale du système immunitaire n'est pas de faire la différence entre le soi et le non-soi mais la réponse immune est provoquée par tous les agents susceptibles d'entraîner des destructions tissulaires nécrotiques et inflammatoires. Ce n'est donc plus le caractère étranger d'un constituant qui déclenche la réponse immunitaire, mais sa capacité à provoquer une mort cellulaire anormale. En revanche, si les cellules meurent par apoptose et sont phagocytées par les macrophages, il n'y aura pas de réponse immunitaire dirigée contre elles. Selon cette hypothèse, le système immunitaire réagit donc à ce qui est dangereux pour l'organisme.

- IV. La théorie de la discontinuité immunitaire quantitative ou qualitative (Pradeu and Vivier 2016) fondée sur l'idée que le système immunitaire serait surtout sensible aux différences entre l'habituel et l'inhabituel et à la cinétique de ces changements potentiels. Ce qui serait important pour le système immunitaire ne serait pas de voir ce qui est « soi » ou « non soi », mais plutôt de voir ce qui change vite ou non avec une notion « d'espace-temps immunologique » : le système immunitaire, compartimenté, serait sensible aux variations dans l'espace (migration de cellules immunitaires du poumon à l'intestin par exemple) et aux variations dans le temps (cinétique de variation). En conséquence, un organisme serait un individu-écosystème complexe fait de nombreux éléments appartenant à différentes espèces (virobiote, mycobiote, microbiote...), on pourrait parler de « méta-organisme ».
- V. La théorie de la criticité auto-organisée de l'auto-immunité de Tsumiyama (Tsumiyama, Miyazaki, and Shiozawa 2009) selon laquelle le défaut du système immunitaire pourrait expliquer la cause de l'auto-immunité. L'auto-immunité systémique semble être la conséquence inévitable de la stimulation excessive du système immunitaire par une immunisation répétée avec un antigène, à des niveaux qui dépassent la criticité auto-organisée du système.

## 1.2 Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires (MAI)

Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires (MAI) sont parmi les plus fréquentes cause de maladie chronique et de handicap dans le monde occidental (Walsh and Rau 2000), (Sebbag et al. 2019).

Les MAI sont des pathologies très complexes dues à divers facteurs génétiques (Deng and Tsao 2014); (Deng and Tsao 2010) (Delgado-Vega et al. 2010) (Dozmorov, Wren, and Alarcón-Riquelme 2014) et environnementaux qui induisent une perte de tolérance du soi par des processus biologiques modifiés et qui sont liés à un déséquilibre de la balance des lymphocytes T régulateurs et T effecteurs (S. Sakaguchi et al. 1995).

Le résultat de la perte de la tolérance est la formation d'autoanticorps et / ou de lymphocytes T autoréactifs qui induisent des lésions tissulaires et des maladies.

De façon générale, l'auto-immunité est définie comme une réaction immunitaire auto-dirigée, entraînant des réponses aberrantes des cellules dendritiques, des cellules B et T, dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les auto-anticorps spécifiques à un organe peuvent précéder l'expression clinique de la maladie de plusieurs années bien avant que des dommages à l'organe cible ne soient discernables. La réponse immunitaire adaptative joue le rôle prédominant dans l'expression clinique éventuelle de la maladie.

Parmi les maladies auto-immunes, on distingue i) les maladies systémiques [exemple : lupus érythémateux systémique (LES), polyarthrite rhumatoïde (PR), sclérodermie systémique (SS), dermatopolymyosite (DM), polymyosite (PM), le syndrome de Gougerot-Sjögren (GS), le syndrome des antiphospholipides (SAPL), et les vascularites associées aux auto-anticorps ANCA (AAV) telles que la granulomatose avec polyangéite (GPA) et granulomatose éosinophilique avec polyangéite (GEPA)] et ii) celles spécifique d'un organe [exemple : diabète

de type 1 (DT1), thyroïdite autoimmune, hépatite autoimmune (HAI), maladie de Biermer, maladie cœliaque, sclérose en plaque (SEP), pemphigus et l'alopecie].

De façon générale, l'auto-inflammation est définie comme une réaction inflammatoire auto-dirigée, par laquelle des facteurs locaux entraînent l'activation de cellules immunitaires innées (y compris les macrophages et les neutrophiles), qui aboutissent à des lésions tissulaires. Les maladies auto-inflammatoires chroniques comprennent un groupe de troubles caractérisés par des épisodes inflammatoires systémiques récurrents, parmi lesquels : i) des perturbations héréditaires de la réponse immunitaire innée comme les fièvres héréditaires récurrentes [notamment la fièvre méditerranéenne familiale (FMF) ou maladie périodique, le syndrome hyper-IgD, les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS), et le syndrome périodique associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1 (TRAPS)], ii) la goutte, iii) les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH)], iv) certaines vascularites (telles que la maladie de Takayasu et la maladie de Behçet) et v) les spondylarthropathies [(telles que la spondylite ankylosante (SpA)] et la psoriasis.

On observe fréquemment des syndromes de chevauchement avec l'association de plusieurs MAI (comme MICI et SpA; LES et SAPL ou GS et PR et d'autres encore), probablement en raison de l'existence d'un terrain immunogénétique commun à ces différentes maladies.

La prévalence des MAI est très variable, certaines très rares et d'autres fréquentes (Tableau 1).

Maladie	Auto-immune (AI)/ Inflammatoire (INF)	Prévalence x/100,000
Cholangite sclérosante (CS)	AI	8-14*
Dermatomyosites (DM)	AI	1-9*
Diabète de Type 1 (DT1)	AI	300 000 **
Fièvre méditerranéenne familiale (FMF)/ CAPS/TRAPS	INF	10*/>100*
Granulomatose avec polyangéite (GPA ; ex Wegener)	AI	6.6*
Granulomatose éosinophile avec micropolyangéite (GPA ; ex syndrome de Churg-Strauss)	AI	1-9*
Hépatite auto-immune (HAI)	AI	15*
Lupus érythémateux systemique(LES)	AI	52*
Maladie de Behçet (MB)	INF	3.4*
Maladie de Crohn (MC)	INF	140*
Maladie de Takayasu (MT)	AI	0.45*
Myosites d'inclusion	INF	1-9*
Polyarthrite Rhumatoïde (PR)	AI	40-80*
Polymyosites (PM)	AI	1-9*
Psoriasis (PSO)	AI	1000-3000*
Rectocolite hémorragique (RCH)	INF	21-294*
Sclérodermie systémique (SS)	AI	0.5*
Spondylarthrite ankylosante (SpA)	INF	200*
Syndrome de Gougerot Sjögren (GS)	AI	5-20*
Uvéites	INF	38-204*

**Tableau 1** : Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires et leur prévalence (\*pour 100,000 habitants de l'Union européenne et des États-Unis ; \*\* pour 60 millions d'habitants de la France).

### 1.2.1 Physiopathologie des MAI

#### *Association génétique des MAI*

La majorité des MAI sont d'origine multifactorielle (résultat des interactions entre les multiples variantes génotypiques et l'environnement).

Néanmoins, il y a des maladies auto-immunes liées à des mutations génétiques à transmission mendélienne où la variante génétique est la cause directe de la maladie (Rioux and Abbas 2005). Les mutations peuvent affecter un ou plusieurs composants du système immunitaire inné ou adaptatif et, ensemble, entraîner une altération de la réponse immunitaire à l'auto-antigène. Parmi les MAI à transmissions génétiques mendéliennes il y a : i) la mutation du gène *AIRE* (régulateur auto-immun) qui donne un syndrome poly-endocrinien auto-immun, ii) la mutation du gène *CTLA4* (l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4 ou CD152) qui est un récepteur inhibiteur exprimé par les cellules T, qui donne : lymphoprolifération des cellules T, auto-inflammation ou auto-immunité (type MICI ou plus rarement Lupus), déficit immunitaire et lymphome ou cancer gastrique ; iii) la mutation du gène du *FOXP3* (codant pour un facteur de transcription de la famille des *forkheads*, exprimé de façon constitutive par les cellules régulatrices T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), conduit à une maladie auto-immune systémique dénommée sous l'acronyme IPEX (dysrégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, syndrome lié au chromosome X) ; iv) la mutation du gène *FAS* (codant pour un récepteur pouvant induire l'apoptose de la famille des récepteurs TNF) peut donner lieu à un phénotype auto-immun complexe, appelé le syndrome lymphoprolifératif auto-immun.

Les maladies auto-immunes, d'origine multifactorielle, résultent d'une combinaison d'allèles de susceptibilité, de facteurs environnementaux (tels que le tabagisme, l'exposition aux agents pathogènes et les niveaux d'hormones) et d'événements stochastiques.

Les associations génétiques, impliquant certains phénotypes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), favorisent l'émergence de maladies auto-immunes.

Certains allèles de HLA-DRB1 (allèles DRB1\*0401, DRB1\*0404, DRB1\*0405, DRB1\*0408, DRB1\*0101, DRB1\*0102, DRB1\*1001, DRB1\*1401) et DR4 (DRB1\*0401, 0404 et 0405) (Ollier and Thomson 1992); (Pociot and Lernmark 2016) (Thorsby and Lie 2005) sont des facteurs de risque pour la polyarthrite rhumatoïde.

Dans le cas du diabète de type 1, les allèles HLA-DR3-DQ2 and HLA-DR4-DQ8 (surtout si ils sont associés), et plus encore certains allèles DQB1, sont des gènes de susceptibilité, avec un rôle favorisant ou protecteur en fonction de la séquence de la molécule codée (Morran et al. 2015).

Le 90 % des patients ayant une maladie cœliaque expriment l'allèle DQ2 (DQ2=DQA1\*0501/DQB1\*02) (Kagnoff 2007).

Le lupus érythémateux systémique a une association avec le HLA-DR2 et DR3 (38 % des patients avec LES possèdent DR3) (Simmonds and Gough 2007) (Graham et al. 2007). Les déficits en fractions précoces du complément (C1q, C1r, C1s, C2 et C4) sont associés à une incidence accrue de maladies auto-immunes : déficit homozygote en C4 (75 % de lupus), en C1q (90 % de lupus).

Le déficit en immunoglobulines A est également fréquemment associé à des désordres auto-immuns (maladie cœliaque, par exemple).

Pour ce qui concerne les maladies inflammatoires, le HLA-B27 est fortement associé à la SpA, le HLA-B51 à la maladie de Behçet et le HLA-A29 aux uvéites (Feltkamp 1990).

D'autres associations génétiques non liées au HLA sont le *MEFV* pour la Fièvre Méditerranéenne Familiale, le *NLRP3* pour les CAPS, *TNFR1* ou *TNFRSF1A* pour TRAPS et des

gènes liés à l'autophagie pour la maladie de Crohn (*ATG16L1*, *IRGM*, *NOD2*) (Goldstein 2009); (Hugot et al. 2001) (Ogura et al. 2001).

Récemment, des études d'association pan-génomique (genome wide association studies, GWAS) réalisées sur plusieurs maladies auto-immunes et plusieurs milliers de cas-témoins ont montré que plusieurs gènes étaient partagés par plusieurs pathologies (Cooper et al. 2009), comme les gènes de certains récepteurs des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T, des gènes de cytokines et des gènes régulant les phénomènes d'apoptose (FAS ligand, BCL2) ou l'activation lymphocytaire (CTLA-4, CD40 ligand). Une autre étude a montré que 7 maladies auto-immunes/auto-inflammatoires partageaient également des loci (Cotsapas et al. 2011).

#### ***Facteurs hormonaux des MAI***

Les femmes ont une plus grande susceptibilité aux maladies auto-immunes. Cela est expliqué par les hormones sexuelles (les œstrogènes ont un rôle particulier dans la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes) et par le gène *TLR7*, localisé sur le bras court du chromosome X (l'expression bi-allélique du gène *TLR7* confère une hyperréactivité fonctionnelle aux lymphocytes B)(Odhams et al. 2019). Il y a une incidence accrue des maladies auto-immunes préférentiellement chez les femmes en âge de procréer et les rôles parfois aggravants de la grossesse et de la contraception hormonale confirment cette importance. Par exemple, la grossesse et les traitements inducteurs de l'ovulation peuvent aggraver un lupus érythémateux systémique (grossesse ou post-partum immédiat).

#### ***Facteurs infectieux des MAI***

Les infections ont été incriminées aussi bien dans l'initiation de l'auto-immunité que dans la pérennisation et les rechutes de certaines maladies auto-immunes (Hussein and Rahal 2019).

C'est le cas pour le virus d'Epstein-Barr dans la polyarthrite rhumatoïde, le LES, le GS et la sclérose en plaques (Serafini et al. 2007; van Noort et al. 2000; Pender 2003; Pender and Burrows 2014; Miyasaka et al. 1989; Mousavi-Jazi et al. 1998; McDermott et al. 1989; Mariette et al. 1991; Kang et al. 2004; Larsen et al. 2011; J. A. James et al. 1997; Judith A. James et al. 2001); le parvovirus b19 dans la PR, LES, GS, SS et la dermatomyosite (Chassagne et al. 1993; Chevrel et al. 2000; Crowson et al. 2000; Dorsch et al. 2002; Ferri et al. 2002; Kerr et al. 1996; Lewkonia, Horne, and Dawood 1995; Murai et al. 1999; Ramos-Casals et al. 2000; White et al. 1985; Zakrzewska et al. 2009), le cytomégalovirus dans le LES et la SS (Arnson et al. 2009; Barzilai et al. 2007; Chen et al. 2015); (Esen et al. 2012; J. A. James et al. 1997) ; le Virus T-lymphotrope humain type 1 (HTLV-1) dans la GS et les uveïtes (Gessain et al. 1985; Romanelli et al. 2010), les entérovirus (Coxsackie virus de type B) dans le DT1 (H. and K. 2002; Horwitz et al. 2004, 2002) ; Escherichia coli et Mycobacterium avium paratuberculosis dans la MC (Nazareth et al. 2015), Klebsiella pneumonia dans la SpA (L. Zhang et al. 2018) été le staphylocoque doré dans la GPA (Stegeman et al. 1996).

En plus de vrais agents infectieux, des rétroéléments endogènes (anciennes insertions virales dans le génome) ont été suggérées jouer un rôle dans la pathogenèse des maladies auto-immunes en raison de leur réactivation partielle ou du contrôle épigénétique de la transcription génique de l'hôte. Un certain nombre d'études ont confirmé leur contribution au développement du syndrome de Gougerot-Sjögren, le lupus érythémateux, la sclérose en plaque, le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la sclérodermie systémique (Perron and Seigneurin 1999; Bergallo et al. 2018; Talotta et al. 2019).

Enfin, le rôle du microbiote intestinal dans la survenue des MAI de même que son potentiel thérapeutique fait actuellement l'objet de nombreuses publications. En effet, le tractus gastro-intestinal est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules hôtes épithéliales

et immunitaires, avec une large gamme de microorganismes et d'antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est composé de milliards de bactéries ( $10^{14}$  bactéries) appartenant à trois grands phylums (Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria). Il a été montré qu'il joue un rôle majeur dans la physiologie humaine et il est notamment impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques, dans la fonction de barrière intestinale et dans la maturation du système immunitaire. La dysbiose désigne un déséquilibre du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal est considéré comme un acteur majeur dans un nombre croissant de maladies humaines, y compris les maladies inflammatoires de l'intestin (Azimi et al. 2018), la polyarthrite rhumatoïde (Maeda and Takeda 2017), la sclérose en plaques (Camara-Lemarro et al. 2018), le diabète de type 1 (Han et al. 2018), l'obésité et les stéatoses hépatiques non hépato-toxiques (Porras et al. 2018). Parmi les différents facteurs pouvant réguler le microbiote intestinal, l'apport alimentaire et les habitudes alimentaires ont une influence sur la richesse et la composition microbienne. Les changements dans la composition du microbiote et la production de métabolites microbiens induits par le régime alimentaire, modifient la perméabilité intestinale et l'afflux de métabolites toxiques dans la périphérie, lesquels peuvent entraîner une « endotoxémie métabolique » (Christ, Lauterbach, and Latz 2019).

### *Facteurs environnementaux des MAI*

Parmi les facteurs environnementaux, les rayons ultraviolets sont impliqués dans les maladies autoimmunes. En effet, la photosensibilité et l'éruption cutanée subséquente est une caractéristique commune à différents MAI (Kuhn, Wenzel, and Weyd 2014). Il existe aussi, pour certaines MAI, un gradient géographique de fréquence Sud / Nord qui ne peut se résumer à la seule contribution de facteurs génétiques, suggérant là encore l'implication de facteurs environnementaux (Selmi 2010).

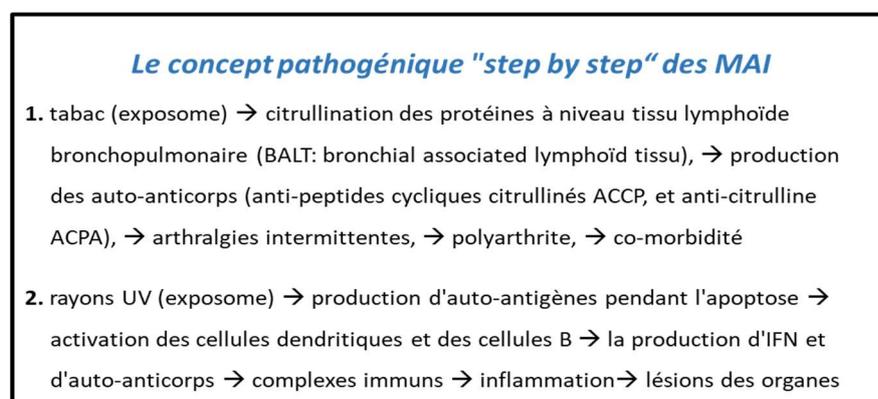
L'exposition professionnelle à la silice est parfois retrouvée chez les patients présentant une sclérodermie (Sharma, Sharma, and Sharma 2018). Les sujets en contact avec du chlorure de vinyle peuvent développer un syndrome de Raynaud avec sclérose cutanée et une acro-ostéolyse (Fontana, Marion, and Catilina 2004).

### *Autres facteurs des MAI*

Certains médicaments tels que la procaïnamide induisent l'apparition d'un lupus érythémateux systémique (Y. He and Sawalha 2018; Rubin 2005), ou tels que l'interféron alpha (prescrit par exemple dans le traitement des hépatites virales)(Krupińska et al. 2011) et les anti-tumor necrosis factors alpha peuvent induire une autoimmunité biologique parfois associée à des manifestations cliniques (Pérez-De-Lis et al. 2017).

### *Le concept pathogénique "step by step"*

Le concept pathogénique "step by step" dans les maladies auto-immunes (Figure 4) est fondé sur le principe qu'un facteur "favorisant" (exposome, infectome ou microbiome), agissant sur un terrain prédisposant (génétique, épigénétique), résulte en une réponse immunitaire "excessive" (auto-immunité ↔ auto-inflammation), donnant lieu à des lésions tissulaires débutantes "spécifiques" d'organe et à des destructions tissulaires "excessives" avec des "défauts" de réparation.



**Figure 4** : Le concept pathogénique "step by step" des maladies auto-immunes

### 1.3 Critères de classification des MAI

Selon le mécanisme physiopathologique en cause : lorsque l'immunité innée est la plus affectée se développe une maladie inflammatoire chronique et, lorsque le système immunitaire adaptatif est le plus affecté se produit une maladie auto-immune.

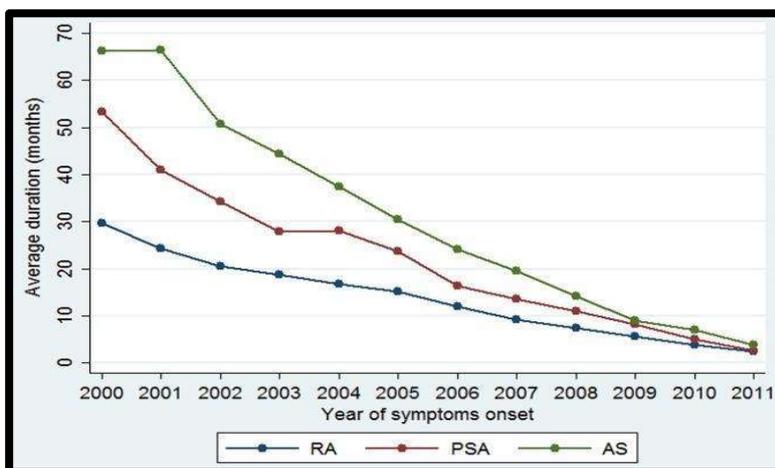
Néanmoins, les critères de classification des MAI sont conçus en tenant compte de l'aspect clinique/phénotypique de la maladie et non du mécanisme physiopathologique impliqué. Celles-ci ont été appelées, en effet, critères de classification et non diagnostiques car ils ne sont pas destinés à un usage diagnostique, mais plutôt à un usage épidémiologique d'association de groupes de patients présentant des caractéristiques similaires.

Le diagnostic d'une maladie auto-immune peut être difficile en raison de la nature complexe de ces maladies et du chevauchement de divers symptômes. Les symptômes communs tels que les arthralgies, l'atteinte rénale, vasculaire et neurologique entre autres, ne sont que la partie émergée de l'iceberg. En effet, certaines de ces maladies ont également en commun : certains autoanticorps (anticorps antinucléaires), des gènes de susceptibilité (association HLA et non HLA), des signatures transcriptomiques (IFN) ainsi que de l'épigénétique (virus, EBV, microbiote). Cela suggère que des profils cliniques similaires peuvent résulter de mécanismes pathogéniques distincts et, inversement, un médicament ciblant une voie moléculaire spécifique peut traiter avec succès des phénotypes cliniques distincts.

Les maladies peuvent se développer de nombreuses années avant la phase symptomatique aiguë et un diagnostic précoce est difficile puisque le tableau clinique devient spécifique d'une maladie après que le dommage tissulaire soit déjà à un stade avancé. Comme le démontrent les travaux publiés dans la littérature (Nielen 2004; Deane et al. 2010), les marqueurs spécifiques des MAI, sont présents bien avant l'apparition des symptômes.

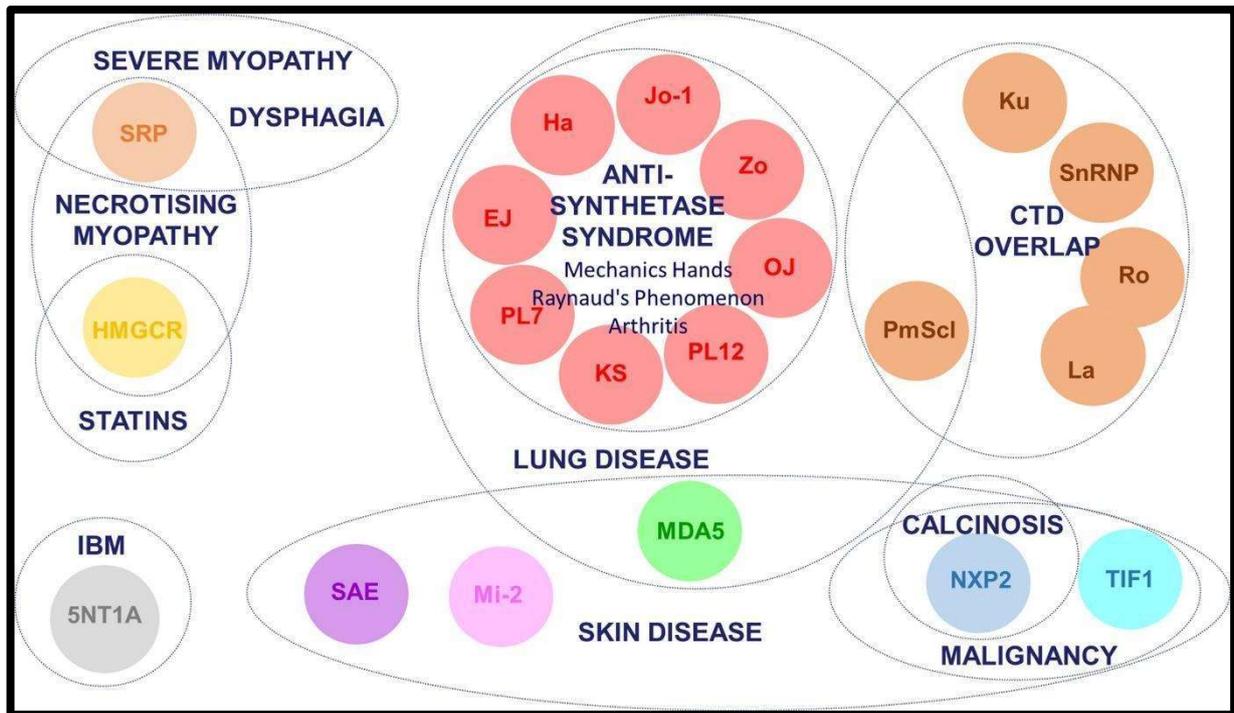
Les premières classifications des MAI ont été publiées au milieu des années 1900 (Bennett et al. 1956; "DIAGNOSTIC Criteria for Rheumatoid Arthritis: 1958 Revision by a Committee of the American Rheumatism Association" 1959).

Les progrès réalisés au cours des dernières décennies dans la définition et la classification de plus en plus détaillées des maladies auto-immunes ont conduit à une réduction drastique du temps entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic (Figure 5) (Sørensen, Hetland, and all departments of rheumatology in Denmark 2015).



**Figure 5** : Temps entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic dans les MAI, (issue Sørensen et al. ARD 2015)

L'élaboration de critères diagnostiques a évolué au cours des dernières décennies à la suite de l'amélioration de la détection des marqueurs immunologiques, comme notamment les anticorps spécifiques. Pour exemple, la classification des myosites a complètement changé dans les dernières années à la lumière des nouveaux auto-anticorps détectés (Figure 6). De même, celle du lupus systémique, qui, selon les dernières directives de la Ligue Européenne Contre le Rhumatisme (EULAR), attribue un pondération plus importante aux critères spécifiques de la maladie (notamment les anticorps anti ADN ou la néphrite lupique) (Aringer et al. 2019).



**Figure 6** : « Les auto-anticorps spécifiques aux myosites : un outil important pour faciliter le diagnostic des myosites », issue de Betteridge, 2016

Les récentes mises à jour des critères de classification mettent donc en avant les caractéristiques moléculaires et physiopathologiques des maladies plutôt que les caractéristiques cliniques. De plus, un article récent avec des patients atteints de SpA met en doute la valeur de la sacroiliite à l'imagerie comme critère indispensable au diagnostic (Bubová et al. 2019). En effet, les patients avec ou sans sacroiliite à l'imagerie avaient la même maladie, avec la même activité clinique et la même réponse aux médicaments.

En outre, il y a aussi certains malades que l'on ne peut pas classer dans une maladie spécifique et que l'on regroupe dans la catégorie des MAI inclassées.

Il est nécessaire, donc, de mieux caractériser la pathogenèse de la maladie au niveau moléculaire, et classer les patients sur la base des caractéristiques moléculaires.

## 1.4 La thérapie des MAI

### *Approche thérapeutique « classique » des MAI*

L'approche thérapeutique des maladies inflammatoires et auto-immunes vise à la suppression ou l'atténuation de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Nous distinguons deux catégories de médicaments : les médicaments non spécifiques ou symptomatiques et les médicaments spécifiques appelés médicaments de fond qui agissent sur les mécanismes pathogéniques et sont capables de ralentir la progression de la maladie (en anglais : *disease-modifying antirheumatic drugs-DMARDs*).

Les objectifs de ces traitements sont de prévenir les poussées de la maladie, de limiter l'évolutivité des atteintes viscérales, et d'améliorer l'impact sur la qualité de vie tout en évitant les effets indésirables.

#### Les médicaments non spécifiques

Parmi les médicaments non spécifiques, on distingue : les analgésiques simples (qui comprennent les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX), et le paracétamol), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les corticostéroïdes et la colchicine.

Les analgésiques simples et les AINS agissent sur la COX, une enzyme qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandines. Parmi les AINS les plus utilisés figurent : l'acide acétylsalicylique (salicylates), l'indométacine (dérivés indoliques), l'ibuprofène, le kétoprofène et le piroxicam (dérivés de l'acide propionique) et le diclofénac (phénylacétate).

Les corticostéroïdes constituent la classe la plus importante et largement prescrite des médicaments immunomodulateurs. Ils agissent en modulant l'expression génique d'un certain nombre de protéines impliquées dans la réaction inflammatoire. Les principaux mécanismes responsables des effets des glucocorticoïdes sont i) une augmentation de

production de protéines anti-inflammatoires (comme l'annexine-1), l'interleukine 10 ou la protéine I $\kappa$ B ; et ii) une diminution de l'expression des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-1 et STATS.

La colchicine est un alcaloïde tricyclique largement utilisé dans les crises de goutte et comme traitement de fond pour la fièvre méditerranéenne familiale et pour la maladie de Behçet.

### Les DMARDs

Les médicaments DMARDs ont été classés en :

DMARDs synthétiques conventionnels et ciblés (csDMARDs et tsDMARDs, respectivement).

Les csDMARD sont des médicaments traditionnels (tels que le méthotrexate, la sulfasalazine, le léflunomide, l'hydroxychloroquine, les sels d'or). Les tsDMARD sont des médicaments développés pour cibler une structure moléculaire particulière, dont font partie les inhibiteurs de Janus kinase (JAK-1, 2 et 3) impliqués dans la transduction du signal de cytokines avec leur récepteur membranaire (voie JAK/STAT).

DMARDs biologiques (bDMARD) qui comprennent les anticorps monoclonaux et les protéines de fusion qui inhibent la fonction des médiateurs de l'inflammation. Les DMARDs biologiques ont différents mécanismes d'action :

- I. Inhibition des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF $\alpha$ , IL-1 et IL-6, par des anticorps monoclonaux, des récepteurs solubles ou des antagonistes des récepteurs (par exemple, infliximab, adalimumab, tocilizumab, étanercept, anakinra).
- II. Inhibiteur de la voie terminale du complément qui se lie au facteur C5 (eculizumab), il en bloque son clivage en empêchant ainsi la formation de C5a et C5b, il inhibe de ce fait, en partie, le processus inflammatoire (activité pro-inflammatoire de C5a).
- III. Agent monoclonal capable d'épuiser des populations de cellules telles que les cellules B (rituximab) grâce à la reconnaissance de molécules de surface spécifiques, le CD20.

- IV. Interruption de l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes par un inhibiteur de molécules co-stimulatrices, tel que l'abatacept (CTLA4-Ig).
- V. Inhibition de l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium de tissus enflammés, en utilisant un anticorps monoclonal anti-intégrine (par exemple, le natalizumab ou l'efalizumab).
- VI. Promotion d'un mécanisme de régulation, tel que l'apoptose (immunothérapie avec un anti-CD3) ou bien l'induction des lymphocytes T régulateurs (traitement par faible dose d'IL-2, détaillé dans le paragraphe suivant).

Toutes ces classes de médicaments sont actuellement utilisées pour le traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires, seules ou en combinaison, en traitement d'attaque lors des phases aiguës de la maladie ou en traitement d'entretien en phase de rémission. Cependant toutes ces thérapies présentent des limites en termes d'efficacité et de tolérance. Pour les produits biologiques, les principales limites sont liées au développement d'une résistance au traitement par la formation d'anticorps contre le médicament (Emami-Shahri and Hagemann 2012). Les limites des traitements conventionnels sont en grande partie liées à une tolérance médiocre (risque accru d'infection et de toxicité multi-système).

Bien que nous disposons aujourd'hui de nombreux médicaments pour traiter les MAI, les patients présentent une hétérogénéité significative en termes de réponse au traitement. En effet, 30 à 40% des patients atteints de PR, de psoriasis et de maladie inflammatoire de l'intestin (MICI) ne répondent pas aux anti TNF- $\alpha$ , même si la présentation clinique des non-répondeurs est identique à celle des patients en rémission complète (Siebert et al. 2015). Les anticorps monoclonaux ciblant les cellules B dans le LES se sont révélés prometteurs en phase II mais ont échoué dans plusieurs essais cliniques de phase III (Kalunian et al. 2016), même s'il

existe de nombreux rapports de résultats positifs dans des études non contrôlées (Aguiar et al. 2017). Même constat pour les récentes études publiées sur les inhibiteurs de l'IFN I dans le LES (R. A. Furie et al. 2019; Morand et al. 2020).

### ***Nouvelle approche thérapeutique dans les MAI: l'interleukine-2 faible dose***

Une nouvelle approche thérapeutique dans les MAI consiste à administrer de faibles doses d'interleukine 2 (fd d'IL-2) pour cibler de façon sélective les cellules Treg qu'on a vu avoir un rôle central dans l'homéostasie du système immunitaire et le maintien de la tolérance (Klatzmann and Abbas 2015).

L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine appartenant à la famille de l'hématopoïétine avec une structure polypeptidique à quatre régions hélicoïdales de poids moléculaire 33KDa.

L'IL-2 a été initialement appelée «T cell growth factor» ou «T lymphocytotropic hormone» du fait de sa capacité à induire la prolifération des lymphocytes T en culture (D. A. Morgan, Ruscetti, and Gallo 1976; Gillis and Smith 1977). Elle est produite par les cellules TCD4<sup>+</sup> activées, les cellules TCD8<sup>+</sup> activées, les cellules dendritiques, les natural killers et les cellules NKT activées.

Le récepteur de l'IL-2 est exprimé à la surface de la cellule sous sa forme trimérique à haute affinité [formée de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) et  $\gamma$  (CD132)] ou sous la forme dimérique à affinité intermédiaire [chaînes  $\beta$  (CD122) et  $\gamma$  (CD132)].

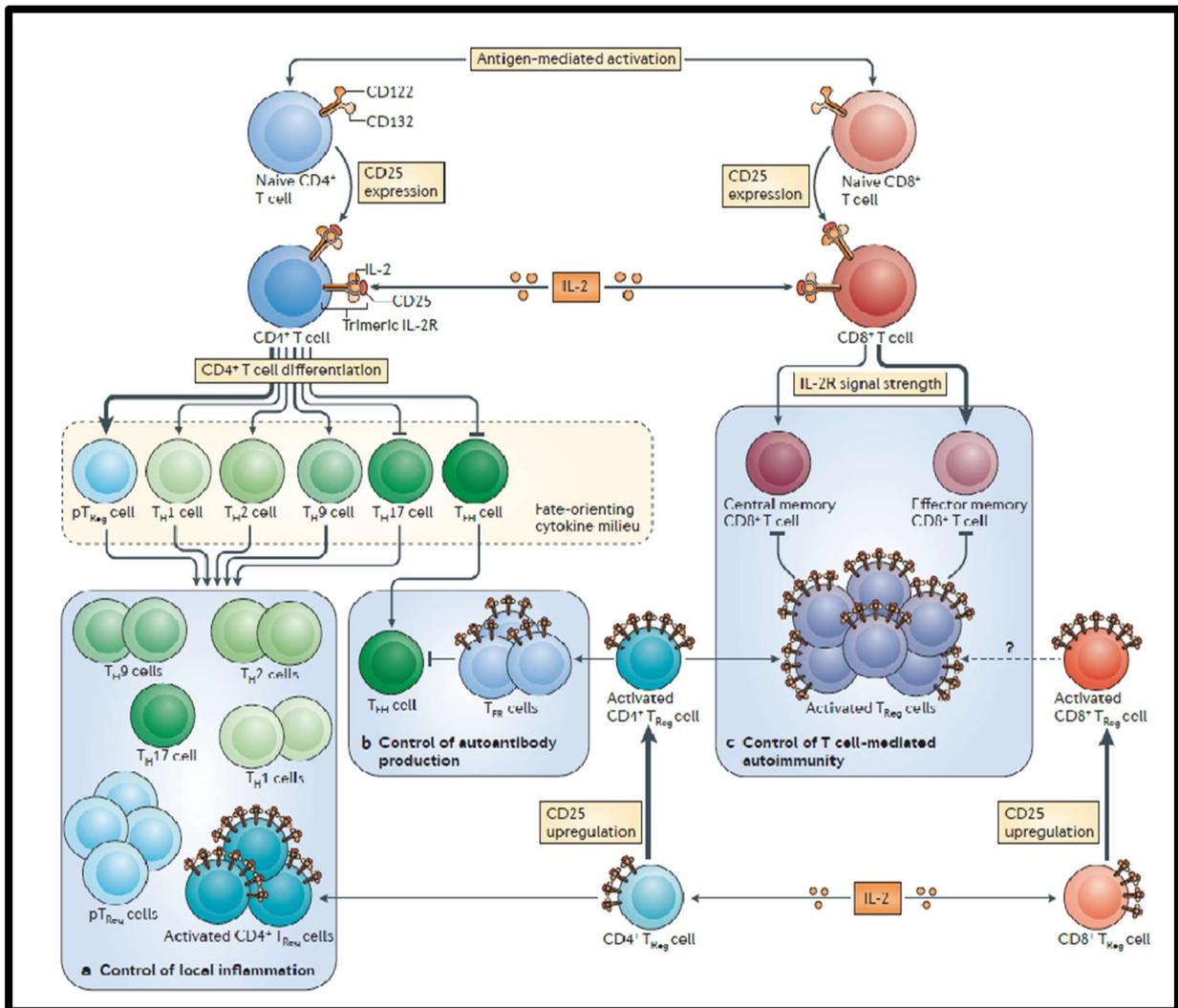
L'interaction IL-2/IL-2 receptor (IL2-R) induit le signal de transduction *via* l'activation de l'activateur de transcription 5 (STAT5) médiées par les protéines Janus kinase 1 et 3 (JAK1 et JAK3), aussi bien que *via* l'activation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK).

L'IL-2 exerce son action pléiotropique sur différentes populations lymphocytaires (Figure 7).

En particulier, elle :

- I. favorise le développement de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules Treg périphériques, en T helper 2 (Th2), en Th9 et en Th1
- II. exerce son action sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T CD8<sup>+</sup> en favorisant la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la différenciation terminale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et en inhibant la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th17<sup>+</sup> et en cellules TFH
- III. active les cellules T $\gamma\delta$  qui acquièrent la production d'interféron- $\gamma$  et l'activité cytolytique
- IV. stimule la prolifération des cellules NK et en particulier une population NK 56<sup>bright</sup> avec une activité régulatrice, et la prolifération des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2)
- V. peut supprimer la formation de centres germinatifs et créer un environnement régulateur en modifiant l'équilibre des cellules T folliculaires régulatrices (cellules Tfr) et des cellules TFH.

Les Treg sont plus sensibles à l'IL-2 : i) par l'expression constitutive du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (tandis que les autres types de lymphocytes acquièrent la chaîne  $\alpha$  (CD25) qu'après activation), et ii) par la sensibilité spécifique de la signalisation *via* l'IL-2R (le Treg ont une voie d'activation du récepteur à l'IL-2 dépendant de la phosphorylation de STAT5 qui est au moins 10 à 100 fois plus sensible que celle des autres cellules T qui utilisent les voies MAPK et PI3K/Akt)(A. Yu et al. 2015).



**Figure 7** : Effet pléiotropique de l'IL-2 (issue Klatzmann et Abbas, 2015)

Un défaut de production d'IL-2 ou de son récepteur a été observé chez les patients affectés par différentes MAI telles que le lupus érythémateux disséminé (Katsiari et al. 2005), la polyarthrite rhumatoïde (Kitas et al. 1988), la sclérose en plaques (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. 2007) ou le diabète de type-1 (DT1) (Concannon, Rich, and Nepom 2009). De plus, une prédisposition au développement de certaines pathologies auto-immunes est également liée à des polymorphismes des gènes codant pour IL-2 ou son récepteur (Crispín and Tsokos 2009).

## L'interleukine-2 en thérapeutique

En raison de son effet de stimulation de l'immunité adaptative (Chang and Rosenberg 1989), de nombreux essais cliniques ont été réalisés en oncologie et dans certaines maladies infectieuses comme l'infection par le VIH (Giedlin and Zimmerman 1993); (Smith 1988). En oncologie, le traitement avec des fortes doses d'IL-2 a été approuvé pour le mélanome et le cancer métastatique du rein mais les résultats ont souvent été décevants puisque moins de 10% des patients répondent au traitement. Les résultats très limités du traitement par l'IL-2 en oncologie s'expliqueraient par le fait que l'IL-2 joue un rôle majeur dans la survie et sur la fonctionnalité des Treg qui ont un effet suppresseur sur la réponse immune anti-tumorale (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006); (Antony and Restifo 2005)(Rosenberg 1994) (Lemoine et al. 2009). De plus, aux doses utilisées (18-36 MIU/jour), on observe des effets secondaires très sévères (Chang and Rosenberg 1989). Dans le cadre de l'infection par le VIH, une réponse immunologique a été observée sous IL-2 (Lévy et al. 2012) avec un plus grand nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les patients traités avec l'IL-2 et la thérapie antirétrovirale plutôt que ceux avec thérapie antirétrovirale seule. Malgré une augmentation substantielle et durable du nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> le traitement par IL-2 plus antirétroviral n'a apporté aucun bénéfice clinique (à noter que la dose d'IL-2 utilisée dans les essais VIH était entre 3 et 7,5 MIU/jour).

En raison de son effet sur la différenciation, la survie et la fonctionnalité des cellules Treg, et des résultats sur modèles murins dans lesquels des faibles doses d'IL-2 corrigent l'autoimmunité (Grinberg-Bleyer et al. 2010) ; (Mizui et al. 2014) ; (Liu et al. 2010), les faibles doses d'IL-2 ont été testées dans différentes MAI chez l'homme. Le tableau 2 résume les essais avec fd IL-2 dans les MAI publiées.

Les essais cliniques visant à tester de faibles doses d'IL-2 (avec des schémas thérapeutiques différents entre 0.3 MIU/jour et 3 MIU/jour) ont reporté une expansion des Treg induite par l'IL-2 dans la cryoglobulinémie (Saadoun et al. 2011), dans la la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)(Koreth et al. 2011; Koreth et al. 2016), dans le diabète de type 1 (Hartemann et al. 2013), dans la syndrome de Gougerot-Sjogren (Miao et al. 2018), dans le LES (Jens Y. Humrich et al. 2017; J. He et al. 2020; Jens Y. Humrich et al. 2019), dans l'*alopecia areata* (AA) (Castela et al. 2014 ; Hordinsky and Kaplan 2014) et dans la dermatomyosite /polymyosite (S.-X. Zhang et al. 2019). L'activation des Treg est démontrée par l'augmentation de l'expression de marqueurs d'activation (tels que le CD25, le GITR et le CTLA4) (Hartemann et al. 2013) et l'activité suppressive de ces cellules Treg activées qui est supérieure à celle des cellules Treg témoins (Saadoun et al. 2011 ; Koreth et al. 2011).

Dans ces mêmes études a été reportée une augmentation dose-dépendante de CD8<sup>+</sup>Treg (Saadoun et al. 2011 ; Hartemann et al. 2013) et des NK (Saadoun et al. 2011 ; Koreth et al. 2011 ; Koreth et al. 2016 ; Koreth et al. 2011; J. He et al. 2020). Des analyses d'immunophénotypage approfondie ont démontré qu'une sous-population de cellules NK, les NK CD56<sup>bright</sup> avec activité/phénotype régulateur, est très induite par des faibles doses d'IL-2 (Saadoun et al. 2011; J. He et al. 2020).

Ces études ont ainsi montré des résultats cliniques très encourageant :

- (i) dans la cryoglobulinémie : une amélioration clinique significative a été observée chez huit patients sur les dix traités, en particulier une diminution de la fatigue, du purpura et des arthralgies (Saadoun et al. 2011);
- (ii) dans la GVHD : des améliorations des atteintes cutanées, articulaires, musculaires, hépatiques et pulmonaires ont été rapportées (Koreth et al. 2011; Koreth et al. 2016);

- (iii) dans le LES : une diminution du rash cutané, de l'arthrite, de la myosite, de l'alopecie et d' une amélioration de la néphrite lupique (Jens Y. Humrich et al. 2017; J. He et al. 2020; J. Y. Humrich et al. 2016; Jens Y. Humrich et al. 2019);
- (iv) dans l'alopecia areata : une diminution de l'infiltration CD8<sup>+</sup> démontré à la biopsie du cuir chevelu et une repousse des cheveux (Castela et al. 2014 ; Hordinsky and Kaplan 2014) ;
- (v) dans la dermatomyosite/polymyosite : une diminution des marqueurs d'activité biologique de la maladie (à noter que dans cette dernière étude, les patients ont reçu une seule cure de 5 jours de fd IL-2)(S.-X. Zhang et al. 2019).

Des analyses de données massives (expliqué dans le chapitre suivant) ont été reportées dans deux de ces études :

- I. l'étude sur la cryoglobulinémie a révélé l'action anti-inflammatoire de l'IL-2, mise en évidence par une analyse du transcriptome des cellules mononuclées du sang périphérique qui montre une diminution significative de la « signature inflammatoire » ;
- II. l'étude sur le GVHD (Whangbo et al. 2019), où l'analyse du TCR (chaîne  $\beta$ ) a montré que les fd d'IL-2 augmentent la diversité du répertoire des TCR en favorisant des expansions clonales au sein des cellules Treg sans affecter les cellules T effectrices. Ces résultats étaient plus marqués chez les répondeurs cliniques que les non-répondeurs.

Ces premières études montrent que tous les patients répondent à de faibles doses d'IL-2 avec une augmentation des Treg mais si la réponse biologique est universelle, ce n'est pas le cas de la réponse clinique. De nombreuses études visant à tester des fd d'IL-2 dans le MAI sont toujours en cours et seront évoqués plus loin dans la discussion de ce manuscrit (page 176).

Maladie (référence)	Cryoglobulinemie HCV induite (Saadoun et al., 2011)	DT1 (Hartemann et al., 2013)	GVHdc active (Koreth et al., 2011)	LES (J. Y. Humrich et al., 2016)	AA (Castela et al., 2014)	LES (He et al., 2016)	LES (Humrich et al., 2017)	GVHD (Koreth et al., 2016)	G-S (Miao et al. 2018)	DM/PM (S.-X. Zhang et al. 2019)	LES (Humrich et al., 2019)	LES (He J et la 2020)
<b>Dose, schéma et voie d'administration</b>	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de trois cures de 5 jours à 3 MUI/j aux semaines 3, 6 et 9 Sous-cutanée	Une cure de 5 jours à 0,33 ; 1 ou 3 MUI/j Sous-cutanée	0,3 ; 1 ou 3 MUI/m <sup>2</sup> /j pendant 8 semaines	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de 3 cures à 3, 1.5 et 1.5 MUI/j pendant 5 jours aux semaines 3, 6 et 9 Sous-cutanée	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de trois cures de 5 jours à 3 MUI/j aux semaines 3, 6 et 9 Sous-cutanée	Trois cures de 1 injection à 1MUI tous les deux jours pendant 2 semaines « Wash out » Sous-cutanée	Quatre cures de 5 jours à 0,75 ; 1,5 ou 3,0 MUI/j suivi de 6-9 jours de « wash-out » Sous-cutanée	1 MUI/m <sup>2</sup> /j pour 12 semaines suivi de 4 semaines de « wash-out », jusqu'à 2 ans pour les repondeurs Sous-cutanée	0.5 MUI /j 1 cure de 5 jours Sous-cutanée	0.5 MUI /j 1 cure de 5 jours Sous-cutanée	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de quatre cures de 5 jours à 3 MUI/j « wash out » de 9 ou 16 jours entre les cures Sous-cutanée	1MUI tous les deux jours pendant 2 semaines « Wash out » pour 12 semaines Sous-cutanée
<b>Schéma expérimental</b>	Ouvert	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	Ouvert	Compassionnel	Ouvert	Ouvert	Ouvert	Ouvert	Ouvert	Randomisé	Ouvert	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo
<b>Nombre de patients</b>	10	25	28	1	5	40	12	35	82	31	13	60
<b>Résultats</b>	Augmentation des Treg Augmentation des NK (NK CD56 <sup>bright</sup> ) Amélioration de la symptomatologie clinique (8/10)	Augmentation dose dépendante des Treg Augmentation des NK à la dose 3 MUI	Augmentation des Treg maintenue Augmentation des NK Amélioration de la symptomatologie clinique (12/25)	Augmentation des Treg maintenue Diminution des antidsDNA Amélioration des scores cliniques	Augmentation des Treg Amélioration des scores cliniques (4/5)	Augmentation du nombre relatif et de la fonction des Treg dans la population de cellules T CD4 <sup>+</sup> . Réalisation SRI-4 à la semaine 12 (34/38)	Augmentation des Treg Amélioration de la symptomatologie clinique (10/12)	Augmentation des Treg maintenue Augmentation des NK Marquers de réponse clinique à l'IL-2 : ratio Treg/Tconv au baseline ≥0,07, et ratio Treg/Tconv à 1 semaine ≥0,2. Amélioration de la symptomatologie clinique (61% des patients à la semaine 12)	Augmentation des Treg	Augmentation des Treg Diminution des marqueurs d'activité biologique de la maladie	Augmentation des Treg Amélioration des scores cliniques (10/12)	Augmentation des Treg Augmentation des NK (NK CD56 <sup>bright</sup> ) SRI-4 à la semaine 12 5 groupe IL-2 55,17 % contre 30,00 % du groupe placebo, (p=0,052). SRI-4 à la semaine 24, groupe IL-2 65,52%, contre 36,67% du groupe placebo (p=0,027)
<b>Tolérance (Effet indésirable relié au médicament expérimental)</b>	Asthénie, réactions locales transitoires sur les sites d'injection, syndrome pseudo-grippal à 3 MUI	Réactions transitoires au site d'injection	Réactions transitoires au site d'injection, syndrome pseudo-grippal, Symptômes constitutionnels, thrombocytopenie, Microangiopathie thrombotique	Réactions transitoires au site d'injection, syndrome pseudo-grippal	Réactions transitoires au site d'injection, Arthralgie, asthénie, urticaire	Réactions au site d'injection et syndrome pseudo-grippal résolue sans aucun traitement.	Réactions transitoires	Réactions transitoires au site d'injection, Arthralgie, asthénie, thrombocytopenie, infections	-	-	Réactions au site d'injection et syndrome pseudo-grippal Arthralgie, asthénie,	Réactions au site d'injection et syndrome pseudo-grippal

**Tableau 2 : Résumé des essais cliniques publiés ayant utilisé de fd d'IL-2-fd**

## 1.5 Données massives et biologie des systèmes

### 1.5.1 Données massives : l'origine historique « d'une vision réductionniste à une vision holistique du corps humain »

La biologie est un système complexe et, pour l'explorer, il faut passer d'une vision « réductionniste » à une vision plus complète dite « holistique ».

Ce concept était déjà introduit par Georges-Louis Leclerc Buffon, en 1749, dans son *Histoire Naturelle Tome I* : « l'étude de la nature suppose dans l'esprit deux qualités qui paraissent opposées : les grandes vues qui embrassent tout d'un coup d'oeil, et les petites attentions qui ne s'attachent qu'à un seul point ». Ensuite, en 1945, Alex B. Novikoff (Novikoff 1945) publie dans la revue *Science* son article « *The Concept of integrative levels and biology* » dans lequel il écrit « Le concept de niveaux d'intégration est une description générale de l'évolution de la matière à travers des ordres de complexité et d'intégration successifs et supérieurs....Dans l'évolution constante de la matière, de nouveaux niveaux de complexité se superposent aux unités individuelles grâce à l'organisation et à l'intégration de ces unités dans un système unique....La connaissance des lois du niveau inférieur est nécessaire pour une compréhension complète du niveau supérieur; pourtant, les propriétés uniques des phénomènes du niveau supérieur ne peuvent être prédites, a priori, à partir des lois du niveau inférieur....Les parties individuelles et les ensembles sont tous les deux des entités matérielles et l'intégration résulte de l'interaction des pièces, en conséquence de leurs propriétés ».

C'est seulement en 1968 que Mesarovic publie « *System theory and Biology – View of a theoretician* » (Mesarović 1968) et en 2004 publie le principe central de la biologie des systèmes, selon lequel la dynamique du système donnent lieu au fonctionnement et à la fonction des cellules (Mesarovic, Sreenath, and Keene 2004).

### 1.5.2 Données massives : définition et méthodologie d'analyse

Le terme « données massives » (aussi appelé données « omiques ») désigne un ensemble très volumineux de données, résultant de l'analyse moléculaire et génétique d'échantillons biologiques. L'analyse des données massives nécessite généralement une approche dans laquelle des données sont d'abord collectées de manière non biaisées, sans hypothèse a priori, puis analysées par des algorithmes d'exploration de données pour formuler de nouvelles hypothèses (R. S. Kim, Goossens, and Hoshida 2016).

Les données massives nécessitent souvent une réduction de la dimensionnalité à l'aide de techniques de projection de données telles que l'extraction de composantes principales et le développement des algorithmes automatiques, supervisés et non supervisés. Ceci permet d'identifier des sous-populations de patients, d'élucider de nouveaux mécanismes pathologiques, de prévoir les résultats cliniques et de réponse à la thérapie (Libbrecht and Noble 2015).

La biologie des systèmes est l'approche par laquelle des questions biologiques sont abordées en intégrant des données massives et leur modélisation mathématique. Cette approche est basée sur l'identification des éléments dynamiques et le développement de modèles mathématiques pour étudier la régulation, le contrôle et la coordination des voies de signalisation (Wolkenhauer 2001).

La complexité des systèmes moléculaires, biologiques et cellulaires est à la base de la théorie des systèmes dynamiques pour la modélisation et la simulation des processus.

Le terme « système complexe » est défini par :

- 1 Le modèle: le grand nombre de variables qui peuvent déterminer le comportement.
- 2 Le système naturel: la connectivité et la non-linéarité des relations.
- 3 La technologie: la précision et l'exactitude limitées des mesures.

4 La méthodologie: l'incertitude résultant du cadre conceptuel choisi (par exemple, le choix des automates au lieu des équations différentielles).

Aujourd'hui, la maladie n'est plus perçue comme une défaillance d'un seul gène ou d'une seule cible, mais comme une conséquence des réseaux perturbés par la maladie. L'analyse des données massives des patients peut fournir des informations sur la « signature » du phénotype de la maladie. L'objectif d'un traitement médicamenteux réussi serait alors le retour à la normale de la signature de la maladie (Schneider and Klabunde 2013).

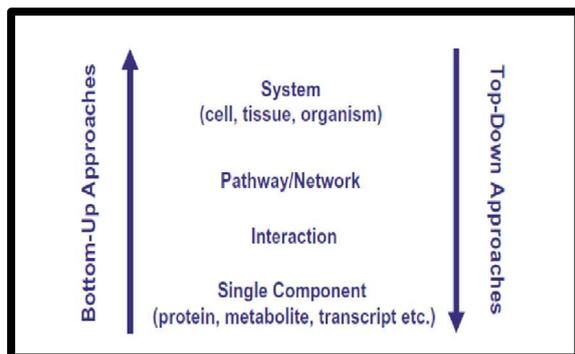
L'objectif de l'approche de la biologie de système appliquée à la médecine est d'aller vers la médecine personnalisée, c'est-à-dire une approche visant à fournir les bons traitements aux bons patients au bon moment (Ashley 2016).

### **1.5.3 Méthodologie des études cliniques avec des données massives**

Les méthodologies utilisées dans les études cliniques qui incluent des données massives avec une approche de biologie des systèmes, peuvent être regroupées en 2 catégories (Schneider and Klabunde 2013) (Figure 8) :

1) les méthodes ascendantes (Bottom-Up) qui partent d'une connaissance souvent détaillée des composants individuels et les assemblent en unités plus grandes (par exemple, une voie) afin de faire la lumière sur les processus de signalisation, d'identifier et / ou de valider des cibles thérapeutiques et de fournir les paramètres clés pour prédire l'effet d'un médicament chez les patients ;

2) les approches descendantes (Top-Down) qui commencent par un ensemble de données générées par une ou plusieurs des technologies « omiques » et visent à identifier les réseaux et les composants qui participent à la génération d'un phénotype ou d'une maladie. Les méthodes de biologie des systèmes descendantes visent à mieux comprendre les causes d'une maladie, à stratifier les patients et à identifier les bonnes cibles moléculaires.



**Figure 8** : Méthodologie des études cliniques avec des données massives (issue Schneider, 2013)

#### 1.5.4 Données massives dans les MAI

Les biomarqueurs qui peuvent prédire le diagnostic précoce et différentiel de la maladie, son activité, sa progression vers une atteinte tissulaire ou organique spécifique, et sa réponse au traitement, sont d'un grand intérêt pour les cliniciens. Dans ce contexte, des études avec une approche de biologie des systèmes chez des patients atteints de maladies auto-immunes se sont révélées très utiles (quelques exemples seront cités dans les paragraphes suivants).

Les données massives, en immunologie, sont obtenues grâce à différents types d'analyses : la cytométrie en flux ou spectrométrie de masse (pour la quantification et le phénotypage de l'ensemble des sous-populations leucocytaires circulantes) ; la protéomique (pour le dosage sérique de protéines) ; le transcriptome (analyse de l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome) ; le répertoire BCR et TCR (étude du récepteur des lymphocytes B et T).

#### *Données massives dans le diagnostic des MAI*

##### *Diagnostic précoce*

Diverses études à grande échelle ont montré que les auto-anticorps spécifiques des MAI sont généralement présents de nombreuses années avant le diagnostic. C'est notamment le cas

dans le LES, la PR et le DT1. En outre, le titre de ces anticorps augmente avec l'approche des symptômes pour le LES et la PR, ainsi que le taux de cytokines/chimiokines pour la PR (Arbuckle et al. 2003) (Deane et al. 2010; Nielen 2004; Stadt et al. 2011). Enfin, les enfants positifs pour les anticorps spécifiques du diabète présentent une signature lymphocytaire qui peut prédire l'évolution vers le DT1 clinique (Jin et al. 2014).

La protéomique chez des patients atteints d'arthrite inflammatoire, a mis en évidence un panel des cytokines significativement plus élevé chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire précoce qui ont ensuite développé une PR dans les 3 mois suivant l'apparition des symptômes, par rapport aux patients atteints d'arthrite précoce qui n'ont pas développé de PR (Raza et al. 2005).

L'étude de BCR chez des patients atteints de PR, a permis d'identifier : des clones B circulants capables de prédire le développement de la maladie chez les sujets à risque (Tak et al. 2017), des clones B autoréactifs présents uniquement dans la phase initiale de la maladie (Doorenspleet et al. 2014), et de nouveaux antigènes cibles d'anticorps autoréactifs notamment l' $\alpha$ -énolase, le fibrinogène citrulliné et l'histone 2B citrullinée (Tan et al. 2014).

De plus, l'étude du BCR chez des patients affectés par la maladie de Crohn, a montré une augmentation de clones dominés par l'isotype IgA, ce qui suggère une contribution microbienne à la pathogénèse de la maladie (Bashford-Rogers et al. 2019).

Enfin, des études transcriptomiques ont montré qu'une proportion significative de patients atteints de MAI présente une signature interféron de type I (IFN-I) dans leurs cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Les MAI concernées sont notamment la polyarthrite rhumatoïde (Toro-Domínguez, Carmona-Sáez, and Alarcón-Riquelme 2014), le lupus érythémateux systémique (Elkon and Stone 2011), (J. Banchereau and Pascual 2006), (Laurent Chiche et al. 2014), (Kennedy et al. 2015), (L. Chiche et al. 2016) , les myosites

(dermatomyosite et polymyosite) (Greenberg 2007), (Baechler et al. 2007), le syndrome de Goujerot-Sjögren (Korman et al. 2008), (Nordmark et al. 2009), la sclérodermie systémique (Bos et al. 2009) et le diabète de type 1 (Ferreira et al. 2014; Kallionpaa et al. 2014).

### *Diagnostic différentiel*

L'analyse du BCR dans diverses MAI a montré des différences significatives entre les patients atteints de la maladie de Crohn, de GEPA et de LES, par rapport à des sujets sains et par rapport à des patients atteints de AAV ou de la maladie de Behçet (Bashford-Rogers et al. 2019).

Des études transcriptomiques dans les MICI, ont révélé des différences significatives entre la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Costello et al. 2005)(Burczynski et al. 2006), et entre la PR et l'arthrose (Ungethuem et al. 2010). Enfin, dans les myosites (un groupe hétérogène qui comprend la dermatomyosite (DM), le syndrome de l'antisynthetase (AS), la myopathie nécrosante à médiation immunitaire (IMNM), la myosite à corps d'inclusion (IBM), la polymyosite et la myosite à chevauchement) l'analyse du transcriptome a permis de classer les biopsies musculaires avec une spécificité de plus de 90 %. Par exemple, *CAMK1G*, *EGR4* et *CXCL8* sont fortement exprimés dans le AS mais pas dans la DM ou d'autres types de myosite.

### *Données massives dans le pronostic des MAI*

Des études transcriptomiques ont également été réalisées pour identifier des signatures qui prédiraient l'évolution de la maladie. Chez les patients atteints de LES et de AAV, une signature génique en lien avec la voie du récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R) et du récepteur des cellules T (TCR), définissait le groupe de mauvais pronostic (McKinney et al. 2010). Également, une signature en lien avec l'IL-7 et le TCR a permis de différencier les patients atteints de MC et de RCH avec des formes fréquemment récidivantes (J. C. Lee et al. 2011).

En outre, une signature de l'épuisement des cellules T CD8<sup>+</sup> a prédit un meilleur pronostic pour plusieurs maladies auto-immunes (le DT1, l'AAV, le LES et la fibrose pulmonaire idiopathique (McKinney et al. 2015).

### *Données massives dans l'activité des MAI*

La protéomique a mis en évidence un panel de chimiokines sériques en corrélation avec les poussées cliniques du LES (Bauer et al. 2009), et qu'un taux élevé d'IFN  $\alpha$  est corrélé avec l'activité de la maladie (évaluée par le score SLEDAI) (Mathian et al. 2019).

Des études transcriptomiques chez des patients affectés par un LES montrent que les signatures IFN et neutrophiliques présentaient une forte corrélation avec le score SLEDAI (R. Banchereau et al. 2016). Grâce à des données d'immunophénotypage approfondi, de transcriptome et des analyses non supervisées, la cartographie immunologique de la néphrite lupique a été réalisée (notamment il a été retrouvé : 21 sous-populations de leucocytes actifs et une activation locale des cellules B dans le rein, corrélées à une signature B cellulaire liée à l'âge des patients et à des stades progressifs de différenciation des monocytes) (Arazi et al. 2019).

### *Données massives dans la réponse aux traitements des MAI*

Les patients atteints de maladies auto-immunes présentent une hétérogénéité significative au regard de la réponse au traitement. A titre d'exemple, 30% des patients atteints de PR et 40% des patients atteints de RCH ne répondent pas au traitement anti-TNF- $\alpha$  (Rubbert-Roth and Finckh 2009; Roda et al. 2016). Dans ce contexte, une approche de biologie des systèmes s'est révélée utile dans l'identification de sous-groupes de patients répondeurs ou non à un médicament donné. Ci-dessous des exemples de marqueurs potentiels de réponse aux traitements chez des patients PR.

Parmi les biomarqueurs cellulaires :

- un taux élevé de cellules B mémoires à la baseline associé avec une bonne réponse aux anti TNF $\alpha$  (Daien et al. 2014) et à l'abatacept (anti-CTLA4) (Gazeau et al. 2017),
- un faible nombre de cellules T CD8+CD28- à la baseline associé avec une bonne réponse à l'abatacept (anti-CTLA4) (Scarsi, Ziglioli, and Airo' 2011),
- des niveaux élevés de monocytes à la baseline corrélés avec une faible réponse au méthotrexate (Chara et al. 2015).

Parmi les biomarqueurs protéomiques :

- un niveau élevé de sICAM1 et un faible niveau de CXCL13 à la baseline est observé chez les répondeurs aux anti TNF $\alpha$  ; *a contrario*, une relation inverse avec ces deux biomarqueurs a été constatée chez les répondeurs à l'anti IL-6 (Dennis et al. 2014) ;
- un niveau élevé d'IL-6 à la baseline est observé chez les répondeurs aux anti-TNF $\alpha$  et à l'anti-IL6 (Shi, Chen, and Litifu 2018; Diaz-Torne et al. 2018) et
- la détection d'IL-33, associée à la positivité des anticorps anti-citrulline (ACPA) et au taux d'IgG sérique, permet de prédire les répondeurs au rituximab (Sellam et al. 2016).

Des études transcriptomiques ont mis en évidence :

- une signature myéloïde associée à une bonne réponse aux anti TNF- $\alpha$  (Dennis et al. 2014),
- une augmentation de l'expression de gènes liés à l'IFN dans les PBMC corrélée avec une mauvaise réponse clinique (van Baarsen et al. 2010).
- une signature IFN de type I prédit négativement la réponse clinique au traitement par anti-CD20 (Thurlings et al. 2010), (Rateman et al. 2012) (Sellam et al. 2014).

L'étude COMBINE a utilisé des données multi-omiques (ADN, ARN, protéomique, cytométrie en flux) pour trouver des prédicteurs de la réponse aux anti-TNF $\alpha$  chez des patients atteints

de PR. La combinaison des ces biomarqueurs en une signature unique pourrait expliquer 51% de la variation du score d'activité clinique (DAS28-CRP) (Folkersen et al. 2016).

### *Données massives et repositionnement des médicaments (Drug repositioning)*

Des études du transcriptome ont permis de trouver de nouvelles indications thérapeutiques pour des médicaments déjà approuvés dans d'autres MAI.

Ceci est notamment le cas dans les pathologies suivantes :

- le LES : une étude a mis en évidence la signature IL-12 comme possible cible thérapeutique (Grammer et al. 2016). Suite à ces résultats, l'ustekinumab (ciblant la sous-unité p40 de l'IL-12/ IL-23) a été testé avec succès chez les patients lupiques (van Vollenhoven et al. 2018) et des études de phase III sont actuellement en cours ("Search of: Ustekinumab" n.d.).
- l'arthrite idiopathique juvénile (JIA) : des études ont détecté la signature IL-1 (Pascual et al. 2005). À la suite de ces études, l'anakinra ou le rilonacept (anti IL-1) ont été testés avec succès chez des patients atteints de JIA (Ilowite et al. 2014; Quartier et al. 2011). À ce jour, plusieurs essais cliniques sont en cours ("Search of: Anakinra" n.d., "Search of: Rilonacept" n.d.).
- le psoriasis, où l'étude du transcriptome issu des cellules cutanées a permis d'identifier l'axe IL-23/Th17 en tant que cible thérapeutique (Noda, Krueger, and Guttman-Yassky 2015).

Comme nous l'avons vu, l'analyse des données massives dans les MAI nous fournit des informations précieuses concernant les caractéristiques moléculaires et cellulaires des patients et l'identification de cibles thérapeutiques.

Malgré tout, les résultats prometteurs des études de phases précoces (R. Furie et al. 2017) ne sont souvent pas confirmés par les études de phase III (R. A. Furie et al. 2019; Morand et al.

2020) (Merrill et al. 2010; Kalunian et al. 2016) car la sélection des patients repose sur le diagnostic clinique. En effet, la classification des maladies repose toujours sur le phénotype clinique (comme décrit au paragraphe 1.3). Une fois que l'analyse des données massives donnent des pistes thérapeutiques possibles, la preuve d'efficacité devrait être recherchée en sélectionnant des patients sur la base de leurs caractéristiques moléculaires et cellulaires et non de leur phénotype clinique.

#### **1.5.5 Nouvelles classifications des MAI : l'apport de l'approche de biologie des systèmes à la classification des MAI**

Sur la base de découvertes génétiques et moléculaires, McGonagle et ses collègues ont reclassé les MAI (McGonagle and McDermott 2006). Les maladies inflammatoires étaient définies par opposition aux maladies autoimmunes comme une inflammation systémique sans titre élevé d'auto-anticorps ou de cellules T spécifiques d'antigène. En effet, la destruction cellulaire liée à l'inflammation peut déclencher des processus auto-immuns. A l'inverse, la destruction auto-immune des tissus normaux peut déclencher l'inflammation.

Les progrès de la biologie moléculaire ont amené à réaliser que les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques ne sont pas deux catégories distinctes de maladies mais qu'elles forment un continuum allant de maladies purement inflammatoires à des maladies purement autoimmunes englobant un large panel de maladies inflammatoires avec des composantes autoimmunes et des maladies auto-immunes avec une composante inflammatoire (Figure 9).

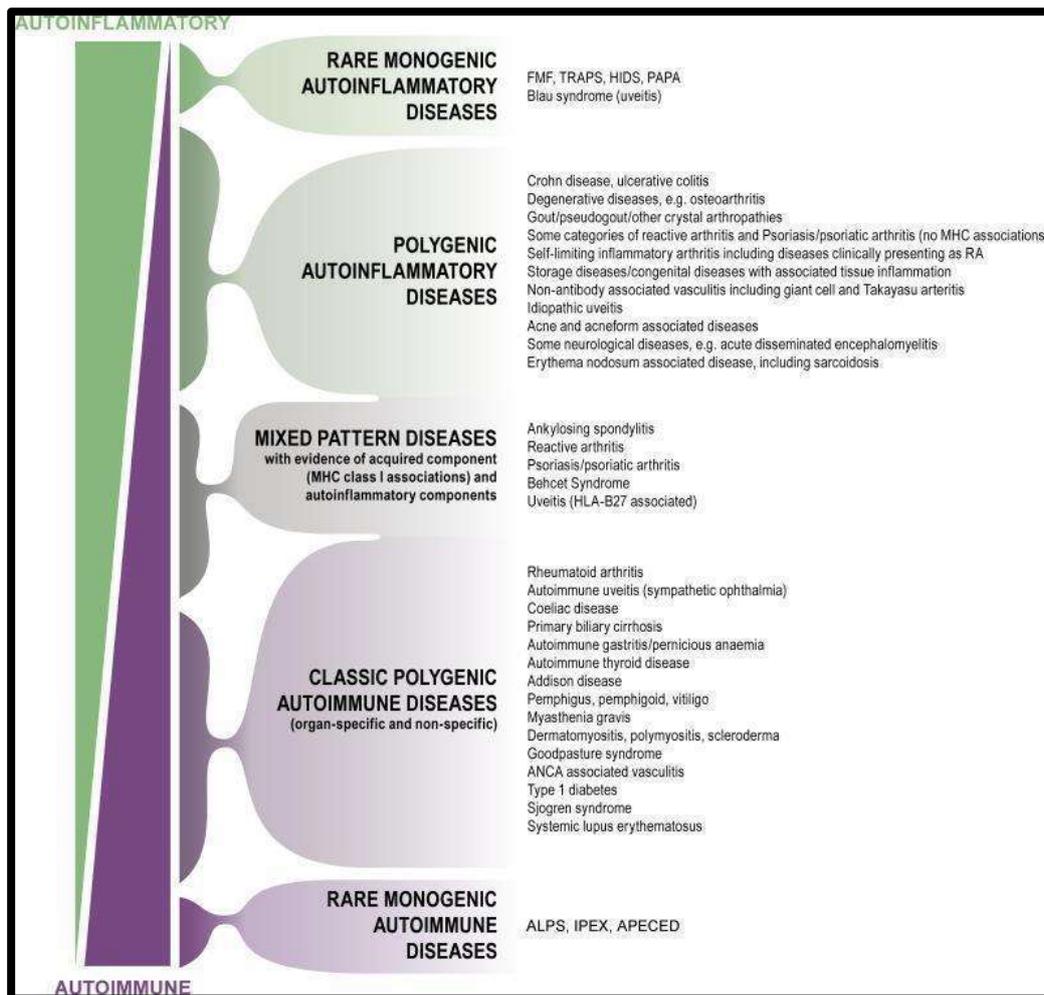


Figure 9 : Continuum des MAI (issue McGonagle, 2006)

## 1.1 Données cliniques

### 1.5.1 Recueil des données cliniques dans les études cliniques

Les protocoles d'études cliniques nécessitent de recueillir des données spécifiques à la recherche et relatives à la maladie de chaque patient participant à l'étude (désigné par clinical core data) (Krishnankutty et al. 2012).

Ils comprennent notamment des données concernant la démographie (sexe, âge ..), la pathologie à l'étude (date du diagnostic, caractéristiques biologiques et phénotypiques, les scores d'activité clinique et de sévérité de la maladie), les résultats des examens (biologiques

ou d'imagerie), ainsi que les données spécifiques à la recherche (date de la visite, échantillons prélevés, etc.).

Tous ces éléments sont recueillis dans un seul et même document : le cahier d'observation clinique ou *Case Report Form* (CRF). Le CRF est un document quel que soit son support (par exemple support papier, optique, magnétique ou électronique) destiné à recueillir par écrit toutes les informations requises par le protocole concernant chaque personne qui se prête à la recherche et devant être transmises au promoteur.

Pour ce qui concerne les CRF électroniques (eCRF) doivent être conformes à un Code de réglementation fédérale (CFR), norme 21 CFR Partie 11.

Des procédures et contrôles adéquats doivent être mis en place pour assurer l'intégrité, l'authenticité et la confidentialité des données.

Le CDISC (Clinical Data Interchange Standards Consortium) est un organisme multidisciplinaire à but non lucratif, qui a élaboré des normes pour soutenir l'acquisition, l'échange, la soumission et l'archivage de données et de métadonnées de recherche clinique. Les normes d'acquisition de données cliniques (CDASH) définissent la base pour la collecte de données dans un essai clinique, notamment les données démographiques, les événements indésirables et d'autres domaines communs à la plupart des essais thérapeutiques. Il est important de souligner que le CDASH définit comment collecter des données cliniques, mais pas quelles données collecter.

Pour ce qui concerne les MAI, certains groupes d'experts ont élaboré des normes de recueil des données pour les maladies rhumatologiques (Radner et al. 2018; "ICHOM" n.d.).

Une fois collectées, les données doivent être d'abord curées puis analysées. Le codage médical est une étape indispensable de la curation des données cliniques avant leur analyse.

Le codage médical aide à identifier et à classer correctement les terminologies médicales associées à l'essai clinique. Les événements indésirables survenant au cours de l'étude, les médicaments administrés et les maladies préexistantes ou co-existantes, sont codés à l'aide des dictionnaires médicaux disponibles. Généralement, le dictionnaire SNOMED (of American Pathologists and Others, n.d.) est utilisé pour la terminologie clinique, le MedDRA ("MedDRA |" n.d.) est utilisé pour coder les événements indésirables, et le WHO-DDE ("UMC | WHODrug Global" n.d.) est utilisé pour coder les médicaments. Le codage permet de classer de façon appropriée et harmonisée respectivement les pathologies, les événements indésirables et les médicaments.

### **1.5.2 Outils pour les systèmes de gestion de données cliniques**

De nombreux outils logiciels, appelés systèmes de gestion de données cliniques (CDMS), sont disponibles pour la gestion des données. Parmi les outils open source, les plus utilisés sont OpenClinica, openCMS, Trial DB et PhOSCo. Ces outils permettent de garantir la qualité et la traçabilité des données recueillies. Lors d'un audit réglementaire, les auditeurs peuvent vérifier le processus de gestion des incohérences, suivre les modifications apportées dans les données recueillies. En outre, OpenClinica a l'avantage d'être connecté à la plateforme d'intégration de données omiques transMART.

### **1.5.3 Plateforme d'intégration des données dans les essais cliniques**

L'intégration de différentes données omiques avec les informations cliniques est essentielle pour des études avec une approche des biologies de systèmes.

Il existe différentes plateformes d'intégration de données omiques disponibles au public gratuitement. Les plus utilisées sont: BRISK, cBio Cancer Genomics Portal, iDASH et tranSMART (Canuel et al. 2015)(-think.com n.d.).

BRISK est un ensemble de trois applications Web fournissant une plateforme d'intégration et de gestion des données développée pour fournir une solution de partage de données aux chercheurs du consortium AllerGen (The Allergy, Genes and Environment Network).

cBio Cancer Genomics Portal est utilisé notamment pour les études sur le cancer et permet l'intégration de données d'imagerie.

iDASH est un Centre National d'informatique Biomédical financé par le NIH, et fournit aux chercheurs de tous les États-Unis l'infrastructure informatique requise pour l'intégration et l'analyse des données.

TranSMART est conçu pour aider les scientifiques à développer et affiner les hypothèses de recherche en étudiant les corrélations entre phénotypes et données omiques. TranSMART peut gérer des données cliniques (données démographiques, résultats de laboratoire et phénotypes cliniques) et des données omiques telles que les profils d'expression génique, les génotypes, les données de métabolomique et de protéomique. Il fournit aux chercheurs des outils d'analyse capables de générer des statistiques descriptives et analytiques avancées.

## 2 HYPOTHÈSE DE LA RECHERCHE : L'IMMUNOME dans les études cliniques

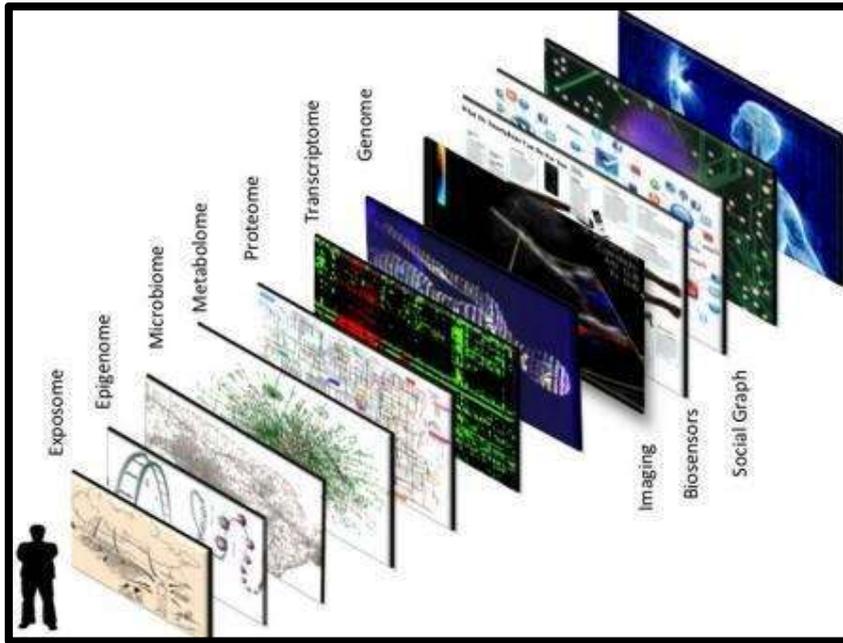
Le système immunitaire est lui-même, un système à plusieurs niveaux avec :

- 1) des cellules immunitaires du système inné et adaptatif qui produisent et libèrent
- 2) des molécules effectrices, qui déterminent la production et la libération
- 3) des molécules régulatrices qui à leur tour ont un effet sur les molécules effectrices et sur les cellules du système immunitaire.

Lorsqu'il y a des déséquilibres à l'un des niveaux, cela se traduit par des symptômes cliniques tels que les douleurs articulaires, la fatigue, l'atteinte rénale...

Les MAI représentent un problème scientifique extraordinaire dû à leur hétérogénéité génétique, leurs physiopathologies multifactorielles et à leur hétérogénéité dans présentation clinique.

Étant donné la complexité des maladies auto-immunes et la nécessité de disposer de marqueurs de diagnostic, de pronostic, d'activité de la maladie et de réponse à la thérapie, il est nécessaire d'avoir une approche holistique qui prend en compte tous les acteurs de ce processus. Ce concept est très bien expliqué par Topol et ses collègues avec la « dissection de l'hétérogénéité de la maladie ». L'étude d'un individu nécessite l'intégration de données à plusieurs échelles : des données démographiques, d'imagerie et de biologie issues des différentes omiques (séquence ADN-génome, transcriptome, protéome, métabolome, microbiome, épigénome et des données sur l'exposition environnementale, connues sous le nom d'"exposome") (Figure 10) (Topol 2014).



**Figure 10** : La dissection de l'hétérogénéité de la maladie (issue de « Individualized medicine from prewomb to tomb » Topol, 2014)

L'ajout d'approches de la biologie des systèmes aux procédures d'investigation traditionnelles peut accélérer la compréhension des mécanismes de la maladie en cause.

L'immunome est défini comme un grand ensemble de gènes et de protéines du système immunitaire humain qui sert de référence pour la biologie des systèmes (Ortutay and Vihinen 2006)(Olmes et al. 2016).

Dans cette thèse, on définit l'immunome comme l'ensemble des caractéristiques biologiques (cellulaires, moléculaires, génétiques) et cliniques qui déterminent le statut immunitaire du sujet dans sa conception plus large.

Les données nécessaires pour étudier l'immunome comportent des données de :

- cytométrie : la quantification et le phénotypage de l'ensemble des sous-populations leucocytaires circulantes par cytométrie de flux multi-paramétrique;

- protéomique : le dosage sérique de protéines d'intérêt liées à la réponse immunitaire et aux processus inflammatoires, telles que des protéines du complément, les chimiokines et les cytokines;
- transcriptomique : l'analyse de l'expression des gènes à partir des PBMC totaux et des populations lymphocytaires purifiées, notamment les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Treg et les lymphocytes T helper effecteurs (Teff);
- répertoire TCR : l'analyse du répertoire TCR des lymphocytes Treg et Teff par séquençage à haut débit des transcrits de TCR;
- microbiome : l'analyse par séquençage haut débit de la composition bactérienne intestinale à partir des selles des patients;
- biologie standard de routine;
- bilan biologique spécifique aux MAI : fractions du complément, facteur rhumatoïde, cryoglobulinémie, auto-anticorps spécifiques;
- clinique : les données démographiques, mode de vie, antécédents, scores de qualité de vie , scores spécifiques à chaque maladie ainsi que les caractéristiques phénotypiques, cliniques et d'imagerie et les traitements concomitants.

### 3 OBJECTIFS

L'objectif de cette thèse est d'évaluer la faisabilité et l'impact de l'étude de l'immunome dans les essais cliniques menés chez des patients affectés par différentes MAI.

Nous avons appliqué cette stratégie d'étude à un étude observationnelle (TRANSIMMUNOM) avec une approche méthodologique descendante (Top-Down), ainsi qu'à des études interventionnelles (DF-IL2 et TRANSREG) avec une approche méthodologique ascendante (Bottom-Up). Ces dernières visent à tester des faibles doses d'IL-2 dans le diabète de type 1 (DF-IL-2, étude de « recherche de dose ») et dans différentes MAI (TRANSREG, étude de « sélection de maladie »).

## 4 RÉSULTATS

### 4.1 Investigations statiques de l'immunome dans les MAI

#### 4.1.1 Méthodologie d'un essai multi-omiques et multi-pathologies

L'approche traditionnelle des essais cliniques est basée sur un concept classique notamment une seule cohorte, incluant des i) patients ayant une présentation clinique homogène, ii) la minimisation des variations des analyses liées aux différentes techniques, et iii) la validation en interne des données.

Cette approche ne prend pas en compte l'hétérogénéité de la maladie et il est très difficile de la généraliser.

En effet, les patients inclus dans ces essais sont tellement sélectionnés que les résultats obtenus ne sont finalement pas représentatifs des malades « tout –venant ».

Comment étudier des maladies hétérogènes telles que les MAI ?

Nous devons intégrer et comprendre l'hétérogénéité des maladies, avec l'étude combinée de plusieurs MAI en prenant en compte les données cliniques et omiques.

Cette approche est en lien avec la « médecine personnalisée » (une médecine qui s'adresse à des patients présentant des caractéristiques moléculaires et phénotypiques communes sans nécessairement avoir le même diagnostic) et changer notre objectif de : « target to treat » en « comprehend to cure ».

Ceci pourrait nous aider à identifier les mécanismes communs à ces maladies et, par la suite, à prédire un traitement efficace.

L'immunologie des systèmes est désormais considérée comme l'avenir pour la découverte de nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques (Zhao and Li 2018), (Irigoyen et al. 2018), (Moon and Nakai 2018).

L'objectif principal du projet TRANSIMMUNOM (Translational phenomics in immunopathology and inflammation) (NCT02466217) est de revisiter la nosologie de plusieurs MAI appartenant au CONTINUUM (Figure 9) afin (i) de faciliter la découverte des bases génétiques des différents phénotypes de maladie, (ii) d'élucider les mécanismes qui relient le génome humain à des syndromes complexes, (iii) de découvrir et valider des biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques. L'étude TRANSIMMUNOM fait partie des études avec une approche « atlas » : nous proposons une cartographie multi-maladies avec des analyses comparatives.

TRANSIMMUNOM a été créé en tant que consortium multidisciplinaire constitué par une équipe multidisciplinaire de gestion de cohorte (CMT) (Figure 2 de l'article 1), comprenant un consortium d'experts cliniques de sept spécialités, infirmières, biologistes, méthodologistes, immunologistes, informaticiens et bioinformaticiens.

L'étude TRANSIMMUNOM prévoit de croiser le phénotype de 1000 participants affectés par un ensemble de 19 MAI récemment diagnostiquées (diagnostic inférieur à 8 ans sauf pour LES, FMF, TRAPS et CAPS) 5 maladies contrôles et des volontaires sains par une approche d'immunologie des systèmes.

Les maladies ont été sélectionnées en fonction (1) de leur prévalence (rare et fréquente) et (2) du degré des composants auto-immuns et inflammatoires de la maladie de manière à couvrir l'ensemble du spectre du CONTINUUM (Figure 3 de l'article 1). Les maladies ainsi sélectionnées sont : la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), la rectocolite hémorragique (RCH), la maladie de Crohn (MC), la spondylite ankylosante (SpA), les uvéites non infectieuses, les myosites (polymyosite, dermatomyosite, myosite à inclusion, myosite nécrosante et liée à l'antisynthétase), les vascularites associées aux anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) (la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (GPA) et la

granulomatose avec polyangéite (GPA)), les vascularites non associées aux ANCA (la maladie de Behçet, la cryoglobulinémie et la maladie de Takayasu), la polyarthrite rhumatoïde (PR), le diabète de type 1 (DT1), le lupus érythémateux disséminé (LES) et les MAI non classées.

Les maladies témoins ont été sélectionnées comme ayant des manifestations cliniques qui se chevauchent mais des mécanismes physiopathologiques différents des maladies auto-immunes et inflammatoires à l'étude : Par exemple : (1) des maladies avec principalement une composante inflammatoire versus une composante auto-immune (DT2 vs DT1; arthrose vs PR), (2) des maladies ayant la même expression clinique mais avec des composantes génétiques différentes (TRAPS-CAPS vs FMF) (3) des maladies génétiques versus des maladies auto-immunes d'un tissu donné (dystrophie musculaire vs myosite) et (4) des maladies auto-immunes primaires ou secondaires à d'autres pathologies (syndrome des antiphospholipides primaires (APLS) vs LES).

L'un des résultats pourrait être que le LES (ou les autres MAI) n'est pas une maladie unique, mais plutôt un groupe de maladies avec divers mécanismes moléculaires conduisant à des manifestations cliniques assez similaires.

L'approche d'analyse consiste à (1) effectuer un contrôle qualité sur toutes les données collectées (y compris les données cliniques grâce à un suivi et une validation approfondie de l'eCRF); (2) analyser le niveau d'expression des protéines ou des gènes pour les cytokines et le transcriptome, l'intensité moyenne de fluorescence ou le pourcentage pour l'immunophénotypage, la diversité pour le microbiome et le répertoire des récepteurs des cellules T; (3) mettre en œuvre en parallèle des méthodes de modélisation non supervisées, dont certaines développées par notre laboratoire (Saadoun et al. 2011), (Allenbach et al. 2014), (Terrier et al. 2014), (Terrier et al. 2012), (Pham et al. 2014), (Rosenzwajg et al. 2015), (Bergot et al. 2015), (Nehar-Belaid et al. 2016), (Plessy et al., n.d.), (Pham et al. 2014), (Nehar-

Belaid et al. 2016; Chaussabel et al. 2008)) et enfin (4) une fois que nous aurons l'ensemble des données multiparamétriques complètes pour chaque sujet, nous effectuerons une analyse intégrée en utilisant des méthodes d'analyse multi-omiques dans le but de déchiffrer leurs relations (Arthur Tenenhaus and Tenenhaus 2011; Rohart et al., n.d.), (Arthur Tenenhaus and Tenenhaus 2014), (A. Tenenhaus et al. 2014), (Arthur Tenenhaus, Philippe, and Frouin 2015)). Nous compléterons notre recherche de biomarqueurs par des études cognitives plus encadrées en comparant les résultats de nos investigations avec les résultats de la littérature.

#### **4.1.2 Clinical coding et Intégration des données**

En sachant que la classification actuelle des MAI est basée sur le phénotype clinique et non sur les caractéristiques moléculaires de la maladie, il est donc nécessaire de revoir les critères de classification en faisant une dissection des aspects cliniques pour sortir de cette vision réductionniste.

Pour ce faire, il faut reporter de manière exhaustive, détaillée et harmonisée toutes les caractéristiques cliniques, biologiques, d'imagerie et thérapeuthiques du patient.

Il s'ensuit qu'un effort plus important a été réalisé pour concevoir un CRF approprié capable de couvrir tous ces aspects pour 24 maladies (19 maladies et 5 maladies témoins).

Le CMT a sélectionné, organisé et harmonisé plus de 5000 variables multiparamétriques codées à partir de 865 paramètres cliniques et biologiques dans un eCRF intégré à l'aide de la plateforme OpenClinica (OC). Cet outil de capture électronique de données (EDC) est capable de concevoir des eCRF complexes pour de grandes études (Franklin, Guidry, and Brinkley 2011).

Le premier groupe de CRF a été construit pour regrouper la « description du patient » et comprenait les informations concernant la démographie, le niveau d'éducation, le mode de vie (alcool, tabac, régime alimentaire), les infections chroniques (hépatite B, hépatite C et

VIH), les vaccinations et les antécédents personnels et familiaux. Au total, nous avons sélectionné 70 éléments organisés en 7 CRF (Figure 3A et matériel supplémentaire de l'article 2).

Le deuxième ensemble de CRF a été construit pour regrouper les informations sur le « suivi clinique commun » et était organisé en 5 CRFs collectant des données recueillies le jour de la visite : les données cliniques générales (signes vitaux, taille, poids, IMC), l'ECG fait avec un électrocardiographe digital hautement standardisé (ELI 280, V1.02.01; Mortara Instrument, Inc., Milwaukee, WI, USA), des questionnaires évaluant la qualité de vie, la fatigue et la dépression (EUROQoL, FACIT-F, HAD), et l'examen physique détaillé et standardisé pour chaque appareil, représentant au total 88 paramètres (Figure 3B et matériel supplémentaire de l'article 2).

La troisième catégorie explore la « surveillance biologique de routine » (Figure 3C, matériel supplémentaire et tableau 2 de l'article 2) et couvre un large éventail d'analyses incluant une évaluation biologique de la fonctionnalité des organes (foie, rein, moëlle osseuse), les marqueurs d'inflammation, les marqueurs métaboliques, la vitamine D et autres. Cette catégorie est organisée en 6 CRF et couvre 91 paramètres.

La quatrième CRF est destiné à collecter des données spécifiques à la maladie et a été subdivisé en 3 parties (Figure 3D et matériel supplémentaire de l'article 2) capturant 616 éléments, y compris les critères de classification, les scores d'activité de la maladie et le statut clinique de la maladie (tableau 2 de l'article 2). Pour les critères de classification, le CRF a été conçu de manière à pouvoir analyser les différents items de ces classifications. Ainsi, les patients ne répondant que partiellement aux critères peuvent être analysés dans un sous-groupe spécifique. L'exemple typique est celui des patients souffrant de lupus cutané-

articulaire qui ne répondent pas aux critères proposés par l'American College of Rheumatology (ACR) peuvent être analysés comme LES « incomplet ».

Enfin, le dernier CRF concerne les aspects thérapeutiques. Celui-ci est à son tour divisé en 7 rubriques comprenant i) les médicaments immunomodulateurs ou immunosuppresseurs, ii) les médicaments antidiabétiques, iii) les médicaments à visée cardio-vasculaire, iv) les médicaments à visée osseuse, v) les médicaments pour l'arthrose, vi) les médicaments hormonaux et vii) la section des médicaments autres où sont répertoriés tous les autres médicaments pris par le patient qui n'entrent pas dans les catégories précédentes.

Pour chaque maladie, on a identifié un ensemble de caractéristiques (clinique, biologique ou d'imagerie) observées soit dans les formes « classiques » ou soit « rares » de la maladie.

En raison de l'hétérogénéité et du nombre de variables sélectionnées, le codage clinique a été conçu comme un format sans ambiguïté avec une utilisation maximisée de listes prédéfinies de réponses. Ce codage a été développé comme une terminologie médicale pragmatique, validée cliniquement, en mettant l'accent sur la facilité de la saisie, la récupération et l'analyse des données. Nous avons donc défini et validé pour chaque paramètre, dans la mesure du possible, le type de données (numérique, texte, date, listes d'options prédéfinies, plages de valeurs) et les unités (le cas échéant) pour tous les paramètres identifiés, afin d'harmoniser les informations recueillies quel que soit le temps et la personne en charge de la collecte des données et pour éviter au maximum les erreurs de saisie.

A titre d'exemple, les antécédents personnels ont été pré-listés au maximum, incluant notamment le risque cardiovasculaire, les maladies métaboliques, pulmonaires, neurologiques, mais également des données qui sont moins souvent collectées comme la présence de parodontite. En effet, on sait maintenant qu'elle joue un rôle dans la citrullination des protéines et prédispose au développement de la polyarthrite rhumatoïde chez les

personnes porteuses de certains HLA, ainsi que d'avoir une influence sur le microbiote intestinal.

La même chose s'applique à l'examen physique où, pour chaque appareil, les manifestations cliniques possibles ont été pré-listées au maximum (par exemple dans l'examen de la peau figure : purpura, nécrose, livedo reticularis, érythème noueux ; les lésions lupiques aiguës, subaiguës et chroniques...). Ainsi que la section traitements où sont indiqués non seulement les médicaments, mais aussi la posologie prise et la voie d'administration.

Au total, nous avons conçu un ensemble de 21 CRF harmonisés CDASH enregistrant 865 paramètres avec 5835 variables codées de manière systématique pour tous les participants (patients et volontaires sains) inclus dans l'essai TRANSIMMUNOM.

Ce panel de variables est aussi large que possible pour pouvoir identifier le profil de la maladie, sa sévérité et les caractéristiques éventuellement partagées par les maladies.

## Résultats supplémentaires à ceux publiés dans les articles 1 et 2

### Inclusions des patients et plan de gestion des données

Dans l'étude TRANSIMMUNOM, nous avons inclus 533 participants (462 patients et 71 volontaires sains). Les cohortes de patients les plus importantes sont celles des maladies rhumatologiques, les vascularites, le diabète et le LES. Le nombre d'inclusions dans chaque cohorte est détaillé dans le tableau 3.

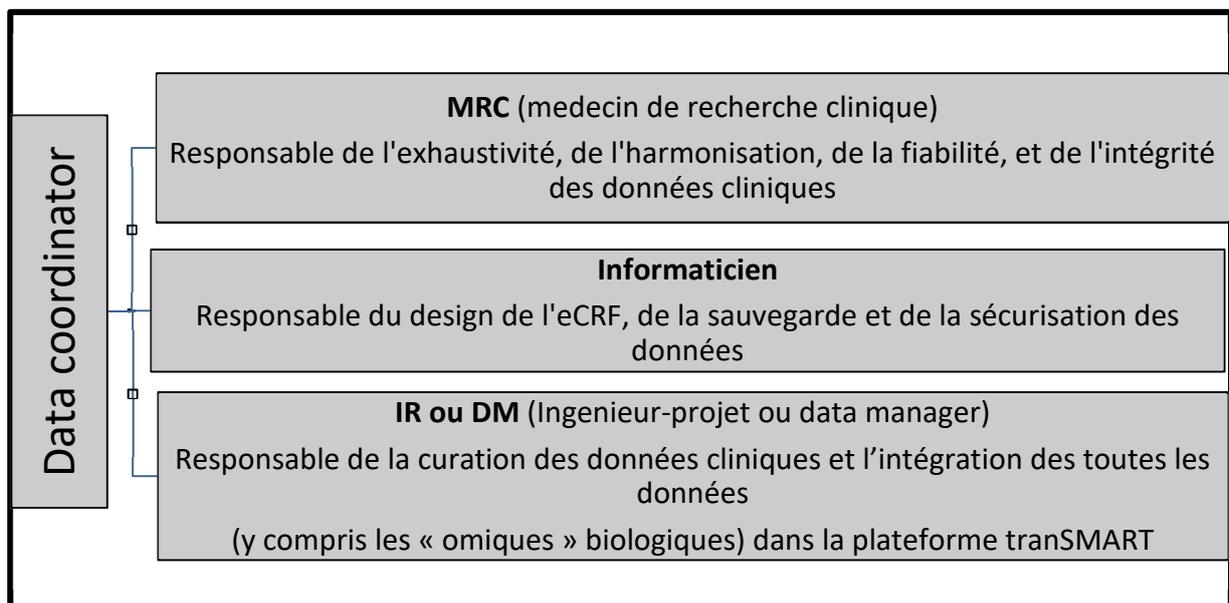
Pathologies / Pathologies témoins	Nb d'inclusions
PR / Arthrose	91 / 47
Vascularites	82
DT1 / DT2	59 / 30
SpA	58
SLE / SAPL	33 / 23
MAI inclassée	12
Crohn	10
FMF / CAPS-TRAPS	7 / 0
RCH	5
Myosite	4
Goujerot-Sjögren	1
Uvéite	-
Volontaires sains	71
<b>Total</b>	<b>533</b>

**Tableau 3** : TRANSIMMUNOM : les inclusions par cohorte

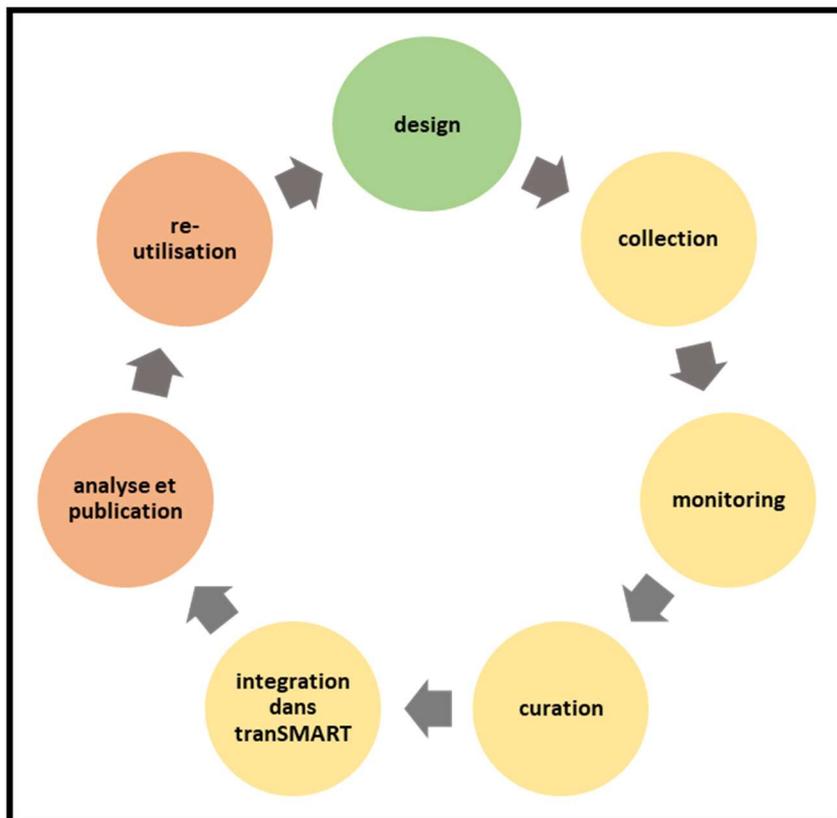
Nous avons établi un plan de gestion des données, cela nous permet de formaliser la gestion du travail et de définir les responsabilités de chaque intervenant et d'assurer la qualité des données (Figure 11a). Le plan de gestion des données comprend : le design de l'étude, la

collection, la saisie, le monitoring et la curation des données, ainsi que l'intégration sur tranSMART, l'analyse, la publication et éventuellement leur ré-utilisation (Figure 11b).

La curation des données, sous la responsabilité du data manager et en lien direct avec les investigateurs et le technicien d'étude clinique, à lieu en 2 phases. Dans la première phase, partiellement automatisée il y a 1) le décodage des variables encodées 2) la standardisation des dates et 3) la standardisation du texte libre pour ce qui concerne les pays de naissance, les termes médicaux (avec le dictionnaire SNOMED CT) et les médicaments (avec le dictionnaire MeSH). La deuxième phase de la curation est consacrée a 1) la création de nouvelles variables pour des termes médicaux et des classes de médicaments fréquentes en texte libre, 2) le contrôle qualité, requêtes et corrections pour les valeurs biologiques et la cohérence entre variables répétées.



**Figure11 a:** Plan de gestion des données, Responsabilités



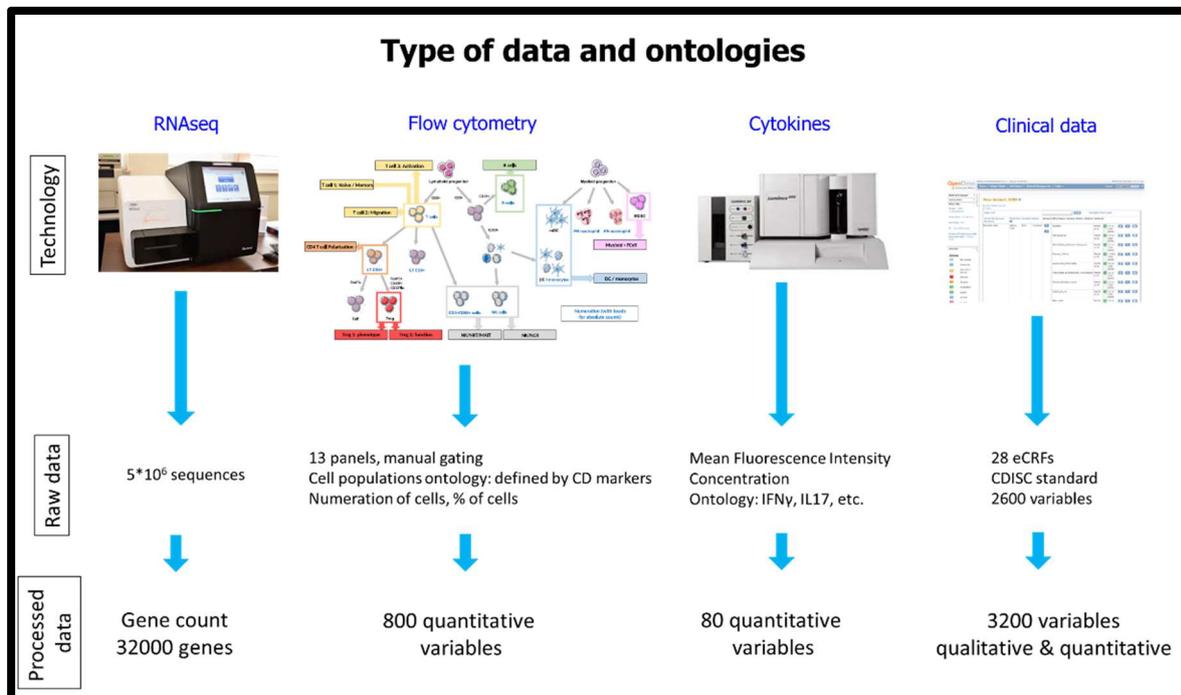
**Figure 11b:** Plan de gestion des données (en vert l'étape faite et validée; en jaune les étapes en cours et en rouge les étapes à faire).

### *Intégration des données sur la plateforme transSMART*

Les données cliniques curées et les données issues des analyses omiques sont chargées sur la plateforme transSMART sous la responsabilité du data manager. Actuellement 533 participants ont été inclus dans l'étude. Pour 167 d'entre eux, les données ont été saisies, partiellement curées et intégrées dans la plateforme transSMART (Figure 12).

Les données actuellement téléchargées sur la plateforme sont des données cliniques, de cytométrie, de protéomique et de transcriptome. Les données résultant de l'analyse du TCR et du microbiote seront chargées ultérieurement. En effet transSMART a une ontologie prévue pour les données de RNA-seq et de microarray, mais pas pour les données issues de l'analyse du TCR et du microbiote. Cette tâche est en cours de résolution par les informaticiens de notre équipe.

L'avantage d'utiliser la plateforme transSMART est qu'elle fournit aux chercheurs un outil d'analyse facile à utiliser et capable de générer des statistiques descriptives et des analyses avancées.

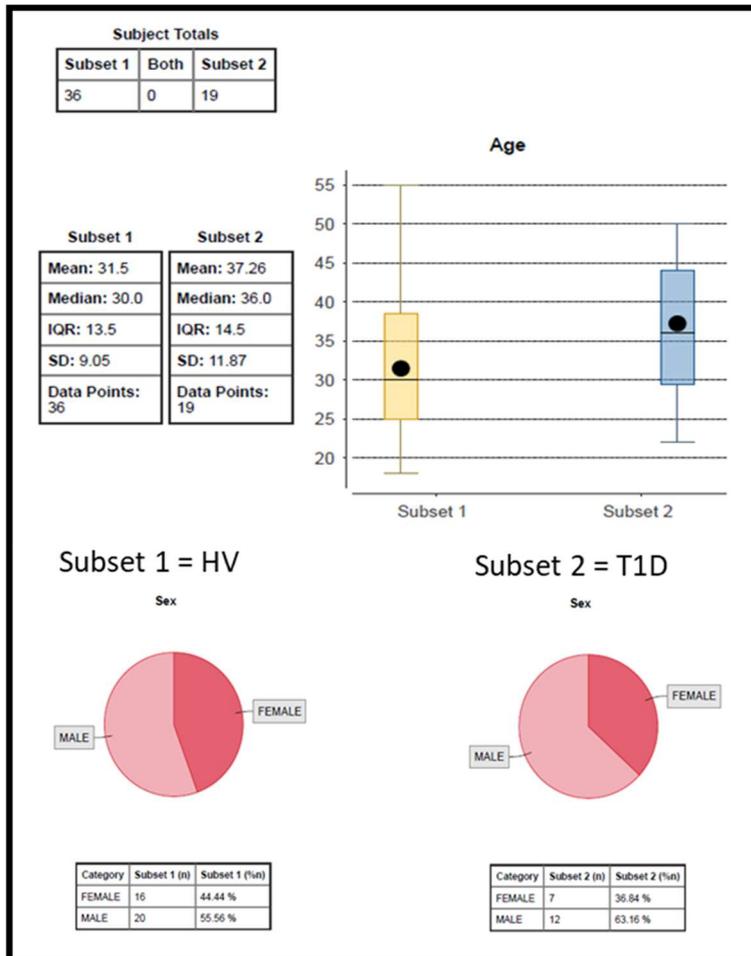


**Figure 12:** Intégration des données dans transSMART

Vous trouverez ici un exemple pratique pour démontrer l'utilité d'une plateforme d'intégration de données. Nous avons analysé les données de 36 volontaires sains et 19 patients affectés par un diabète de type 1. La première analyse est faite systématiquement et montre la répartition du sexe et de l'âge dans les deux cohortes (Figure 13). Dans ce premier échantillon, les volontaires sains ont un âge moyen de 31,5 ans et les patients diabétiques de 36 ans. La proportion d'hommes représente 55,56% chez les volontaires sains vs 66,16% chez les patients diabétiques.

Nous avons ensuite sélectionné certains paramètres à analyser et nous avons trouvé des paramètres statistiquement significatifs attendus (comme la fatigue et l'atopie plus marquée chez les diabétiques), et d'autres inattendus (les fumeurs sont plus nombreux chez les

diabétiques, et la pilule contraceptive est prise par 36% des femmes de la cohorte des volontaires sains contre 0% chez les diabétiques) (tableau 4).



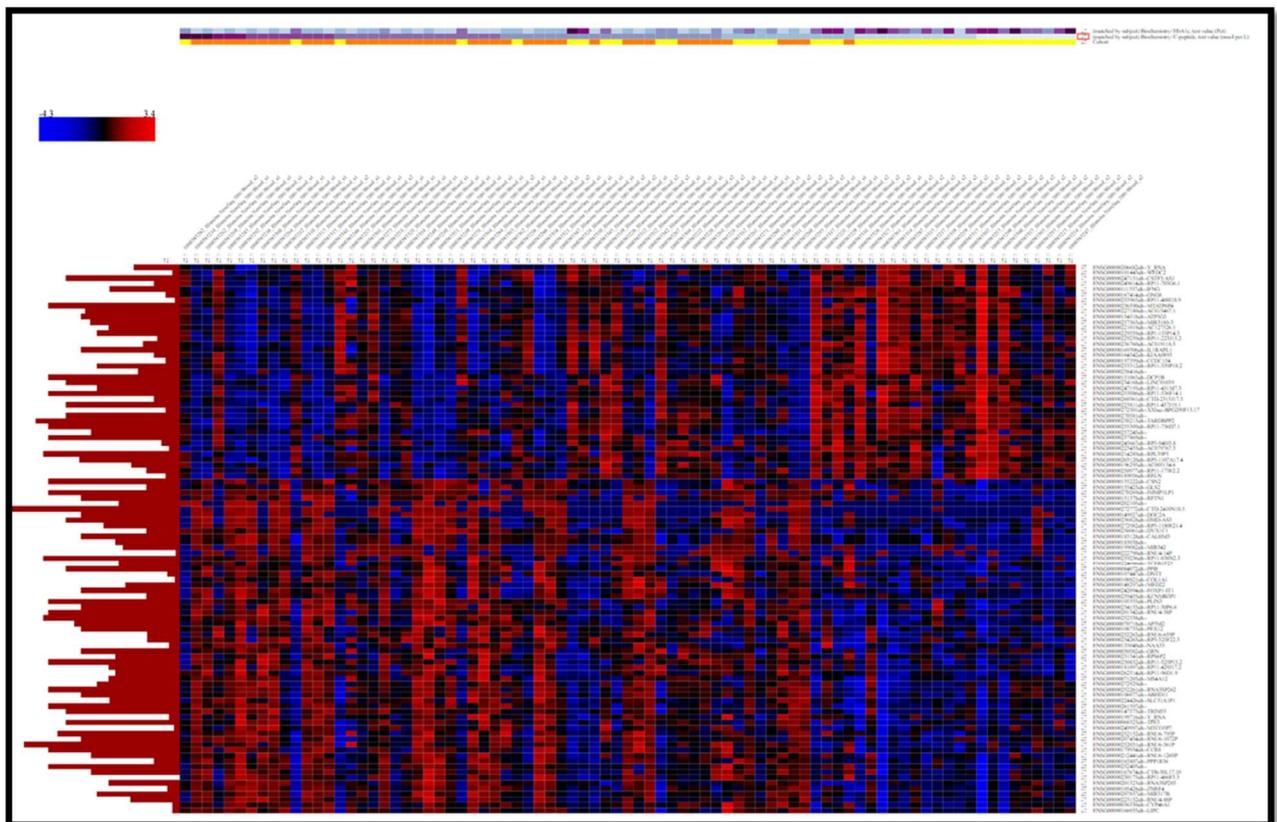
**Figure 13:** Analyse des données avec transMART : répartition du sexe et de l'âge dans les deux cohortes

Variable	Pval	significant	freq in HV	freq in T1D
Asthenia_YN	1,12E-07	Yes	0%	40%
Med_surg_hist_YN	0,0003195	Yes	70,80%	96,40%
Smoking	0,00153308	Yes	10,4% current smoker	41,1% current smoker
estrogenic_pill_YN	0,00163084	Yes	36% of F	0% of F
Atopy_YN	0,04498723	Yes	16,70%	35,70%

**Tableau 4 :** Analyse statistique des variables sélectionnées dans les VS et les DT1

Enfin, nous avons effectué une analyse avancée avec un *heatmap* en sélectionnant : i) les deux cohortes (volontaires sains en orange et diabétiques en jaune), ii) les dosages d'hémoglobine glyquée et de peptide C effectués dans ces deux cohortes (le violet indique les valeurs les plus élevées et le bleu les valeurs les plus faibles), et iii) les données de transcriptome (en rouge les transcrits régulés à la hausse et en bleu ceux régulés à la baisse) (figure 14).

Comme on peut le voir dans la Figure 14, la *heatmap* sépare bien la cohorte des patients diabétiques de celle des volontaires sains. La plupart des patients DT1 sont regroupés en haut à droite et sont associés à un groupe de transcrits régulés à la hausse (notamment des transcrits liés à l'IFN ou pro-inflammatoires comme ceux liés à l'IL-1). Les patients DT1 qui présentent un profil similaire aux sujets sains en termes de dosage de peptide C et d'hémoglobine glyquée sont intercalés dans la cohorte des sujets sains.



**Figure 14:** *Heatmap* des VS et des patients DT1 avec les valeurs d'HbA1c, de peptide-C et de transcriptome.

Les données présentées sont un exemple de la facilité d'utilisation de la plateforme tranSMART.

**4.1.3 Article 1 « Clinical and multi-omics cross-phenotyping of patients with autoimmune and autoinflammatory diseases: the observational TRANSIMMUNOM protocol »**

# BMJ Open Clinical and multi-omics cross-phenotyping of patients with autoimmune and autoinflammatory diseases: the observational TRANSIMMUNOM protocol

Roberta Lorenzon,<sup>1,2</sup> Encarnita Mariotti-Ferrandiz,<sup>1</sup> Caroline Aheng,<sup>1,2</sup> Claire Ribet,<sup>1,2</sup> Ferial Toumi,<sup>1</sup> Fabien Pitoiset,<sup>1,2</sup> Wahiba Chaara,<sup>1,2</sup> Nicolas Derian,<sup>1,2</sup> Catherine Johanel,<sup>3,4</sup> Iannis Drakos,<sup>1</sup> Sophie Harris,<sup>1</sup> Serge Amselem,<sup>5</sup> Francis Berenbaum,<sup>6,7</sup> Olivier Benveniste,<sup>8,9</sup> Bahram Bodaghi,<sup>10</sup> Patrice Cacoub,<sup>1,8</sup> Gilles Grateau,<sup>11,12</sup> Chloe Amouyal,<sup>13</sup> Agnes Hartemann,<sup>13</sup> David Saadoun,<sup>1,8</sup> Jeremie Sellam,<sup>6,7</sup> Philippe Seksik,<sup>14,15</sup> Harry Sokol,<sup>14,15</sup> Joe-Elie Salem,<sup>16</sup> Eric Vicaut,<sup>17</sup> Adrien Six,<sup>1,2</sup> Michelle Rosenzweig,<sup>1,2</sup> Claude Bernard,<sup>1,2</sup> David Klatzmann<sup>1,2</sup>

**To cite:** Lorenzon R, Mariotti-Ferrandiz E, Aheng C, *et al.* Clinical and multi-omics cross-phenotyping of patients with autoimmune and autoinflammatory diseases: the observational TRANSIMMUNOM protocol. *BMJ Open* 2018;**8**:e021037. doi:10.1136/bmjopen-2017-021037

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2017-021037>).

RL and EM-F contributed equally.

Received 3 January 2018  
Revised 2 July 2018  
Accepted 17 July 2018



© Author(s) or their employer(s) 2018. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

#### Correspondence to

Professor David Klatzmann;  
david.klatzmann@sorbonne-universite.fr

#### ABSTRACT

**Introduction** Autoimmune and autoinflammatory diseases (AIDs) represent a socioeconomic burden as the second cause of chronic illness in Western countries. In this context, the TRANSIMMUNOM clinical protocol is designed to revisit the nosology of AIDs by combining basic, clinical and information sciences. Based on classical and systems biology analyses, it aims to uncover important phenotypes that cut across diagnostic groups so as to discover biomarkers and identify novel therapeutic targets.

**Methods and analysis** TRANSIMMUNOM is an observational clinical protocol that aims to cross-phenotype a set of 19 AIDs, six related control diseases and healthy volunteers. We assembled a multidisciplinary cohort management team tasked with (1) selecting informative biological (routine and omics type) and clinical parameters to be captured, (2) standardising the sample collection and shipment circuit, (3) selecting omics technologies and benchmarking omics data providers, (4) designing and implementing a multidisease electronic case report form and an omics database and (5) implementing supervised and unsupervised data analyses.

**Ethics and dissemination** The study was approved by the institutional review board of Pitié-Salpêtrière Hospital (ethics committee Ile-De-France 48–15) and done in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice. Written informed consent is obtained from all participants before enrolment in the study. TRANSIMMUNOM's project website provides information about the protocol (<https://www.transimmunom.fr/en/>) including experimental set-up and tool developments. Results will be disseminated during annual scientific committees appraising the project progresses and at national and international scientific conferences.

**Discussion** Systems biology approaches are increasingly implemented in human pathophysiology research. The

#### Strengths and limitations of this study

- The study is conducted by a specialised 'Clinical Investigation Centre in Biotherapy and Immunology' with extensive experience in clinical immunology research, allowing standardisation of the procedure.
- A multidisciplinary cohort management team, with specialists from medical and research specialties as well as from biostatistics and bioinformatics has been gathered allowing a robust study design.
- The design integrates more than 800 clinical and biomedical information covering 19 autoimmune and autoinflammatory diseases and six related control diseases assembled in a multidisease harmonised case report form (part 11 compliant), a crucial effort for multidisease cross-analysis.
- Production of a large collection of multiomics data from 1000 patient blood and faeces samples following standardised procedures that (1) are analysed through a system immunology approach together with clinical and biomedical data and (2) will benefit to the community once publicly available.
- One limitation is that TRANSIMMUNOM patients are currently sampled only once, with the goal of portraying their immune status; however, the re-sampling of patients at later time points is possible and could be planned according to specific scientific questions that would arise from the study or from the literature.

TRANSIMMUNOM study applies such approach to the pathophysiology of AIDs. We believe that this translational systems immunology approach has the potential to provide breakthrough discoveries for better understanding and treatment of AIDs.

Trial registration number NCT02466217; Pre-results.

## INTRODUCTION

Autoimmune and autoinflammatory diseases (AIDs) are the second highest cause of chronic illness in the Western world.<sup>1</sup> Reducing their morbidity is a major public health challenge. Historically, the classification of AIDs was founded first on clinical symptoms. With the development of biomedical technologies, immune markers were then progressively included in the description of AIDs. As examples, specific autoantibodies help to define systemic lupus erythematosus (SLE), type 1 diabetes (T1D), rheumatoid arthritis (RA), mixed cryoglobulinaemia, antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis and some types of myositis. Similarly, histological parameters such as inflammatory cell infiltrate help to refine the diagnosis of the different types of systemic vasculitis, such as Takayasu arteritis, giant cell arteritis and ANCA-associated vasculitis. Finally, genetic markers such as human leucocyte antigen (HLA)-B27 and *MEFV* gene mutations are associated with spondyloarthritis (SpA) and of familial Mediterranean fever (FMF), respectively.

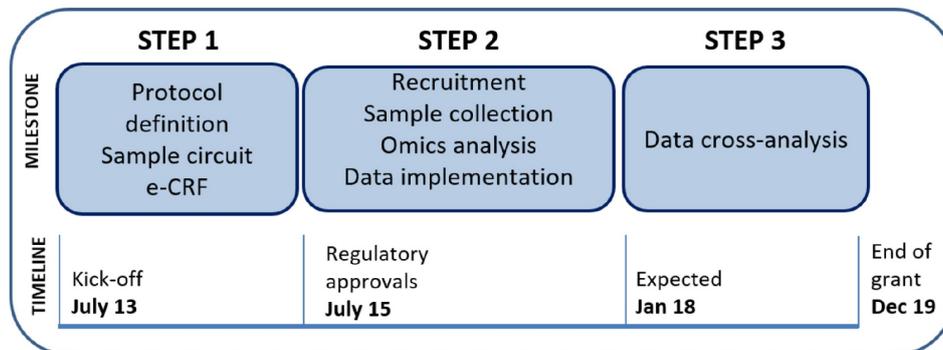
Importantly, recent progress in molecular understanding of AIDs showed that there are not two distinct categories of diseases. Instead, AIDs form a continuum (the AIDC) of diseases with various proportions of inflammatory and autoimmune manifestations.<sup>2-4</sup> Indeed, several cytokines are similarly modulated in different AIDs, such as interleukin (IL)-1 in FMF, uveitis and RA or IL-6 in RA and inflammatory bowel disease (IBD), IL-17 and IL-13 in SpA and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in RA, SpA and IBD,<sup>5</sup> and the therapeutic inhibition of these cytokines has been successful in different AIDs.<sup>6</sup> Shared genetic association between diseases also helps define this continuum. Many yet unknown molecular and cellular mechanisms and/or alterations may be shared as well. Embracing immune system homeostasis at a

multiscale level should be heuristic. It should help characterise commonalities and differences between different AIDs and find important phenotypes that cut across diagnostic groups, likewise providing biomarkers and novel therapeutic targets for these patients.

This complex type of multiscale study can be addressed through a systems biology approach. One example of the potential of systems biology in immunology was the study of the immune response induced by the yellow fever vaccine.<sup>7</sup> The strategy involved proteomics, transcriptomics and bioinformatics. Using this approach, the authors identified gene expression signatures that could predict the humoral immune response to the yellow fever vaccine. Similarly, several international projects, such as the Human Immunology Project consortium<sup>8</sup> funded by National Institute of Health and the Health Human Project emanating from the Milieu Intérieur Consortium,<sup>9</sup> have already revealed the power of multiparametric systems immunology studies.<sup>10</sup>

We designed and launched an observational the Translational phenomics in immunopathology and inflammation: from cross phenotyping to biotherapy clinical protocol (TRANSIMMUNOM), designed to re-examine the nosology of a selection of AIDs using a multiparametric systems immunology experimental design. To that purpose, we selected 19 AIDs and six related control diseases for which multiparametric cross-analysis will be applied to clinical, biological, immunological and microbiome data between patients and in comparison with healthy volunteers (HV).

TRANSIMMUNOM was established as a multidisciplinary consortium including representatives of (1) clinical care (including medical doctors, medical technologists and nurses from the different specialties), (2) research activities (including immunologists, microbiologists, computational biologists and computer scientists) and (3) regulatory aspects of clinical trials (clinical trial



**Figure 1** TRANSIMMUNOM overview of the study. The figure represents the implementation of the study summarised in three steps. Step 1: protocol definition, sample circuit, electronic case report form (e-CRF); Step 2: recruitment, sample collection, omics analysis and data implementation and Step 3: data cross-analysis. The three steps are shown chronologically following the timeline of the study.

methodologists and clinical research associates). This endeavour has made possible the inclusion of patients with different diseases and followed up in different clinical departments and the completeness and standardisation of data collection and integration. TRANSIMMUNOM is funded by the French Research Agency (ANR) as a Laboratory of Excellence (LabEx).

### Study aim

The main goal of TRANSIMMUNOM is to revisit the nosology of multiple AIDs belonging to the AIDC in order (1) to discover and validate biomarkers and novel therapeutic targets and (2) to evaluate biotherapies based on this knowledge. To this end, we propose to cross-phenotype a set of 19 AIDs through a systems immunology approach. The primary evaluation criterion is the significance of new gene expression levels, pathways and signatures involved when comparing the clinical phenotypes of different AIDs. The secondary evaluation criterion is the identification of new biomarkers and/or therapeutic targets by system biology approach. More details on primary and secondary outcome measures can be found on <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02466217>.

The implementation of the study can be summarised in three steps (figure 1), from design (Step 1) to implementation (Step 2) and data analysis (Step 3).

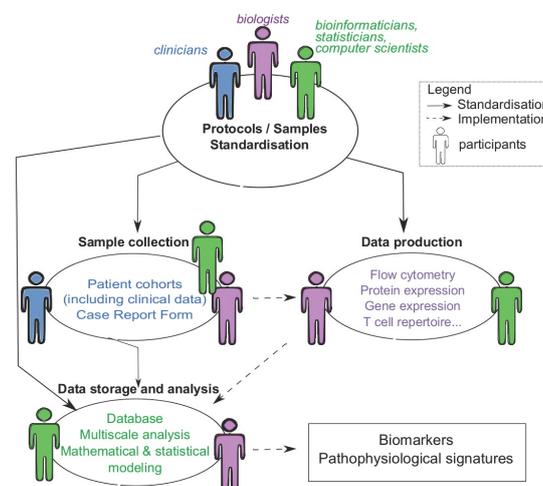
## METHODS AND ANALYSIS

### Study design and set-up

The multiple AIDs selected call for multiple medical specialties and together with the systems immunology approach to be implemented; this made the endeavour

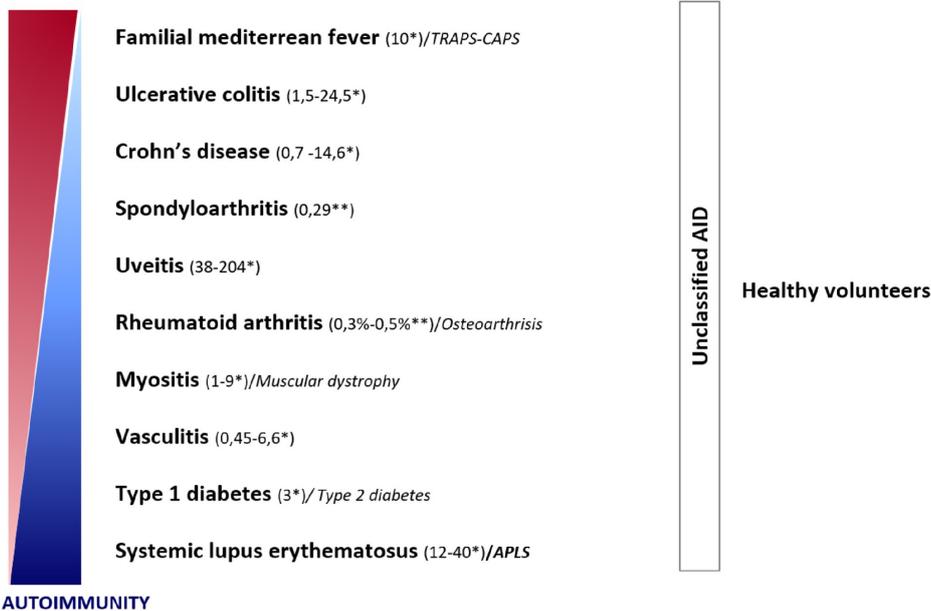
necessarily multidisciplinary. Therefore, to design the study, we assembled a multidisciplinary cohort management team (CMT) (figure 2), including a clinical expert consortium (CEC) from seven specialties, nurses, biologists, clinical trial methodologists, immunologists, computer scientists and bioinformaticians. We (1) selected the list of 19 AIDs representative of the AIDC and six related control diseases and included HV, (2) established the study protocol, (3) set up a uniform and controlled sample collection and shipment circuit and (4) designed and implemented a multidisease electronic case report form (e-CRF) and a multiomics database. Control diseases were selected as to contrast with the pathophysiology of the autoimmune and inflammatory diseases under study. They were chosen as having overlapping clinical manifestations but different pathophysiological mechanisms: (1) diseases with mainly an inflammatory versus an autoimmune driver (T2D vs T1D; osteoarthritis vs RA), (2) different genetic mutations (TNF-Tumor Necrosis Factor) Receptor Associated Periodic Fever - Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (TRAPS-CAPS) vs FMF), (3) genetic disease versus autoimmune disease of a given tissue (muscular dystrophy vs myositis) and (4) autoimmune disease that may arise as primary or secondary to other pathologies (primary antiphospholipid syndrome (APLS) vs SLE).

The study has been designed as a multidisease observational protocol of up to 1000 patients suffering from the list of selected diseases (see below). Patients are recruited and blood and faecal samples are collected once, at the time of a clinical evaluation.



**Figure 2** TRANSIMMUNOM multidisciplinary cohort management team (CMT). The figure represents the staff involved in the CMT grouped by major discipline (biologists (purple), clinicians (blue), bioinformaticians/statisticians/computer scientists (green)) and their respective role in the implementation of the different aspect of the study (ellipse). Tasks are described following disciplinary colour code described above.

### AUTOINFLAMMATION



### AUTOIMMUNITY

**Figure 3** TRANSIMMUNOM participant chart. This chart describes the TRANSIMMUNOM group of participants with respect to the autoinflammatory disease (AID) continuum. The TRANSIMMUNOM group is composed of patients affected by either one of the 10 AID families displayed in the chart or a control disease or an unclassified AID, as well from healthy volunteers (HV). Colour gradient bars represent the contribution of autoimmunity (blue) and autoinflammation (red) across the continuum. Each AID family is positioned along these gradients according to current knowledge, together with its respective prevalence (in parentheses) per 100 000 individuals in European Union (\*) or per 60 million individuals in France (\*\*) and, when applicable, the associated control diseases (italic). Unclassified AIDs appear across the continuum as the autoimmune/autoinflammatory processes proportions remained to be determined. HV are part of the TRANSIMMUNOM participants. Altogether the group is composed of 19 AIDs, including familial mediterranean fever, ulcerative colitis, Crohn's disease, spondyloarthritis, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, systemic lupus erythematosus, polymyositis, dermatomyositis, inclusion-body myositis and antisynthetase-related myositis (grouped into myositis), Churg-Strauss disease and granulomatosis with polyangiitis (vasculitis antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) related) and Behçet's disease, cryoglobulinaemia and Takayasu (vasculitis non-ANCA-related) (grouped into vasculitis family); six control diseases, including TRAPS/CAPS, osteoarthritis, muscular dystrophy, type 2 diabetes and antiphospholipid antibody syndrome (APLS) (adapted from McGonagle and Mc Dermott<sup>2</sup>).

Patients are recruited in the departments of Diabetology, Ophthalmology, Internal Medicine and Clinical Immunology at the Pitié-Salpêtrière Hospital, Rheumatology and Gastroenterology at the Saint-Antoine Hospital (Paris) and Internal Medicine at the Tenon Hospital. They are then screened and included by one of the two recruiting centres: Rheumatology at the Saint-Antoine Hospital and the Clinical Investigation Centre of Paris Est. A standard circuit for sample collection and shipment has been established and shared by the two recruiting centres. HV are selected based on internal records.

The study was done in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice. Written informed consent is obtained from all participants before enrolment in the study.

### Study population

The TRANSIMMUNOM participants comprise three groups: selected AIDs, control diseases and HV. The diseases were selected based on (1) their prevalence (rare and common) and (2) the degree of autoimmune and inflammatory components of the disease so as to cover the entire spectrum of the AIDC. Selected diseases are: FMF, ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD), SpA, uveitis, myositis (in particular, polymyositis, dermatomyositis, inclusion-body myositis, necrotising and antisynthetase-related myositis), vasculitis ANCA-related (Churg-Strauss disease and granulomatosis with polyangiitis (GWP)), vasculitis non-ANCA-related (such as Behçet's disease, cryoglobulinaemia, and Takayasu's disease), RA, T1D, SLE and unclassified AIDs. We also included control diseases such as TRAPS-CAPS for FMF,

APLS for SLE, osteoarthritis for RA, muscular dystrophy for myositis and T2D for T1D. Finally, HV were also included, stratified by age in four groups (18–30, 31–40, 41–50 and over 50 years old) and matched by sex in each group (figure 3). To be in line with the human diseases, we chose to recruit patients with heterogeneous clinical profiles and with various therapies (ie, immunosuppressive therapy, biotherapy or patient with no treatment). Diverse profiles are likely to enrich the cross-evaluation potential of our analysis and allow us to identify new molecular signatures and provide new hypotheses on underlying networks.

#### Inclusion and exclusion criteria

Participants must be over 18 years old, either diagnosed with one selected AID in the last 8 years or with one of the control disease or a healthy subject and covered by the French healthcare system. A participant is excluded if he/she is undergoing cancer chemotherapy, presents contraindications to donating blood (according to the guidelines of WHO<sup>11</sup>), is pregnant, is affected by a chronic lifelong viral infection unrelated to the disease or had an infectious event within the previous month. Informed consent is obtained from participants at the time of the inclusion visit. The study was approved by the regulatory authorities in June 2015. We aimed to include approximately 1000 patients. As an intermediary goal, we aim to include approximately 100 healthy controls, 300 patients with T1D and T2D and 200 patients with any of the selected AIDs, control diseases or unclassified diseases.

#### Sample and data collection

For each participant, an anonymised subject unification (ASU) number was generated based on hospital patient number (NIP) and French healthcare registration number (INSEE). ASU is a simple four-letter code one-way encrypted to guarantee safe anonymisation.

We collect 135 mL of blood for routine lab measurements and for multiomics assays. Patients are provided with a standardised kit (Metagenopolis, INRA, France) that allows easy collection of faecal samples and maintenance of their integrity during shipment before microbiota metagenomics studies.<sup>12</sup>

In a 1-day visit (lasting about 2.5 hour), we collect all samples and all clinical and biological data, which are stored in an in-house secure e-CRF (table 1). Common clinical data include demographic data, educational level, lifestyle, personal and family medical history, current and previous treatment, ECG and quality of life questionnaires. In addition, we collect disease-specific data, such as diagnostic criteria, specific activity score and clinical status and evaluation. The diagnostic criteria CRFs are used to record international validated criteria specific to each disease and features of unclassified AIDs. Specific activity scores were selected based on international guidelines: Auto-Inflammatory Diseases Activity Index for FMF,<sup>13</sup> simplified Mayo score for UC,<sup>14</sup> Harvey-Bradshaw

**Table 1** TRANSIMMUNOM data description and management

Data category	Data collected	Database
Common clinical data	Demographic data	eCRF
	Educational level and lifestyle Medical personal and familial history Current and previous treatments ECG Quality of life questionnaires and VAS Physical examination	
Disease-specific clinical data	Diagnostic criteria	eCRF
	Specific activity score Clinical status and evaluation	
Biological data	Routine biology Serological status Immunochemistry HLA	eCRF
Omics	Deep immunophenotyping Proteome Transcriptome T cell receptor Microbiome	Omics

eCRF, electronic case report form; HLA, human leucocyte antigen; VAS, visual analogue scale.

Index for Crohn's disease,<sup>15</sup> Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index for SpA,<sup>16</sup> Birmingham Vasculitis Activity Score for Churg-Strauss disease, cryoglobulinaemia and GWP,<sup>17</sup> vasculitis disease activity of National Institutes of Health for Takayasu's disease,<sup>18</sup> Disease Activity Score-28 for RA,<sup>19</sup> insulin dose-adjusted HbA1c for T1D<sup>20</sup> and the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index for SLE.<sup>19–21</sup> Immediately after collection, samples are shipped following standardised operating procedures to (1) dedicated routine laboratories for routine biology assays at the Pitié-Salpêtrière and Saint-Antoine Hospitals, (2) the Biotherapy Department for cell immunophenotyping and sorting as well as for serum cytokine analysis, (3) the Genetics Laboratory at the Trousseau Hospital for RNA and DNA extraction prior to transcriptomic and HLA analysis, respectively, and (4) the MGP laboratory for microbiome studies. The samples are processed the same day according to specific protocols.

#### Data integration and storage

The CMT selected, organised and standardised 865 clinical data and routine lab data on an e-CRF and integrated them using OpenClinica, a Code of Federal Regulations (CFR) 21—part 11 compliant electronic data capture tool.<sup>22</sup>

Once samples are collected and treated by the different laboratories, several million omics data are generated by using selected technologies and facilities and stored in a dedicated secure database, including deep-immunophenotyping data (circulating leucocyte subpopulations identified by flow cytometry, as an extension of our standardised

method for regulatory T cell monitoring<sup>33</sup>), proteomic, transcriptomic, T cell receptor repertoire and microbiome data. All the information is centralised on secured servers hosted by the investigator laboratory.

#### Data analysis strategy

Since TRANSIMMUNOM protocol is an open study, we will start analysing data progressively in order to first validate the methodologies selected (pilot study) and second to ensure sample quality and data robustness. Classical statistical analyses and modelling as well as integrative analyses will be used to identify potential biomarkers of disease as well as new therapeutic targets. As a general design, the analysis approach consist in (1) performing quality control on all the data collected using dedicated tools and solutions publicly available (including clinical data through a thorough eCRF monitoring and validation); (2) implementing supervised and classical statistical methods mastered in the team,<sup>24 25</sup> we will analyse parameter modulation (such as protein or gene expression level for cytokines and transcriptome, mean fluorescence intensity or percentage for immunophenotyping, diversity for microbiome and T cell receptor repertoire); (3) in parallel, we will implement unsupervised modelling methods publicly available or developed in the laboratory<sup>24 26–33</sup> in order to identify more complex or hidden parameter modulations within each type of data sets, such as signature discovery<sup>29 32 34</sup> and finally (4) once we will have complete multiparametric data sets for each subject, we will perform integrated analysis using methods relying on Regularised Generalised Canonical Correlation Analysis and variations,<sup>35–39</sup> dedicated to the analysis of structured data sets with the aim of deciphering their relationships. Lastly, biomarkers can be discovered without full knowledge of their biological meaning. This is well exemplified in cancer where resistance or sensitivity to chemotherapy can be predicted using biomarkers without understanding the underlying mechanisms. We will thus complete our pragmatic search for biomarkers by more supervised cognitive studies by collating results from our investigations with results in the literature.

These different analysis will be applied (1) between patients (regardless of the disease) and HV, (2) between patients (disease per disease) and HV and (3) between patients diagnosed with different diseases; including gender and age as a variable for stratification of the samples.

#### Patient and public involvement

Patients and public were not involved in the definition of the research question or the outcome measures nor the design of the study. There are no plans to disseminate the results of the research to study participants.

#### DISCUSSION

AIDs encompass a large panel of complex diseases with multifactorial aetiology. Recent molecular evidences suggest that some of these diseases share genetic and immune components,<sup>2–6</sup> which has been a real breakthrough in the

field. Indeed, most AIDs are diagnosed based on specific criteria related to symptoms and signs, which are usually subdivided into organ specific or systemic. However, it is known that many patients suffering from one AID (organ specific or systemic) may with time develop other symptoms and signs relating to a different organ, sometimes leading to the diagnosis of a second AID. Therefore, understanding the commonalities and specificities of AIDs at a molecular and cellular level appears to be essential if we are to propose better tolerated and more effective treatments for patients with AIDs. We describe here a multidisciplinary approach applied to the design, implementation and analysis of a trans-AIDs observational protocol.

Based on translational medicine, a CMT designed an innovative protocol that allowed the inclusion of patients currently followed up in different clinical departments and ensured the completeness and standardisation of data collection and integration. The centralisation of the omics analysis and the standardisation of the techniques (flow cytometry panel, molecular biology) provided a uniformity of results. The CMT, including the CEC, recruited researchers from different fields to select, design and integrate state-of-the-art standards in clinical medicine, medical biology measurements and science. All the data collected were finally integrated in an e-CRF (database) so as to share information between all the CMT members.

Compared with other systems immunology projects focusing mainly on biological aspects, TRANSIMMUNOM (1) also collects a large list of clinical data that have been coded so as to allow a cross-analysis between clinical and biological data; (2) analyses patients with different AIDs, control diseases and in HV and (3) investigates cross-talk between the immune system and gut microbiota, as there is robust evidence that the microbiota influences the immune system and vice versa.<sup>40–44</sup> TRANSIMMUNOM has the potential to provide fundamental knowledge about the pathophysiology of AIDs and to redefine their nosology. Indeed, we and others already showed the power of systems immunology to better understand biological processes associated with autoimmune and AID.<sup>24 26 28 30 45–49</sup> Systems immunology is now seen as the future for new biomarkers and therapeutic target discovery, validated in oncoimmunology.<sup>50–52</sup> With the advance of high-throughput data modelling and integrative analyses, it has been already shown that blood can be used to follow and even predict biological process undergoing in distant tissue.<sup>34 46 53–55</sup> We have no doubt that with the unprecedented endeavour and deep clinical and immune profiling to be achieved in TRANSIMMUNOM, we will contribute to identify new disease biomarkers and possibly new therapeutic targets.

#### Ethics and dissemination

The study was approved by the institutional review board of Pitié-Salpêtrière Hospital (ethics committee Ile-De-France 48–15) and done in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice. Written informed consent are obtained from all participants before enrolment in the study.

TRANSIMMUNOM's project website provides information about the protocol (<https://www.transimmunom.fr/en/>) including experimental set-up, tool developments and publications. Results will be disseminated through annual scientific committees appraising the project progresses, national and international scientific conferences, peer-reviewed journals, as well as through electronic, social, broadcast and print media. Medical school and Science University student will also be informed through lectures.

### Protocol status

Step 1 is completed. We are currently at Step 2. Recruitment started in July 2015 and is expected to include 1000 patients by December 2018. A pilot study on the first 96 samples has been set up and both clinical and omics data are currently being analysed. The protocol version currently in use is V.4.0 dated 19 May 2017.

### Author affiliations

<sup>1</sup>Immunology, Immunopathology, Immunotherapy (I3), Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

<sup>2</sup>Biotherapy (CIC-BTI) and Inflammation, Immunopathology, Biotherapy Department (I2B), Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>3</sup>Immunology Department, Saint-Antoine Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>4</sup>UFR 967, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>5</sup>Laboratoire de génétique, UMR S933, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

<sup>6</sup>Rheumatology Department, Saint-Antoine Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>7</sup>UMR S938, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

<sup>8</sup>Internal Medicine and Clinical Immunology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>9</sup>UMR 974, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>10</sup>Département Hospitalo-Universitaire Vision and Handicaps 'ViewMaintain', Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, Île-de-France, France

<sup>11</sup>Internal Medicine Department, Tenon Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>12</sup>UMR S933, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

<sup>13</sup>Diabetology Department, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, Île-de-France, France

<sup>14</sup>Gastroenterology Department, Saint-Antoine Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>15</sup>GRC-UPMC 03, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>16</sup>CIC-1421, Pharmacology Department, INSERM, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>17</sup>Unité de recherche clinique, UMR 942, Saint-Louis Lariboisière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

**Acknowledgements** All the authors thank the patients for having accepted to enter in this clinical protocol. We thank all the staff members involved in TRANSIMMUNOM protocol: Florence Levenez and Mylène Robinet of INRA for their involvement in microbiota collection and analyses; Camille Louvrier and Fawaz Awad for DNA and RNA extraction in the Genetics Laboratory at the Trousseau Hospital; Michelle Barbie, Cornelia Degbe, Nathalie Fery, Sylvain Porrot, Anne-Laure Raveu and Alexandra Roux for the management of immunological samples in the Biotherapy Department; Adela Mekouo-Tagne and Olivia Tran for the monitoring and the regulatory aspects of the study; Anne-Marie Chenier, Eric Dasque, Edith Guilloux, Françoise Joughannet, Celine Kocher, Laurence Koehl, Martine Lebot from Pitié-Salpêtrière CIC and the nurses of the Rheumatology Department of the Saint Antoine Hospital for management of the participants.

**Contributors** DK initiated and obtained the funding for the TRANSIMMUNOM project as a Laboratory of Excellence from the French National Research Agency

(ANR). RL, EM-F and DK wrote the manuscript with input from all the authors. SA, FB, PC, DS, AS and DK designed the TRANSIMMUNOM project. RL, FB, OB, BB, PC, GG, AH, DS, JS, PS and DK designed the study protocol. RL, CA, CR, FT, ID, SH and EM-F designed the e-CRF. EM-F, AS, MR and DK with input from FP, WC, ND and HS designed the scientific research approach. CJ provides the autoantibody assays and rationale for the selection of assays. RL, CR, ChA, JS and J-ES are in charge of patient recruitment. EV and CB were in charge of the regulatory aspects and EV led the monitoring of the study.

**Funding** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. TRANSIMMUNOM (LabEx), n° ANR-11-IDEX-0004-02.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** Ethics committee Ile De France 48-15.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

### REFERENCES

- Walsh SJ, Rau LM. Autoimmune diseases: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. *Am J Public Health* 2000;90:1463-6.
- McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med* 2006;3:e297.
- Doria A, Zen M, Bettio S, et al. Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmun Rev* 2012;12:22-30.
- Ciccarelli F, Martinis M, Ginaldi L. An update on autoinflammatory diseases. *Curr Med Chem* 2013;21:261-9.
- Magyari L, Varszegi D, Kovesci E, et al. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World J Orthop* 2014;5:516-36.
- Moran EM, Mastaglia FL. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications. *Clin Exp Immunol* 2014;178:405-15.
- Querec TD, Akondy RS, Lee EK, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;10:116-25.
- Poland GA, Quill H, Toghias A. Understanding the human immune system in the 21st century: the Human Immunology Project Consortium. *Vaccine* 2013;31:2911-2.
- Thomas S, Rouilly V, Patin E, et al. The Milieu Intérieur study – an integrative approach for study of human immunological variance. *Clin Immunol* 2015;157:277-93.
- Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized whole-blood transcriptional profiling enables the deconvolution of complex induced immune responses. *Cell Rep* 2016;16:2777-91.
- WHO. WHO | WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. [http://www.who.int/infection-prevention/publications/drawing\\_blood\\_best/en/](http://www.who.int/infection-prevention/publications/drawing_blood_best/en/) (accessed 15 Sep 2017).
- International Human Microbiome Standards (IHMS) project. <http://www.microbiome-standards.org/>.
- Piram M, Koné-Paut I, Lachmann HJ, et al. Validation of the auto-inflammatory diseases activity index (AIDAI) for hereditary recurrent fever syndromes. *Ann Rheum Dis* 2014;73:2168-73.
- Lewis JD, Chuai S, Nessel L, et al. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1660-6.
- Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet Lond Engl* 1980;1:514.
- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-91.
- Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, et al. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). *Arthritis Rheum* 2001;44:20:912.
- Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med* 1994;120:919-29.
- van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step



- in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis* 1990;49:916–20.
20. Mortensen HB, Hougaard P, Swift P, *et al*. New definition for the partial remission period in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1384–90.
  21. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, *et al*. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630–40.
  22. Lorenzon R, Drakos I, Ribet C, *et al*. Clinical data specification and coding for cross-analyses with omics data in autoimmune disease trials. *bioRxiv*. (Epub ahead of print 5 Jul 2018).
  23. Pitoiset F, Barbé M, Monneret G, *et al*. A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials. *Cytometry B Clin Cytom* 2018 (Epub ahead of print 6 Jan 2018).
  24. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, *et al*. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–77.
  25. Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, *et al*. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013;1:295–305.
  26. Allenbach Y, Chaara W, Rosenzweig M, *et al*. Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis. *PLoS One* 2014;9:e88788.
  27. Terrier B, Chaara W, Dufat L, *et al*. Serum biomarker signature identifies patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma associated with cryoglobulinemia vasculitis in chronic HCV infection. *Autoimmun Rev* 2014;13:319–26.
  28. Terrier B, Geri G, Chaara W, *et al*. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2001–11.
  29. Pham HP, Dérian N, Chaara W, *et al*. A novel strategy for molecular signature discovery based on independent component analysis. *Int J Data Min Bioinform* 2014;9:277–304.
  30. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, *et al*. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun* 2015;58:48–58.
  31. Bergot AS, Chaara W, Ruggiero E, *et al*. TCR sequences and tissue distribution discriminate the subsets of naïve and activated/memory Treg cells in mice. *Eur J Immunol* 2015;45:1524–34.
  32. Nehar-Belaid D, Courau T, Dérian N, *et al*. Regulatory T cells orchestrate similar immune evasion of fetuses and tumors in mice. *J Immunol* 2016;196:678–90.
  33. Plessy C, Mariotti-Ferrandiz E, Manabe R, *et al*. High throughput analysis of T cell antigen receptor sequences. *Biorxiv* 2015.
  34. Chaussabel D, Quinn C, Shen J, *et al*. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2008;29:150–64.
  35. Tenenhaus A, Tenenhaus M. Regularized generalized canonical correlation analysis. *Psychometrika* 2011;76:257–84.
  36. K-Al C, Rohart F, Gonzalez I, *et al*. mixOmics: Omics Data Integration Project. 2017 <https://cran.r-project.org/web/packages/mixOmics/index.html>.
  37. Tenenhaus A, Tenenhaus M. Regularized generalized canonical correlation analysis for multiblock or multigroup data analysis. *Eur J Oper Res* (Epub ahead of print Jan 2014).
  38. Tenenhaus A, Philippe C, Guillemot V, *et al*. Variable selection for generalized canonical correlation analysis. *Biostatistics* 2014;15:569–83.
  39. Tenenhaus A, Philippe C, Frouin V. Kernel generalized canonical correlation analysis. *Comput Stat Data Anal* 2015;90:114–31.
  40. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268–73.
  41. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014;157:121–41.
  42. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol* 2015;36:3–12.
  43. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, *et al*. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013;500:232–6.
  44. Kato LM, Kawamoto S, Maruya M, *et al*. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev* 2014;260:67–75.
  45. Terrier B, Bièche I, Maisonnobe T, *et al*. Interleukin-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome. *Blood* 2010;116:4523–31.
  46. Brosius FC, Ju W. The promise of systems biology for diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2018;25:202–13.
  47. Burel JG, Apte SH, Doolan DL. Systems approaches towards molecular profiling of human immunity. *Trends Immunol* 2016;37:53–67.
  48. Huan T, Zhang B, Wang Z, *et al*. A systems biology framework identifies molecular underpinnings of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1427–34.
  49. Cervantes-Gracia K, Husi H. Integrative analysis of multiple sclerosis using a systems biology approach. *Sci Rep* 2018;8:5633.
  50. Zhao H, Li H. Network-based meta-analysis in the identification of biomarkers for papillary thyroid cancer. *Gene* 2018;661:160–8.
  51. Irigoyen A, Jimenez-Luna C, Benavides M, *et al*. Integrative multi-platform meta-analysis of gene expression profiles in pancreatic ductal adenocarcinoma patients for identifying novel diagnostic biomarkers. *PLoS One* 2018;13:e0194844.
  52. Moon M, Nakai K. Integrative analysis of gene expression and DNA methylation using unsupervised feature extraction for detecting candidate cancer biomarkers. *J Bioinform Comput Biol* 2018;16:1850006.
  53. Greenberg SA. Biomarkers of inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:753–62.
  54. Chiche L, Jourde-Chiche N, Whalen E, *et al*. Modular repertoire analysis identifies complex coordinated type I-type. *Ann Rheum Dis* 2014;73:98–9.
  55. Aghaeepour N, Ganio EA, McIlwain D, *et al*. An immune clock of human pregnancy. *Sci Immunol* 2017;2:eaan2946.

**4.1.4 Article 2 « Clinical data specification and coding for cross-analyses with omics data in autoimmune disease trials »**

1 Clinical data specification and coding for cross-analyses with omics data in  
2 autoimmune disease trials.

3

4 Lorenzon Roberta<sup>1,2\*</sup>, Drakos Iannis<sup>1,2\*</sup>, Claire Ribet<sup>2</sup>, Sophie Harris<sup>2</sup>, Cordoba Maeva<sup>2</sup>, Tran  
5 Olivia<sup>3</sup>, Dasque Eric<sup>4</sup>, Cacoub Patrice<sup>5,1,2</sup>, Hartemann Agnes<sup>6,2</sup>, Bodaghi Bahram<sup>7,1</sup>, Saadoun  
6 David<sup>5,1,2</sup>, Berenbaum Francis<sup>8,2</sup>, Grateau Gilles<sup>9,2</sup>, Ronco Pierre<sup>10,2</sup>, Benveniste Olivier<sup>11,2</sup>,  
7 Mariampillai Kuberaka<sup>11,2</sup>, Sellam Jeremie<sup>8,2</sup>, Seksik Philippe<sup>12,2</sup>, Rosenzwajg Michelle<sup>1,2</sup>, Six  
8 Adrien<sup>1,2</sup>, Bernard Claude<sup>2</sup>, Aheng Caroline<sup>2</sup>, Vicaut Eric<sup>3</sup>, Klatzmann David<sup>1,2,\*\*</sup>, Mariotti-  
9 Ferrandiz Encarnita<sup>1,2\*\*</sup>

10 \*,\*\* these authors equally contributed to the work

11 <sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR S 959, Immunology-Immunopathology-  
12 Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France;

13 <sup>2</sup> Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU  
14 i2B), Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75651, Paris, France;

15 <sup>3</sup> Unité de recherche clinique, UMR 942, Univ Paris 07, Hôpitaux Saint Louis Lariboisière,  
16 APHP, Paris, France;

17 <sup>4</sup> CIC-1421, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France;

18 <sup>5</sup>UMR 974, UPMC, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Hôpital Pitié-  
19 Salpêtrière, AP-HP, Paris, France;

20 <sup>6</sup>Department of Diabetology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, France; Faculty of Medicine,  
21 Sorbonne Université; Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France;

22 <sup>7</sup>Département Hospitalo-Universitaire Vision and Handicaps 'ViewMaintain', Pitié-  
23 Salpêtrière University Hospital, Paris, France

24 <sup>8</sup>Department of Rheumatology, Sorbonne Université, INSERM UMR\_S938, Hôpital Saint-  
25 Antoine, APHP, Paris, France;

26 <sup>9</sup>Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 933, Department of Internal Medicine Hôpital  
27 Tenon, APHP, Paris, France;

28 <sup>10</sup>Sorbonne Université; INSERM, UMR\_S 1155, Paris, France; Hôpital Tenon, AP-HP,  
29 Department of Nephrology and Dialysis, Paris, France;

1

30 <sup>11</sup>UMR 974, UPMC, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Hôpital Pitié-  
31 Salpêtrière, AP-HP, Paris, France;

32 <sup>12</sup>Department of Gastroenterology, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, and GRC-UPMC 03,  
33 Sorbonne Université, Paris, France;

34

35 Keywords: multi-disease; harmonization; clinical trial; clinical coding

36

37 **ABSTRACT**

38 **Objectives:** Autoimmune and inflammatory diseases (AIDs) form a continuum of  
39 autoimmune and inflammatory diseases, yet AIDs' nosology is based on syndromic  
40 classification. The TRANSIMMUNOM trial (NCT02466217) was designed to re-evaluate AIDs  
41 nosology through clinic-biological and multi-omics investigations of patients with one of 19  
42 selected AIDs. To allow cross-analyses of clinic-biological data together with omics data, we  
43 needed to integrate clinical data in a harmonized database. **Materials and Methods:** We  
44 assembled a clinical expert consortium (CEC) to select relevant clinic-biological features to  
45 be collected for all patients and a cohort management team comprising biologists, clinicians  
46 and computer scientists to design an electronic case report form (eCRF). The eCRF design  
47 and implementation has been done on OpenClinica, an open-source CFR-part 11 compliant  
48 electronic data capture system. **Results:** The CEC selected 865 clinical and biological  
49 parameters. The CMT selected coded the items using CDISC standards into 5835 coded  
50 values organized in 28 structured eCRFs. Examples of such coding are check boxes for  
51 clinical investigation, numerical values with units, disease scores as a result of an automated  
52 calculations, and coding of possible treatment formulas, doses and dosage regimens per  
53 disease. **Discussion:** 21 CRFs were designed using OpenClinica v3.14 capturing the 5835  
54 coded values per patients. Technical adjustment have been implemented to allow data  
55 entry and extraction of this amount of data, rarely achieved in classical eCRFs designs.  
56 **Conclusions:** A multidisciplinary endeavour offers complete and harmonized CRFs for AID  
57 clinical investigations that are used in TRANSIMMUNOM and will benefit translational  
58 research team.

59

60

## 61 **1 BACKGROUND AND SIGNIFICANCE**

62 Autoimmune and auto-inflammatory diseases (AID) are the third cause of morbidity and  
63 mortality in the world <sup>1</sup>. The development of more effective and better tolerated treatments  
64 for these chronic and severely disabling diseases is an important public health issue.  
65 Recently, genetic studies have highlighted altered biological processes that are common to  
66 several AIDs<sup>2</sup>, and others studies have shown that an imbalance between effector T cells  
67 and regulatory T cells resulting in the rupture of immune tolerance is associated with AIDs<sup>3-</sup>  
68 <sup>6</sup>. This collection of evidence is in line with the proposed reclassification of AIDs to form a  
69 continuum of diseases ranging from pure autoimmune to pure inflammatory diseases with a  
70 number of diseases displaying variable degrees of both autoimmune and inflammatory  
71 disorders <sup>7</sup>. This is further sustained by immune markers common to several diseases, such  
72 as cytokines, which are currently targeted in therapeutics <sup>8,9</sup>. The complexity of these  
73 diseases, due to the various genetic and environmental factors as well as patient  
74 heterogeneity, prompted the scientific community to reconsider research practices with a  
75 view to a more integrative approach. In particular, AIDs are associated with multiple and  
76 variable immune-related disorders, including dysregulation of the innate immune response  
77 or of the adaptive immune response or of both. Systems biology approaches raise the hope  
78 that a more comprehensive understanding of cells and tissues in health and disease will  
79 open up new avenues for the treatment of patients <sup>10,11</sup>. These approaches will transform  
80 disease taxonomies from syndromic classification to molecular classification, and their  
81 combination, and will allow physicians to select optimal therapeutic regimens for individual  
82 patients <sup>12</sup>. Recent studies have successfully identified molecular signatures associated with  
83 specific autoimmune diseases <sup>4,13-16</sup> as well as in physiological and pathological contexts <sup>17-</sup>  
84 <sup>19</sup>.

85 Those results led us to setup an observational clinical trial, TRANSIMMUNOM,  
86 (NCT02466217) the main goal of which was to revisit the nosology of AIDs through a  
87 systems immunology approach. TRANSIMMUNOM participants include patients diagnosed  
88 with one out of 19 selected AIDs or one out of 5 control diseases (Figure 1), and healthy  
89 donors with no history of autoimmune disorders. The systems immunology approach used a  
90 multi-scale deep immunophenotyping on peripheral blood (including transcriptome, TCR  
91 repertoire, cytokine expression) and microbiome NGS studies. Importantly, classic routine

92 biology assays as well as clinical investigations are fully part of the data collection strategy.  
93 Our aim was to integrate all these data (biology, routine biology and clinical data) so as to  
94 allow further cross-analysis of all patients and data to better characterize the immunome of  
95 each patient regardless of the initial diagnosis. A similar strategy was initiated by the  
96 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) under the Human Immunology  
97 Project Consortium.

## 98 **2 OBJECTIVES AND OUR CONTRIBUTION**

99 Therefore, we needed to develop data integration approaches to efficiently record and  
100 store collected data such that we could easily analyze them afterwards through  
101 computational biology approaches. The first challenges of the project were to implement a  
102 comprehensive case report form (CRF) covering all diseases in terms of clinical data and  
103 biomarkers and to provide a user-friendly, vocabulary-controlled and not expensive  
104 platform with standard vocabulary to record all data collected by the clinical assistant during  
105 patient interviews. To meet these challenges, we assembled the multidisciplinary “Cohort  
106 Management Team (CMT)” composed of clinicians from different specialties, nurses, biology  
107 medical doctors, clinical trial methodologists, immunologists and computer scientists.  
108 Here we present our electronic CRF (eCRF), designed using an open-source electronic data  
109 capture (EDC) tool, capturing more than 5000 multiparametric coded values from 865  
110 harmonized clinical and biological parameters per subject included in a multi-disease clinical  
111 trial focusing on 24 diseases, 22 areas of clinical investigation and one vast set of routine  
112 biology assays. Altogether, we believe that this effort could be of interest for small cohort  
113 studies for which the commercially available eCRF services are not accessible.

## 114 **3 MATERIAL AND METHODS**

### 115 **3.1 Study population**

116 Patients with one of the following AIDs, of the AID continuum are recruited for  
117 TRANSIMMUNOM trial (Figure 1): familial mediterranean fever (FMF), ulcerative colitis,  
118 Crohn’s disease, spondyloarthritis, uveitis, myositis (polymyositis, dermatomyositis,  
119 inclusion-body myositis, necrotizing and anti-synthetase related myositis), ANCA-related

120 vasculitis (Churg-Strauss' disease and granulomatosis with polyangiitis (ex Wegener), non-  
121 ANCA-related vasculitis (such as Behçet's disease, cryoglobulinaemia and Takayasu),  
122 rheumatoid arthritis (RA), type-1-diabetes and systemic lupus erythematosus (SLE). We also  
123 included patients with diseases exhibiting symptoms similar to those of some AIDs but  
124 linked to different gene mutations (control diseases), such as TRAPS and CAPS as a control  
125 for FMF, or diseases with a similar autoimmune mechanism with overlapping  
126 clinical/biological features, such as antiphospholipid syndrome (APLS) as a control of for SLE,  
127 or degenerative diseases that do not have the same mechanism as AIDs such as  
128 osteoarthritis for RA and muscular dystrophy for myositis. Finally, healthy volunteers are  
129 included.

### 130 **3.2 Cohort Management Team**

131 Set up to interact with a Clinical Expert Consortium (CEC), a Cohort Management Team  
132 (CMT) of biological experts, routine laboratory personnel, clinical trial methodologists and  
133 clinical investigation centre harmonized the clinical and laboratory outcomes/results. The  
134 CMT ensured that all required data are collected in an appropriate format for analyses and  
135 that the questions are unambiguous. The computer scientist defined the data and metadata  
136 structure required to minimize non-controlled data entry and to specify the expected  
137 values. The overall design was supervised by an immunologist involved in the scientific part  
138 of the clinical trial, who liaised between the clinicians and the computer scientist.

### 139 **3.3 Data collection for eCRF design and coding**

140 Each clinician received an Excel form to be filled in with the description of the item to be  
141 recorded in a standardized manner: item ID, item value type (string, decimal); list of pre-  
142 determined item values; item value unit (if applicable); item value range (if applicable).  
143 Afterwards, all the data collected from the different specialties were grouped and  
144 harmonized using CDISC standards.

### 145 **3.4 OpenClinica implementation**

146 Given the amount of data to be collected across 19 AIDs and 5 control diseases, OpenClinica  
147 v3.14, an open-source CFR-part 11 compliant electronic data capture platform has been  
148 selected for the design and capture of selected clinico-biological data. A test and production

149 instances have been installed on dedicated and secured CentOS virtual machines with 16Go  
150 RAM, 8 cores and 15 Go disk space each. OpenClinica's application server (Tomcat v9.0.6)  
151 and database server (PostgreSQL v.9.5) parameters have been upgraded to fit multiple  
152 simultaneous data entry and data extraction, in particular JAVA\_OPTS for heap memory  
153 have been upgraded to 8 Go instead of 1Go Mo by default.

### 154 **3.5 Patient anonymization**

155 To have completely anonymized subjects who are also unique (no double entries for the  
156 same subject in our database because of anonymity) we developed the Anonymized Subject  
157 Unification (ASU) system as a completely autonomous system that can be used for any  
158 clinical trial. Briefly, ASU takes advantage of a unique identifier of each subject (like Paris  
159 Hospital patient number [NIP] or French healthcare registration number [INSEE]) to produce  
160 a simple 4-letter code by using a one-way encryption technique.

## 161 **4 RESULTS**

### 162 **4.1 OpenClinica as the compromise in designing a multi-disease**

#### 163 **eCRF**

164 The TRANSIMMUNOM observational trial targeted recruitment of 1,000 patients suffering  
165 from one out of 24 diseases and healthy controls. During a single visit, patient medical  
166 history and clinical investigations are performed together with the collection of samples  
167 (blood, serum and feces) for further multi-omics analyses. The goal of the trial is to revisit  
168 the nosology of AIDs by defining groups/clusters of patients based on clinical and molecular  
169 signatures that cut across disease classification. To deal with the expected amount of  
170 heterogeneous (such as disease severity scores, imaging data, biological measures) from  
171 routine clinical investigations, and to allow the cross-evaluation of clinical and omics data,  
172 we needed to develop an eCRF with a system that allows further omics data integration. We  
173 selected OpenClinica (OC) as an electronic data capture (EDC) tool to support our eCRF  
174 design. OC is an open-source CRF-part 11 compliant EDC able to design complex eCRFs for  
175 large studies<sup>20,21</sup>. One of the major features of OC is to rely on Clinical Data Acquisition  
176 Standards Harmonization (CDASH) from the Clinical Data Interchange Standards Consortium

177 (CDISC)<sup>22</sup>, which allows the harmonization of clinical and biological data coding. Finally, OC  
178 includes the mandatory validation of all recorded data to ensure data quality<sup>20</sup>. In addition,  
179 the main strategy of TRANSIMMUNOM is to cross-analyze data from multiple AIDs, each of  
180 which is usually characterized by particular clinical investigation records and biological data  
181 measures. We anticipated the final cross-analysis, which would require the same  
182 information for all the diseases. Finally, the eCRF had to follow regulatory guidelines and  
183 Good Clinical Practices to ensure data entry, traceability and integrity throughout the  
184 patient recruitment period. Although installation and implementation of OC is not trivial, as  
185 it requires computer science expertise and time, we decided to favour the landscape of  
186 possibilities offered by OC to fulfil our study requirement.

#### 187 **4.2 A multidisciplinary workflow ensuring the design of a robust** 188 **multi-disease eCRF**

189 Expertise in different but converging fields was pooled in the CMTs, each of which  
190 participated in a 3-step workflow to (1) define the protocol, (2) design and (3) validate the  
191 eCRF (Figure 2). The first step of protocol definition involved a Clinical Expert Consortium  
192 (CEC) to define the list of items for all the patients with the aim of collecting exactly the  
193 same information regardless of the disease. All the clinical specialists together selected a  
194 sample of items per specialty so that the CRF was reasonably comprehensive and synthetic.  
195 Biology lab experts were also questioned to ensure the feasibility of sample drawing and of  
196 the required biology assays. Upon collection and validation of the actual items to be  
197 recorded, the specification of the database started with the design of an e-template where  
198 the computer scientist structured the information for each item by imposing the format of  
199 the data and metadata. Once the e-template was defined, we proceeded to the eCRF  
200 design: the CEC, in close collaboration with the computer scientist, designed the clinical  
201 coding of clinical investigation data following an unambiguous format for each item with  
202 maximized use of a predefined list of responses in order to avoid erroneous data entry.  
203 Biology lab experts defined for each parameter measured the value type (string, integer,  
204 decimal, Boolean), as well as the unit and range, when applicable. All the information was  
205 summarized in a spreadsheet and converted by the computer scientist into a PostgreSQL  
206 relational database following the OpenClinica structure. Finally, clinical research technicians

207 evaluated the user-friendliness of the eCRF, the clinical research assistant evaluated the  
 208 item relationship constraints, and finally the CMT validated the eCRF with a patient “Zero”  
 209 simulation before release for production.

### 210 4.3 An integrated multi-disease eCRF

211 As AIDs belong to different medical specialities, the CEC comprised clinicians working in  
 212 rheumatology, internal medicine, gastroenterology, diabetology, ophthalmology, medical  
 213 biology, nephrology and genetics who ensured the feasibility of data collection in terms of  
 214 cost, patient morbidity and examination invasiveness. The list of information to be collected  
 215 for all the participants was organized in 4 categories. For each recorded item, we defined  
 216 the type of value such as free text field, free numerical field, automated calculation, check-  
 217 box, drop-down list and calendar/date field (Figure 3). The first group of CRFs was built  
 218 under the “Patient description” category and included classic clinical information required  
 219 to assess the biology and social environment of the patient. Altogether, we selected 70  
 220 items organized as 7 CRFs (Figure 3A & Supplementary material). Each CRF collects 4 to 30  
 221 different items. The second set of CRFs focuses on “Common clinical monitoring” and was  
 222 organized as 5 CRFs collecting generic clinical data at the day of the visit and accounting in  
 223 all for 88 items (Figure 3B & Supplementary material). The third category explore the  
 224 “Routine biology monitoring” (Figure 3C, Supplementary material & Table 1) and covered a  
 225 wide spectrum of tests.

Hematology	Biochemistry	Protein electrophoresis	Urine analysis	Immunochemistry	Genetic	Serology
Basophils	25-OH Vitamin D	Albuminemia	Creatinuria	ANA	B cell clonality	HIV
Eosinophils	Alkaline phosphatases	Alpha 1 globulin	Hematuria	ANCA	HLA27	
ESR	ALT	Alpha 2 globulin	Proteinuria	Anti-CCP	HLA51	
Ferritin	AST	Beta globulin		Anti-dsDNA	HLADR4	
Hematocrite	Calcium	Gamma globulin		Anti-EJ	HLADR8	
Hemoglobin	CH50	Protein electrophoresis peaks		Anti-ENA		
Iron	Cholesterol			Anti-GAD		
Leucocytes	C-Peptide			Anti-HM CR		
Lymphocytes	CPK			Anti-IA2		
MCH	Creatinine			Anti-Jo1		
MCHC	Dyslipidemia			Anti-OJ		
MCV	GGT			Anti-PL12		
Monocytes	Glycemia			Anti-PL7		
Neutrophils	HDL			Anti-SRP		
Platelet	LDL			Anti-ZNT8		
Red blood cells	Phosphate			ASCA		
Transferrin	Triglycerides			C3		
Transferrin saturation	us-CRP			C4		
				CH50		
				Cryoglobulin		
				Anti-KU		
				Anti-MAD5		
				Anti-MI2		

				Anti-PM/Scl Rheumatoid factor Anti-TIF 1 gamma Anti-RNP		
--	--	--	--	--	--	--

226 **Table 1: List of routine biology assay in the TRANSIMMUNOM trial**

227 Table abbreviation legend: ALT - alanine aminotransferase, ANA - antinuclear antibodies, ANCA - anti-  
 228 neutrophil cytoplasmic antibodies, Anti-CCP - anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, Anti-dsDNA - Anti-  
 229 double stranded DNA antibodies, Anti-EJ - anti-glycyl-transfer RNA synthetase antibodies, Anti-ENA - anti-  
 230 extractable nuclear antigens antibodies, Anti-GAD - anti-glutamic acid decarboxylase antibodies, Anti-HMGCR -  
 231 anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies, Anti-IA2 - anti-Islet antigen-2 antibodies,  
 232 Anti-Jo1 - anti-histidyl tRNA synthetase antibodies, Anti-Ku - anti- Ku antigen antibodies, Anti-MDA5 -  
 233 melanoma differentiation-associated gene 5 antibodies, Anti-MI2 - anti-Mi-2 antibodies, Anti-OJ - anti-  
 234 isoleucyl-tRNA synthetase antibodies, Anti-PL7 - anti-threonyl-tRNA synthetase antibodies, Anti-PL12 - anti-  
 235 alanyl-tRNA synthetase antibodies, Anti-PM/Scl - anti- nucleolar macromolecular complex PM/Scl, Anti-RNP -  
 236 anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies, Anti-SRP - anti-signal recognition particle antibodies, Anti-TIF1-  
 237 gamma - anti-transcriptional intermediary factor 1-gamma antibodies, Anti-ZnT8 -anti-zinc transporter 8  
 238 antibodies, ASCA - anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, AST - aspartate aminotransferase, C3 -  
 239 complement fraction 3, C4 - complement fraction 4, CH50 - total complement activity, CPK - Creatinine  
 240 phosphokinase, ESR - erythrocyte sedimentation rate, GGT - gamma-glutamyl transferase, HDL - high-density  
 241 lipoprotein, HIV - Human Immunodeficiency Virus, HLA-B27-B51-DR4-DR8 Human leukocyte antigen -B27-B51-  
 242 DR4-DR8, LDL - low-density lipoprotein, MCH - mean corpuscular haemoglobin, MCHC - mean corpuscular  
 243 hemoglobin concentration, MCV - mean corpuscular volume, us-CRP - ultrasensitive c-reactive protein.  
 244

245 These included biological assessment of organ function (liver, kidney, bone marrow) and of  
 246 inflammation state and safety, organized in 6 CRF and covering 91 parameters. Finally, the  
 247 last set of CRFs recorded “Disease-specific monitoring” data and was subdivided into 3 CRFs  
 248 (Figure 3D & Supplementary material) capturing 616 items, including disease activity scores  
 249 as described in Table 2. This is thought to be as wide as possible in identifying clinical  
 250 parameters not usually collected in a particular disease including imaging and histology  
 251 features to allow the identification of disease profile, disease severity and features possibly  
 252 shared by diseases. Each clinician of the CEC identified a collection of features observed in  
 253 his/her specialty as classic or rare parameters. The CMT gathered all the parameters from  
 254 the different specialties and listed them in the clinical status and clinical evaluation CRFs.  
 255 Altogether, we selected 865 parameters to describe each patient regardless of the disease.

Disease	Diagnostic criteria	Activity score
Familial Mediterranean Fever/TRAPS/CAPS	Heller <sup>23</sup> <i>Gene mutation: MEFV; TNFRSF1; NLRP3</i>	AIDAI <sup>24</sup>
Ulcerative colitis	clinical and histological features	Mayo <sup>25</sup>
Crohn’s disease	clinical and histological features	HBI <sup>26</sup>

Spondyloarthritis	ASAS <sup>27</sup> Modified New-York criteria <sup>28</sup>	BASDAI <sup>29</sup>
Uveitis	non-infectious uveitis	NA
Myositis/dystrophy	clinical and biological	NA
Vasculitis	<u>Behcet's disease</u> ICBD <sup>30</sup> <u>Churg-Strauss</u> ACR <sup>31</sup> <u>Cryoglobulinemia</u> <sup>32</sup> <u>Wegener</u> ACR <sup>33</sup>  <u>Takayasu</u> ACR <sup>34</sup>	BVAS <sup>35</sup>          NIH <sup>36</sup>
Rheumatoid Arthritis	ACR; EULAR <sup>37</sup>	DAS-28 <sup>39</sup>
Osteoarthritis	Kellgren-Lawrence <sup>38</sup>	
Type-1-Diabetes	ADA <sup>40</sup>	IDAA1C <sup>41</sup>
Systemic Erythematosus /	Lupus ACR <sup>42,43</sup>	SLEDAI <sup>45,46</sup>
Anti-phospholipid syndrome	Sapporo <sup>44</sup>	

256 **Table 2: Disease specific diagnostic criteria and activity score**

#### 257 **4.4 Clinical coding and CDASH harmonization**

258 Because of the heterogeneity of the selected parameters, clinical coding was designed as an  
 259 unambiguous format based on CDASH standards with maximized use of a predefined list of  
 260 responses, and was developed as a pragmatic, clinically-validated medical terminology with  
 261 an emphasis on ease-of-use data entry, retrieval and data analysis. We therefore defined  
 262 and validated for each parameter, wherever possible, the data-type (numerical, text, date,  
 263 predefined lists of options, value ranges) and units (when applicable) for all the parameters  
 264 identified in order to harmonize the information regardless of the collection time and  
 265 person and to avoid errors due to mistyping. Examples are Yes/No check boxes for clinical

266 investigation, numerical values with a list of relevant units according to the parameter,  
 267 disease scores as a result of the automated sum of several scores, treatment description  
 268 including the coding of possible formulas, doses and dosage regimens (Table 3). We then  
 269 coded all the possible/expected values that each item could take and identified 1 to 8  
 270 possible variables per item coded as one of the value type. This work was especially critical  
 271 for the description of patient treatments. The list of all possible treatments regimen within  
 272 each specialty was fully generated with clinicians and is available in the database as a menu  
 273 list of 637 variables. Altogether, we built a database with 3815 uniquely coded variables.  
 274 However, since clinical status and evaluation of several diseases share identical CRFs, we  
 275 reached 5835 possible variables per patient. Altogether, we designed a collection of 21  
 276 CDASH harmonized CRFs recording 865 parameters with 5835 coded variables systemically  
 277 for all the patients and healthy donors included in the TRANSIMMUNOM trial.

eCRF	Coded question	Coded answer	Value type
Medical History	Medical parameter > AID family history	Presence YES or NO	<input type="checkbox"/>
Hematology	Clinical parameter > Leucocyte count	Numerical (min-max)   unit Decimal (4 - 10)   10 <sup>9</sup> /L	<input type="text" value="123"/>
Specific activity score	Disease > Ulcerative colitis	Disease score calculation Mayo Score (Sum of 3 scores)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Treatment	Medicine name > Azathiopine	Formula   Dosage   Posology Tablet   25/50 mg   1/2/3mg/kg/day	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="123"/> <input type="text" value="abc"/>

278 **Table 3: Clinical item coding**  
 279 For 5 exemplary eCRF, a coded question and expected coded answer are described with the type of values to  
 280 be entered following Figure 3 legend.

## 281 5 DISCUSSION

282 Clinical data management is of utmost importance for any clinical study. This includes  
 283 clinical information collection, validation and storage, usually completed through the use of  
 284 CRFs. While generally clinical research organizations (CROs) propose and use eCRFs, most  
 285 academic sponsored clinical studies still take advantage of the cost-benefit of paper versions  
 286 of CRFs, sometimes in combination with Excel based databases<sup>20</sup>. However, such tools,  
 287 although convenient, lack validation and data traceability. In addition, they do not usually

288 use harmonized vocabulary and allow free text data entry. These drawbacks were  
289 particularly counterproductive in our multi-disease clinical trial from several points of view.  
290 First, the main goal of our trial is cross-analysis of multi-omics data obtained with clinical  
291 and lab biology data from 1,000 patients selected for one out of 24 AIDs or control diseases.  
292 Therefore, we needed an efficient and homogenized set of clinical and routine biology lab  
293 for all the patients, which led to the selection of 865 parameters and to the coding of more  
294 than 5000 values. This vast amount of data would have been unmanageable using classic  
295 paper CRFs and spreadsheets. Second, the amount of information to be collected requires a  
296 thorough validation with automated rules and limited free text data entry to avoid  
297 mistyping and errors. Again, this cannot be handled using classic methods. Third, for cross-  
298 analysis, we need to be able to extract clinical and routine biology data efficiently so that we  
299 can filter for parameters as variables of interest (such as gender, BMI, disease activity,  
300 autoantibody level). Again, considering the number of patients to be recruited in the  
301 TRANSIMMUNOM trial, this would have been impossible. And finally, as regards the disease  
302 heterogeneity, it would have been too expensive and complicated to ask an eCRF provider  
303 to design such integrated CRFs. For all these reasons, we decided to take advantage of an  
304 open-source EDC, Open-Clinica, for the implementation of our eCRFs. Although we  
305 anticipated that the design and computer-based requirements would be time-consuming,  
306 we found in this tool a number of advantages that allow (i) the integration of a very  
307 significant amount of multi-parametric data, (ii) the possibility to design constraints rules  
308 between entries to control data entry errors, associated with red flags in the case of errors  
309 (for instance a man cannot be pregnant), (iii) the validation of the data entry by a third  
310 person who double-checks (the latter advantages being CFR 21 - part 11 compliant) and (iv)  
311 the addition of short instructions on the CRF page when needed to guide the data entry and  
312 explain to the investigator how to fill in the eCRFs.

313 Altogether, this choice allowed the design of a controlled series of CRFs using harmonized  
314 vocabulary to record data across 19 AID patients, 5 control disease patients and healthy  
315 donors. This was made possible by the workflow we dedicated to the project, going from  
316 the selection of parameters to be collected for all patients regardless of the disease to the  
317 coding of all possible values per parameter in a harmonized manner based on CDASH  
318 coding. 26 persons were involved in the process, including 14 clinicians, 1 computer  
319 scientist, 7 scientists, 3 clinical research technician and assistant as well as 2 medical

320 biologists for more than 100 hours of meetings and discussion over a year and a half. Clinical  
321 data coding has the enormous advantages that it (i) pools reported terms in medically  
322 meaningful groups, (ii) facilitates identification of common data sets for evaluation of  
323 clinical information, (iii) supports consistent retrieval of specific cases or medical conditions  
324 from a clinical database and (iv) smooths electronic data interchange of clinical safety  
325 information.

326 Finally, our CRFs covers a wide spectrum of clinical and routine biology data of interest for  
327 most AIDs, offering the community a pre-designed set of CRFs that can be used together or  
328 individually. Although clinical safety was not added to our set of CRFs, because of the non-  
329 interventional nature of the TRANSIMMUNOM trial, this could easily be done if needed. This  
330 complex set of data has been harmonized and the database designed to store and query  
331 efficiently the massive amount of data stored. Altogether, a truly multidisciplinary  
332 endeavour led to the design and implementation a collection of 21 CRFs capturing more  
333 than 5000 coded values that are now used in TRANSIMMUNOM and could benefit the  
334 academic clinical community studying AIDs.

335 **Acknowledgments:** We are grateful to Frédéric Mariotti as an informatic subcontractor for  
336 helping in the implementation and maintenance of the OpenClinica instance and to the  
337 OpenClinica community, in particular Gerben Rienk Visser from Trial Data Solution for  
338 providing help in OpenClinica parameter setup.

339 **Funding:** The work of RL, ID, CR, SH, CA, DK, EMF is funded by the LabEx Transimmunom  
340 (ANR-11-IDEX-0004-02) as well as by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and Sorbonne  
341 Université. TRIPoD funded the TCR-relevant part of the study.

342 **Author contributions:** RL, ID, CR, CA, AS, DK and EMF composed the Cohort Management  
343 Team (CMT) for the design and implementation of the eCRF. RL, ED, PC, AH, BB, DS, FB, GG,  
344 PR, OB, KM, JS, PS, MR, CB formed the Clinical Expert Consortium (CEC) and defined the  
345 selected clinical and biological data. RL and CR wrote the CRF in agreement with the CMT  
346 recommendations. ID performed the computer science part of the work. CM, SH, TO worked  
347 on the eCRF validation. EMF coordinated the design and implementation. EMF and RL wrote  
348 the manuscript with input from all authors. EMF and DK conceived and supervised the  
349 entire work.

350 **Competing interests:** Authors have no competing interests to declare.

351 **6 FIGURES**

		IL-1	IL-6	IL-12	IL-17	IL-23	TNF- $\alpha$	IFN	Blys	B cell
<b>Autoinflammation</b>	FMF	Red					Red			
	TRAPS/CAPS	Grey								
	IBD	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	OA	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
	SpA	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
	Uveitis	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
	Myositis		Red	Red	Red	Red	Red	Red		
	MD						Red	Red		
	Vasculitis							Red	Red	Red
	RA	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		
	T1D	Red					Red	Red		Red
	SLE	Red	Red	Red	Red		Red	Red	Red	Red
	APLS						Red	Red	Red	Red
			Anti-IL-1	Anti-IL-6	Anti-IL-12	Anti-IL-17	Anti-IL-23	Anti-TNF $\alpha$	IFN	Anti-Blys

352

353 **Figure 1: TRANSIMMUNOM selected AIDs and control diseases share immune markers and**  
 354 **therapeutic strategies**

355 This table shows the list of AIDs selected for the TRANSIMMUNOM trial, belonging to the AID continuum and  
 356 their association with cytokines modulation (red) as well as immunotherapies targeting immune markers  
 357 (grey). *Abbreviation legend:* Diseases: APLS anti-phospholipid syndrome, CAPS cryopyrin associated periodic  
 358 syndromes, FMF familial mediterranean fever, IBD - inflammatory bowel disease, MD muscular dystrophy, OA  
 359 osteoarthritis, RA rheumatoid arthritis, SLE systemic erythematous lupus, SpA spondyloarthritis, T1D type 1  
 360 diabetes, TRAPS tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. Cytokines : IFN interferon, IL-1  
 361 interleukin-1, IL-6 interleukin-6, IL-12 interleukin-12, IL-17 interleukin-17, IL-23 interleukin-23, TNF- $\alpha$  tumor  
 362 necrosis factor alpha. Immunotherapies: Anti-BLyS anti-BLyS monoclonal antibody, Anti-CD20 anti-CD20  
 363 monoclonal antibody Anti-IL-1 anti-interleukin-1 monoclonal antibody, Anti-IL-6 anti-interleukin-6  
 364 monoclonal antibody, Anti-IL-12 anti-interleukin-12 monoclonal antibody, Anti-IL-17 anti-interleukin-17  
 365 monoclonal antibody, Anti-IL-23 anti-interleukin-23 monoclonal antibody, Anti-TNF $\alpha$  tumor necrosis factor  
 366 alpha-blockers.

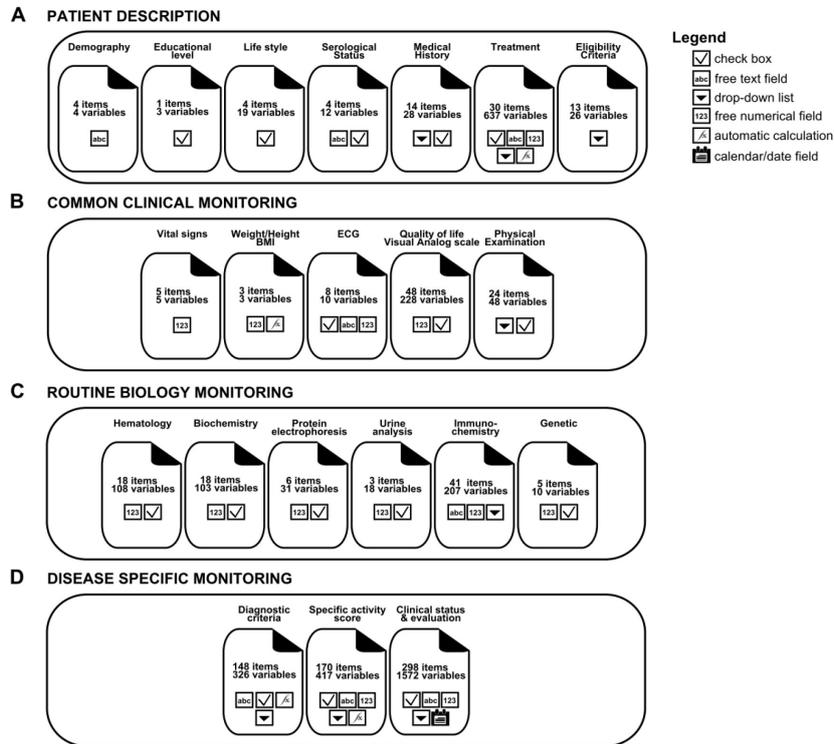
367



368

369 **Figure 2: eCRF workflow**

370 The figure represents the 3-steps workflow adopted for the eCRF design and implementation: (1) Protocol  
 371 design, (2) eCRF design and (3) eCRF validation. In each box are listed the actions, its aim and the person in  
 372 charge of it. Color code: Blue: clinical team, purple: biological team, green: computer scientist, and orange: the  
 373 trial monitor team and brown the Core management team (see methods for description).  
 374



375

376

**Figure 3: Schematic representation of the TRANSIMMUNOM integrated eCRF**

377 Four categories of eCRFs were designed (A-D). Each category is composed of several eCRFs (form icon), each of  
 378 which contained the indicated number of items for which 1 to 8 variables were coded. The type of values are  
 379 indicated in the square boxes (see legend), so as to check-box, free text field, drop-down list, free numerical  
 380 field, automatic calculation and calendar/date field. Altogether, 865 items were coded resulting in 5835  
 381 variables organized in 21 eCRFs. See Supplementary material for details on eCRF

382

## 7 REFERENCES

- 383 1. Getts DR et al. *Immunol. Rev.* **255**, 197–209 (2013).  
 384 2. Farh KK-H et al. *Nature* **518**, 337–343 (2014).  
 385 3. Allenbach Y et al. *Am J Pathol* **174**, 989–98. (2009).  
 386 4. Allenbach Y et al. *PLoS One* **9**, e88788 (2014).  
 387 5. Buckner JH *Nat Rev Immunol* **10**, 849–59 (2010).  
 388 6. Rosenzweig M et al. *Curr. Diab. Rep.* **14**, 553 (2014).  
 389 7. McGonagle D et al. *PLoS Med.* **3**, (2006).  
 390 8. Magyari L et al. *World J. Orthop.* **5**, 516–536 (2014).  
 391 9. Moran EM et al. *Clin. Exp. Immunol.* **178**, 405–415 (2014).  
 392 10. Germain RN et al. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 527–585 (2011).

- 393 11. Pepperkok R et al. *Genome Biol.* **9**, 314 (2008).  
394 12. Bielekova B et al. *Front. Neurol.* **5**, (2014).  
395 13. Chaussabel D et al. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 271–280 (2014).  
396 14. Chaussabel D et al. *Immunity* **29**, 150–164 (2008).  
397 15. Saadoun D et al. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2067–2077 (2011).  
398 16. Terrier B et al. *Arthritis Rheum.* **64**, 2001–2011 (2012).  
399 17. Godec J et al. *Immunity* **44**, 194–206 (2016).  
400 18. Nehar-Belaid D et al. *J. Immunol.* **196**, 678–690 (2016).  
401 19. Querec TD et al. *Nat. Immunol.* **10**, 116–125 (2009).  
402 20. Franklin JD et al. *J. Biomed. Inform.* **44**, S103–S108 (2011).  
403 21. Leroux H et al. *Stud. Health Technol. Inform.* **168**, 89–95 (2011).  
404 22. <http://www.cdisc.org/ICD>  
405 23. Livneh A et al. *Arthritis Rheum.* **40**, 1879–1885 (1997).  
406 24. Piram M et al. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2168–2173 (2014).  
407 25. Lewis JD et al. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1660–1666 (2008).  
408 26. Harvey RF et al. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 514 (1980).  
409 27. Rudwaleit M et al. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 777–783 (2009).  
410 28. van der Linden S et al. *Arthritis Rheum.* **27**, 361–368 (1984).  
411 29. Garrett S et al. *J. Rheumatol.* **21**, 2286–2291 (1994).  
412 30. International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet’s Disease  
413 (ITR-ICBD) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **28**, 338–347 (2014).  
414 31. Masi AT et al. *Arthritis Rheum.* **33**, 1094–1100 (1990).  
415 32. Quartuccio L et al. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **53**, 2209–2213 (2014).  
416 33. Leavitt RY et al. *Arthritis Rheum.* **33**, 1101–1107 (1990).  
417 34. Arend WP et al. *Arthritis Rheum.* **33**, 1129–1134 (1990).  
418 35. Stone JH et al. *Arthritis Rheum.* **44**, 912–920 (2001).  
419 36. Kerr GS et al. *Ann. Intern. Med.* **120**, 919–929 (1994).  
420 37. Aletaha D et al. *Arthritis Rheum.* **62**, 2569–2581 (2010).  
421 38. Kellgren JH et al. *Ann. Rheum. Dis.* **16**, 494–502 (1957).  
422 39. van der Heijde DM et al. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 916–920 (1990).  
423 40. American Diabetes Association *Diabetes Care* **35 Suppl 1**, S11-63 (2012).  
424 41. Mortensen HB et al. *Diabetes Care* **32**, 1384–1390 (2009).  
425 42. Petri M *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **31**, 245–254, vi (2005).  
426 43. Hochberg MC *Arthritis Rheum.* **40**, 1725 (1997).  
427 44. Wilson WA et al. *Lupus* **10**, 457–460 (2001).  
428 45. Bombardier C et al. *Arthritis Rheum.* **35**, 630–640 (1992).  
429 46. Petri M et al. *Lupus* **8**, 685–691 (1999).  
430

## 4.2 Investigations dynamiques de l'immunome dans les MAI

En plus de l'étude statique de l'immunome dans l'étude observationnelle TRANSIMMUNOM, nous avons appliqué cette même approche holistique à deux essais cliniques visant à tester les faibles doses d'interleukine 2 dans les maladies auto-immunes.

Aujourd'hui, plusieurs publications dans la littérature montrent le rôle central des cellules Treg dans le maintien de la tolérance et que, leur activation et leur expansion, peuvent être d'un grand intérêt dans le traitement des MAI. En effet :

1. les cellules Treg contrôlent l'inflammation (Wing and Sakaguchi 2010),
2. les cellules Treg contrôlent les réponses immunitaires cellulaires (le défaut des Treg conduit à l'auto-immunité) (Wing and Sakaguchi 2010), (J. M. Kim, Rasmussen, and Rudensky 2007),
3. les cellules Treg / Tfr contrôlent les réponses humorales (le défaut des Tfr affecte la qualité des réponses humorales) (Chung et al. 2011), (Linterman et al. 2011) et
4. la majorité des MAI sont associées à un déficit quantitatif et/ou fonctionnel des Treg (Todd M. Brusko, Putnam, and Bluestone 2008a) (Miyara et al. 2011)), se traduisant par un déséquilibre de la balance T effectrice / T régulatrice (Teff / Treg) (Shimon Sakaguchi et al. 2001).

De plus, il a été constaté que de faibles doses d'IL-2 (fd d'IL-2) induisent l'expansion et l'activation des cellules Treg.

Les fd d'IL-2 ont donc un intérêt thérapeutique potentiel pour toutes les MAI mais, cependant, leur efficacité peut être limitée car :

- ✓ certaines MAI comme le diabète de type 1 (DT1) (Zier et al. 1984), la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Kitas et al. 1988) et le lupus érythémateux systémique (LES)

(Lieberman and Tsokos 2010) ont un déficit intrinsèque de la voie d'activation de l'IL-2,

- ✓ dans un environnement inflammatoire important, l'efficacité de fd d'IL-2 pourrait être limitée,
- ✓ la suppression dépendante des Treg, des réponses immunitaires et de l'inflammation dépend à leur tour de nombreuses cellules, molécules et voies qui sont affectées différemment selon les maladies,
- ✓ bien que de fd d'IL-2 activent les Treg à des doses au moins 20 fois plus faibles que celles nécessaires pour l'activation d'autres types de cellules, de fd d'IL-2 peuvent également activer les cellules T effectrices (Teff), les cellules natural killer (NK), les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC-2) et les éosinophiles d'une manière dose-dépendante (Ito et al. 2014), (Liao, Lin, and Leonard 2013), (Saadoun et al. 2011), (Koreth et al. 2011), (Koreth et al. 2014), (Klatzmann and Abbas 2015), (Abbas et al. 2018).<sup>2</sup>

Il reste donc à déterminer la dose et le schéma d'administration de fd d'IL-2 les plus appropriés pour induire l'expansion et l'activation des cellules Treg chez les patients atteints de MAI, et si ce schéma peut être appliqué à diverses MAI. Pour répondre à ces questions, nous avons mené une étude de « recherche de doses » dans le diabète de type 1 (DF-IL2), et une étude de « recherche de maladies » avec différentes pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques (TRANSREG). Ces études ont été réalisées en intégrant des données clinico-biologique avec des données omiques. Les données ont été analysées à la fois par des approches statistiques classiques et de biologie de système.

#### 4.2.1 Faibles doses d'IL-2 dans le diabète de type 1

La justification de l'utilisation de fd d'IL-2 dans le diabète de type 1 est donnée par plusieurs études qui démontrent que :

- (i) plusieurs gènes de susceptibilité sont directement connectés à la voie IL-2 : CD25 (IL-2RA) (Dendrou et al. 2009), IL-2Rb (Todd 2010), et PTPN2 (Todd et al. 2007), (W. Y. S. Wang et al. 2005) ;
- (ii) un déficit en Treg dans le sang périphérique (T. M. Brusko et al. 2005), (Lindley et al. 2005) et dans les ganglions lymphatiques pancréatiques est observé (Ferraro et al. 2011), (Bluestone, Herold, and Eisenbarth 2010);
- (iii) au moment du diagnostic, la plupart des patients présente une fonction résiduelle des cellules bêta-pancreatiques. La mise en route d'une immunothérapie de façon précoce pourrait permettre de la préserver, et donc d'être d'un grand intérêt pour la prise en charge thérapeutique des patients (Battaglia and Roncarolo 2011).

Sur la base de ce rationnel, nous avons conçu un essai de recherche de dose (randomisé, en double aveugle, contrôlé versus placebo) pour déterminer la tolérance et les réponses immunologiques de fd d'IL-2 chez des patients atteints de diabète de type 1 (DF-IL2; NCT01353833). Nous avons inclus 25 patients diabétiques de type 1 (avec diagnostic confirmé selon les critères ADA (Mellitus and The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1997) et la positivité d'au moins un anticorps spécifique du diabète). Ces 25 patients ont reçu une cure de 5 jours d'IL-2 en sous-cutanée, administrée à la dose de 0.33, 1 ou 3 MUI /jour, versus placebo. Les données cliniques de cette étude ont fait l'objet d'une première publication (Hartemann et al. 2013).

L'article 3, mentionné dans cette thèse, présente les résultats de l'analyse approfondie de l'immunome de cette même étude.

Les résultats montrent que de faibles doses d'IL-2 induisent une augmentation dose-dépendante des cellules Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figure 1 de l'article 3). Les Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> présentent une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation, notamment le CD25, GITR et le CTLA-4. De plus, la phosphorylation de la tyrosine STAT5 (pSTAT5) *in vitro* montre que les Treg de ces patients ont des réponses stables, très sensibles et sélectives à l'IL-2 (Figure 2 de l'article 3).

Les résultats sur les cytokines montrent une augmentation dose-dépendante de celles liées aux Treg (avec notamment une élévation significative de l'IL-2, IL-2RA, IL-10, TGF beta, et CCL22). Il y a également une augmentation significative du CXCL10 et du TNF alpha, tandis qu'une augmentation de l'IL-5 et de l'IL-17 n'a été observée qu'à la dose de 3 MUI. L'analyse par composante principale montre que les patients du groupe 0,33 MUI / jour chevauchent largement les patients du groupe placebo, tandis que les patients des groupes 1 et 3 MUI / jour présentent des comportements plus distincts (Figure 4 et Tableau 1 en *supplementary* de l'article 3).

En terme de nombre absolu, il n'y a pas eu de changements significatifs des cellules T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, B et NK dans les groupes 0,33 et 1 MUI par rapport au placebo (Figure 2 en *supplementary* de l'article 3). À la dose de 3 MUI / jour, le nombre de cellules T, B et NK a diminué au cours du traitement, suivi d'un retour immédiat aux valeurs de baseline (Figure 2 en *supplementary* de l'article 3).

En termes de pourcentages, une diminution des cellules B a été observée dans les groupes 1 et 3 MUI pendant le traitement, suivi d'un retour aux valeurs de baseline par la suite (Figure 3 en *supplementary* de l'article 3). Une augmentation significative des cellules NK est observée à la dose de 3 MUI/jour. Enfin, il y a eu une augmentation significative des cellules NK CD56<sup>bright</sup>

(cellules NK avec une activité régulatrice) à la dose de 1 MUI / jour (Figure 4 en *supplementary*).

Les analyses du transcriptome des PBMC montrent une régulation à la baisse des signatures liées aux cellules B, et une régulation à la hausse des signatures moléculaires liées au cycle cellulaire et à la transcription, quelle que soit la dose d'IL-2. Les signatures associées aux chimiokines se trouvent régulées à la baisse avec les 2 doses d'IL-2 les plus faibles, mais à la hausse à la dose de 3 MUI, dose à laquelle les signatures liées aux cellules NK sont également régulées à la hausse. La signature moléculaire liée au gène *FOXP3* est considérablement enrichie et régulée à la hausse aux doses de 1 et 3 MUI.

Nous avons aussi étudié les réponses des lymphocytes T dirigées contre l'acide glutamique décarboxylase (GAD), la proinsuline (PI), le peptide C et le peptide pre-proinsuline à la baseline et après traitement par fd d'IL-2 chez 9 patients. Nous avons observé une suppression de toutes les réponses Teff testées dans 1/3, 1/2 et 4/4 patients respectivement aux doses de 0,33, 1 et 3 MUI, pour un total de 6/9 patients.

**4.2.2 Article 3 « Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients »**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jautimm](http://www.elsevier.com/locate/jautimm)

## Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients



Michelle Rosenzweig<sup>a, b, c</sup>, Guillaume Churlaud<sup>a, b, c</sup>, Roberto Mallone<sup>d, e, f, g</sup>,  
Adrien Six<sup>a, b, c</sup>, Nicolas Dérian<sup>a, b, c</sup>, Wahiba Chaara<sup>a, b, c</sup>, Roberta Lorenzon<sup>a, b, c</sup>,  
S. Alice Long<sup>h</sup>, Jane H. Buckner<sup>h</sup>, Georgia Afonso<sup>d, e, f, g</sup>, Hang-Phuong Pham<sup>i</sup>,  
Agnès Hartemann<sup>j</sup>, Aixin Yu<sup>k, m</sup>, Alberto Pugliese<sup>k, l, m</sup>, Thomas R. Malek<sup>k, m</sup>,  
David Klatzmann<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTI) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (I2B), F-75651, Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, UMR5 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), F-75005, Paris, France

<sup>c</sup> Inserm, UMR5 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), F-75005, Paris, France

<sup>d</sup> Inserm, U1016, Institut Cochin, Immunology of Diabetes Team, DeAR Lab, F-75014, Paris, France

<sup>e</sup> CNRS, UMR8104, F-75014, Paris, France

<sup>f</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75014, Paris, France

<sup>g</sup> AP-HP, Hôpital Cochin-Port Royal, Diabetology Department, F-75014, Paris, France

<sup>h</sup> Translational Research Program, Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle, WA, USA

<sup>i</sup> ILTOO Pharma, iPEPS ICM, Hôpital Pitié Salpêtrière, 75013, Paris, France

<sup>j</sup> AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Diabetology, F-75651, Paris, France

<sup>k</sup> The Diabetes Research Institute, University of Miami, Miami, FL, USA

<sup>l</sup> Department of Medicine, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL, USA

<sup>m</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Miami, Miami, FL, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 December 2014

Received in revised form

26 December 2014

Accepted 5 January 2015

Available online 26 January 2015

#### Keywords:

Tolerance

Immunotherapy

Inflammation

Immunopathology

Pharmacokinetics

### ABSTRACT

Most autoimmune diseases (AID) are linked to an imbalance between autoreactive effector T cells (Teffs) and regulatory T cells (Tregs). While blocking Teffs with immunosuppression has long been the only therapeutic option, activating/expanding Tregs may achieve the same objective without the toxicity of immunosuppression. We showed that low-dose interleukin-2 (ld-IL-2) safely expands/activates Tregs in patients with AID, such as HCV-induced vasculitis and Type 1 Diabetes (T1D). Here we analyzed the kinetics and dose-relationship of IL-2 effects on immune responses in T1D patients. ld-IL-2 therapy induced a dose-dependent increase in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg numbers and proportions, the duration of which was markedly dose-dependent. Tregs expressed enhanced levels of activation markers, including CD25, GITR, CTLA-4 and basal pSTAT5, and retained a 20-fold higher sensitivity to IL-2 than Teff and NK cells. Plasma levels of regulatory cytokines were increased in a dose-dependent manner, while cytokines linked to Teff and Th17 inflammatory cells were mostly unchanged. Global transcriptome analyses showed a dose-dependent decrease in immune response signatures. At the highest dose, Teff responses against beta-cell antigens were suppressed in all 4 patients tested. These results inform of broader changes induced by ld-IL-2 beyond direct effects on Tregs, and relevant for further development of ld-IL-2 for therapy and prevention of T1D, and other autoimmune and inflammatory diseases.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Most self-reactive T lymphocytes are physically eliminated during thymic selection to avoid immune responses against self-antigens. Yet this process is imperfect, and potentially harmful self-specific effector T cells (Teffs) survive thymic deletion and

\* Corresponding author. Hôpital Pitié-Salpêtrière, Clinical Investigation Center for Biotherapies and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department, 83 Bd de l'Hôpital, F-75651, Paris cedex 13, France. Tel.: +33 1 42 17 74 61; fax: +33 1 42 17 74 62.

E-mail address: [david.klatzmann@upmc.fr](mailto:david.klatzmann@upmc.fr) (D. Klatzmann).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.001>

0896-8411/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

populate the periphery. In the normal immune system, these autoreactive Tregs do not mediate autoimmunity as their expansion and function are inhibited by regulatory T cells (Tregs) [1]. In most autoimmune diseases (AID), there is an imbalance between Tregs that attack normal tissues and Tregs that normally control them. Tregs are essential players in the control of all immune responses, including responses to self, tumors, and infectious agents [1], and in the control of inflammatory disorders [2]. The discovery of Tregs revolutionized our understanding of AID pathophysiology and opened new avenues for the treatment of autoimmunity. Human beings and mice presenting a FOXP3 genetically-determined Treg defect develop multiple organ-specific AID [3–8]. Treg quantitative or qualitative defects have been described in common human AID and their mouse models [9–13]. Moreover, administration/restoration of Tregs improves symptoms in experimental animals and patients with AID [14–19]. Thus, while blocking Tregs with immunosuppressive drugs has long been the only therapeutic option for AID, activating/expanding Tregs is becoming a novel approach that may lead to improved outcomes with better safety [14–19].

Until recently, most Treg-based therapies have been based on the infusion of ex vivo expanded Tregs, as there were no drugs or molecules that could specifically expand/activate Tregs in vivo. We and others recently showed that IL-2, a molecule identified almost 30 years ago for its capacity to stimulate T cells in vitro, could be such a molecule [14–17]. We performed the first clinical trial aimed at inducing Tregs with IL-2 in patients with an AID [17], namely hepatitis C virus (HCV)-related vasculitis (NCT00574652) [20]. We treated these patients with low-dose (ld) IL-2 (1.5–3 million international units MIU/day; 52.5 MIU cumulative dose; Proleukin®). The treatment was very well tolerated. Importantly, we observed a major expansion of Tregs with subsequent clinical improvement in 8/10 patients [17]. Our results showed for the first time that ld-IL-2 could be exploited as an immunoregulatory drug for the treatment of AID, acting via Treg expansion/activation. Others have reported that low dose IL-2 is safe and beneficial for the treatment of alloimmunity, i.e. chronic graft versus host disease (GVHD) [15,16].

Based on these results, we evaluated ld-IL-2 in patients with type 1 diabetes (T1D), a condition resulting from the chronic autoimmune destruction of pancreatic beta-cells, eventually leading to insulin deficiency. There are several reasons for using IL-2 in T1D patients: (i) several susceptibility genes are directly connected to the IL-2 pathway: *IL-2*, *CD25 (IL-2RA)* [21–23], *IL-2RB* [24], and *PTPN22* [25,26]; (ii) some studies reported Treg deficiency in peripheral blood [9,10], and in pancreatic lymph nodes [27,28]; (iii) at the time of clinical diagnosis, there is significant residual beta-cell function in most patients, so that immunotherapy could curtail inflammation, promote immune tolerance, and in turn preserve beta-cell mass and function [29]. In Non Obese Diabetic (NOD) mice, a model of spontaneous autoimmune diabetes with remarkable similarities to the human disease, IL-2 prevents T1D and we showed that a short course of IL-2 at diabetes onset led to disease reversal in one third of the mice [14,30]. Finally, the use of immunosuppressants such as cyclosporine A (CsA), a calcineurin inhibitor that reduces T cell activation and expansion, provided proof of principle that newly-diagnosed T1D could be treated with immunotherapy [31–33]. CsA demonstrated clinical efficacy in prolonging endogenous insulin production, but remission from autoimmunity was limited to the duration of the treatment and CsA toxicity precluded its clinical use. Other immunosuppressive drugs or immunomodulators have been tested in clinical trials in T1D, both as short therapy courses or chronic regimens, only in some cases resulting in temporary preservation of insulin secretion with better results in subsets of responder patients, as reported recently for therapies with anti-CD3, anti-CD20 and CTLA4-Ig [34–38].

The identification of a dose of IL-2 capable of safely tipping the Treg/Teff balance towards Tregs is of major importance. In our vasculitis trial, we showed that IL-2 at the dose of 1.5 MIU induced Tregs in all 10 patients and was well tolerated. However, the dose to be used in T1D was not predictable as (i) some T1D patients may have defects in the IL-2/IL-2R activation pathway [39] (ii) HCV vasculitis is an antibody-mediated disease, while in T1D beta-cell destruction is mediated by pathogenic Tregs that could respond to IL-2 and thus exacerbate disease. Hence, we designed a dose finding trial to define safety and immunological responses; we previously reported that a 5-day course of single IL-2 injections, given at 0.33, 1 or 3 MIU, were well tolerated and stimulated Tregs [40].

Here, we report the results of detailed immunomonitoring of these patients, showing that ld-IL-2 induces a dose-dependent, regulatory milieu characterized by broad changes extending beyond the primary effect on Tregs. Thus, our study provides important information for further developing ld-IL2 therapies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patient characteristics

Male and female patients aged from 18 to 55 years, with confirmed T1D were recruited at the Diabetology Department of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) and thereafter followed at the Clinical Investigation Centre-Paris Est. Written informed consent was obtained from all subjects before they were enrolled in the DF-IL2 trial (NCT01353833). Detailed patients description, safety analyses and peak effects of the treatment on Tregs have been reported [40]. This clinical trial was conducted according to Declaration of Helsinki principles. All human studies were approved by the appropriate institutional review boards.

### 2.2. Immunomonitoring

Blood samples were collected according to the planned protocol: absolute numbers of lymphocyte subsets and Tregs were monitored at each patient visit: day-1, before treatment; day 2–5, during IL-2 administration; day-6; 15, 22, and 60 end of the follow up.

Tregs phenotyping and cytokines assay were performed at baseline, day 6, 15, 22 and 60. Because of the limited amount of blood collected, other phenotypic markers were only investigated at baseline and day 15. When possible, cells were frozen for other investigations. Stat5 phosphorylation (pSTAT5) was examined on frozen cells from 2 controls and 3 patients per treated group. Beta-cell-specific Teff responses were studied in 1 control, 3 patients for the dose 0.33, 2 for the dose 1 and 4 for the dose 3.

### 2.3. Flow cytometry and pStat5 analysis

Flow cytometry and basal pStat5 experiments were performed according to previously published methods [17,41]. Monoclonal antibodies (mAbs) used were CD3-APCa750, CD4-ECD, CD8-APCa700, CD16-FITC, CD19-ECD, CD45RO-FITC, CD56-PCy7 and CD152-PE from Beckman Coulter; CD25-PE, CD45RA-APC and CD45RA-PCy7 from BD Biosciences; CD127-FITC from eBioscience; CD25-APC and LAP-PE from R&D Systems and GITR-PE from Miltenyi.

For pSTAT5 activation experiments, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured (500,000/well) for 30 min at 37 °C and IL-2 was added for 15 min. Cells were then fixed with 1.6% paraformaldehyde, permeabilized with 100% methanol, stained for pSTAT5 and appropriate surface markers. Events were collected

using a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using Diva software (BD Biosciences). To calculate EC50, after subtracting the value from the media control, binding data for each sample was normalized to 100% based on the maximal response and non-linear regression of these data was performed assuming a variable slope using Graph-Pad Prism 6.0.

#### 2.4. Plasma cytokine measurement

Plasma samples were collected, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed. Quantitative determination of 26 cytokines/chemokines (GM-CSF, IFN- $\alpha 2$ , IFN- $\gamma$ , IL-1RA, IL1a, IL1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, CXCL-10, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-2, TNF- $\alpha$  and IL-2RA) was performed using Human Milliplex HCYTOMAG-60 kits (Millipore) and TGF-beta using Human TGF-beta1 Platinum ELISA (eBioscience) in accordance with the manufacturer protocols.

#### 2.5. Analysis of beta-cell antigen-specific T-cell responses

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses were evaluated according to previously published assay [42].

#### 2.6. Anti-IL-2 antibodies assay

The presence of plasma IL-2-binding antibodies was studied by ELISA, as previously described [43]. Data are the average of two replicates. Positive controls are from ApoE<sup>-/-</sup> mice that were injected three times a week with 25,000 IU of Proleukin<sup>®</sup> for 4 months. Mouse studies were approved by the appropriate institutional review boards.

IL-2 neutralizing activity of plasma was assayed in a proliferation assay with Kit 225 cells [44]. 10,000 cells/well were cultured ( $37^{\circ}\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub>) in 100  $\mu\text{L}$  of RPMI (Gibco) and 10% of BSA. Plasma were preincubated for 1 h with IL-2 10 IU/ml at  $37^{\circ}\text{C}$  and then added at the start of the cultures at a concentration of 20%. Cell proliferation was assayed by counting cells at day 3.

#### 2.7. Transcriptomic analysis

Transcriptomic analysis was performed using the SurePrint G3 Human GE v2 8  $\times$  60K Microarray (Agilent Technologies, ID: 039494) according to the manufacturer's protocol and to previously published [17]. Cyanine-3 labeled cRNAs were prepared using the One-Color Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies).

The slides were scanned using a G2565CA Scanner System (Agilent Technologies), and using a scan protocol with a resolution of 3  $\mu\text{m}$  and a dynamic range of 20 bit. The resulting tiff images were analyzed with the Feature Extraction Software v10.7.3.1 (Agilent Technologies) and using the GE2\_107\_Sep09 protocol. Original dataset was normalized using quantile method implemented in Limma's package. Probes with bad detection  $p$ -values ( $<0.01$ ) in half of the samples of a biological group were discarded. Ranked gene lists were obtained using statistical score of paired eBays implemented in Limma's package. Gene set enrichment analyses were performed using the Blood Transcription Modules [45] added with a selection of molecular signatures from C2 database provided by GSEA software [46,47]. Network analyses were performed using Cytoscape 2.8.3 and the plugin Enrichment Map dedicated to gene set enrichment analyses.

All datasets can be accessed in the ArrayExpress database ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) under accession number E-MTAB-2858.

#### 2.8. Statistical analysis

Data were compared between patients groups using a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures using Graph-Pad Prism version 5.0. When the  $p$  value of the time by treatment interaction was significant ( $p < 0.05$ ), each IL-2 group of patients was compared to placebo group.

Detailed statistical results of two-way ANOVA for repeated measures are shown in the Supplementary Table 1.

Principal Component Analyses were then performed on log10-transformed data expressed as fold change compared to day 1. Multivariate analyses were performed using R platform ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### 3. Results

#### 3.1. Clinical trial design, patients and safety

Results presented here are from a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. Patients received a daily sub-cutaneous injection of placebo or 0.33, 1 or 3 MIU of IL-2 for 5 consecutive days. They were sampled every day just before the IL-2 injection for the first 5 days, then at day 6, 15, 22 and 60 (Supplementary Fig. 1). Twenty-four patients (6 per dose) were included in the per-protocol analysis. No serious adverse events were reported during the trial [40].

#### 3.2. Dose dependent effects on peripheral blood mononuclear cells

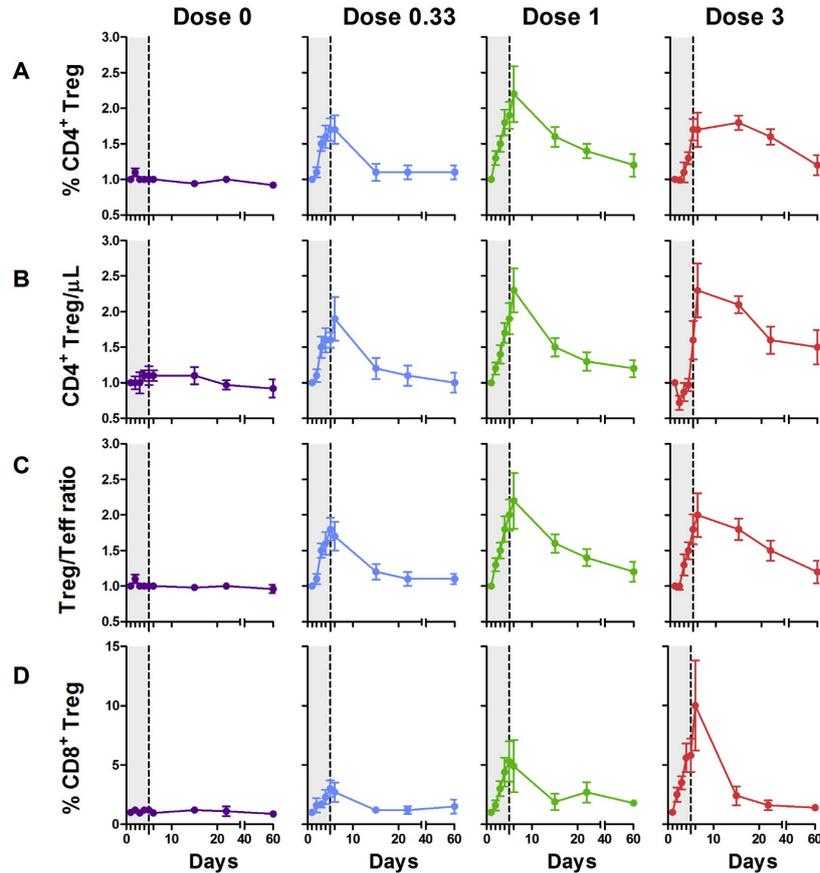
##### 3.2.1. T, B and NK cells

There were no significant changes in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell, B cell and NK cell numbers in the two lower dose groups compared to placebo (Supplementary Fig. 2). At the dose of 3 MIU/day, T, B and NK cell numbers were decreased approximately 2 fold during treatment, followed by an immediate return to baseline thereafter (Supplementary Fig. 2). Regarding cell percentages (Supplementary Fig. 3), a B cell reduction was observed at the two highest doses ( $p = 0.03$  at 1 MIU/day and 0.003 at 3 MIU/day) during treatment, followed by a return to baseline levels thereafter. No statistically significant variations of NK cell percentages were observed at the doses of 0.33 and 1 MIU/day while increase NK proportions were observed at the dose of 3 MIU/day ( $p = 0.003$ ). However, at this dose, individual variations of NK cell percentages remained in the range observed in the placebo group (see below). Finally, there was an increase in CD56bright regulatory NK cells [48] at the dose of 1 MIU/day ( $p = 0.015$ ) (Supplementary Fig. 4).

##### 3.2.2. CD4 and CD8 Tregs

Effects of treatment on the proportions of CD4<sup>+</sup> Tregs are shown in Fig. 1A. Comparisons between placebo and each of the three doses of IL-2 by repeated measures ANOVA showed that the day/treatment interaction was highly significant ( $p < 0.0001$ ). Tregs were expanded at all doses, and the duration of increase was dose-dependent. By day 15, Tregs returned to baseline at the dose of 0.33 MIU/day, but persisted elevated at the dose of 1 MIU/day; increased Treg levels were still detected at day 60 at the dose of 3 MIU/day. The increased percentage of CD4<sup>+</sup> Tregs was associated with an increase in their absolute numbers ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1B), leading to an increase in the Tregs/Teff ratio ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1C).

We previously reported that the very small population of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells, which are suppressive and expanded in colorectal cancer [49], was expanded in the VASCU-IL-2 trial [17]. Here, we show a dose-dependent expansion of these CD8<sup>+</sup> Tregs ( $p = 0.0002$ ), remarkably high at the highest IL-2 dose ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1D).



**Fig. 1.** Dose-dependent increase of Treg in T1D patients treated by ld-IL-2. Each curve represents changes in  $CD25^{high}CD127^{-}Foxp3^{+}$  among  $CD4^{+}$  T cells (percentages in A and absolute numbers in B), in Treg/Teff ratio (C) and in percentages of  $CD8^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$  cells (D). Data are shown as mean  $\pm$  SEM of individual results normalized by baseline values for each patient at different time points (the grey zone represents the 5 days IL-2 treatment).

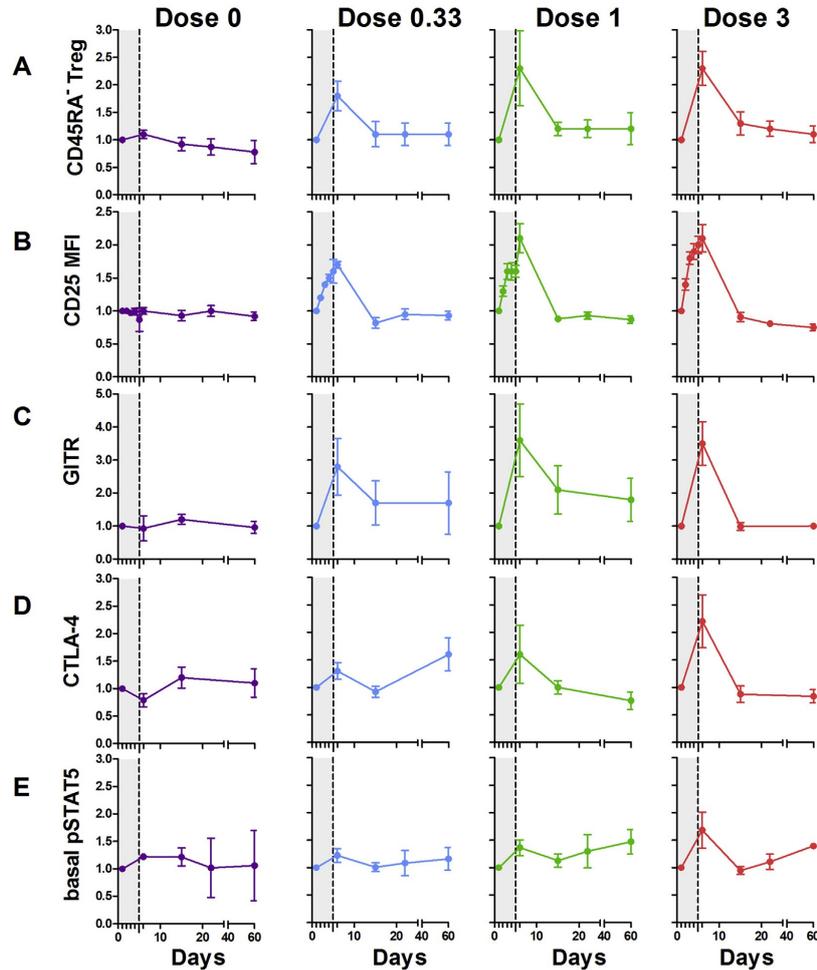
### 3.3. Treg immunophenotyping

Expanded Tregs displayed a memory phenotype ( $p = 0.0051$ ) [50] and phenotypic features characteristic of enhanced activation (Fig. 2A). The expression of IL-2 receptor-alpha (CD25) was increased in Tregs (Fig. 2B), but not in  $CD4^{+}CD45RA^{-}$  T effector/memory ( $T_{EM}$ ) cells (not shown), during IL-2 therapy, from day 2 or 3, for all doses ( $p < 0.0001$ ), and rapidly returned to baseline values thereafter. This was associated with increased expression of GITR ( $p = 0.0058$ ) and CTLA-4 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 2C, D), whereas TGF- $\beta$  latency-associated peptide (LAP) remained unchanged (data not shown).

### 3.4. Tregs show stable, selective, and highly sensitive responses to IL-2

An immediate consequence of IL-2 binding to the IL-2R is tyrosine phosphorylation of STAT5 (pSTAT5). Basal pSTAT5 levels in

Tregs were transiently increased at the 3 MIU/day dose ( $p = 0.0308$ ) (Fig. 2E), which may be related to the increased proportions of  $CD45RA^{-}$  Tregs (Fig. 2A). We also assessed the IL-2-dependent activation of pSTAT5 by  $CD4^{+}$  Treg and  $T_{EM}$  cells by various amounts of IL-2, for patients' samples that were obtained before and 4–6 days after the initiation of IL-2 therapy. For each patient's sample examined, Tregs showed increased sensitivity to IL-2 when compared to  $T_{EM}$  cells. These responses were largely comparable to cells from normal controls that did not receive IL-2 therapy (Fig. 3A). This trend was similar regardless of the dose of IL-2 used to treat the patients. In addition, the responses during treatment were essentially identical to those detected before ld-IL-2 therapy. Thus, a short course of IL-2 therapy did not rapidly alter IL-2-dependent pSTAT5 activation. By calculating the EC50s of these responses, Tregs from T1D patients were approximately 15–20-fold more sensitive to IL-2 than  $T_{EM}$  cells (Fig. 3B). These analyses of frozen PBMCs resulted in IC50s in a similar range detected for fresh PBMCs, i.e. 3–7 pM for Tregs and 30–35 pM for  $CD4^{+} T_{EM}$  cells (A.Y,



**Fig. 2.** Dose-dependent Treg activation in T1D patients treated by ld-IL-2. Curves represent changes in Treg activation markers. Percentage of CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup> Tregs among CD4<sup>+</sup> cells (A), CD25 MFI (B), percentage of GITR<sup>+</sup> (C), CTLA-4<sup>+</sup> (D) and basal pSTAT5 expression (E) in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of patients' values normalized by individual baseline values at different time points (the grey zone represents the 5 days IL-2 treatment). Results are for all 6 patients per group, except for pSTAT5 measurement for which 2, 3, 3 and 3 patients were studied for the 0, 0.33, 1 and 3 MIU doses, respectively.

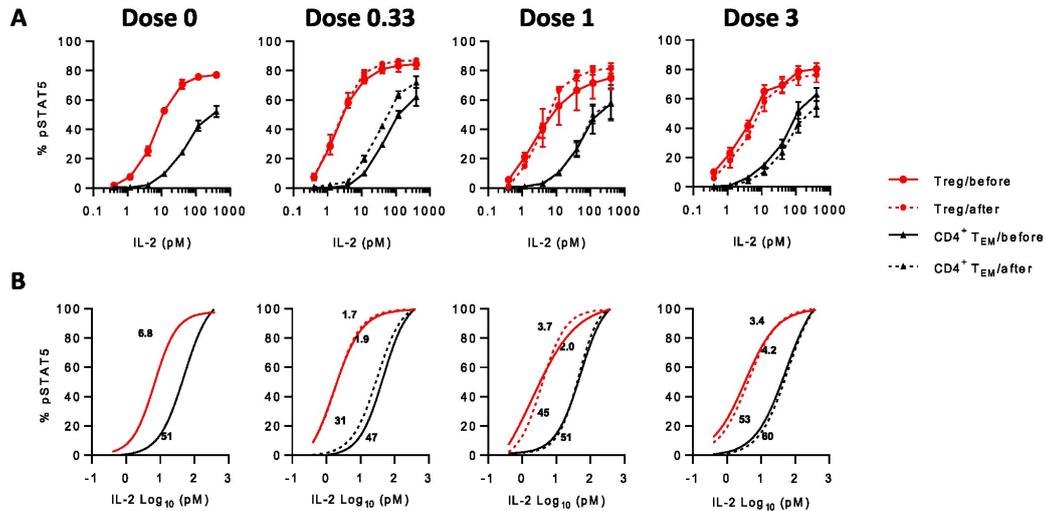
A.P. and T.R.M, unpublished data). Overall, these data are consistent with stable, highly sensitive, and selective responses by Tregs to IL-2 in these T1D patients.

### 3.5. Dose dependent modulation of plasma cytokine profiles

A panel of 26 cytokines and chemokines were assayed to investigate whether IL-2 could influence the balance of Th1/Th2/Th17 cytokines during treatment. The entire cytokine profile was tested at day 6, according to dose and to the functional classification of cytokines. Dose dependent IL-2 levels could be detected in the plasma. A radar chart (Fig. 4A) illustrates a clear trend for a dose-dependent increase of Treg-related cytokines, while the other

cytokines are modestly affected at the 0.33 and 1 MIU/day doses. At 3 MIU/day, there are discrete and more pronounced cytokine increases, notably for CXCL10 and IL-5 whereas other cytokines tested remained unchanged (Fig. 4A). Principal Component Analyses of these results illustrate this dose-dependent trend: the 0.33 MIU/day patients largely overlap with placebo-treated patients, while the 1 and 3 MIU/day patients show more distinct behaviors (Fig. 4B).

Repeated measures ANOVA for the day/treatment interaction were significant for IL-2, IL-2RA, IL-5, IL-10, IL-17, TNF-alpha, TGF-beta1, CCL22, and CXCL10 ( $p < 0.0001$  for IL-2, IL-2RA, IL-5, IL10, CXCL10 and TNF-alpha,  $p = 0.0006$  for TGF-beta1,  $p = 0.0059$  for IL-17 and  $p = 0.0096$  for CCL22) (Fig. 4A and Supplementary Table 1).



**Fig. 3.** Selective IL-2-dependent activation of STAT5 by Tregs does not vary after ld-IL-2 therapy. PBMC from controls ( $n = 4$ ) or patients treated with 0.33 MIU ( $n = 3$ ), 1 MIU ( $n = 2$ ), and 3 MIU ( $n = 3$ ) of IL-2 were stimulated with IL-2 for 15 min and the activation of pSTAT5 was determined for CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells. (A) Dose response curves and (B) non linear regression analyses of the binding data for the indicated cell populations. The numbers on the regression curves are the EC50s.

The time-course changes for cytokines show a dose-dependent and rapid increase, with values already elevated at day 2 (Fig. 4C). The increase of IL-17 was only observed at the 3 MIU/day dose (Fig. 4C), but this was paralleled by an increase in the regulatory cytokine TGF- $\beta$ .

### 3.6. Transcriptomic analysis

We compared the global transcriptome of PBMCs at baseline and day-6. For each IL-2 treatment dose (0.33, 1 and 3 MIU), Enrichment Map analysis was performed on significantly up- and down-regulated molecular signatures ( $q$ -value < 0.05). Network analyses of significantly enriched molecular signatures show a good consistency for all IL-2 doses (Fig. 5). Whatever the IL-2 dose, there is a striking down-regulation of B-cells related signatures, and an up-regulation of molecular signatures related to cell cycle and transcription. Chemokines-associated signatures are found down regulated with the 2 lowest IL-2 doses, but up-regulated at the dose of 3 MIU/day, a dose at which NK cells signatures also became up-regulated.

The molecular signature related to FOXP3 target genes [51] is non-significantly up-regulated at the lowest dose ( $q$ -val = 0.2), and significantly enriched and up-regulated at the dose of 1 and 3 MIU/day.

### 3.7. Modulation of beta-cell-specific T<sub>eff</sub> responses

Preproinsulin (PPI) and glutamic acid decarboxylase (GAD) are beta-cell autoantigens commonly targeted by pathogenic T<sub>eff</sub>s in T1D patients. We therefore investigated T-cell responses directed to GAD, proinsulin (PI), C-peptide and the PPI signal peptide during ld-IL-2 treatment in 10 patients for whom samples from different time points (day 1, 6, 15 and 22) were available. Compared to pre-treatment values, many treated patients showed a reduction or stabilization of IFN- $\gamma$  responses to most antigens between day 6 and 22 (Fig. 6). Specifically, we observed consistent

suppression of all T<sub>eff</sub> responses tested in 1/3, 1/2 and 4/4 patients treated with 0.33, 1 and 3 MIU of IL-2, respectively. The suppressive effect on these responses was maintained after cessation of IL-2 therapy at the higher 3 MIU/day dose (Fig. 6), up to day 22.

### 3.8. Anti-IL-2 antibodies are not induced by ld-IL-2

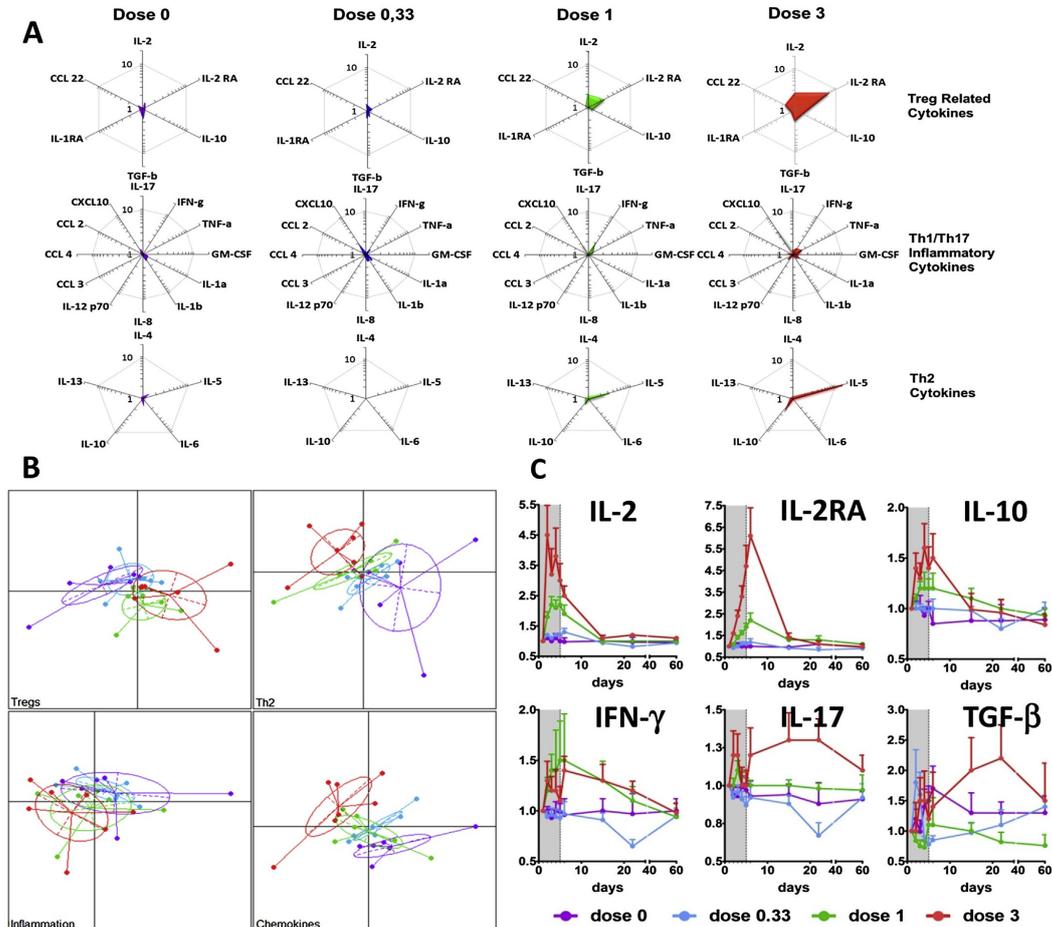
We did not observe induction of anti-IL-2 antibodies and neutralizing antibodies in the plasma, at any time during the follow-up (Fig. 7). While a very small reactivity against IL-2 could be detected in some patients, (i) it was not increased by IL-2 administration (Fig. 7A and B) and (ii) it did not neutralize the effect of IL-2 on the proliferation of an IL-2-dependent cell line (Fig. 7C).

## 4. Discussion

### 4.1. On finding an optimal IL-2 dose for Treg specific expansion/activation

IL-2 has been initially described as a T cell growth factor [52] and developed for the treatment of conditions calling for the boosting of T<sub>eff</sub>s, i.e. cancer and infections [53,54]. However, IL-2 is dispensable for the differentiation, survival and function of T<sub>eff</sub>s, as IL-2<sup>-/-</sup> mice develop T-cell-mediated autoimmunity [55]. In contrast, IL-2 is essential for the differentiation, survival and function of Tregs [56,57]. IL-2 also has pleiotropic functions and can activate T<sub>eff</sub>s and notably memory CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>s, and using IL-2 for treating T-cell mediated AID by promoting Treg function carries the risk of stimulating T<sub>eff</sub>s and could potentially worsen disease. Thus, therapeutic use of IL-2 to control autoimmunity requires identifying doses that selectively promote Treg function without activating effector populations.

The present study shows that the 0.3–3 MIU/day dose range is safe and effectively expanded/activated Tregs in T1D patients. The IL-2 dose-range of 0.3–1 MIU/day, given for 5 days effectively expands and activates Tregs without untoward effects on T<sub>eff</sub>s or NK



**Fig. 4.** Dose-dependent changes in cytokines and chemokines in the plasma of T1D patients treated by Id-IL-2. Plasma cytokines and chemokines were measured by luminex assay, except for TGF-beta measured by ELISA. Radar chart representation of Treg/anti-inflammatory, Th1/Th17/inflammatory and Th2 cytokines at day 6 of follow-up (A). For each cluster of cytokines, patient projections according to the first two PCA components (capturing more than 70% of the overall variability) (B). Time course changes of representative cytokines (C). Data are shown as mean  $\pm$  SEM of patients' values normalized by individual baseline values at different time points.

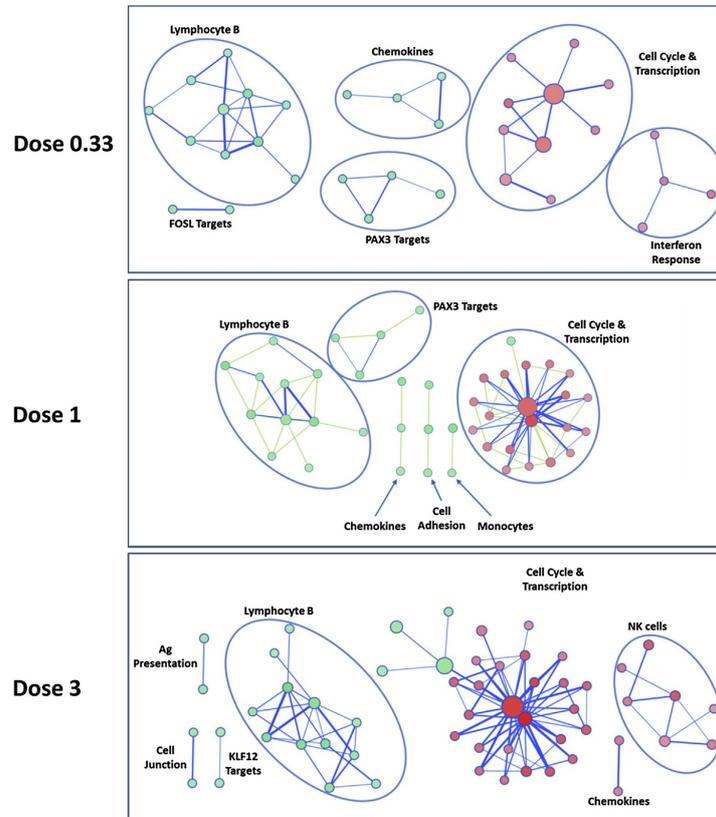
cells. These results are in line with a recent study of low dose IL-2 ( $\approx 0.1$ – $0.4$  MIU/day for five days) in healthy adults [58]. At the dose of 3 MIU/day, the effect on Tregs is even more pronounced and importantly more durable; yet at this dose, we observed a trend toward NK cell expansion (Supplementary Fig. 2), a trend for chemokine cytokine/chemokine increase (Fig. 4), and more frequent mild to moderate side effects [40].

Under the assumption that chronic diseases will require maintaining increased proportion of Tregs over time, repeated treatment will likely be necessary. The appropriate dosing should consider the patient population, the duration and frequency of the treatment, and the cumulative dosing effects in relation to time. The duration of Tregs expansion, which is clearly dose-dependent, is a major parameter to take in consideration for designing regimen of administration. Using results from this trial, we modeled that at a

dose of 1 MIU/day, a 5-day induction course followed by one injection every two weeks would allow to maintain a modest increase (<30%) of Tregs throughout the treatment period, a dosing that we currently use in a trial investigating Id-IL-2 in 11 different AIDs (NCT01988506).

#### 4.2. On the effect of IL-2 on the immune environment

At the dose of 1 and 3 MIU/day, we observed a significant and unexpected decrease in B cell percentages, correlating with increases in Treg but not NK cells (Supplementary Fig. 2). Interpretation of this finding is not straightforward. A direct effect of IL-2 on mature B cells is unlikely because they do not express CD25 nor the signal transducing beta and gamma chains of the IL2 receptor [59]. The clinical significance of these findings



**Fig. 5.** Clustering of significantly regulated molecular signatures from PBMCs. For each IL-2 treatment dose (0.33, 1 and 3 MIU), Enrichment Map analysis was performed on significantly up- and down-regulated molecular signatures, in red and green, respectively ( $q$ -value < 0.05). Clusters have been labeled according to their main biological feature. Size of nodes (circles) is proportional to the number of genes in the signature; width of bars linking nodes is related to the Jaccard coefficient between two signatures. Signatures without connection are not shown.

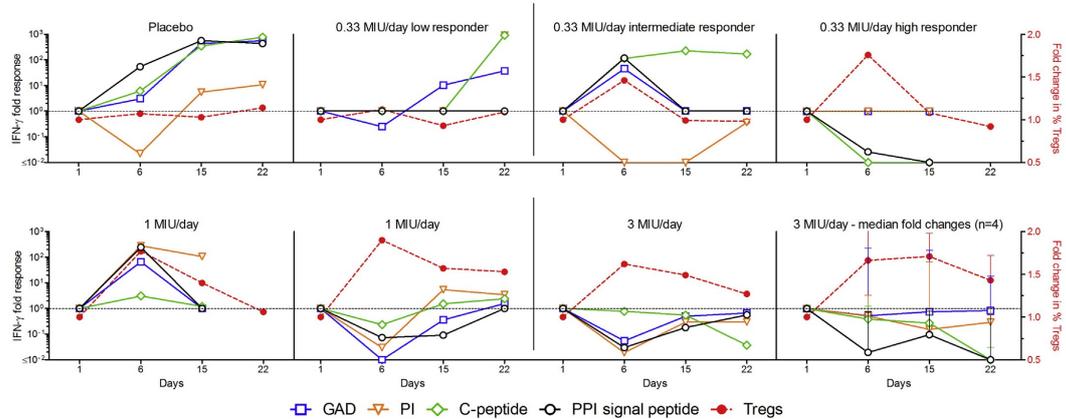
remains to be clarified in future studies, particularly because a decrease in B cells could be advantageous for the treatment of B cell dependent AIDs.

IL-2 induces a clear shift of the peripheral blood immune environment towards a regulatory milieu, as reflected not only by changes in cell proportions, but also by plasma proteomics. This shift is dose-dependent, as well illustrated by the unsupervised statistical analyses (Fig. 4B). These results suggest a broad anti-inflammatory effect of *ld*-IL-2 [17] and thus a broader therapeutic scope.

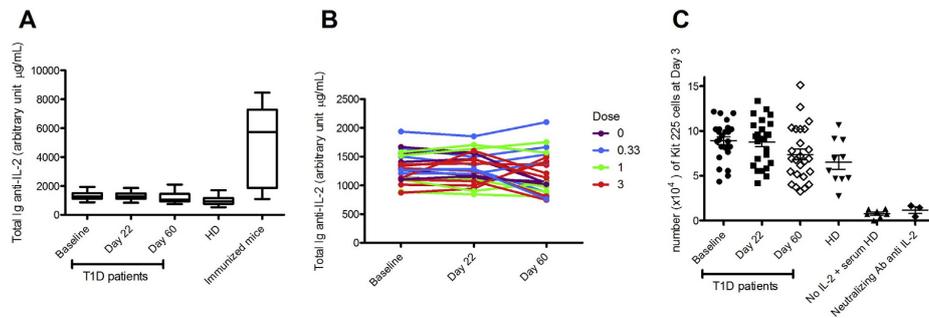
IL-10 and TGF-beta, two cytokines involved in suppressive functions, are also increased by IL-2 therapy, more pronouncedly at 3 MIU/day. At the same dose, there is an increase in IFN-gamma, which is usually classified as a Th1 cytokine. However, this is the only Th1 cytokine impacted and it was only modestly elevated, possibly coming from IFN-gamma secreting Tregs [60]. IL-17 was moderately increased only at the 3 MIU/day dose, a dose at which IL-2, IL-10 and TGF-beta were markedly increased; thus, the overall balance still appears tipped towards a regulatory milieu at this dose. Consistent with this interpretation, beta-cell-specific Teff

responses were reduced in 6/9 patients tested during treatment, importantly in 4/4 treated with the 3 MIU/day dose (Fig. 6), with no reductions in the placebo-treated patient tested. Thus, altogether, there is a clear IL-2 dose-dependent tuning of the immune response towards regulation of effector responses, including disease-specific, autoreactive Teff responses.

At the dose of 3 MIU/day, there was a marked increase of IL-5 levels (Fig. 4A), a cytokine involved in eosinophil homeostasis. However, at the single and cumulative doses used, our available data show only a modest increase in eosinophil counts. This contrasts with the marked increase reported by others at doses of IL-2 that were higher and/or given over a longer time course [15,61]. These results are compatible with IL-2 triggering IL-5 production by stimulating ILC2 cells, which are CD25<sup>+</sup> [62]. However, ILC2 also produce IL-13, IL-9 and IL-4 [62], which were not increased in patients' plasma. Of note, it has been reported that IL-5 promotes induction of antigen-specific Treg that suppress autoimmunity [63]. Importantly, at the 1 MIU/day dose, IL-5 was not induced, further pointing at this dose as safer choice for chronic administration.



**Fig. 6.** Modifications of  $\beta$ -cell-specific T-cell responses and Treg numbers in Id-IL-2-treated T1D patients. PBMCs from T1D patients were analyzed for IFN- $\gamma$  T-cell responses against  $\beta$ -cell protein antigens (left Y axis) at different time points. Percentages of Tregs are shown by the dashed red line (right Y axis). Results are expressed as fold changes normalized to day 1 (baseline). Each graph represents one patient except the bottom right graph which represents the median and range fold changes of 4 patients treated at 3 MIU/day.



**Fig. 7.** Anti-IL-2 antibodies study. Patients' plasma were tested for the presence of anti-IL-2 antibodies at different time points. (A) Mean values for anti-IL-2 Ig in patients and healthy donors (HD) plasma and for anti-human IL-2 Ig in plasma of mice treated for 4 months with human IL-2. (B) Individual time course of human Ig anti-IL-2 among normal and low responders group. (C) Proliferation of the IL-2 dependent Kit 225 cells in presence of patients and HD plasma, or an anti-IL-2 neutralizing antibody.

#### 4.3. On IL-2 and therapy and prevention of AIDs

AIDs often develop over a long period of time and are chronic, with a progressive aggravation. Early intervention with Id-IL2 could help reestablish a proper immune milieu and slow-down or even reverse the process. This is exemplified in T1D, for which at diagnosis most patients still maintain a functional mass of pancreatic  $\beta$ -cells and produce insulin upon stimulation. Halting beta-cell autoimmune destruction and preserving residual beta-cells soon after diagnosis could prevent further disease progression, thus improving clinical management and long-term outcomes for patients with T1D. In this perspective, our initial results showing the blunting of beta-cell-specific Tregs during Id-IL-2 are very encouraging. We caution that such analyses could be performed only in a subset of patients and thus further study and validation are needed, which we will pursue in our efficacy trial of Id-IL-2 in patients with T1D (NCT01862120).

We believe that there may be even greater potential for using Id-IL-2 to prevent AIDs. Providing a boost to Tregs in patients at risk for AIDs, such as autoantibody-positive relatives of T1D patients, could

help delay or prevent the onset of the full-blown disease. Moreover, boosting Tregs with Id-IL2 could also prevent or decrease the frequency and severity of relapses in relapsing-remitting diseases like multiple sclerosis (MS).

Finally, Id-IL-2 has now been used successfully in the setting of chronic and acute GVHD [15,64] and several AIDs, such as HCV-vasculitis [17], T1D [40], alopecia areata [65], and SLE [66–68]. A therapeutic benefit was observed in most patients treated in these trials. This changes the paradigm of a highly focused effect of Id-IL-2 on Tregs to one where IL-2 has a broader regulatory influence on the homeostasis of the immune system, and notably inflammation. As such, future studies should explore further the effects of IL-2 and define efficacious Id-IL-2 regimens that can benefit patients currently suffering from several forms of AID and inflammatory disorders.

#### The DF-IL2 study group

Principal Investigator: Prof D Klatzmann MD, PhD  
Principal Clinical Investigator: Prof A Hartemann MD

**Methodologist:** G Bensimon MD  
**Data management & Statistical Analysis:** C A Payan MD  
**Clinical Investigations**  
 Centre-Centre d'Investigation Clinique Paris-Est Hopital de La Pitié-Salpêtrière Paris France  
 Prof C. Funck-Brentano MD, B. Charbit MD, N Nicolas MD, S Delroise MD  
**Biological Investigation**  
 M Rosenzweig MD, M Fontfrede PharmD  
**Safety committee**  
 Pr P Bougnères MD, Pr C Boitard MD  
**Scientific watch**  
 E Piaggio PhD  
**Modeling and Interim Analysis**  
 Clinical Pharmacology, Angers Hospital, Angers, France (Prof B. Diquet PharmD, C. Abbara PharmD)  
 Biometry, Curie Institute, Paris, France (Prof B Asselain MD, Dr Y de Rycke PhD)  
**Regulatory affairs and Monitoring**  
 Clinical Research and Development Department, APHP, Paris, France (V. Millul PhD)  
 Clinical Research Unit Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France (N Dedise CRA, D Wenjie Gu CRT)  
**Randomization**  
 Clinical Research Unit- EST GH St Antoine, APHP, Paris, France (A Rousseau PhD)  
**Treatment Management**  
 Pharmacy, Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP, Paris, France (MH Fievet PharmD, G. Churlaud PharmD, PhD)  
**Clinicians at recruiting centres**  
 - Department of endocrinology-diabetology, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne, France  
 - Univ Versailles SQY, Versailles, France (M-L Raffin-Sanson, MD)  
 - Department of diabetology, AP-HP, Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France (D Dubois-Laforgue, MD)  
 - Department of endocrinology-diabetology-nutrition, AP-HP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Prof A Hartemann, O Bourron MD, S Jacqueminet MD)  
 - Department of Internal Medicine, AP-HP, Henri Mondor Hospital, Creteil, France (G Lagadec, MD)  
 - Department of internal medicine, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France (C Deybach, MD)  
 - Centre Hospitalier de Rambouillet, Department of internal medicine, France, (M Popelier MD)  
 - Department of endocrinology-diabetology, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Paris, F-75012, France (N Bourcigaux, MD, E Laroche MD, S Christin-Maitre MD)  
 - Department of endocrinology-diabetology-nutrition, AP-HP, Jean Verdier Hospital, Bondy, France (E Cosson MD, B Donadille, MD, B Lormeau, MD)

#### Acknowledgments

We are indebted to Christophe Misse, director of the Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD) of the AP-HP, for initiating the support for this study. We thank the patients and the members of the DF-IL2-study group (listed above), and more specially Gilbert Bensimon for the study design and Christine Payan for data management and statistical analyses. We also thank all the personnel of the Endocrinology department, the Clinical Investigation Center Paris-est (CIC-PE) and the Clinical Investigation Center for Biotherapies (CIC-BTi) for their participation and more especially Nathalie Fery and Cornélia Degbe. DK, MR and TRM are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take

responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

MR and DK are inventors on a patent application related to the therapeutic use of Id-IL-2, which belongs to their academic institutions and has been licensed to ILTOO pharma. MR, GC and DK hold shares in ILTOO pharma. HPP is an employee of ILTOO pharma. No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

This work was funded by the DRCD, the CIC-PE and CIC-BTi, the Inserm and French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme (ANR-11-IDEX-0004-02). RM was supported by the Aviesan/AstraZeneca program. JB and AL were supported by the Immune Tolerance Network (NIH Contract #N01 A15416), an international clinical research consortium headquartered at the Benaroya Research Institute and supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the Juvenile Diabetes Research Foundation. This work was also supported by the Diabetes Research Institute Foundation, Hollywood, FL, the Peacock Foundation, Inc., Miami, FL, and the Anton E. B. Schefer Foundation, which supported AY, AP and TRM.

MR supervised immunomonitoring, participated to the study design and analyzed results; GC, RM, AS, ND, WC, RL, AL, JB, GA, HPP, AY, AP and TRM performed some experiments and analyzed results; AH was the principal clinical investigator of the study, participated to the study design and analyzed results; DK was the principal investigator of the study, conceived the study, participated to the study design, analyzed results and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.001>.

#### References

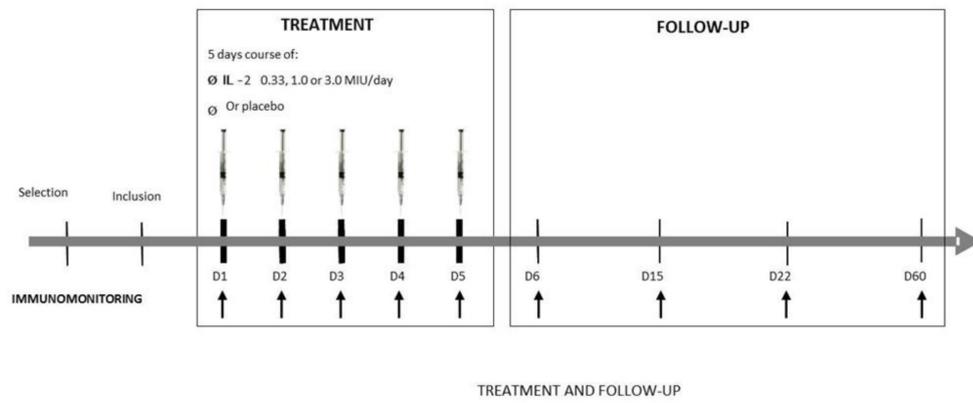
- [1] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500.
- [2] Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006;12:178–80.
- [3] Campbell DJ, Koch MA. Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119–30.
- [4] Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11:7–13.
- [5] Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006;116:1713–22.
- [6] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
- [7] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepel B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68–73.
- [8] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
- [9] Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:1407–14.
- [10] Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:92–9.
- [11] Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 2010;59:407–15.
- [12] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010;10: 849–59.
- [13] Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol* 2011;187:2061–6.
- [14] Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010;207:1871–8.

- [15] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea 3rd EP, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011;365:2055–66.
- [16] Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, Bascug G, McDonough S, Kawano Y, et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2013;5: 179ra43.
- [17] Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–77.
- [18] Tang Q, Bluestone JA, Kang SM. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 2012;4:11–21.
- [19] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199–210.
- [20] Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC group. Multi-department virus C. *Arthritis Rheum* 1999;42:2204–12.
- [21] Dendrou CA, Plagnol V, Fung E, Yang JH, Downes K, Cooper JD, et al. Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat Genet* 2009;41:1011–5.
- [22] Qu HQ, Montpetit A, Ge B, Hudson TJ, Polychronakos C. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56:1174–6.
- [23] Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2005;76:773–9.
- [24] Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 2010;32:457–67.
- [25] Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:857–64.
- [26] Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;6:109–18.
- [27] Ferraro A, Socci S, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011;60:2903–13.
- [28] Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010;464:1293–300.
- [29] Battaglia M, Roncarolo MG. Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Semin Immunol* 2011;23:182–94.
- [30] Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008;28:687–97.
- [31] Bougneres PF, Carel JC, Castano L, Boitard C, Gardin JP, Landais P, et al. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med* 1988;318:663–70.
- [32] Feutren G, Papoz L, Assan R, Viallettes B, Karsenty G, Vexiau P, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicenter double-blind trial. *Lancet* 1986;2:119–24.
- [33] Stiller CR, Dupre J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984;223:1362–7.
- [34] Skyler JS. Immune intervention for type 1 diabetes, 2012–2013. *Diabetes Technol Ther* 2014;16(Suppl. 1):S85–91.
- [35] Orban T, Bundy B, Becker DJ, Dimeglio LA, Gitelman SE, Goland R, et al. Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: follow-up 1 year after cessation of treatment. *Diabetes Care* 2014;37:1069–75.
- [36] Herold KC, Gitelman SE, Ehlers MR, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Hagopian W, et al. Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes* 2013;62:3766–74.
- [37] Hagopian W, Ferry Jr RJ, Sherry N, Carlin D, Bonvini E, Johnson S, et al. Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: two-year results from the randomized, placebo-controlled protege trial. *Diabetes* 2013;62:3901–8.
- [38] Orban T, Beam CA, Xu P, Moore K, Jiang Q, Deng J, et al. Reduction in CD4 Central memory T-cell subset in co-stimulation modulator abatacept-treated patients with recent-onset type 1 diabetes is associated with slower C-peptide decline. *Diabetes* 2014;63:3449–57.
- [39] Garg G, Tyler JR, Yang JH, Cutler AJ, Downes K, Pekalski M, et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function. *J Immunol* 2012;188:4644–53.
- [40] Hartemann A, Bensimon G, Payan C, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose Interleukin-2 induces regulatory T cells and is well tolerated in patients with type-1 diabetes: results of a phase I/II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013;1:295–305.
- [41] Long SA, Rieck M, Tatum M, Bollyky PL, Wu RP, Muller I, et al. Low-dose antigen promotes induction of FOXP3 in human CD4+ T cells. *J Immunol* 2011;187:3511–20.
- [42] Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, Naselli G, Mittag D, Combadiere B, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood* 2011;118:2128–37.
- [43] Scharenberg JG, Stam AG, von Blomberg BM, Roest GJ, Palmer PA, Franks CR, et al. The development of anti-interleukin-2 (IL-2) antibodies in cancer patients treated with recombinant IL-2. *Eur J Cancer* 1994;30A:1804–9.
- [44] Hori T, Uchiyama T, Tsudo M, Umadome H, Ohno H, Fukuhara S, et al. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood* 1987;70:1069–72.
- [45] Li S, Roupael N, Duraisingham S, Romero-Steiner S, Presnell S, Davis C, et al. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat Immunol* 2014;15:195–204.
- [46] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC- $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003;34:267–73.
- [47] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545–50.
- [48] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? the example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44–9.
- [49] Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009;58:520–9.
- [50] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899–911.
- [51] Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771–5.
- [52] Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007–8.
- [53] Chang AE, Rosenberg SA. Overview of interleukin-2 as an immunotherapeutic agent. *Semin Surg Oncol* 1989;5:385–90.
- [54] Giedlin MA, Zimmerman RJ. The use of recombinant human interleukin-2 in treating infectious diseases. *Curr Opin Biotechnol* 1993;4:722–6.
- [55] Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sichel E, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1995;25:3053–9.
- [56] Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108:1571–9.
- [57] Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010;33:153–65.
- [58] Ito S, Bollard CM, Carlsten M, Melenhorst JJ, Biancotto A, Wang E, et al. Ultra-low dose interleukin-2 promotes immune-modulating function of regulatory T cells and natural killer cells in healthy volunteers. *Mol Ther* 2014;58:1388–95.
- [59] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:180–90.
- [60] Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009;31:772–86.
- [61] Long SA, Rieck M, Sanda S, Bollyky JB, Samuels PL, Goland R, et al. Rapanmycin/IL-2 combination therapy in patients with type 1 diabetes augments Tregs yet transiently impairs beta-cell function. *Diabetes* 2012;61:2340–8.
- [62] Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells—how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013;13:75–87.
- [63] Tran GT, Hodgkinson SJ, Carter NM, Verma ND, Plain KM, Boyd R, et al. IL-5 promotes induction of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that suppress autoimmunity. *Blood* 2012;119:4441–50.
- [64] Kennedy-Nasser AA, Ku S, Castillo-Caro P, Hazrat Y, Wu MF, Liu H, et al. Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20:2215–25.
- [65] Castela E, Le Duff F, Butori C, Ticchioni M, Hofman P, Bahadoran P, et al. Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol* 2014;150:748–51.
- [66] Klatzmann D. Immunoregulation without immunosuppression: the promise of low dose IL-2. In: FOCIS meeting Chicago; 2014.
- [67] Von Spee-Mayer CSE, Rose A, Humrich J, Riemekasten G. Low-dose interleukin-2 therapy caused selective expansion of Tregs together with rapid reduction of disease activity in a patient with severe refractory SLE. In: EULAR meeting Paris; 2014.
- [68] Yu D. Low-dose interleukin-2 in active systemic lupus erythematosus. In: FOCIS meeting Chicago; 2014.

Online supplemental materials

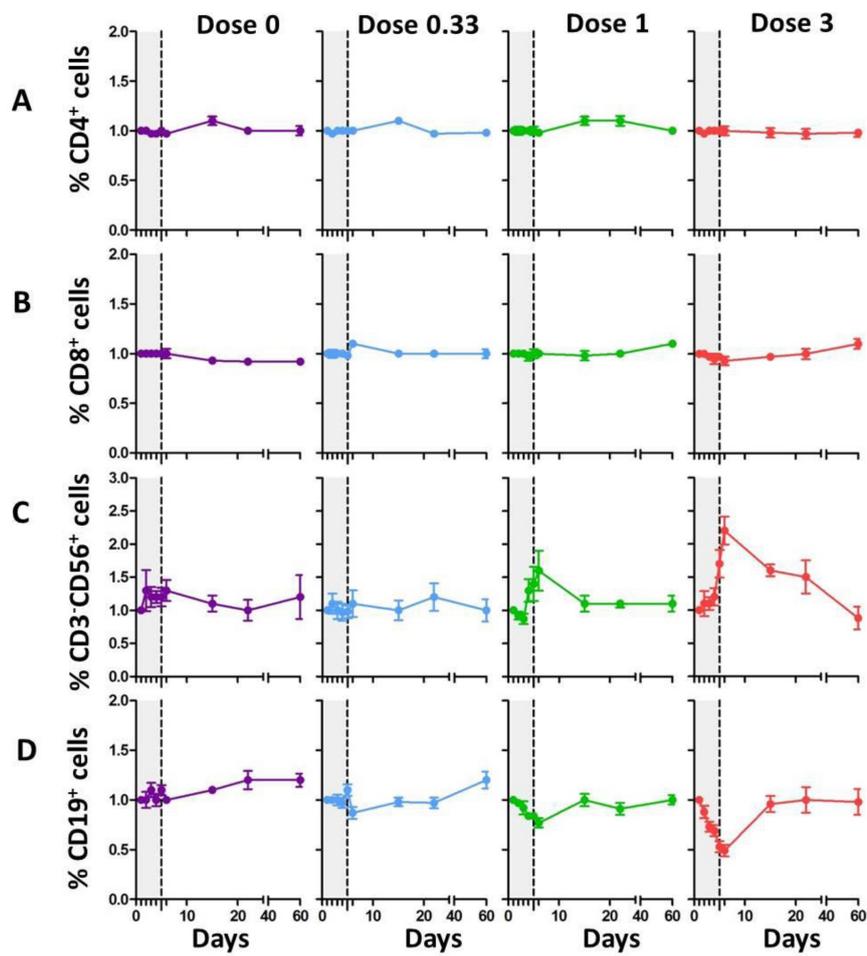
Supplementary figures and table

Supplementary Fig 1: Trial design



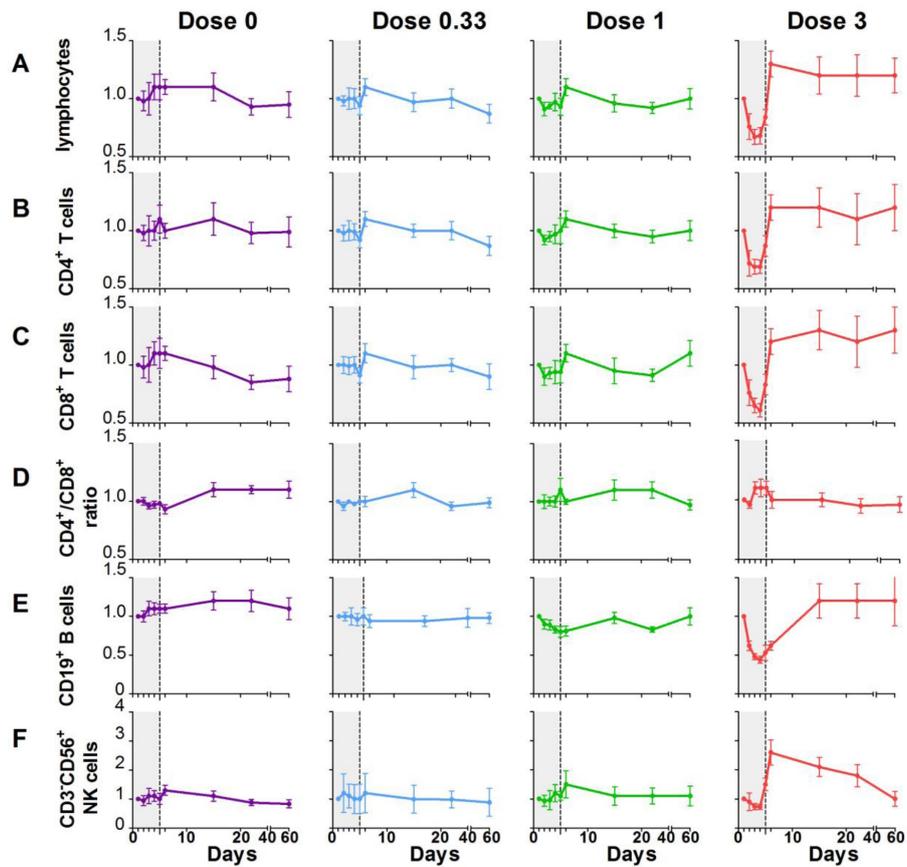
**Supplementary Fig 3: Effect of Id-IL-2 on lymphocyte subpopulations percentages during follow up of patients groups**

% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (A), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (B), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK cells (C), CD19<sup>+</sup> B cells (D) in blood of patients. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of cell percentages normalized by individual baseline values for each patient at the different time points.



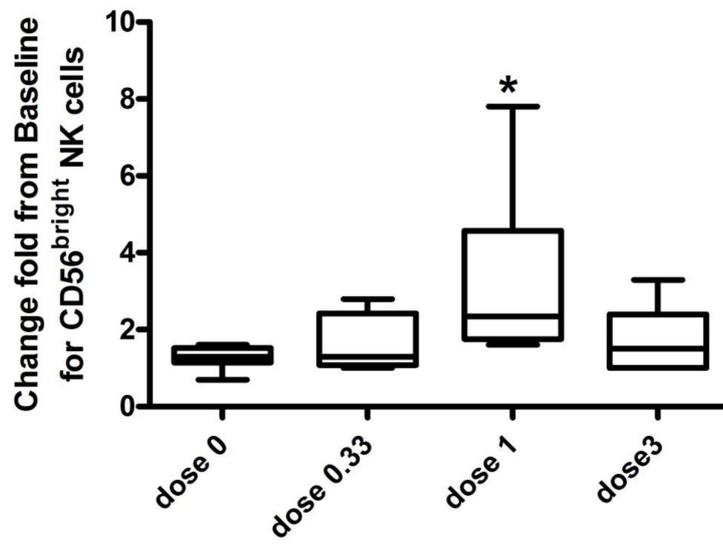
**Supplementary Fig 2: Effect of Id-IL-2 on Lymphocyte Subpopulations numbers during follow up of patients groups**

Flow cytometry quantification of total lymphocytes (A), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (B), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (C), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell ratio (D), CD19<sup>+</sup> B cells (E), CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK cells (F), in blood of patients. Data are shown as mean ± SEM of absolute cell numbers/mm<sup>3</sup> normalized by individual baseline values for each patient at the different time points.



**Supplementary Fig 4: CD56<sup>bright</sup> NK cells changes under Id-IL-2 therapy**

Representation of CD56<sup>bright</sup> cells percentages within CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of cell percentages normalized by individual baseline values in each group of 6 patients at day 15.



**Supplementary Table 1: Detailed statistical results of two-way ANOVA for repeated measures: time by treatment interaction**

		All dose groups	Dose0.33 vs placebo	Dose1 vs placebo	Dose3 vs placebo	
<b>Fig. 1</b>	% treg/CD4	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	CD4 <sup>+</sup> Treg/mm3	<0.0001	0.012	0.002	<0.0001	
	% Treg/Teff	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	% CD8 <sup>+</sup> Treg/CD8	0.0002	0.008	0.001	<0.0001	
<b>Fig. 2</b>	% CD45RA <sup>-</sup> Treg	0.0051	0.0451	0.0004	<0.0001	
	CD25 MFI	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	% GITR	0.0058	0.0193	0.0068	<0.0001	
	% CTLA-4	<0.0001	0.0247	0.0024	0.0005	
	% LAP	ns	-	-	-	
<b>Fig. 3</b>	pSTAT5 MFI	0.0308	0.0372	ns	ns	
	IL-2	<0.0001	0.03	<0.0001	<0.0001	
	IL-2RA	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001	
	IL-10	<0.0001	ns	ns	0.0002	
	TGF-β	0.0006	0.002	ns	0.036	
	IL-17A	0.0059	ns	ns	0.019	
	IFN-γ	ns	-	-	-	
	TNF-α	<0.0001	0.039	ns	<0.0001	
	IL-5	<0.0001	ns	ns	0.0003	
	CCL22	0.0096	0.01	ns	ns	
	CXCL10	<0.0001	0.002	<0.0001	<0.0001	
	<b>Fig. S2</b>	Lymphocytes/mm <sup>3</sup>	<0.0001	ns	ns	<0.0001
		CD4 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>	0.0005	ns	ns	0.0029
CD8 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>		<0.0001	ns	ns	<0.0001	
CD4/CD8		0.0075	0.002	ns	0.0003	
B CD19 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>		<0.0001	ns	ns	0.001	
NK CD3 <sup>-</sup>		<0.0001	ns	ns	0.002	
CD56 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>		<0.0001	ns	ns	0.002	
<b>Fig. S3</b>	CD4 <sup>+</sup> (%)	ns	-	-	-	
	CD8 <sup>+</sup> (%)	0.04	0.006	0.01	0.006	
	CD19 <sup>+</sup> (%)	<0.0001	ns	0.03	<0.0001	
	NK CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> (%)	0.0003	ns	ns	0.0003	

### 4.2.3 Approche Transnosographique d'un essai clinique interventionnel

L'idée d'une étude de « recherche de maladie » est née sur la base des différentes publications qui montrent que la stimulation des Treg par fd d'IL-2 renforce leur fonction de prévention et de contrôle des pathologies auto-immunes, et aboutit à modifier la balance Teff/Treg en faveur de ces derniers avec donc un effet sélectif sur les Treg. D'où un intérêt thérapeutique dans le contexte des différentes MAI et dans la GVHD (Saadoun et al. 2011; Koreth et al. 2011; Hartemann et al. 2013; Castela et al. 2014; Spee-Mayer et al. 2016; Jens Y. Humrich et al. 2017 ; J. He et al. 2020; Jens Y. Humrich et al. 2019; J. Y. Humrich et al. 2016; Miao et al. 2018; Koreth et al. 2016 ; Hordinsky and Kaplan 2014 ; S.-X. Zhang et al. 2019).

A partir d'une modélisation pharmacocinétique des résultats de l'étude DF-IL2, nous avons défini la dose et le schéma thérapeutique optimal : à savoir une injection de 1 MUI/jour pendant 5 jours consécutifs (la phase d'induction) suivie d'une injection toutes les deux semaines pendant six mois (la phase de maintenance) (Churlaud et al. 2018).

Mais comment sélectionner les maladies d'intérêt pour des essais de phase II ?

Le comité scientifique du Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Inflammation-Immunopathologie-Biothérapie (i2B), qui a pour objectif de mieux comprendre et mieux prendre en charge les MAI, a donc conçu une étude de phase I/IIa, multicentrique, en ouvert, visant à tester des fd d'IL-2 dans différentes MAI (TRANSREG NCT01988506). Ce type d'étude, dans laquelle la même molécule est testée dans différentes pathologies (appelée « *basket trial* »), est déjà appliqué avec succès dans d'autres disciplines, notamment en oncologie (Redig and Jänne 2015; Woodcock and LaVange 2017). Les maladies retenues pour cette étude ont été sélectionnées pour représenter au mieux l'ensemble du CONTINUUM des MAI : des maladies purement inflammatoires à des maladies purement autoimmunes en passant par des maladies à composante mixte. Tous les patients ont reçu l'IL-2 selon le même schéma :

une période d'induction avec 1 MUI / jour pendant cinq jours suivie d'une période de maintenance avec 1 MUI toutes les deux semaines pendant six mois (excepté la 2<sup>ème</sup> cohorte lupus qui, pendant le période de maintenance, a reçu 1 MUI toutes les semaines pendant six mois). Les patients ont été sélectionnés si porteurs d'au moins une des pathologies à l'étude, s'ils avaient une activité légère ou modérée de la maladie, et s'ils étaient sous traitement d'entretien stable depuis au moins deux mois avant l'administration de fd d'IL-2.

Les questions posées dans le cadre de cette étude sont sur l'effet des fd d'IL-2 sur les cellules Treg (est-ce qu'il y a un effet spécifique selon la MAI?), sur les bénéfices cliniques et sur la tolérance (notamment pour ce qui concerne la sécurité d'administration des fd d'IL-2 en association avec d'autres médicaments, tels que les immunosuppresseurs ou les agents biologiques).

Pour répondre à ces questions, le critère principal d'efficacité retenu était les valeurs de Treg à J8 (après la cure d'induction) par rapport à la baseline, les critères secondaires étaient : les valeurs de Treg pendant la phase de maintenance par rapport au baseline, les résultats sur la clinique et les résultats sur la tolérance à l'IL-2.

Nous avons publié des résultats sur les 46 premiers patients inclus dans cet essai et traités avec Proleukin®. Ces 46 premiers patients traités présentaient différentes pathologies parmi celles sélectionnées. Après la cure d'induction, le critère principal d'efficacité a été atteint avec une augmentation de 2 fois par rapport à la valeur de baseline. L'expansion des Treg à J8 semblait similaire d'une maladie à l'autre et la comparaison croisée de ces réponses entre les différentes pathologies n'était pas statistiquement différente.

Il est important de noter que, pendant la phase de maintenance, les dosages de Treg ont été effectués juste avant l'administration d'IL-2. Par conséquent, les dosages effectués pendant

cette phase ne captent donc que l'augmentation résiduelle des Treg par rapport à l'injection précédente 14 jours plus tôt.

Malgré cela: au 15ème jour (soit 10 jours après la dernière administration de la phase d'induction), les Treg étaient toujours significativement augmentés par rapport à la baseline. Et également pendant toute la période de maintenance (du mois 1 au mois 6), la valeur moyenne de l'AUC des Treg par rapport à la baseline était statistiquement significative pour tous les patients. Nous avons aussi observé une augmentation de cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Figure 4A-C en *supplementary*).

Nous avons ensuite évalué l'effet de fd d'IL-2 en utilisant une analyse non supervisée. À l'aide du t-SNE (van der Maaten 2008), les *clusters* ont été définis automatiquement en fonction de l'expression de FOXP3 et du CD127. Le *cluster* 6, correspondant au *cluster* Treg, tandis que les autres *clusters* correspondent aux cellules Teff. Ensuite, nous avons répété la procédure pour séparer automatiquement les Treg et les Teff en fonction des autres marqueurs. Cela a généré 6 *clusters* pour les Treg et 8 *clusters* pour les Teff (Figure 3B et 3D de l'article 4). La comparaison des différents marqueurs au jour 8 par rapport à la baseline a montré des valeurs statistiquement significatives uniquement pour les *clusters* Treg et, parmi eux, ceux avec les phénotypes les plus activés avec une expression élevée de CD25, Helios et le CTLA-4. (Figure 3C de l'article 4). D'un autre côté, l'analyse statistique non supervisée n'a détecté aucune différence pour aucun des sous-groupes de Teff (Figure 3E de l'article 4).

La même stratégie d'analyse a ensuite été appliquée à un autre panel d'anticorps (Figure supplémentaire S3 de l'article 4). Ici encore, seuls 2 sous-ensembles de Treg correspondant à ceux ayant le phénotype naïf (soit CD45RA<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>ICOS<sup>+/-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) ou ceux ayant le phénotype activé / mémoire (CD45RA<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CCR7<sup>+/-</sup>ICOS<sup>+/-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) ont été

considérablement augmentés au jour 8, tandis que d'autres sous-ensembles de cellules T n'ont pas été affectés.

Nous avons analysé le transcriptome global des PBMC avant et après fd d'IL-2. Nous avons trouvé 91 gènes différentiellement exprimés (DEG) avec une valeur de  $p < 0,05$  au jour 8 comparativement à la baseline. L'analyse avec *Ingenuity pathways analysis* a montré un enrichissement significatif de quatre signatures toutes directement ou indirectement liées aux Treg. La voie la plus significativement régulée à la hausse est organisée autour de gènes essentiels pour la fonctionnalité des Treg (tels que *FOXP3*, *IL-2Ra*, *IL-2Rb* et *CTLA 4*). Ainsi, avec nos données d'immunomonitoring analysées de façon non supervisée et notre analyse du transcriptome, nous confirmons l'effet sélectif sur les Treg de notre schéma d'administration de fd d'IL-2 chez les patients de la cohorte TRANSREG.

Afin d'évaluer l'efficacité clinique d'une manière commune d'une maladie à l'autre, nous avons utilisé l'échelle d'impression clinique globale d'activité (CGI-act) et de sévérité (CGI-sev) de la maladie. L'échelle CGI était à l'origine utilisée dans les essais cliniques pour fournir une évaluation de la vision du clinicien de l'activité et de la sévérité de la maladie chez un patient, avant et après le début d'un médicament à l'étude. On considère que l'état du patient s'est amélioré si au moins un des symptômes présents à la baseline s'est amélioré sans aggravation ou apparition de nouveaux symptômes.

Comparativement à la baseline, une amélioration statistiquement significative de la CGI-act a été observée aux mois 3 et 6 ( $p < 0,001$ ) (Figure 4A de l'article 4) et de la CGI-sev au mois 6 ( $p < 0,001$ ) (Figure 4B de l'article 4). Des changements significatifs ont également été constatés lors de la visite de suivi deux mois après l'arrêt du traitement (CGI-act,  $p = 0,02$  et CGI-sev,  $p = 0,04$ ).

Parmi les 46 premiers patients traités, 26 présentaient des arthralgies et de la fatigue chronique à la baseline. Ce sont les symptômes les plus fréquemment rencontrés parmi les maladies sélectionnées. Au mois 3 (M3), il y avait une diminution significative du pourcentage de patients souffrant de fatigue ( $p = 0,002$ ) et d'arthralgies ( $p = 0,00015$ ) (Figure 4C de l'article 4) et cette tendance s'est poursuivie à M6.

Pour ce qui concerne la tolérance, nous n'avons pas signalé d'effets indésirables graves liés au traitement. La majorité des événements indésirables (EIs) rapportés étaient des réactions aux sites d'injection et la fréquence et la nature des EIs ne diffèrent pas selon les traitements concomitants pris par les patients.

#### *Résultats supplémentaires à ceux publiés dans l'article 4*

Le protocole est toujours en cours. A ce jour, nous avons terminé les inclusions avec 81 patients traités.

La deuxième cohorte a été traitée avec ILT-101® (de l'IL-2 conditionnée en flacon lyophilisé de 1 MIU et donc simple d'utilisation par rapport au Proleukin® qui est lui conditionné en flacon de 18 MUI). Les résultats préliminaires sur les Treg montrent que le Proleukin® et l'ILT-101® ont le même effet sur l'expansion des Treg (Figure 15).

Si l'on regarde la réponse biologique (l'augmentation des Treg) parmi les patients cliniquement répondeurs et ceux non répondeurs, les résultats préliminaires sur 72 patients ne montrent pas de différence significative (Figure 16).

Nous avons exploré le phénotype des Treg des 80 patients inclus dans les différentes cohortes. La Figure 17, où est représentée l'évolution moyenne des marqueurs d'activation des Treg au cours du traitement, montre bien qu'il y a une augmentation significative à J8 de tous les marqueurs d'activation. Pour le CD25, cette augmentation reste même statistiquement significative pendant la phase de maintenance.

Si nous analysons ces mêmes marqueurs dans chaque cohorte (Figure 18), nous constatons qu'il y a une augmentation des marqueurs d'activation dans toutes les pathologies, bien qu'il y ait une variabilité individuelle vis-à-vis de la réponse à l'IL-2.

En ce qui concerne la réponse clinique, la Figure 19 montre l'évolution des scores d'activité clinique spécifiques à chaque pathologie. Il n'y a pas de changements statistiquement significatifs. On note une diminution de l'activité de la maladie pour les scores spécifiques de la SpA (BASDAI), du Psoriasis (PASI et BSA), de la Rectocolite hémorragique (Mayo score simplifié), du Gougerot-Sjogren (ESSPRI), de la maladie de Behçet (BDCAF), et du lupus systémique (SLEDAI) mais pas du score HBI pour la maladie de Crohn. Cependant, il est à noter que l'étude n'avait pas été conçue initialement pour avoir assez de puissance pour montrer un effet sur la clinique [tant du point de vue de la taille des cohortes (entre 6 et 12 patients maximum par cohorte) que du point de vue de la population étudiée (les patients inclus présentaient une activité de la maladie faible ou modérée)]. Outre les scores d'activité globaux, il est intéressant de regarder les résultats cliniques sur les symptômes individuels. Les Figures 20 et 21, montrent l'évolution des symptômes cliniques des patients inclus dans la première et la deuxième cohorte de lupus respectivement. Les arthralgies et la fatigue, qui sont les symptômes les plus rapportés chez ces patients, répondent bien au traitement par l'IL-2, de même que l'alopecie.

Les patients atteints de la maladie de Behçet (Figure 22) présentent une réponse clinique variable parmi les répondeurs (4 sur 6), avec des améliorations sur les manifestations cutanées, articulaires, sur l'aphtose et les maux de tête.

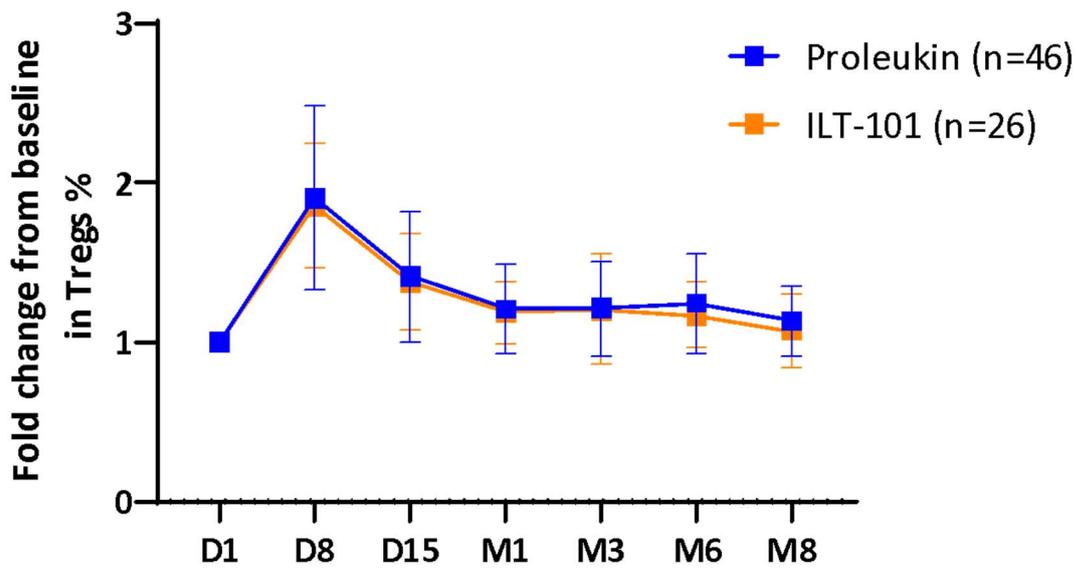


Figure 15 : Effet du Proleukin® et de l'ILT-101® sur les Treg

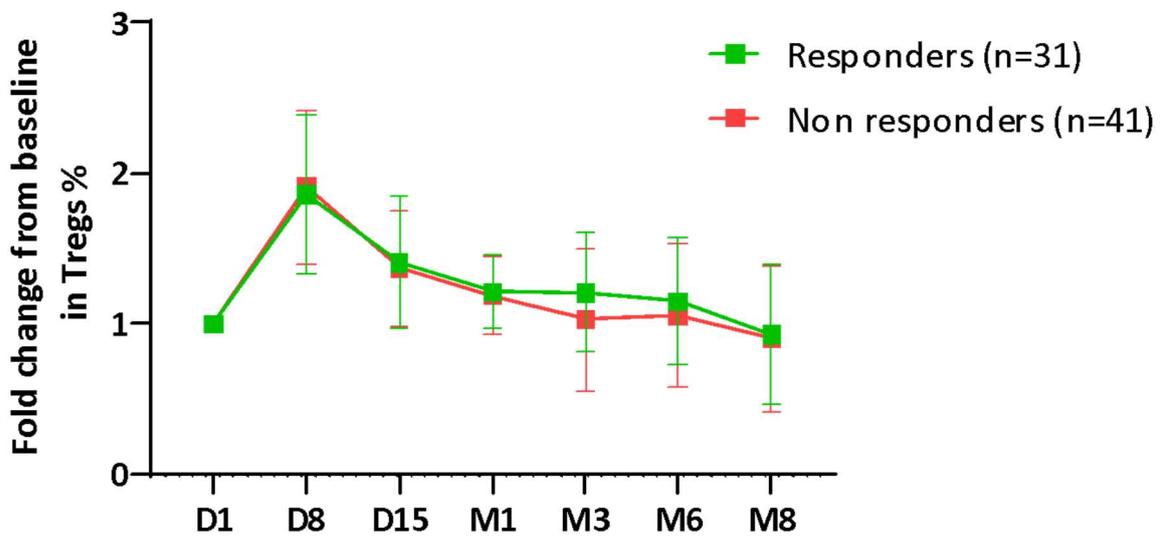


Figure 16 : Evolution des Treg chez les répondeurs et non répondeurs clinique

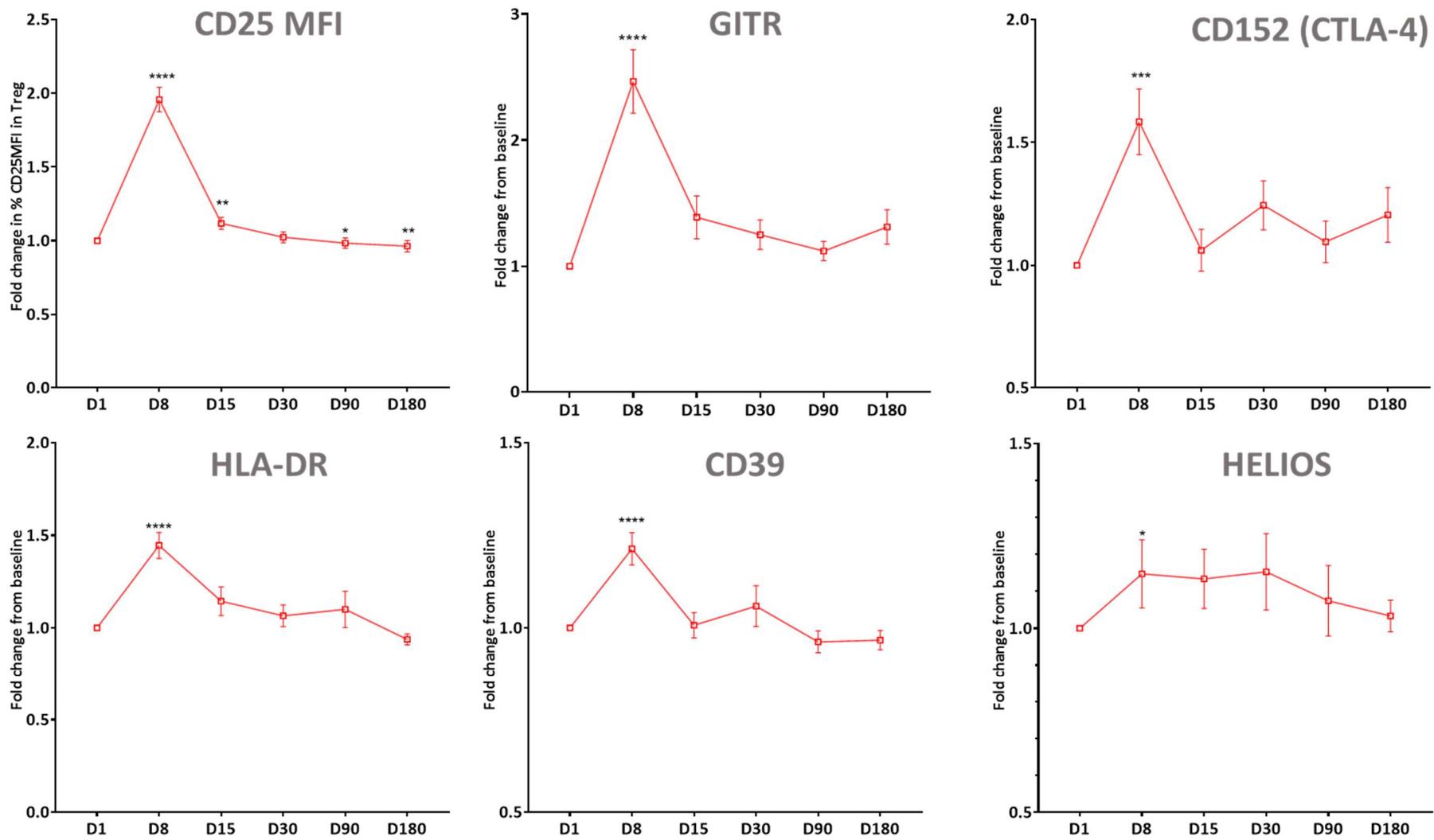
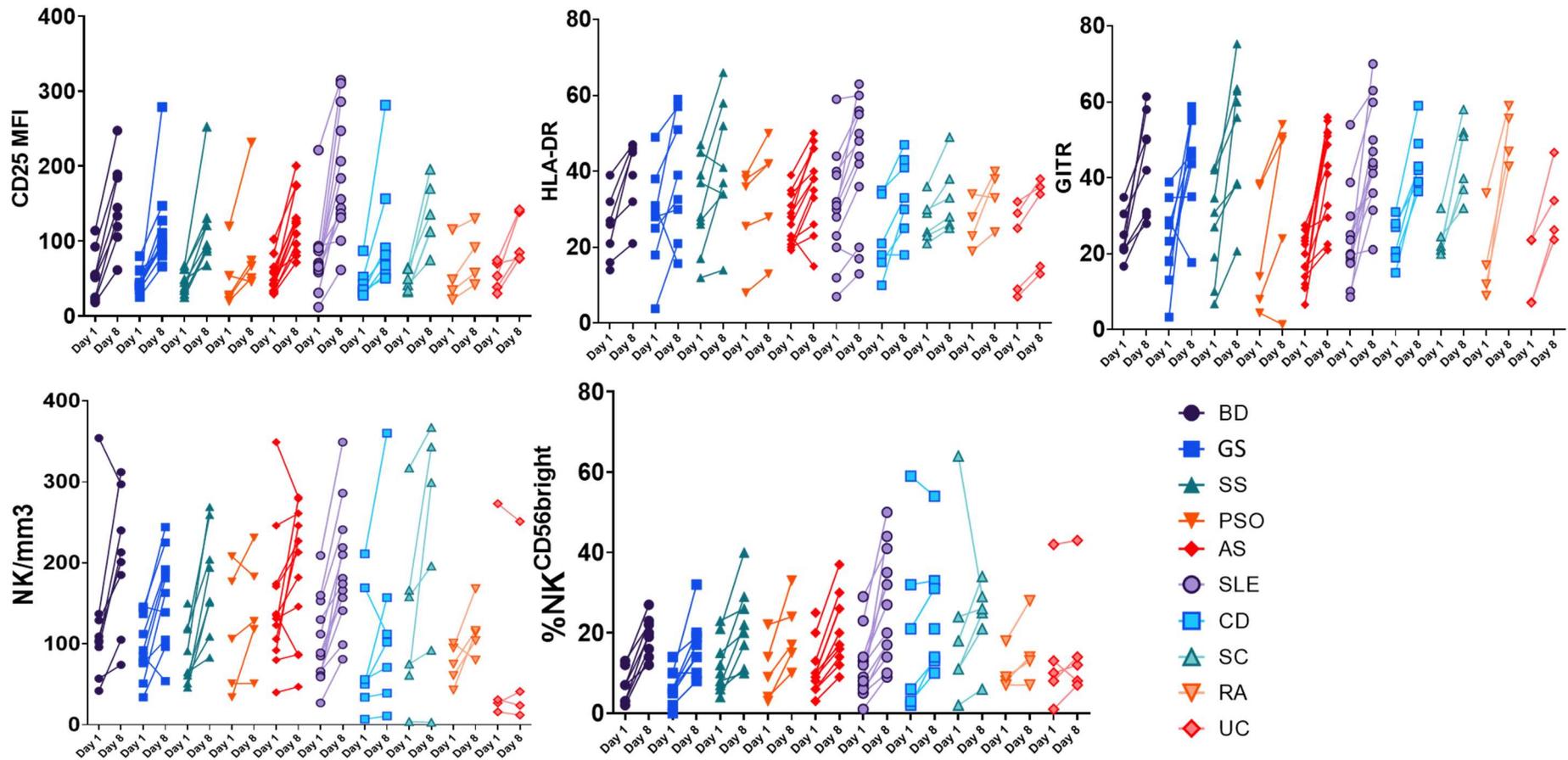


Figure 17 : Evolution des marqueurs phénotypiques des Treg



**Figure 18** : Evolution des marqueurs phénotypiques des Treg par pathologie (BD : maladie de Behçet ; GS : Gougerot-Sjögren; SS : sclérodermie systémique; PSO : psoriasis ; AS : spondylite ankylosante; SLE : lupus systémique ; CD : maladie de Crohn ; SC : cholangite sclérosante ; RA : polyarthrite rhumatoïde; UC : rectocolite hémorragique)

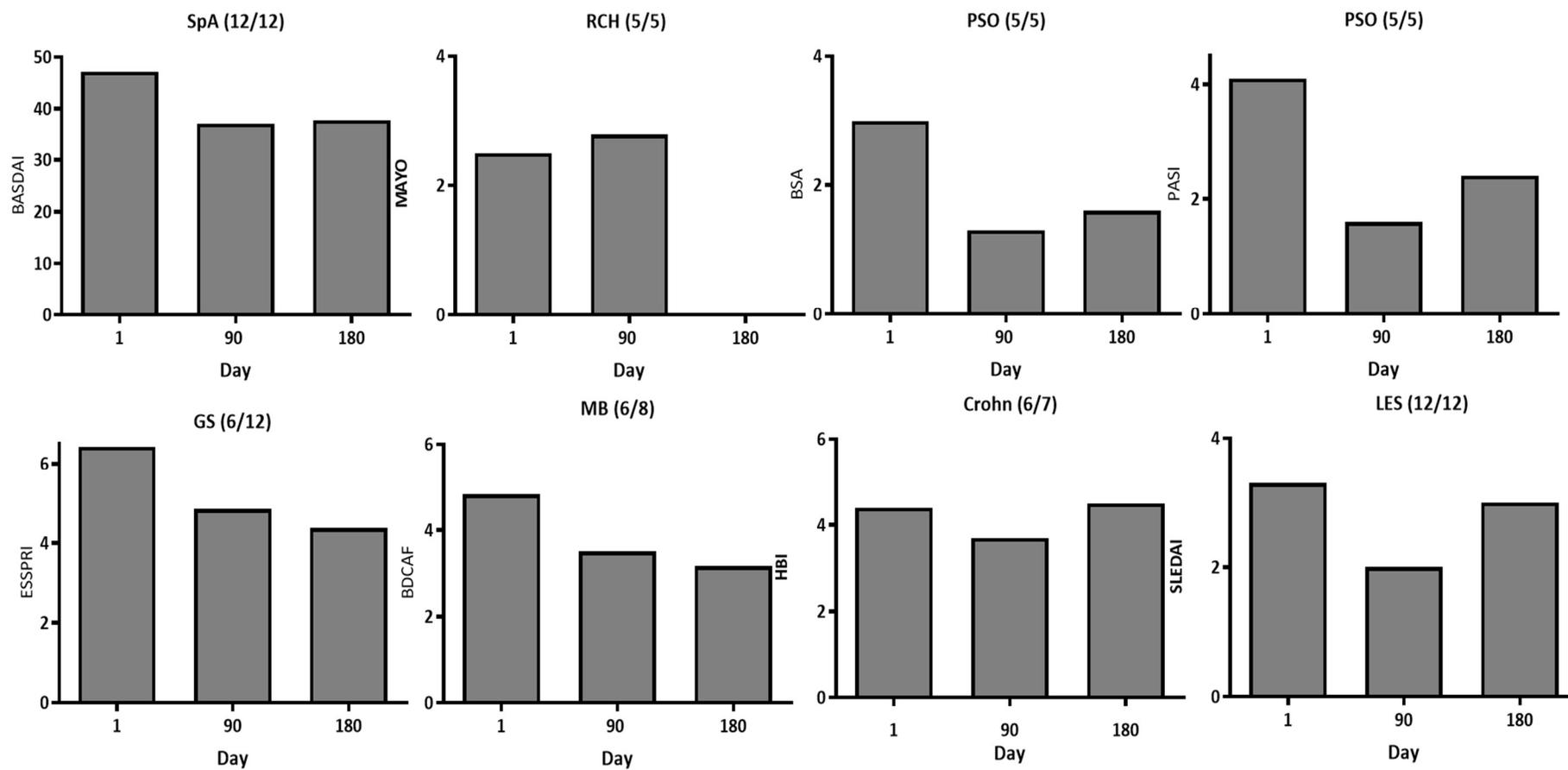


Figure 19 : Evolution des score cliniques par pathologie

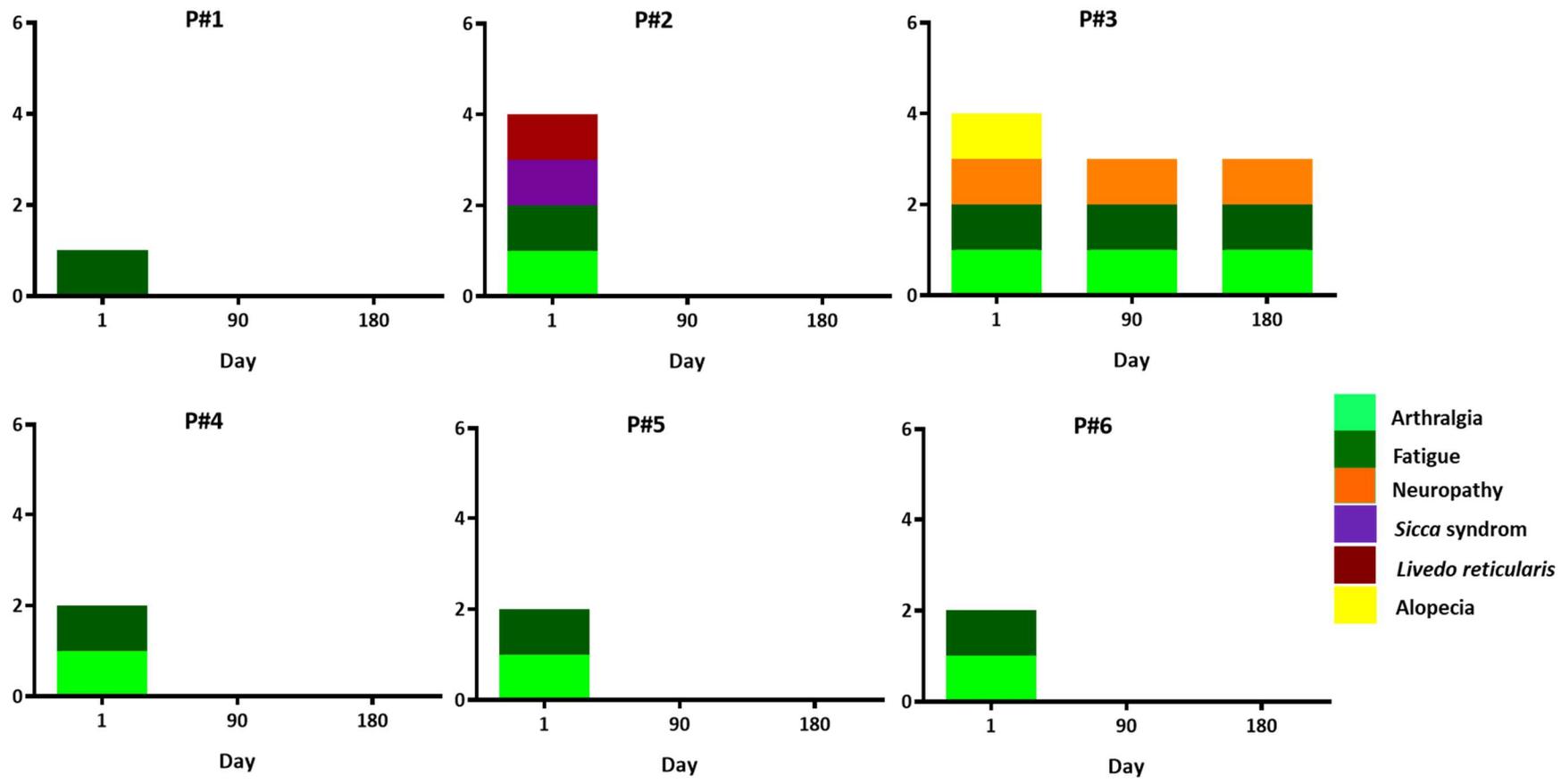


Figure 20 : Evolution des symptômes individuels chez les patients atteints de LES 1<sup>er</sup> cohorte

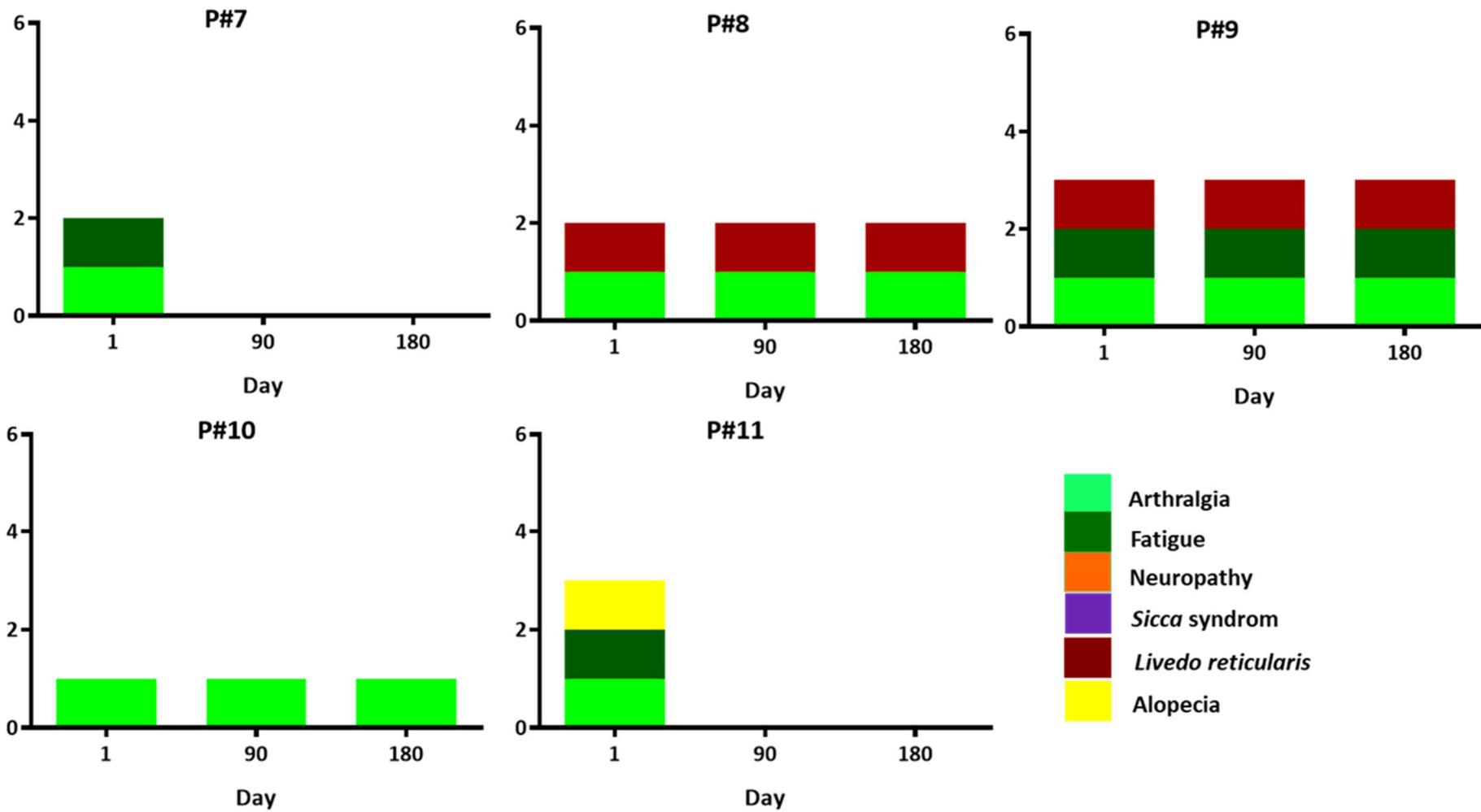


Figure 21 : Evolution des symptômes individuels chez les patients atteints de LES 2<sup>ème</sup> cohorte

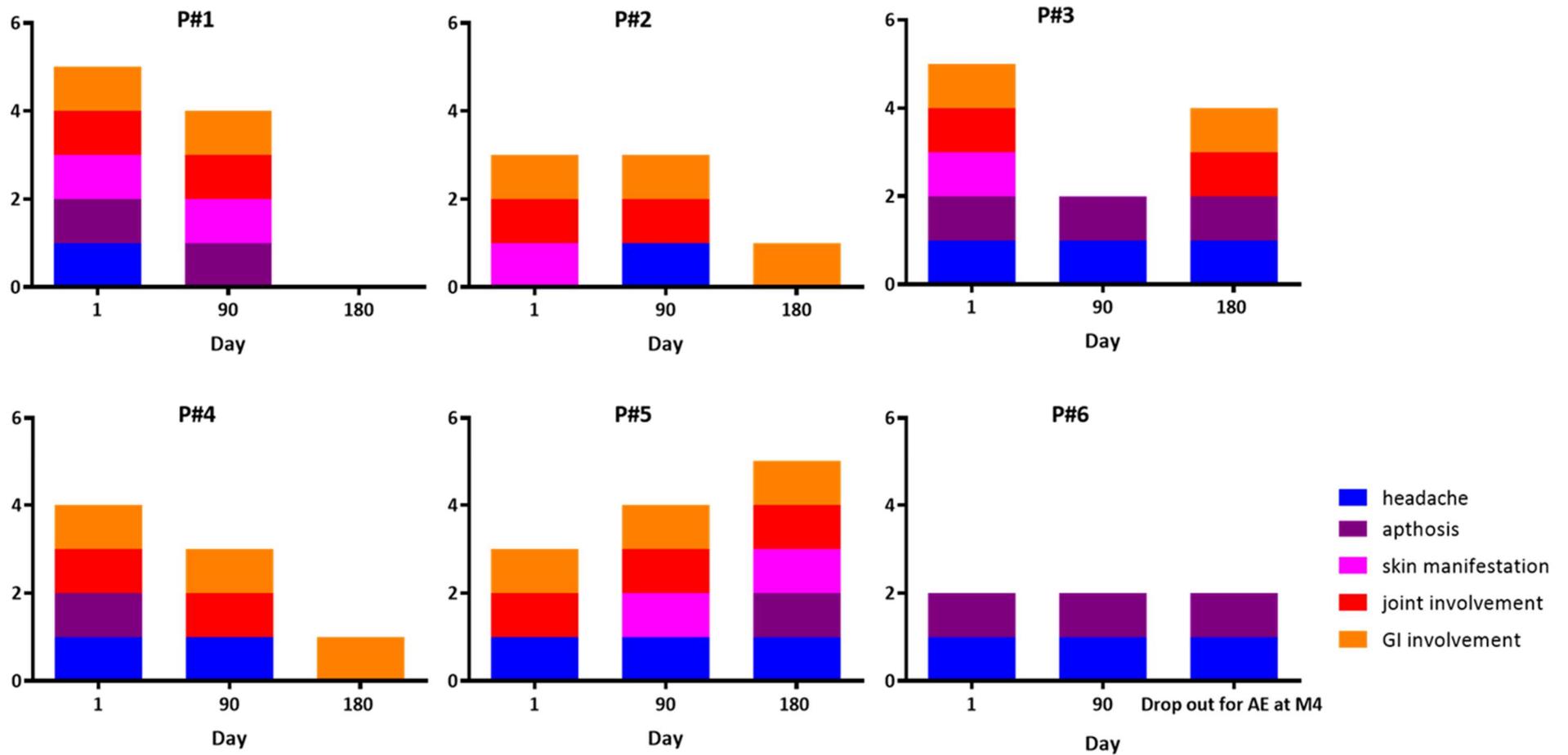


Figure 22 : Evolution des symptômes individuels chez les patients atteints de maladie de Behçet

**Article 4 « Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial »**

## EXTENDED REPORT

# Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial

Michelle Rosenzweig,<sup>1,2</sup> Roberta Lorenzon,<sup>1,2</sup> Patrice Cacoub,<sup>1,2,3</sup> Hang Phuong Pham,<sup>4</sup> Fabien Pitoiset,<sup>1,2</sup> Karim El Soufi,<sup>1,2</sup> Claire Ribet,<sup>1</sup> Claude Bernard,<sup>1,2</sup> Selim Aractingi,<sup>5</sup> Beatrice Banneville,<sup>6</sup> Laurent Beaugier,<sup>7</sup> Francis Berenbaum,<sup>8</sup> Julien Champey,<sup>8</sup> Olivier Chazouilleres,<sup>9</sup> Christophe Corpechot,<sup>9</sup> Bruno Fautrel,<sup>6</sup> Arsène Mekinian,<sup>10</sup> Elodie Regnier,<sup>5</sup> David Saadoun,<sup>1,2,3</sup> Joe-Elie Salem,<sup>11</sup> Jérémie Sellam,<sup>8</sup> Philippe Seksik,<sup>7</sup> Anne Daguanel-Nguyen,<sup>12</sup> Valérie Doppler,<sup>4</sup> Jérémie Mariau,<sup>4</sup> Eric Vicaut,<sup>13</sup> David Klatzmann<sup>1,2</sup>

**Handling editor** Josef S Smolen

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214229>).

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**

Professor David Klatzmann, Clinical Investigation Center for Biotherapies and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy department (i2B), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France; david.klatzmann@sorbonne-universite.fr

MR and RL contributed equally.

Received 2 August 2018  
Revised 29 October 2018  
Accepted 1 November 2018



© Author(s) (or their employer(s)) 2018. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

**To cite:** Rosenzweig M, Lorenzon R, Cacoub P, et al. *Ann Rheum Dis* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214229

**ABSTRACT**

**Objective** Regulatory T cells (Tregs) prevent autoimmunity and control inflammation. Consequently, any autoimmune or inflammatory disease reveals a Treg insufficiency. As low-dose interleukin-2 (ld-IL2) expands and activates Tregs, it has a broad therapeutic potential.

**Aim** We aimed to assess this potential and select diseases for further clinical development by cross-investigating the effects of ld-IL2 in a single clinical trial treating patients with 1 of 11 autoimmune diseases.

**Methods** We performed a prospective, open-label, phase I–IIa study in 46 patients with a mild to moderate form of either rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Behcet's disease, granulomatosis with polyangiitis, Takayasu's disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, autoimmune hepatitis and sclerosing cholangitis. They all received ld-IL2 (1 million IU/day) for 5 days, followed by fortnightly injections for 6 months. Patients were evaluated by deep immunomonitoring and clinical evaluation.

**Results** ld-IL2 was well tolerated whatever the disease and the concomitant treatments. Thorough supervised and unsupervised immunomonitoring demonstrated specific Treg expansion and activation in all patients, without effector T cell activation. Indication of potential clinical efficacy was observed.

**Conclusion** The dose of IL-2 and treatment scheme used selectively activate and expand Tregs and are safe across different diseases and concomitant treatments. This and preliminary indications of clinical efficacy should licence the launch of phase II efficacy trial of ld-IL2 in various autoimmune and inflammatory diseases.

**Trial registration number** NCT01988506.

**INTRODUCTION**

Regulatory T cells (Tregs) prevent autoimmunity and control inflammation.<sup>1</sup> Consequently, any autoimmune or inflammatory disease denotes a Treg insufficiency. Low-dose interleukin-2 (ld-IL2) expands and activates Tregs, and so has a broad therapeutic potential.<sup>2</sup> This potential is further supported by the central role of IL-2/IL-2 receptor

**Key messages****What is already known about this subject?**

- Whereas high dose interleukin-2 (IL-2) activates effector T cells, low-dose interleukin-2 (ld-IL2) expands and activates regulatory T cells (Tregs), and likewise has a broad therapeutic potential for many autoimmune and inflammatory diseases.
- Proof-of-concept clinical trials have already reported the safety and indication of ld-IL2 efficacy in hepatitis C-related vasculitis, systemic lupus erythematosus and graft versus host disease.

**What does this study add?**

- This is the first prospective, phase IIa clinical trial that cross-analyses the safety, biological and clinical effects of ld-IL2 across 11 individual diseases chosen to represent the whole spectrum of autoimmune/inflammatory chronic diseases.
- We report that ld-IL2 selectively activates and expands Tregs without activating effector T cells whatever the disease.
- We report signals of efficacy without safety issues of ld-IL2 across diseases by using a unique global evaluation scale, validated in the assessment of psychiatric disease therapies but not yet used in autoimmune/inflammatory diseases.

in autoimmune diseases (AIDs), as recently highlighted in a genetic meta-analysis,<sup>3</sup> and by IL-2 pleiotropic functions.<sup>2</sup> Indeed, robust data demonstrate that IL-2 expands Tregs and blocks the differentiation of CD4 naïve T cells into follicular helper or proinflammatory helper 17 (Th17) T cells.<sup>4,5</sup> Therefore, ld-IL2 can act on three distinct arms of the immune response involved in AID pathophysiology: cellular and humoral immune responses and inflammation. Likewise, ld-IL2 is now being investigated in various clinical settings.<sup>6–12</sup> Results of

## Key messages

## How might this impact on clinical practice or future developments?

- ▶ Our study highlights a 'universal' biological efficacy and a potential clinical efficacy and safety of ld-IL2 across a wide range of patients suffering from autoimmune/inflammatory conditions.
- ▶ These results should licence the initiation of randomised controlled trials in numerous indications in order to confirm these promising preliminary results.

open trials have already yielded promising signs of efficacy, such as in systemic lupus erythematosus (SLE).<sup>13 14</sup>

However, ld-IL2 efficacy may be affected by different factors: (1) Tregs from all patients may not respond similarly to ld-IL2, as some diseases may carry some intrinsic deficit of the IL-2 activation pathway<sup>15-18</sup>; (2) Treg efficacy might be limited by high levels of inflammation such as during flares; (3) the existence of Tregs with appropriate T cell receptor antigen specificity that could be mobilised for therapy for each disease context is unknown; and (4) the global effect of ld-IL2 may be affected by the fact that Treg-dependent suppression of immune responses and inflammation depends on numerous cells, molecules and pathways that are likely to be affected differently in various AIDs. Finally, although ld-IL2 activates Tregs at doses at least 20-fold lower than for activating other cell types,<sup>12 19 20</sup> IL2 can affect effector T cells (Teffs), natural killer cells, type 2 innate lymphoid cells and eosinophils in a (high) dose-dependent manner.<sup>21-23</sup> Thus, it remains to be seen whether a common appropriate dose/scheme of administration of ld-IL2 can be applied to various AIDs.

To address these questions, we designed a clinical trial in which we treated similarly ld-IL2 patients with 1 of 11 selected AIDs chosen to represent diverse pathophysiological processes. All patients received the same treatment and were monitored similarly. The aim was to cross-analyse the biological and clinical effects of ld-IL2 in heterogeneous patients, such as to appreciate the universality of ld-IL2 effects, and select diseases for conducting further phase II trials. We report here the results of the cross-analysis of 46 treated patients.

## METHODS

## Study design and participants

TRANSREG is a multicentre, interventional open study comparing biochemical and clinical responses to the administration of ld-IL2 across 11 selected diseases (ClinicalTrials.gov trial registration number, NCT01988506). The selected diseases were rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), SLE, psoriasis, Behçet's disease, granulomatosis with polyangiitis, Takayasu's disease, Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), autoimmune hepatitis and sclerosing cholangitis. Patients were selected based on common and disease-specific exclusion and inclusion criteria (online supplementary table S1A and S1B). The main inclusion criteria were a documented diagnosis of at least one of the selected diseases of mild to moderate activity, and being on stable standard therapy for  $\geq 2$  months at the time of inclusion. The main exclusion criteria were having another severe or progressive autoimmune/inflammatory disease, haematological disorders, vital organ failure, cancer, and active HIV, Hepatitis B Virus (HBV) or Epstein-Barr Virus (EBV) infections (online supplementary table S1A).

For homogeneity and proper cross-analyses, we report here the results of the first 46 patients who have been treated with IL-2 as Aldesleukin (Proleukin 18 MIU, Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France), before we switched to a different formulation of IL-2 (ILT-101, ILTOO Pharma, Paris, France). Indeed, the use of Proleukin necessitates a cumbersome preparation by a pharmacist to dilute the product and prepare syringes that have limited time span.

## Treatment

We previously showed the dose relation between IL-2 and Treg activation/expansion.<sup>8 12</sup> We selected the dose and scheme of administration of IL-2 used in TRANSREG from these results and a mathematical modelling of the long-term effects of IL-2 administration.<sup>24</sup> Likewise, patients received 1 Million International Units (MIU)/day of IL-2 from day 1 to day 5 (the induction period), and then every 2 weeks from day 15 to day 180 (the maintenance period). A follow-up visit was made 2 months after the end of the IL-2 treatment (day 240). Patients continued to receive their standard background therapy.

## Immunomonitoring

All the immunomonitoring procedures are described in the online supplementary methods.

## Endpoints

The primary endpoint was the change in the relative concentration of peripheral blood Tregs on day 8 compared with baseline.

Biological secondary endpoints were the area under the curve (AUC) of the changes from baseline in relative concentration of Tregs during the maintenance period from day 30 to day 183 and the changes in inflammation markers from baseline to the end of treatment.

Clinical secondary endpoints were Clinical Global Impression (CGI),<sup>25</sup> disease-specific and Five-level EuroQoL Five-dimensional (EuroQL-5D-5L) scores. Chronic fatigue and arthralgia were also evaluated by physicians at baseline, month 3 and month 6 as they are the most common symptoms shared by patients across all pathologies included in this trial. All clinical evaluation procedures are described in the online supplementary methods.

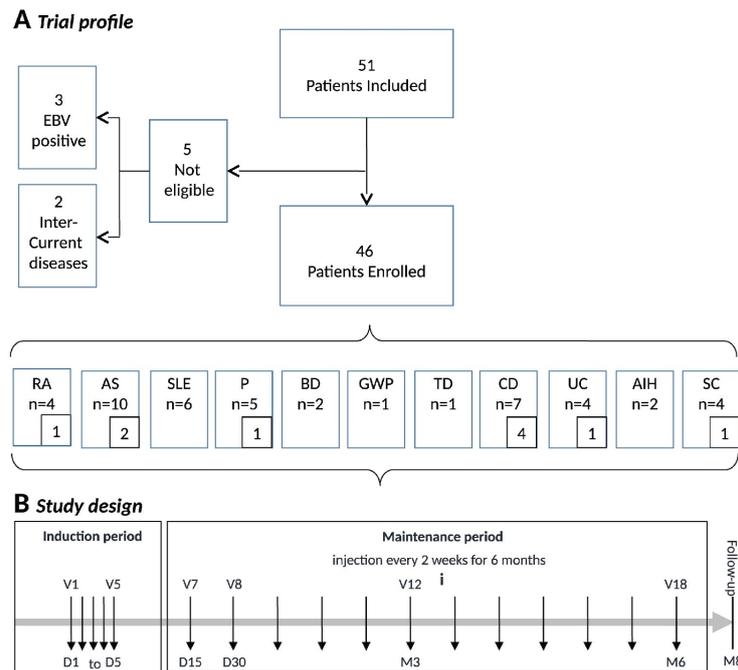
## Statistical analysis

Changes in Tregs, immunological parameters and inflammation biomarkers between day 1 and day 8 were analysed using analysis of variance for ranked data (Conover's method) considering factor time and disease. The global effect of treatment at the initiation of treatment and its persistence during the maintenance phase was evidenced by demonstrating that the AUCs (calculated by the trapezoidal method) of the changes from baseline between day 1 and day 15 ( $iAUC_{D1-D15}$ ) and between day 30 and day 180 ( $mAUC_{D30-D180}$ ) were significantly different from zero using Wilcoxon test.

Changes in specific clinical scores and EuroQL-5D-5L were analysed by means of the Wilcoxon test. Changes in CGI severity and activity were analysed by t-test. Fatigue and arthralgia at months 3 and 6 were compared with baseline using Fisher's test.

## RESULTS

Fifty-one patients were included between January 2014 and May 2016. Five patients were not eligible, three because of a viral load of EBV greater than that permitted and two for intercurrent diseases. Thus, 46 patients were treated (figure 1). Patients



**Figure 1** (A) Trial profile. We included 51 patients suffering from 11 autoimmune diseases: rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), systemic lupus erythematosus (SLE), psoriasis (P), Behcet's disease (BD), granulomatosis with polyangiitis (GWP), Takayasu's disease (TD), Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), autoimmune hepatitis (AIH) and sclerosing cholangitis (SC). Five patients were not eligible: three patients for an EBV viral load >1000 copies/mL and two patients for intercurrent diseases; 10 patients dropped out of the study (n in small inserts). (B) Study design. Patients received 1 MIU/day of interleukin-2 from D1 to D5 (the induction period), and then every 2 weeks from D15 to D180 (the maintenance period). D1, day 1; D5, day 5; D15, day 15; D30, day 30; EBV, Epstein-Barr Virus; M3, month 3; M6, month 6; M8, month 8; MIU, Million International Units; V, visit.

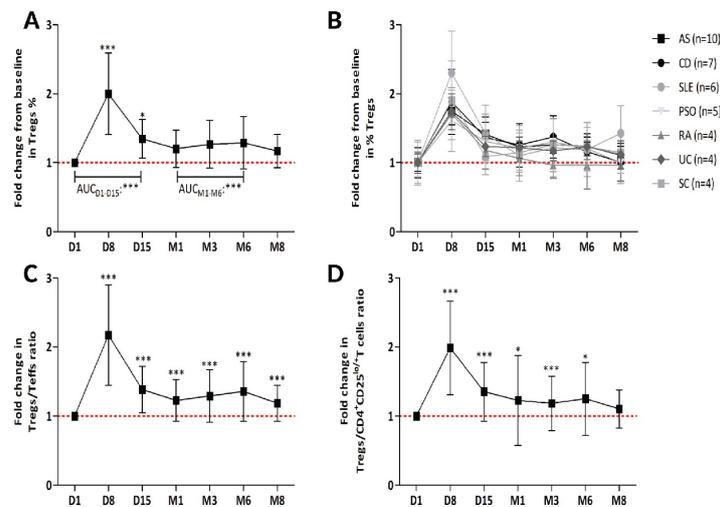
were heterogeneous in terms of age (23–75 years), disease duration (10–536 months), body mass index (18.3–40.8), per cent of Tregs at baseline (2.2%–12.8%) and background therapy (online supplementary table S2). Several patients had other concomitant autoimmune or allergic diseases (online supplementary table S2). Concomitant Sjogren's syndrome (n=3), antiphospholipid antibody syndrome (n=3), morphea (n=1), Raynaud's phenomenon (n=1) or psoriasis (n=1) were observed in patients with SLE and RA. Concomitant allergic rhinitis (n=1), allergic asthma (n=1), multiple food allergy (n=1) and cutaneous contact hypersensitivity (n=1) were observed in patients with UC and psoriasis. In agreement with the inclusion criteria, the value of CGI activity and severity score ranged from 0 to 4 at baseline, with mild to moderate specific clinical scores for each disease. There were no other noticeable aspects of baseline demographic and laboratory characteristics of patients.

No major deviations were observed during the study. The most common minor protocol deviations were out of windows visits (n=11) or drug administration not performed because of intercurrent diseases (n=7) in the maintenance period. Ten patients dropped out of the study (online supplementary table S3).

The mean±SD baseline percentage of Tregs in patients was 5.8%±2.3% of CD4<sup>+</sup> T cells (online supplementary table S2). On day 8, the primary efficacy endpoint was reached with an increase of Tregs to a mean of 11.1%±4.6%, corresponding

to a 2.0±0.6-fold increase ( $p<0.0001$ ) (figure 2A and online supplementary table S4A). Treg expansion on day 8 appeared similar across the various diseases for which a minimum of four patients were treated (figure 2B), and cross-comparisons of these responses between diseases showed no significant differences (online supplementary table S4B). Moreover, we did not observe difference in Treg increase between patients receiving antiproliferative drugs and patients receiving non-steroid anti-inflammatory treatments or corticosteroids (online supplementary figure S1). On day 15, that is, 10 days after the last ld-IL2 administration of the induction phase, Treg increase was still significant ( $p=0.02$ ) (figure 2A and online supplementary table S4A). Treg expansion persisted during the maintenance period. From months 1–6, the mean AUC value of Treg changes from baseline for all patients was significantly different from 0 ( $AUC_{M1-M6}=35.1\pm13.1$ ,  $p<0.001$ ). It is noteworthy that the recorded results may underestimate the true effect of ld-IL2 because Treg measurements were performed just before the IL-2 injections and thus capture only the residual increase from the previous injection 14 days earlier. The significant changes in percentages of Tregs were also observed for absolute numbers of Tregs (online supplementary table S4A).

There were no detectable effects of ld-IL2 on Teffs (defined as all Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells), or on activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> Foxp3<sup>-</sup> Teffs (online supplementary figure S2). This led



**Figure 2** Changes in Treg cells and Teffs cells in patients treated with ld-IL2. Treg cells were gated in CD4<sup>+</sup> T cells and identified as CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>-Foxp3<sup>+</sup> cells. (A) Data represent changes in Tregs as percentages among CD4<sup>+</sup> T cells for all patients from day 1 to month 8. (B) Data represent changes in Tregs in patients for diseases with  $n \geq 4$ . (C) Changes in Treg:Teff ratio defined as the percentage of Tregs divided by the percentage of the non-Treg CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. (D) Changes in Treg:activated CD4<sup>+</sup> T cells ratio as the percentage of Tregs divided by the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells. (A–D) Data are represented as mean  $\pm$  SD. Data were normalised by baseline values for each patient at the different time points and are represented as fold change, but all statistics were made on raw data. Comparison between day 8 and baseline (main endpoint) was made by Wilcoxon signed-rank test. For each type of cell, global effect of the treatment at its initiation and its persistence during the maintenance phase was evidenced by showing that the AUC of the changes from baseline between day 1 and day 15 (iAUC<sub>D1-D15</sub>) and between day 30 and day 180 (mAUC<sub>D30-D180</sub>) was significantly different from 0 using Wilcoxon test. \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . AS, ankylosing spondylitis; AUC, area under the curve; CD, Crohn's disease; D1, day 1; D8, day 8; D15, day 15; ld-IL2, low-dose interleukin-2; M1, month 1; M3, month 3; M6, month 6; M8, month 8; PSO, psoriasis; RA, rheumatoid arthritis; SC, sclerosing cholangitis; SLE, systemic lupus erythematosus; Teffs, effector T cells; Tregs, regulatory T cells; UC, ulcerative colitis.

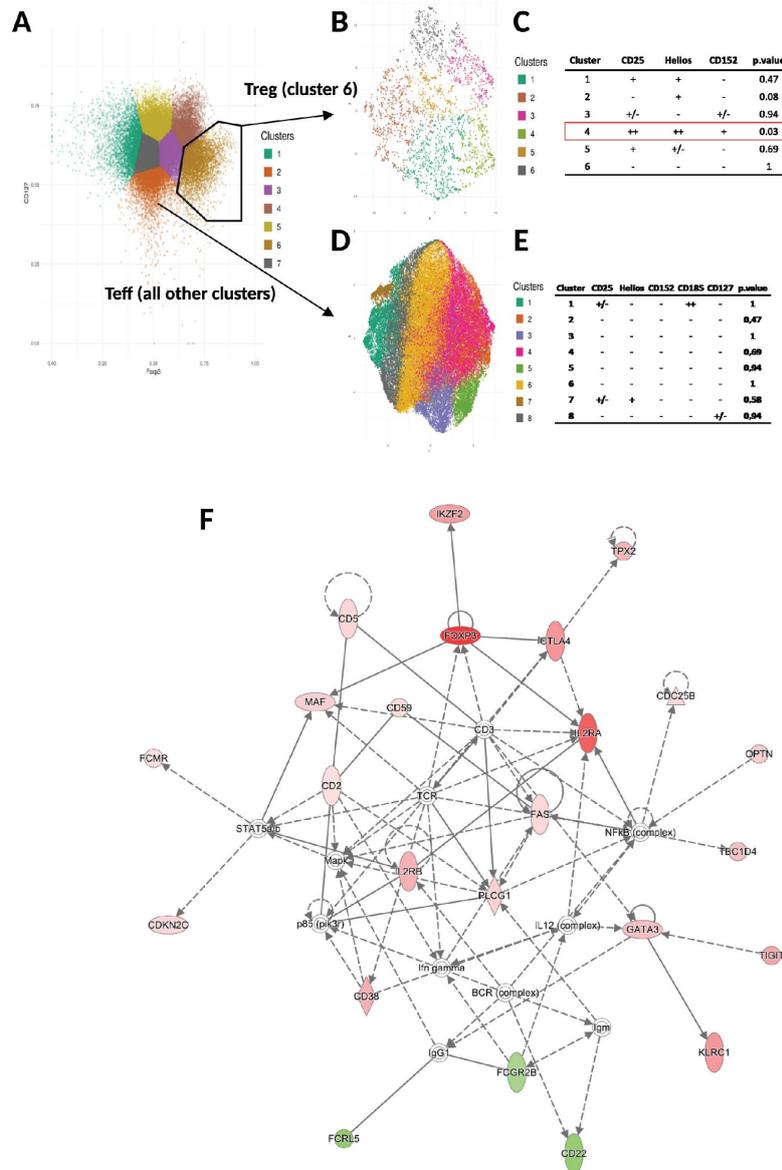
to a  $2.17 \pm 0.72$ -fold increase of the Treg:Teff ratio ( $p < 0.0001$ ) (figure 2C), as well as to a  $1.98 \pm 0.42$ -fold increase of Tregs/activated non-Treg CD4<sup>+</sup> cells ( $p < 0.0001$ ) at the end of the induction course (figure 2D). It is worth noting that every single patient responded to 1 MIU/day of IL-2 by expanding their percentage of Tregs in the peripheral blood by at least 25%.

Because unwanted stimulation of Teff could be deleterious in the treatment of AIDs, the demonstration of a specific effect of ld-IL2 on Tregs is of utmost importance for the treatment of AIDs caused by Teffs. Although classic immunophenotyping did not show any expansion of non-Treg T cells, we further assessed that the effects of IL-2 are Treg-specific in a group of nine patients in whom an extensive immunophenotyping was performed<sup>26</sup> and using unsupervised analyses. Using t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) and flowMeans R packages,<sup>27–29</sup> clusters were defined automatically based on Foxp3 and CD127 expression (figure 3A). Cluster 6 corresponded to Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-low</sup> cells and thus defines the Treg cluster, while the Teff cells corresponded to all the other clusters. We repeated the procedure to automatically recluster separately Tregs and Teffs based on the other markers of staining (CD25, Helios, CD45RA and CCR5). This generated six and eight clusters for Tregs and Teffs, respectively (figure 3B,D). For each cluster, comparison of the different values per marker on day 8 versus baseline showed statistically different values only for Tregs ( $p = 0.03$ ), and among them those with the more

activated phenotypes (figure 3C). There were no differences for any of the Teff subsets (figure 3E), with p value not even close to significance. The same analysis strategy was then applied to another panel of antibodies (online supplementary figure S3). Here again, only two Treg subsets corresponding to those with the phenotype of either resting/naïve CD45RA<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>ICOS<sup>+/+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> or activated/memory Tregs (CD45RA<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>CCR7<sup>+/+</sup>ICOS<sup>+/+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) were significantly expanded on day 8 while other T cell subsets were not affected.

Analysis of T, B and natural killer (NK) cell subsets showed little change during the induction period (online supplementary table S4A). As previously described,<sup>12</sup> we observed an increased frequency of the regulatory CD56<sup>bright</sup> NK cell subset (online supplementary figure S4A-C). Eosinophils levels were heterogeneous at baseline. For the 43 patients with normal counts, we observed a slight increase on day 8 that stayed under the normal value limit, or slightly above in two patients. For the three patients with eosinophilia at baseline, eosinophil counts approximately doubled after the induction period for two of them and remained stable for the other. All values returned to baseline during the maintenance treatment (online supplementary figure S5).

Plasma levels of Th1/Th2/Th17/Treg cytokines were unchanged all along treatment (online supplementary figure S6). In agreement with the mild to moderate activity of the diseases, C-reactive protein (CRP) was detected (>5 mg/dL) in only 10



**Figure 3** Unsupervised analysis of Treg phenotype and transcriptome. (A–E) Cells were stained for Helios, CD25, CXCR5, Ki67, CTLA-4, FOXP3, CD8, CD127, CD4 and CD8. A first step of automatic clustering based on the expression of FOXP3 and CD127 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells was performed on a merge of samples from baseline and day 8 for the nine patients studied. (A) The algorithm generated seven clusters that are represented in different colours on a FoxP3/CD127 biplot. (B and D) A second step of automatic clustering was performed separately on Tregs (cells from cluster 6 in A) and Teffs (cells from all other clusters in A) based on FoxP3<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. (C and E) P values of the statistical analysis of the difference between baseline and day 8 for each cluster identified in B and D, respectively (statistical test: Wilcoxon pairwise test, p values <0.05 were considered as significant). (F) Transcriptomic analysis of significantly regulated genes from PBMCs on day 8 compared with baseline using Ingenuity Pathway Analysis reveals a Treg-related pathway (upregulated genes in red and downregulated genes in green; direct and indirect interactions between molecules are depicted by solid and dotted lines, respectively). PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; Teffs, effector T cells; Tregs, regulatory T cells.

patients at baseline and thus could not be studied as an endpoint (online supplementary figure S7).

We reported that ld-IL2 has a global anti-inflammatory effect based on a transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).<sup>6</sup> Here, we similarly analysed the global transcriptome of PBMCs before and after ld-IL2. We found 91 differentially expressed genes with a Benjamini-Hochberg corrected  $p$  value  $<0.05$  on day 8 versus baseline (online supplementary table S5). Ingenuity Pathway Analysis showed significant enrichment of four pathways/signatures all directly or indirectly related to Treg. The most significantly modulated pathway ( $-\log(p \text{ value}) > 3$ ) is organised around upregulated genes such as Foxp3, IL-2Ra and Rb and CTLA4 that are essential for Treg function (figure 3F). We also assessed the modulation of a recent Treg signature defined from single cell transcriptomic.<sup>30</sup> This signature was significantly upregulated on day 8 versus baseline ( $p < 1e-04$ ) as well as at month 3 versus baseline ( $p < 0.03$ ), indicating that ld-IL2 effects on Tregs were maintained over time across diseases (online supplementary figure S8).

As previously reported, we did not observe anti-IL-2 antibodies in patients' plasma after ld-IL2 treatment (online supplementary figure S9).<sup>12,31</sup>

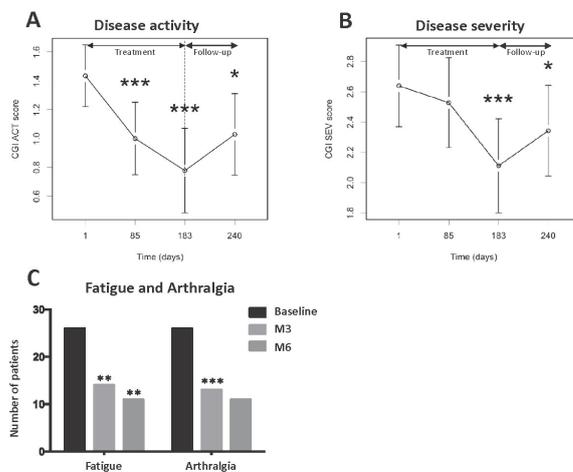
Low-dose recombinant human (rh)IL-2 was well tolerated. Six patients displayed seven serious adverse events, none of which was considered related to IL-2 (online supplementary table S6A). Most non-serious adverse events (NSAEs) were injection site reactions, which occurred in approximately a quarter of the injections. The frequency of seasonal upper or lower respiratory tract infections ( $n=28$ ), with associated fever of over  $38^{\circ}\text{C}$  in 17 of them, was as expected. The investigators did not report any unforeseen outcome of these infections (online supplementary table S6A). Finally, the analysis of the NSAEs according

to background therapy did not show any significant difference (online supplementary table S6B).

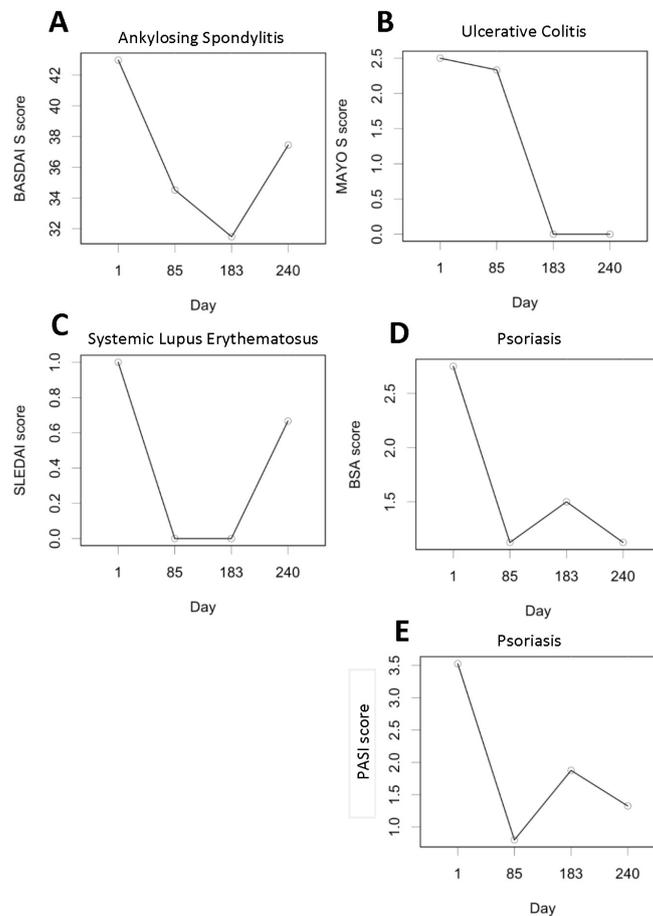
Clinical secondary endpoints were CGI, disease-specific and EuroQL-5D-5L scores. CGI was selected as a clinical evaluation method that could work across our heterogeneous group of diseases. Indeed, CGI was originally developed for use in clinical trials to provide a brief, stand-alone assessment of the clinician's view of the patient's global functioning prior to and after initiating a study medication.<sup>25</sup> CGI is commonly used in psychiatry but has not yet been validated in AIDs. Compared with baseline, a statistically significant improvement of the CGI scored by the physician was found at months 3 and 6 for CGI activity ( $p < 0.001$ ) (figure 4A) and at month 6 for CGI severity ( $p < 0.001$ ) (figure 4B). Significant changes were also found at the follow-up visit 2 months after discontinuation of the treatment (CGI activity  $p=0.02$  and CGI severity  $p=0.04$ ). Among the 46 treated patients, there were 26 with documented arthralgia and 26 with chronic fatigue at baseline. At month 3, there was a significant decrease of the percentage of patients with fatigue ( $p=0.002$ ) and with arthralgia ( $p=0.00015$ ) (figure 4C), and this trend continued at month 6. Evaluation of the impact of ld-IL2 on quality of life using EuroQL-5D-5L showed a non-significant improvement. We also assessed the disease-specific score for diseases with at least four patients treated. There was an improvement for AS (figure 5A), UC (figure 5B), SLE (figure 5C and online supplementary figure S9) and psoriasis (figure 5D,E), but not for CD (online supplementary table S7).

## DISCUSSION

We previously reported a double-blind, placebo-controlled dose-finding study of ld-IL2 in type 1 diabetes.<sup>8</sup> This identified a dose



**Figure 4** Clinical effects of ld-IL2 across the 11 autoimmune diseases. Clinical Global Impression (CGI) for (A) activity and (B) severity was scored by the physician at baseline (day 1), month 3 (day 85), month 6 (day 183) and at a follow-up visit at month 8 (day 240). Data are represented as mean±SD. Data were compared with baseline using t-test. (C) Arthralgia pain intensity and fatigue level were assessed by the physician at baseline, month 3 and month 6. Data are represented as the number of patients presenting arthralgia or fatigue. Data were compared with baseline using Fisher's test. \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ACT, activity; ld-IL2, low-dose interleukin-2; SEV, severity; M3, month 3; M6, month 6.



**Figure 5** Clinical effects of low-dose interleukin-2 in specific diseases. Specific clinical scores were measured at baseline (day 1), month 3 (day 85), month 6 (day 183) and follow-up visit at month 8 (day 240): (A) BASDAI for patients with ankylosing spondylitis (n=10); (B) Mayo for patients with ulcerative colitis (n=4); (C) SLEDAI for patients with systemic lupus erythematosus (n=6); (D) BSA and (E) PASI for patients with psoriasis (n=4). Data are represented as means. BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BSA, body surface area; PASI, Psoriasis Area Severity Index; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

of 1 MIU/injection as well tolerated and boosting Tregs without effects on Teffs.<sup>8 12</sup> Given the heterogeneity of ld-IL2 target diseases and of their pathophysiological background, it remained to investigate how ‘universal’ would be the effects of this dosage. We thus initiated a trial aimed at cross-evaluating ld-IL2 in 11 different AIDs chosen to cover diseases that are organ-specific and systemic, T cell-mediated or antibody-mediated, and with high or little inflammation.

Our supervised analyses clearly demonstrated that 1 MIU/injection, with the scheme used, selectively activates and expands Tregs without activating Teffs, whatever the disease. This translates in a significant increase of both the Treg/Teff as well as the Treg/activated CD4+ T cell ratios. A similar response was observed for patients with low or high Treg counts at baseline. Both naïve and activated/memory Tregs expanded after ld-IL2, while we did not

detect expansion of CD4 effector memory cells. As previously reported, at the dose used, we did not observe an effect on the overall NK cell population, but only on the non-cytotoxic CD56<sup>hi</sup> NK cell subset, also called regulatory NK cells. Given the importance of the specificity of the effect on Tregs, we also evaluated it using unsupervised analyses that can be considered as less biased. This fully confirmed the specificity of the ld-IL2 effects for Tregs, further showing that the only cells responding to ld-IL2 were the resting/naïve and activated/memory Tregs. Thus, supervised and unsupervised cellular and molecular analyses indicate that, with the dose/scheme used, ld-IL2 triggers a ‘universal’ specific effect for Tregs across a group of very heterogeneous patients.

Although this trial was powered only to evaluate the effects of IL-2 on Tregs, we also monitored secondary efficacy criteria relating to clinical status. With the idea of a cross-analysis of

diseases with various symptoms and scores, we chose CGI as our main per protocol clinical endpoint for cross-evaluation. Despite the fact that patients had mild or moderate disease forms, thus low CGI scores at baseline, and were heterogeneous, we observed an overall significant improvement of CGI scores. Improvements in CGI scores were already noted at month 3 and continued to increase at month 6. A potential clinical benefit was also evaluated across diseases by specifically monitoring arthralgia and chronic fatigue, which were the most shared symptoms of our patients. There was a significant improvement of these symptoms, already noted at month 3. Two months after treatment discontinuation, CGI scores had a tendency to increase but were still significantly improved compared with baseline. No flare was observed during this period. Finally, we evaluated the disease-specific scores for diseases with such available scores and with at least four patients included. As previously reported, we saw improvement in SLE. We also saw improvements for patients with UC, AS and psoriasis but not in those with CD. Altogether, these evaluations converge to suggest a broad potential of Id-IL2 and contributed to the selection of SLE as the target disease of an ongoing phase II trial (NCT02955615). They also suggest to further evaluate CGI in the field of AIDs. Indeed, as many drugs being developed target pathways involved in multiple AIDs, they thus have a broad therapeutic potential. Our trial design and methods could represent an early clinical cross-evaluation step that would help select diseases for further evaluation.

The safety profile of Id-IL2 across the different diseases and across various background treatments was very good. There has been no serious adverse event related to treatment. The most frequent adverse events were reaction at the injection sites, which are common for biologics, and are of unknown mechanisms. As in other trials of Id-IL2, we did not observe induction of anti-IL-2 antibodies under treatment.<sup>12, 31</sup> Based on safety data from our previous clinical trials and our modelling of the effects of IL-2 on Tregs,<sup>24</sup> we used in this trial the dose of 1 MIU/injection, with once-a-fortnight injections during the maintenance course. Should a more pronounced effect on Treg during the maintenance phase be desired, one could use weekly injections as we do in our current LUPIL-2 trial (NCT02955615).

Altogether, our study highlights the 'universal' safety, biological efficacy and possible clinical efficacy of Id-IL2 across a group of very heterogeneous patients. It also highlights that the therapeutic window of plain IL-2 is satisfactory and thus licences the initiation of phase II efficacy trials, which are now necessary to ascertain the therapeutic potential of Id-IL2.

#### Author affiliations

- <sup>1</sup>Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France
- <sup>2</sup>Immunology-Immunopathology- Immunotherapy (i3), Sorbonne Université, INSERM, Paris, France
- <sup>3</sup>Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France
- <sup>4</sup>ILTOO Pharma, Paris, France
- <sup>5</sup>Department of Dermatology, AP-HP Cochin Hospital, Paris, France
- <sup>6</sup>Department of Rheumatology, AP-HP Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France
- <sup>7</sup>Department of Gastroenterology, AP-HP Saint-Antoine Hospital, Paris, France
- <sup>8</sup>Department of Rheumatology, AP-HP Saint-Antoine Hospital, Paris, France
- <sup>9</sup>Department of Hepatology, AP-HP Saint-Antoine Hospital, Paris, France
- <sup>10</sup>Department of Internal Medicine, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Paris, France
- <sup>11</sup>Department of Pharmacology and CIC-1421, AP-HP Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France
- <sup>12</sup>Department of Pharmacy, AP-HP Saint-Antoine Hospital, Paris, France
- <sup>13</sup>Unité de Recherche Clinique and Université Paris, AP-HP Saint-Louis/Lariboisière Hospitals, Paris, France

**Acknowledgements** We thank the patients and the members of the TRANSREG study group for their participation. We thank all the personnel of the Clinical

Investigation Center Paris-Est (CIC-PE), in particular C Funck-Brentano, E Dasque, L Koehl and M Chenier, and the personnel of the Clinical Investigation Center for Biotherapies (CIC-BTI), Guillaume Churlaud, Michèle Barbié, Cornélia Degbé, Natalie Féry, Anne Laure Raveu and Alexandra Roux, for their excellent help. We thank G Bensimon for his initial contribution to the trial design and the selection of diseases. We also thank the UMR 8199 LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France), which belongs to the 'Federation de Recherche' 3508 LabEx EGD (European Genomic Institute for Diabetes; ANR-10-LABX-46) and was supported by the ANR Equipex 2010 session (ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM'). The LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France) is also supported by the FEDER and the Region Nord-Pas-de-Calais-Picardie.

**Collaborators** Principal Investigator: Prof D Klatzmann MD, PhD. Methodologist: Prof E Vicaut, MD, PhD. Clinical Investigator: R Lorenzon MD. Clinical pathologist: M Rosenzweig MD, PhD. Clinical Investigations Centers: (1) Clinical Investigation Center Paris-Est CIC-1421 Pitié-Salpêtrière Paris France: Prof C. Funck Brentano MD, PhD; J-E Salem, MD, PhD; E. Guilloix, (2) Clinical Investigation Center for Biotherapy and immunology CIC-1420 Pitié-Salpêtrière Paris France: M Barbié, N Fery, C Degbe, C Bernard, C Ribet. Clinicians and recruiting centers: (1) Prof S Aractingi MD, PhD; E Regnier, MD: Department of Dermatology, AP-HP, Cochin Hospital (2) Prof L Beaugerie MD, PhD; Prof P. Seksik: Department of Gastroenterology, AP-HP, Saint Antoine Hospital (3) Prof F Berenbaum MD, PhD; Prof J. Sellam MD, PhD: Department of Rheumatology, APHP, Saint-Antoine Hospital (4) Prof P Cacoub MD, PhD: Department of Internal Medicine, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital (5) Prof O Chazouillères MD, PhD, Dr C. Corpechot MD, PhD: Department of Hepatology APHP, Saint Antoine Hospital (6) Prof B Fautrel MD, PhD: Department of Rheumatology, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital (7) Dr A Mekinian, MD, PhD; Pr Fain, MD: Department of Internal Medicine, AP-HP, Saint Antoine Hospital. Treatment Management: Pharmacy, Saint Antoine Hospital, APHP, Paris, France: C Mayala PharmD; A. Daguenel Nguyen PharmD, V Quiniou Pharm D, PA Vinot Pharm D; Pharmacy, Pitié Salpêtrière Hospital APHP, Paris, France: Fanny Charbonnier-Beaupel. Regulatory affairs and Monitoring: Clinical Research and Development Department (DRCD) APHP, Paris, France: K. Seymour-Inamo; Clinical Research Unit Lariboisière, APHP, Paris, France: E. Vicaut MD, PhD; V. Jouis, A. Mekouo-Tagne, O. Tran. Data and Safety Monitoring Board: (1) Prof Jacques Eric Gottenberg: Department of Rheumatology, Hautepierre Hospital, Strasbourg (2) Prof Olivier Blétry: Department of Internal Medicine, Foch Hospital, Suresnes (3) Prof Pierre Galanaud: Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Antoine Béclère Hospital, Clamart.

**Contributors** MR participated in the design of the study, supervised immunomonitoring, analysed the results and helped write the article. RL participated in the design of the study, was the principal clinical investigator, analysed the results and helped write the article. PC participated in the design of the study and was a clinical investigator of the study. FP, KES and HPP analysed the immunological and transcriptomic results. SA, BB, LB, FB, BF, JC, OC, CC, CF, AM, ER, DS, PS, JS and J-ES were clinical investigators of the study. CR was an assistant clinical investigator and supervised the logistics. CB and AD-N were in charge of treatment management. VD and JM contributed to the study performance and regulatory affair follow-up. EV participated in the design of the study, wrote the statistical report, analysed the results and helped write the article. DK conceived and supervised the study, was the principal investigator, analysed the results and wrote the first draft of the article. All authors edited and approved the final draft of the article.

**Funding** Funding was provided by the sponsor, the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. ILTOO Pharma provided support to the sponsor for clinical trial conduct and regulatory affairs, and contributed to some statistical analyses. Additional funding came from the ANR within the Investissements d'Avenir programme (ANR-11-IDEX-0004-02, LabEx Transimmunom), the Recherche Hospitalo-Universitaire (ANR-16-RHUS-0001, RHU IMAP) and the European Research Council Advanced Grant (FP7-IDEAS-ERC-322856, TRiPoD).

**Competing interests** MR, RL, PC, FB, BF, PC, JS, DS, CB and DK are inventors for patent applications related to the therapeutic use of Id-IL2, which belongs to their academic institutions and has been licensed to ILTOO Pharma. MR, VD, JM and DK hold shares in ILTOO Pharma. HPP, VD and JM are employees of ILTOO Pharma. No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** The study was approved by the institutional review board of Pitié-Salpêtrière Hospital (CPP-IdFVI) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

#### REFERENCES

- 1 Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11:7–13.
- 2 Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2015;15:283–94.

- 3 Li YR, Li J, Zhao SD, *et al.* Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. *Nat Med* 2015;21:1018–27.
- 4 Laurence A, Tato CM, Davidson TS, *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371–81.
- 5 Ballesteros-Tato A, León B, Graf BA, *et al.* Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 2012;36:847–56.
- 6 Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–77.
- 7 Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011;365:2055–66.
- 8 Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, *et al.* Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013;1:295–305.
- 9 Castela E, Le Duff F, Butori C, *et al.* Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol* 2014;150:748–51.
- 10 Kennedy-Nasser AA, Ku S, Castillo-Caro P, *et al.* Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity. *Clin Cancer Res* 2014;20:2215–25.
- 11 Koreth J, Ritz J, Tsokos GC, *et al.* Low-dose Interleukin-2 in the Treatment of Autoimmune Disease. *Oncology & Hematology Review* 2014;10:157–63.
- 12 Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, *et al.* Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun* 2015;58:48–58.
- 13 He J, Zhang X, Wei Y, *et al.* Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2016;22:991–3.
- 14 von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdrami D, *et al.* Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1407–15.
- 15 Zier KS, Leo MM, Spielman RS, *et al.* Decreased synthesis of interleukin-2 (IL-2) in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33:552–5.
- 16 Kitas GD, Salmon M, Farr M, *et al.* Deficient interleukin 2 production in rheumatoid arthritis: association with active disease and systemic complications. *Clin Exp Immunol* 1988;73:242–9.
- 17 Lieberman LA, Tsokos GC. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:1–6.
- 18 Comte D, Karampetsou MP, Kis-Toth K, *et al.* Brief Report: CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus respond poorly to exogenous interleukin-2. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:808–13.
- 19 Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, *et al.* 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* 2015;64:2172–83.
- 20 Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, *et al.* Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2013;5:179ra43.
- 21 Ito S, Bollard CM, Carlsten M, *et al.* Ultra-low dose interleukin-2 promotes immune-modulating function of regulatory T cells and natural killer cells in healthy volunteers. *Mol Ther* 2014;22:1388–95.
- 22 Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38:13–25.
- 23 Van Gool F, Molofsky AB, Morar MM, *et al.* Interleukin-5-producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. *Blood* 2014;124:3572–6.
- 24 Churlaud G, Abbara C, Vinot PA, *et al.* Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose IL-2. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1344–6.
- 25 Busner J, Targum SD. The clinical global impressions scale. *Psychiatry Edgmont* 2007;4:28–37.
- 26 Pitoiset F, Cassard I, El Soufi K, *et al.* Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. *Cytometry A* 2018;93:793–802.
- 27 Aghaepour N. FlowMeans: non-parametric flow cytometry data gating. R Package Version. 2010. Available: <http://bioconductor.jp/packages/3.1/bioc/vignettes/flowMeans/inst/doc/flowMeans.pdf>
- 28 der MLvan, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res* 2008;9:2579–605.
- 29 Van Der Maaten L. Accelerating t-SNE using tree-based algorithms. *J Mach Learn Res* 2014;15:3221–45.
- 30 De Simone M, Arrighi A, Rossetti G, *et al.* Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells. *Immunity* 2016;45:1135–47.
- 31 Churlaud G, Rosenzweig M, Cacoub P, *et al.* IL-2 antibodies in type 1 diabetes and during IL-2 therapy. *Diabetologia* 2018;61:2066–8.

**Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single open clinical trial**

**Supplemental Data**

**TABLE OF CONTENTS**

Figure S1: Changes in Tregs percentages according to background therapy

Figure S2: A) Gating Strategy for Treg and CD4+CD25lo/+Teff; B-C) Changes in activated effector T cells in patients treated with Id-IL2.

Figure S3: Unsupervised analysis of Treg phenotype

Figure S4: A) Gating Strategy for CD56<sup>bright</sup>; B) Changes in CD56<sup>bright</sup> NK cells upon Id-IL2 treatment

Figure S5: Eosinophil values (G/L) upon Id-IL2 treatment

Figure S6: Changes in plasma cytokine levels upon Id-IL2 treatment

Figure S7: CRP levels at baseline and end of treatment

Figure S8: Anti-IL2 antibodies study

Figure S9: Symptoms' changes in SLE patients during the study

Table S1A: Common inclusion and exclusion criteria

Table S1B: Specific inclusion and exclusion criteria/disease

Table S2: Baseline demographic and laboratory characteristics of patients (intention-to-treat population) including concomitant treatments

Table S3: Summary of reasons for dropping out of the study

Table S4A. Lymphocyte subpopulations

Table S4B. Treg changes by pathology

Table S5: List of the differentially expressed genes at day-8 versus baseline

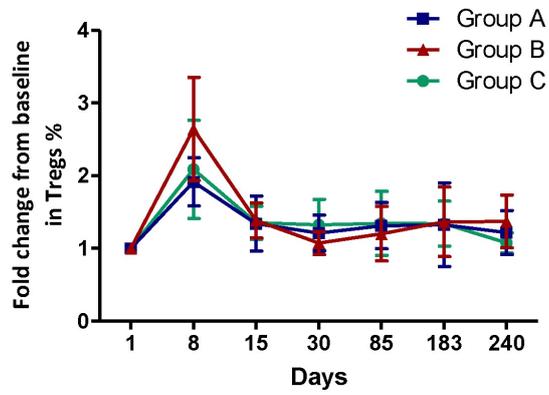
Table S6A: Summary of non-serious adverse events (intention-to-treat population)

Table S6B: Summary of adverse events in the background therapy groups (intention-to-treat population)

Table S7: Summary of specific clinical scores for each disease

Supplemental Methods

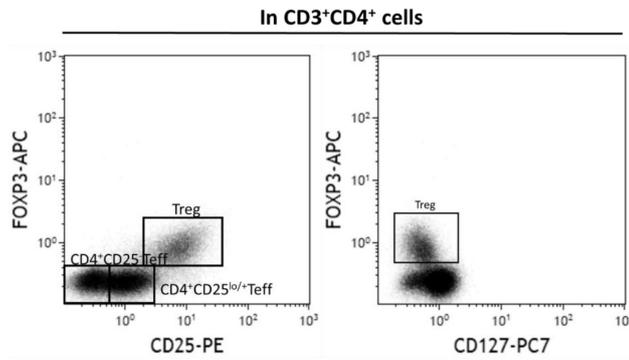
Figure S1. Changes in Tregs percentages according to background therapy



Fold changes from baseline between patients receiving non-steroid anti-inflammatory treatments (Group A), Corticosteroids (Group B) or antiproliferative drugs (Methotrexate or Azathioprine) (Group C). No significant difference in increase Treg was observed between background therapies

Figure S2

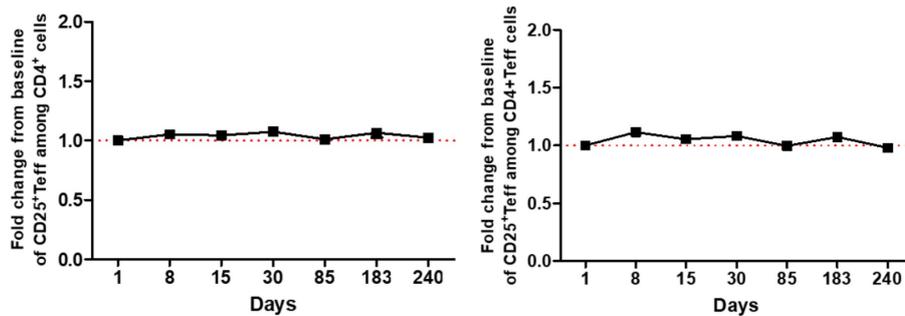
A) Gating Strategy for Treg and CD4+CD25lo/+Teff



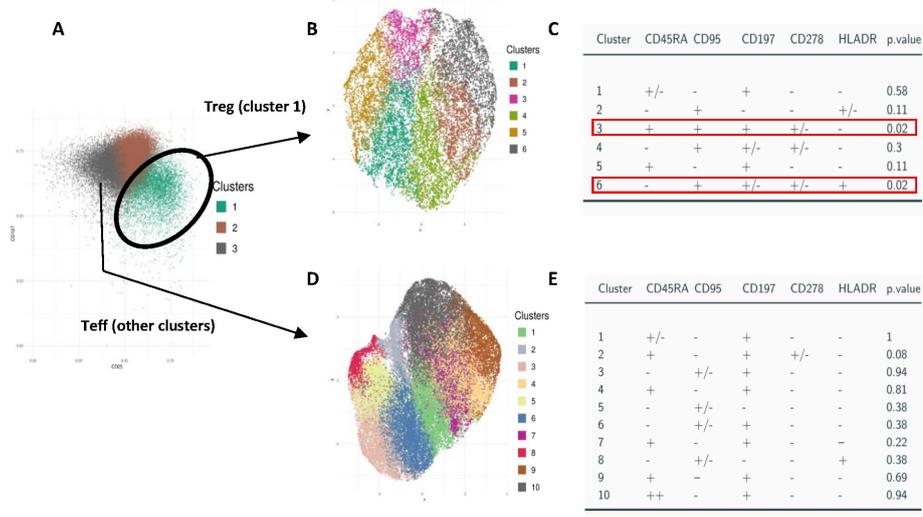
Example of staining with Foxp3, CD25 and CD127 are shown. Treg were gated from CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells as CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> CD127<sup>-/low</sup>. Teff were defined as all Foxp3<sup>-</sup> cells and activated CD4 Teffs as CD25<sup>lo/+</sup>Foxp3<sup>-</sup> CD4 Teffs.[1]

B-C) Changes in activated effector T cells in patients treated with Id-IL2.

B) Data represent changes in activated Teff as percentages among CD4<sup>+</sup> T cells for all patients from day 1 to month 8; C) Data represent changes in activated Teff as percentages among CD4<sup>+</sup> Teff cells for all patients from day 1 to month 8



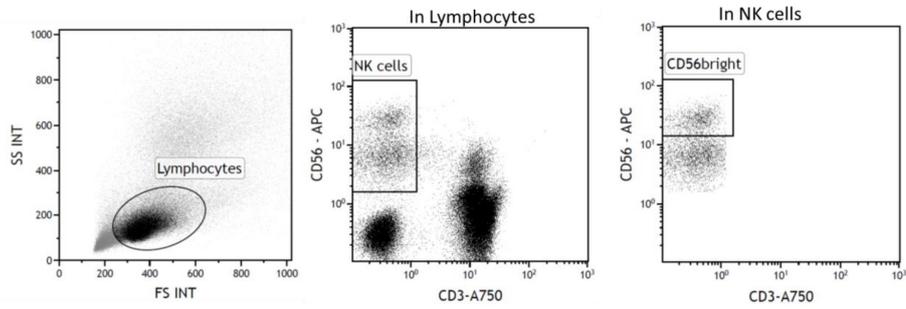
**Figure S3: Unsupervised analysis of Tregs phenotype.**



A first step of automatic clustering was performed on a merge of samples from 9 patients at baseline and day 8. Based on the expression of CD25 and CD127 the algorithm generated 3 clusters that are represented in different colors on a CD25/CD127 biplot (A). A second step of automatic clustering was performed separately on Tregs (cells from cluster 3 in A) and Teffs (cells from all other clusters in A) (B and D, respectively). Figures C and E show the p value of the statistical analysis of the difference between baseline and day 8 for each cluster identified in B and D, respectively (statistical test: Wilcoxon signed-rank test, p values <0.05 were considered as significant).

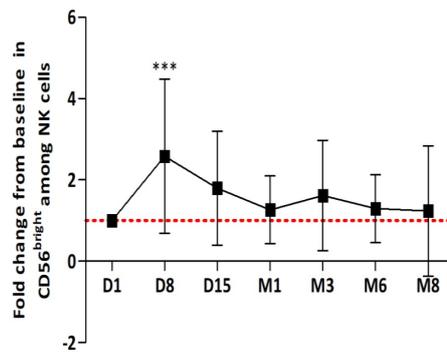
Figure S4

A) Gating Strategy for CD56<sup>bright</sup> NK cells



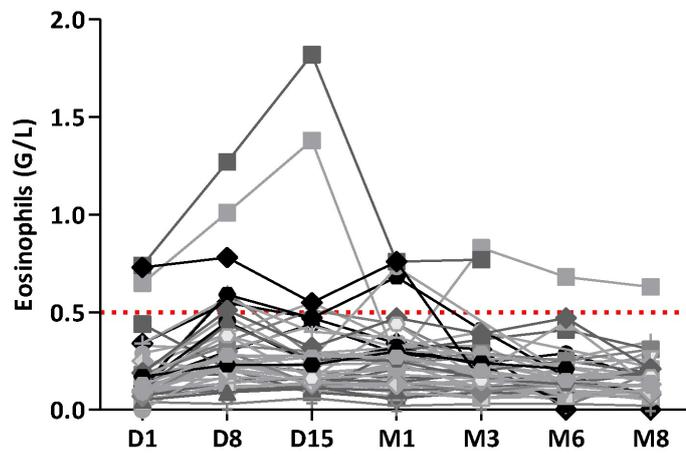
Example of staining with CD3 and CD56, CD56<sup>bright</sup> NK cells were gated from CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells

B) Changes in CD56<sup>bright</sup> NK cells upon Id-IL2 treatment.



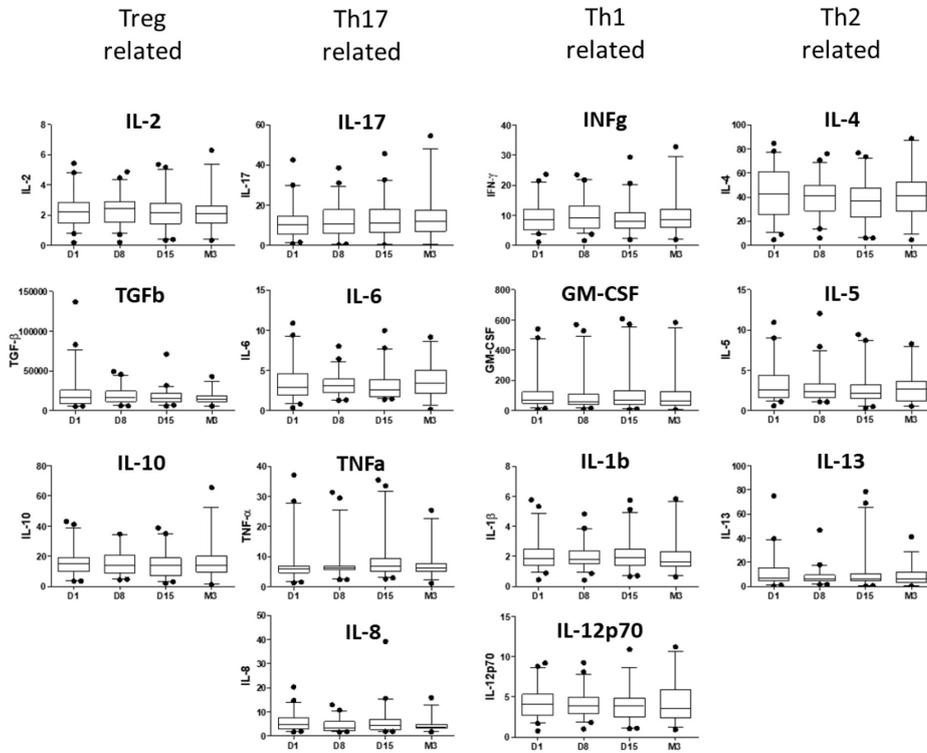
Data are presented as mean  $\pm$  sd fold change from baseline values for each patient at the different time points. Comparison between day 8 and baseline (main endpoint) was made by Wilcoxon signed-rank test.

Figure S5: Eosinophil values (G/L) upon Id-IL2 treatment



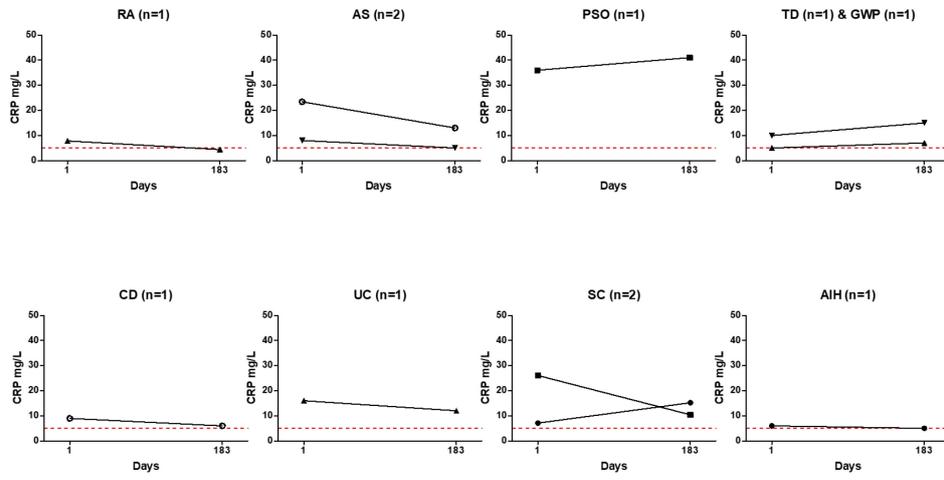
Data are presented as Giga per liter for each patient.

**Figure S6: Changes in plasma cytokine levels upon Id-IL2 treatment.**



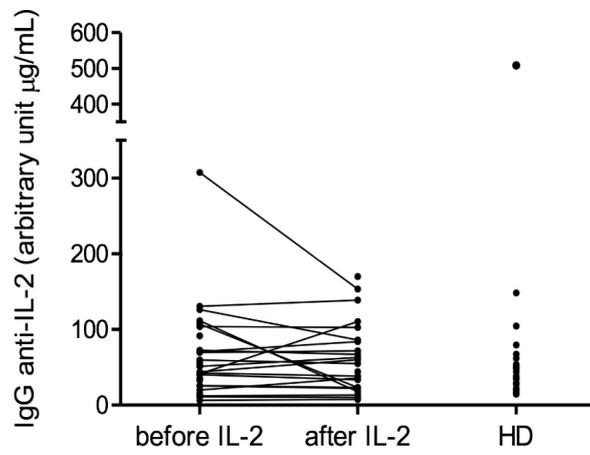
Plasma cytokines and chemokines were measured at day 0, day 5, day 15 and month 3 by Luminex assay and are expressed in pg/mL. Each box plot represents the median and the 25th and 75th percentiles; whiskers extend to the minimum and maximum (excluding outliers); outliers are shown as black dots. Data were compared to baseline values using the Wilcoxon signed-rank test and were not significantly different.

Figure S7 : CRP levels at baseline and end of treatment



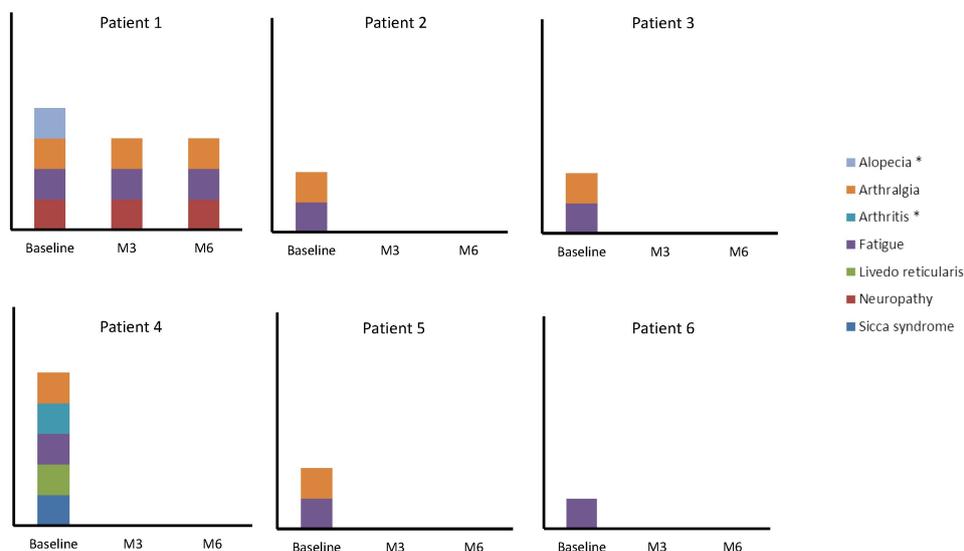
CRP levels at baseline and M6 for patients with detectable level at baseline (>5 mg/l), according to pathology.

Figure S8: Anti-IL2 antibodies study



Patients' plasma was tested for the presence of anti-IL-2 IgG before and after IL-2 treatment (n=31). Plasmas from healthy donors (HD) were tested as control.[2]

Figure S9: Symptoms' changes in SLE patients during the study



Each graph represents one patient. Symptoms in patients affected by SLE were evaluated at baseline, month 3 (M3) and month 6 (M6) by clinical examination. The squares indicate the presence of specific symptom according to color's legend. Symptoms with \* are part of SLEDAI score.

Table S1A: Common inclusion and exclusion criteria

Common criteria (to all pathologies)	Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ age &gt; 18 year</li> <li>✓ male or female</li> <li>✓ documented diagnosis of one AIID among the 11 diseases selected (following consensual specific criteria)</li> <li>✓ stable or moderately active disease under standard treatment (≥ 2 months) at the time of inclusion</li> <li>✓ normal thyroid function (with or without treatment)</li> <li>✓ effective contraception for more than two weeks at selection visit and negative beta HCG test for women of childbearing potential</li> <li>✓ affiliated to the social security system</li> <li>✓ written informed consent form.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ known intolerance for IL2 (see SPC)</li> <li>✓ administration of a non-authorized treatment and/or IV bolus or intra-articular infiltration of corticosteroids in the last 2 months</li> <li>✓ vaccination with live attenuated virus in the months preceding the inclusion or planned during the study</li> <li>✓ other severe or progressive autoimmune/inflammatory pathology,</li> <li>✓ leukocytes count &lt; 2000/mm<sup>3</sup>, lymphocytes &lt; 600/mm<sup>3</sup>, platelets &lt; 80 000/mm<sup>3</sup></li> <li>✓ heart failure (≥ grade III NYHA), renal insufficiency (Cockcroft &lt; 60ml/mn except patients with lupus or Wegener's granulomatosis) or hepatic insufficiency (transaminases &gt; 5N except for patients with autoimmune hepatitis), or lung failure</li> <li>✓ significant abnormality in chest X-ray other than these linked to the diseases under investigation</li> <li>✓ cancer or history of cancer cured for less than five years (except in situ carcinoma of the cervix or basocellular carcinoma)</li> <li>✓ poor venous access not allowing repeated blood tests</li> <li>✓ restrictive diet or parenteral nutrition</li> <li>✓ surgery during the last 2 months or surgery planned during the study,</li> <li>✓ participation in other biomedical research in the last 3 months or planned during the study</li> <li>✓ pregnant or lactating women</li> <li>✓ concomitant psychiatric disease or any other chronic illness or drug-abuse that could interfere with the ability to comply with the protocol or to give informed consent</li> <li>✓ positive HIV serology, active hepatitis B or EBV infection (viral load &gt; 1000copies/ml)</li> <li>✓ patients under a measure of legal protection</li> </ul>

**Table S1B: Specific inclusion and exclusion criteria /pathology**

	Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
RA	<b>Diagnostic criteria:</b> American College of Rheumatology (ACR) /European League against rheumatism (EULAR) >6[3]. <b>Allowed concomitant therapy:</b> immunosuppressor alone or combined with anti-TNF $\alpha$ or with tocilizumab or with abatacept and/or with methotrexate/leflunomide and/or prednisone $\leq$ 10mg/day <b>Disease activity:</b> 2.6< DAS-28 <5,1[4]	
AS	<b>Diagnostic criteria:</b> ASAS[5] <b>Allowed concomitant therapy:</b> immunosuppressor alone or combined with anti-TNF $\alpha$ and/or methotrexate or nonsteroidal anti-inflammatory drugs alone <b>Disease activity:</b> 30< BASDAI <60[6]	
Pso	<b>Diagnostic criteria:</b> Cutaneous or articular psoriasis [7] <b>Allowed concomitant therapy:</b> immunosuppressor alone (methotrexate or anti-TNF $\alpha$ ) or phototherapy (alone or with retinoids), retinoids alone or ustekinumab <b>Disease activity:</b> in remission or moderate activity defined as : - BSA <10% et/ ou PASI <10 (for cutaneous psoriasis) [8,9] - 2.6< DAS-28 <5,1 ou 30< BASDAI <60 (for articular psoriasis with peripheral or axial component respectively) [5,6]	
SLE	<b>Diagnostic criteria:</b> ACR[10] <b>Allowed concomitant therapy:</b> prednisone $\leq$ 15mg/d, hydroxychloroquine 200-400mg/d, immunosuppressor (except those non authorized in the protocol) <b>Disease activity:</b> SLEDAI $\leq$ 8 [11]	Severe renal form (GFR $\leq$ 30ml/mn)
BD	<b>Diagnostic criteria:</b> ISG[12,13] <b>Allowed concomitant therapy:</b> colchicine, prednisone $\leq$ 15 mg/d, immunosuppressor (except those non authorized in the protocol) <b>Disease activity:</b> moderate	Severe flare of the disease defined by an evolutive visceral involvement (eg : central neurologic, cardiac, large arterial vessel)
GWP	<b>Diagnostic criteria:</b> ACR[14] <b>Allowed concomitant therapy:</b> prednisone $\leq$ 15mg/d, immunosuppressor, cotrimoxazole <b>Disease activity:</b> moderate activity BVAS <4[17]	Severe flare of the disease
TD	<b>Diagnostic criteria:</b> ACR[16] <b>Allowed concomitant therapy:</b> prednisone $\leq$ 15 mg/d and/or immunosuppressor <b>Disease activity:</b> moderate activity at inclusion (NIH score $\leq$ 2) and positive biological inflammation markers (CRP >10mg/l et/ou CRPus >5mg/l or ESR > 20mm at 1 hour)	
CD	<b>Diagnostic criteria:</b> clinic (morphologic) & histologic <b>Allowed concomitant therapy:</b> immunosuppressor alone or combined with anti-TNF $\alpha$ and/or azathioprine <b>Disease activity:</b> 4 $\leq$ HBI $\leq$ 7[17]	Perineal or cutaneous fistula Active infection by <i>Clostridium difficile</i> (germ or toxin A/B)
UC	<b>Diagnostic criteria:</b> clinic (morphologic) & histologic <b>Allowed concomitant therapy:</b> immunosuppressor alone or combined with anti-TNF $\alpha$ AND/OR azathioprine <b>Disease activity:</b> simplified Mayo score $\leq$ 3[18]	Patients with moderate or severe flare Active infection by <i>Clostridium difficile</i> (germ or toxin A/B)
SC	<b>Diagnostic criteria:</b> cholangio MRI[19] <b>Allowed concomitant therapy:</b> no treatment or under ursodesoxycholic acid <b>Disease activity:</b> ALT<5N and bilirubin<35 $\mu$ mol/l, alkaline phosphatases >N	Decompensated cirrhosis, Child-Pugh >A[20] Cholangio-carcinoma suspicion Endoscopic treatment planned within the 6 months
AIH	<b>Diagnostic criteria:</b> simplified criteria IAHG[22] <b>Allowed concomitant therapy:</b> prednisone or prednisolone or budesonide alone or associated with calcineurin inhibitor OR azathioprine OR mycophénolate mofétil since more than 2 months <b>Disease activity:</b> IgG>ULN and/or LNL<ALT<10 ULN	Decompensated cirrhosis, Child-Pugh >A[20] Hepatocellular carcinoma suspicion

Rheumatoid Arthritis (RA), Ankylosing Spondylitis (AS), Psoriasis, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Behcet's Disease (BD), Granulomatosis with polyangiitis (GWP), Takayasu's Disease (TD), Crohn's Disease (CD), Ulcerative Colitis (UC), Sclerosing Cholangitis (SC), Autoimmune Hepatitis (AIH).

**Table S2: Baseline demographic and laboratory characteristics of patients (intention-to-treat population) including concomitant treatments**

	RA N=4	AS N=10	Psoriasis N=5	SLE N=6	BD N=2	GWP N=1	TD N=1	CD N=7	UC N=4	SC N=4	AIH N=2	Overall population N=46
<b>Age (years)</b>												
Mean	60.0	46.1	52.0	46.3	56.0	75.0	50.0	42.6	45.5	47.8	39.5	48.4
(range)	45.0, 69.0	25.0, 70.0	33.0, 69.0	27.0, 67.0	51.0, 61.0			23.0, 59.0	30.0, 53.0	38.0, 60.0	28.0, 51.0	23.0, 75.0
Median	63.0	42.5	52.0	45.0	56.0	NA	NA	45.0	49.5	46.5	NA	50.0
Q1-Q3	52.0-8.0	39.0-0.0	51.0-5.0	31.0-3.0	51.0-1.0			29.0-5.0	39.0-2.0	41.0-4.5		38.0-59.0
<b>Sex (M/F)</b>												
	0/4	8/2	2/3	0/6	2/0	1/0	0/1	5/2	2/2	2/2	2/0	24/22
<b>Disease duration in months</b>												
Mean ±SD	214±95.6	87.2±82	209±88.5	157.6±201.6	124.5±146.4	164	134	145±105.8	106.5±111.4	394±82.2	110±132.9	152±117
Median	212	51.5	225	87	124.5	NA	NA	142	80.5	90.5	NA	135.6
Range	97-338	7-255	75-287	5-535	21-228	NA	NA	10-308	13-252	13-200	NA	10-536.4
<b>BMI</b>												
Mean ± SD	27.4 ± 8.0	26.1 ± 4.0	26.0 ± 6.0	24.6 ± 4.3	31.4 ± 5.3	27.8 ±	31.8 ±	26.6 ± 7.9	27.5 ± 7.2	24.5 ± 2.8	25.5 ± 7.9	26.4 ± 5.5
Median	25.6	24.7	25.4	25.4	31.4	27.8	31.8	23.3	27.9	24.1	25.5	25.2
Q1-Q3	22.4-2.5	23.7-0.1	21.9-6.9	21.1-8.1	27.6-5.1	27.8-7.8	31.8-1.8	20.8-2.4	21.6-3.4	22.6-6.5	19.9-1.1	21.6-30.1
Range	19.8, 38.7	21.4, 32.6	20.2, 35.5	18.3, 29.2	27.6, 35.1	27.8, 27.8	31.8, 31.8	19.1, 40.8	19.3, 34.9	21.6, 28.3	19.9, 31.1	18.3, 40.8
<b>Concomitant allergic / AIID</b>												
	Morphea n=1 Raynaud's phenomen n=1	Rhinitis n=1 Crohn's disease n=1 Biermer's disease n=1	Allergic asthma n=1 Cutaneous contact hypersensiv ity n=1	Allergic rhinitis n=1 APLS n=3 Psoriasis n=1 Sjogren's syndrome n=3	-	-	AS n=1 UC n=1	Allergic asthma n=1	Multiple food allergies n=1 Allergic rhinitis n=1	AS n=1 Vitiligo n=1 UC n=1	Psoriasis n=1	

Background therapy	Group 2 n=4	Group 1 n=2 Group 2 n=1 Group 3 n=4 Group 4 n=3	Group 1 n=2 Group 2 n=2 Group 4 n=1	Group 1 n=1 Group 2 n=5	Group 2 n=2	Group 2 n=1	Group 2 n=1	Group 1 n=1 Group 2 n=2 Group 4 n=4	Group 1 =1 Group 2 n=3	Group 1 n=4	Group 1 n=1 Group 2 n=2	
<b>Tregs</b>												
Mean ± SD	5.4 ± 1.6	5.6 ± 1.5	4.6 ± 2.4	6.5 ± 3.4	6.5 ± 2.1	9.0 ±	2.2 ±	6.2 ± 2.5	5.3 ± 1.1	6.7 ± 3.1	5.8 ± 3.2	5.8 ± 2.3
Median	5.8	5.4	5.0	5.7	6.5	9.0	2.2	7.4	4.9	5.6	5.8	5.4
Q1-Q3	4.2-6.6	4.8-6.5	2.7-5.0	5.5-6.7	5.1-8.0	9.0-9.0	2.2-2.2	3.2-7.9	4.6-6.0	4.6-8.9	3.5-8.0	4.6-7.4
Range	3.2, 6.7	3.1, 7.9	2.2, 8.2	2.7, 12.8	5.1, 8.0	9.0, 9.0	2.2, 2.2	2.8, 9.3	4.5, 7.0	4.5, 11.1	3.5, 8.0	2.2, 12.8
<b>CGI Activity</b>												
Mean±SD	2.0 ± 0.0	1.7 ± 0.67	1.4 ± 0.9	1 ± 0.63	0.5 ± 0.7	1	1	1.4 ± 0.8	1.5 ± 0.6	1.25 ± 0.8	2 ± 1.4	1.43 ± 0.72
<b>CGI severity</b>												
Mean ± SD	3 ± 0.0	2,7 ± 0.7	2,4 ± 1.34	2.5 ± 0.55	2 ± 0.0	3	2	2,7 ± 0.6	2,25 ± 0.9	3,25 ± 0.5	3,5 ± 0.7	2,67 ± 0.73
<b>Specific activity score</b>												
Mean	4.6	45.7	4.1; 3.0	1.0	NA	2.0	0.0	4.4	2.7	NA	NA	NA

Rheumatoid Arthritis (RA), Ankylosing Spondylitis (AS), Psoriasis, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Behcet's Disease (BD), Granulomatosis with poliangitis (GWP), Takayasu's Disease (TD), Crohn's Disease (CD), Ulcerative Colitis (UC), Sclerosing Cholangitis (SC), Autoimmune Hepatitis (AIH). Background therapy: Group 1 patients with no specific immunological therapy, Group 2 patients with low dose corticosteroids (<15 mg/day) or/and low dose of immunosuppressants (low-dose azathioprine ≤2.5mg/kg/day; or methotrexate ≤20mg/weekly), Group 3 to patients treated with anti-TNF-α, Group 4 to patients treated with combination of biological DMARDs and low dose of immunosuppressants.

Table S3: Summary of reasons for dropping out of the study

	RA	AS	Psoriasis	SLE	BD	GWP	TD	CD	UC	SC	AHI	Overall population
N° of patients recruited	4	10	5	6	2	1	1	7	4	4	2	46
N° of patients dropping out	1	2	1	0	0	0	0	4	1	1	0	10
<b>Reasons for dropping out</b>												
Adverse event	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3
Relapse or lack of efficacy	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4
Patient's wish	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3

Table S4A. Lymphocyte subpopulations

	Baseline	Day 8	Day15	Day 30	Day 85	Day 183	Day 240
<b>Treg cells</b> Cells/mm <sup>3</sup>	50 ± 25	118 ± 57***	77 ± 44*	63 ± 28	67 ± 32	73 ± 33 <sup>EE</sup>	63 ± 35
% among CD4 <sup>+</sup>	5,8 ± 2,3	11,1 ± 4,6***	7,6 ± 2,8	6,7 ± 2,7	7,03 ± 2,7	7,1 ± 2,6 <sup>EE</sup>	6,6 ± 2,6
<b>Lymphocytes</b>	1632±615	1898±693**	1884±651	1749±583	1791±675	1822±478	1787±606
<b>CD3<sup>+</sup>T cells</b> cells/mm <sup>3</sup>	1293 ± 495	1526 ± 533***	1480 ± 512	1383 ± 469	1433 ± 546	1490 ± 415	1408 ± 483
%	79,6 ± 8,3	81,2 ± 7,1*	79,1 ± 8,5	79,4 ± 8,4	80,6 ± 8,2	81,7 ± 7,5	80,1 ± 7,4
<b>CD4<sup>+</sup>T cells</b> cells/mm <sup>3</sup>	899 ± 355	1098 ± 425***	1029 ± 398	975 ± 379	988 ± 368	1033 ± 352	974 ± 435
%	55,7 ± 11	58,7 ± 10,2***	55,8 ± 10,2	56 ± 11,2	56,4 ± 11,1	56,9 ± 10,3	54,5 ± 11,4
<b>CD8<sup>+</sup>T cells</b> cells/mm <sup>3</sup>	371 ± 193	402 ± 194	419 ± 199	388 ± 197	420 ± 257	412 ± 176	404 ± 174
%	22,5 ± 8,7	21,3 ± 8*	22,3 ± 8,4	22,2 ± 8,6	22,7 ± 9,3	23,3 ± 8,7	23,8 ± 9,6
<b>CD19<sup>+</sup>B cells</b> cells/mm <sup>3</sup>	188 ± 115	177 ± 126	205 ± 135	187 ± 119	202 ± 122	204 ± 110	204 ± 124
%	11,1 ± 5,4	8,7 ± 4,5***	10,4 ± 5,9	10,4 ± 5,1	10,9 ± 5,4	11 ± 5,5	11,1 ± 5,4
<b>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK cells</b> cells/mm <sup>3</sup>	120 ± 87	168 ± 102*	166 ± 104	142 ± 104	129 ± 102	109 ± 73	134 ± 97
%	7,3 ± 4,7	8,7 ± 4,6***	8,6 ± 4,6	8,1 ± 5,3	6,9 ± 4,4	6 ± 3,9	7,5 ± 4,5

Data are represented as mean ± sd. Changes between Baseline and day 8 were analyzed values using by ANOVA on ranks including factor time and pathology. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 for factor time. EE<0.01and EE p<0.001 for demonstrating that residual AUC during maintenance phase is different from zero (see methods)

Table S4B. Treg changes by pathologies

	RA n=4	AS n=10	PSO n=5	SLE n=6	CD n=7	UC n=4	SC n=4	Overall N=40	P-value*
Treg fold change day 8/day1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.5	2.5 ± 0.7	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.5	0,31
AUC induction	1.6 - 1.9	1.0 - 2.6	1.3 - 2.5	1.9 - 3.5	1.3 - 2.6	1.5 - 2.0	1.5 - 2.4	4.3 ± 1.6	0,40
AUC maintenance	26.5 ± 9.3	35.3 ± 6.8	28.4 ± 8.4	39.1 ± 22.5	39.1 ± 17.1	32.3 ± 3.4	41.7 ± 13.1	35.1 ± 13.1	0,51

\*Data are represented as mean ± sd. Comparison between pathology were analyzed using Kruskal Wallis test

Table S5: list of the differentially expressed genes at day-8 versus baseline

ENSEMBL_GENE_ID	hgnc_symbol	ENSEMBL_GENE_ID	hgnc_symbol	ENSEMBL_GENE_ID	hgnc_symbol
ENSG00000049768	FOXP3	ENSG00000136068	FLNB	ENSG00000160791	CCRS
ENSG00000134460	IL2RA	ENSG00000205476	CCDC85C	ENSG00000162676	GF11
ENSG00000182010	RTKN2	ENSG00000116771	AGMAT	ENSG00000100427	MLC1
ENSG00000181847	TIGIT	ENSG00000152465	NMT2	ENSG00000140511	HAPLN3
ENSG00000081985	IL12RB2	ENSG00000156738	MS4A1	ENSG00000107957	SH3PXD2A
ENSG00000100298	APOBEC3H	ENSG00000244270		ENSG00000139182	CLSTN3
ENSG00000100385	IL2RB	ENSG0000026103	FAS	ENSG00000072694	FCGR2B
ENSG00000136111	TBC1D4	ENSG00000099219	ERMP1	ENSG0000012124	CD22
ENSG00000071575	TRIB2	ENSG00000106462	EZH2	ENSG00000152804	HHEX
ENSG00000003147	ICAI	ENSG00000137070	IL11RA	ENSG00000162894	FCMR
ENSG00000134545	KIRC1	ENSG00000184371	CSF1	ENSG00000182199	SHMT2
ENSG00000123240	OPTN	ENSG00000273707	CDKN1C	ENSG00000239961	IL1RA4
ENSG00000123411	IKZF4	ENSG00000106415	GLCC1	ENSG00000196405	EVL
ENSG00000143167	GPA33	ENSG00000241106	JILA-DOB	ENSG00000111845	PAK1IP1
ENSG00000132185	FCRLA	ENSG00000238121	LINC00426	ENSG00000164120	HPGD
ENSG00000030419	IKZF2	ENSG00000129757	CDKN1C	ENSG00000173218	VANGL1
ENSG00000149294	NCAM1	ENSG00000099917	MED15	ENSG00000224397	SMIM25
ENSG00000085063	CD59	ENSG00000143297	FCRL5	ENSG00000136738	STAM
ENSG00000107485	GATA3	ENSG00000144152	FBLN7	ENSG00000123080	CDKN2C
ENSG00000153064	BANK1	ENSG00000116983	HPCAL4	ENSG00000154760	SLFN13
ENSG00000149527	PLCH2	ENSG00000100346	CACNA1I	ENSG00000185527	PDE6G
ENSG00000143891	GALM	ENSG00000121964	GTDC1	ENSG00000111206	FOXO1
ENSG00000178573	MAF	ENSG00000141469	SLC14A1	ENSG00000175115	PAC1
ENSG00000106537	TSPAN13	ENSG00000101842	V5IG1	ENSG00000101224	CDC25B
ENSG00000159713	TPPP3	ENSG00000174080	CTSF	ENSG00000116874	CD2
ENSG00000163599	CTLA4	ENSG00000103148	NPRL3	ENSG00000136193	SCRN1
ENSG00000136573	BLK	ENSG00000110448	CDS	ENSG00000187118	CMC1
ENSG00000124181	PLCG1	ENSG00000143515	ATP8B2	ENSG00000257698	
ENSG00000164530	PI16	ENSG00000155265	GOLGA7B	ENSG00000004468	CD38
ENSG00000110042	DTX4	ENSG00000154451	GBP5	ENSG00000088325	TPX2

Table S6A: Summary of adverse events (intention-to-treat population)

	N° Event (N° Patients) [%administrations]
Treatements administered	705 (46)
Serious Adverse events (SAE)	7 (6)
SAE related to treatment	0
Non Serious Adverse events(NSAE)	529 (46)
NSAE which requires corrective treatment	159 (40) [30%]
NSAE related to treatment	370 (45) [70%]
NSAE related to treatment which requires corrective treatment	51 [13.8%]
<i>Most common NSAE related to treatment</i>	
<i>Injection-site reaction</i>	194 (40)
Injection-site reaction induction period (n=230 administrations)	149 (40), 76.8% of total site reactions
Injection-site reaction maintenance period (n=475 administrations)	45 (11), 23.2% of total site reactions
Fatigue	66 (18) [9.4%]
Influenza-like syndrome	38 (11) [5.4%]
Headache	20 (12) [2.8%]
Nausea	20 (9) [2.8%]
<i>Most common NSAE not related to treatment reported by System Organ Class (SOC)</i>	
Oral cavity	3 (3)
Upper or Lower airways infections	11 (9)
Infections of the gastrointestinal tract	6 (3)
Urinary tract infection	9 (5)
Skin and joint infection	4 (3)
Seasonal Influenza and fever	17 (6)

**Table S6B: Summary of adverse events in the background therapy groups (intention-to-treat population)**

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Patients (n° administrations)	11 (172)	23 (375)	4 (51)	8 (107)
NSAE Non serious adverse events [%]	112 [65.1%]	279 [74.4%]	55 [107.8%]	83 [77.57]
NSAE related to treatment	75 [43.6%]	192 [51.2%]	40 [78.43%]	64 [59.8%]
NSAE related to treatment which requires corrective treatment	16 [9.3%]	25 [6.66%]	1 [1.9%]	9 [8.41%]
<i>Most common NSAE related to treatment</i>				
Injection-site reaction	44 [25.58%]	98 [26.13%]	28 [54.9%]	27 [25.23%]
Fatigue	9 [5.23%]	52 [13.8%]	2 [3.9%]	3 [2.80%]
Headache	3 [1.74%]	14 [3.73%]	1 [1.96%]	2 [1.86%]
Influenza-like syndrome	10 [5.81%]	12 [3.2%]	1 [1.9%]	15 [14.01%]
Nausea	3 [1.74%]	10 [2.66%]	3 [5.88%]	4 [3.73%]

Group 1 patients with no specific immunological therapy, Group 2 patients with low dose corticosteroids (<15 mg/day) or/and low dose of immunosuppressants (low-dose azathioprine ≤2.5mg/kg/day; or methotrexate ≤20mg/weekly), Group 3 to patients treated with anti-TNF-α, Group 4 to patients treated with combination of biological DMARDs and low dose of immunosuppressants.

**Table S7: Summary of specific clinical scores for each pathology**

Pathology	Scale	Mean+/-SD score at Baseline	Mean+/-SD score at M3	Mean+/-SD score at M6
RA	2.6 < DAS-28-ESR <5,1	4.6+/-0.5 (n=4)	3.9+/-1.3 (n=4)	3.5+/-1.4 (n=2)
AS	30 < BASDAI < 60	45.7+/-8.6 (n=10)	37.1 +/-14.5 (n=9)	38.6+/-24.3 (n=10)
SLE	SLEDAI ≤ 8	1.0+/-1.7 (n=6)	0.0+/-0.0 (n=6)	0.0+/-0.0 (n=6)
Psoriasis	PASI <10	4.1+/-4.0 (n=5)	1.6+/-2.0 (n=5)	2.4+/-2.0 (n=5)
	BSA < 10%			
BD	No clinical score	No clinical score	No clinical score	No clinical score
GWP	BVAS < 4	2.0 (n=1)	1.0 (n=1)	1.0 (n=1)
TD	NIH scores≤2	0.0 (n=1)	0.0 (n=1)	0.0(n=1)
CD	4≤ HBI ≤ 7	4.4+/-1.3 (n=7)	3.7+/-3.4 (n=6)	4.5+/-3.5 (n=6)
UC	Simplified MAYO score ≤3	2.7+/-0.6 (n=3)	1.8+/-1.3 (n=4)	0.0+/-0.0 (n=1)
AIH	No clinical score	No clinical score	No clinical score	No clinical score
SC	No clinical score	No clinical score	No clinical score	No clinical score

Data are represented as mean ± sd. Changes in specific clinical scores between baseline and M3 or M6 were analyzed by means of the Wilcoxon test, no significant change was observed

## Supplemental Methods

### Immunomonitoring

Blood samples were collected in lithium heparin according to the planned protocol: absolute numbers of lymphocyte subsets and Tregs were monitored at each patient visit: day-1 (baseline), before treatment and during IL-2 administration; day-8; 15, 30, 85 and at 183 of the follow up. The last day follow up was 2 month post treatment at day 240.

### Flow cytometry analysis and cytokine measurements

Flow cytometry analysis was performed according to previously published methods.[1,23,24] Blood subsets (CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocytes, CD19+ B lymphocytes and CD3-CD56+ NK cells) counts (cells/ $\mu$ l) were established from fresh blood samples using CYTO-STAT tetraCHROME kits with Flowcount fluorescent beads and tetra CXP software with a FC500 cytometer according to manufacturer's instructions. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were analyzed using multicolor FC and mAbs directly conjugated either to Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Texas Red (ECD), Allophycocyanin (APC), phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cya7), APC -Alexafluor 700 (APCa700) or APC -Alexafluor 750 (APC-a750) were used for: CD3-APCa750, CD4-ECD, CD8-APCa700, CD16-PC7, CD56-APC, CD127-PC7, all from Beckman Coulter. CD25-PE, was from BD Biosciences, Foxp3 labeling was performed after CD3, CD4, CD8, CD127 and CD25 membrane staining using APC anti-human Foxp3 kit (PCH101 clone, eBioscience) using fixed and permeabilized cells using Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (eBioscience) and according to manufacturer's instructions. Cells acquisition and analysis were performed using a Navios Cytometer and data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter). Deep Immunophenotyping of Treg was performed in a group of 9 patients (RA, AS, SLE, PSO and UC) as already described by Pitoiset et al.[25]

Plasma samples were collected, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed. Quantitative determination of 14 cytokines (GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ) was performed using Human Milliplex High Sensitivity T Cell Panel Premixed 13-plex (Millipore) and

**Anti-IL-2 antibodies assay** The presence of plasma IL-2-binding antibodies was studied by ELISA, as previously described.[2,23]

### Transcriptomic analysis

RNAs were generated from frozen PBMCs using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyser showing a quality of RNA integrity number of 7–9.5 (Agilent Technologies). RNA yield was assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Products, Thermo Fisher Scientific). Transcriptomic data were generated by high throughput RNA sequencing (Ligan-PM Platform, Lille, France). Count data consist in quantification of the expression of transcripts. Transcripts with low counts (10-fold below in one sample) were filtered out. The remaining count data were transformed into the log<sub>2</sub> - count per million for variance stabilization and were normalized using the Voom method.[26] Principal component analysis was performed on transformed and normalized data to explore the relationship between samples. Differential expression analysis was performed using the DESeq2 method[7] to identify genes that differentially expressed at visit 6 (day 8) and at visit 12 (month 3) compared to baseline (visit 1). Functional analysis was performed on differentially expressed genes using QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)). In the network representation of the molecular relationships between genes and gene products, genes or gene products are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). Red and green nodes represent positively and negatively correlated genes, respectively. Solid lines represent protein-protein interactions; dashed lines represent regulatory relationships. All analyses were done using SAS 9.4 (from SAS Institute North Carolina USA) or R v3.4.1 software

### **Clinical scores**

Guidelines were provided to investigators to complete all clinical evaluations (specific disease score, CGI, chronic fatigue and arthralgia). Clinical scores were completed by physician at baseline, month 3 and month 6. EuroQOL-5D-5L is a self-administered questionnaire completed by the patients at baseline and at month 6.

### **Specific disease scores**

- DAS-28 is a continuous measure of RA disease activity that combines information about pain and synovitis on the 28 proposed joint, the value of the erythrocyte sedimentation rate and the overall assessment of the patient on a 100 mm visual analogue scale.[4]
- BASDAI (0-100) is a self-administered instrument consists of six 100 mm visual analog scales to measure severity of fatigue, spinal and peripheral joint pain, localized tenderness and morning stiffness (both qualitative and quantitative).[6]
- SLEDAI is a global index including clinical and laboratory variables.[12]
- PASI index is based on severity and area evaluation of psoriatic lesions.[8]
- BSA measure the surface area of the involved skin in psoriatic lesions.[9]
- BVAS is a global score including clinical, radiological and laboratory variables.[28]
- NIH score evaluate prospectively the clinical features, angiographic and laboratory findings.[29]
- HBI is a simple index including clinical variables.[17]
- Simplified MAYO score is a non invasive (without endoscopy) 9-point partial Mayo score including clinical variables.[18]

### **CGI Scales**

For the CGI-Severity (CGI-S), the clinician respond to the question: "Considering your total clinical experience with this particular population, how ill is the patient at this time?" 1=normal, not at all ill; 2=borderline; 3=mildly; 4=moderately; 5=markedly; 6=severely; 7=among the most extremely ill patients.[30] For the CGI activity the clinician respond to the question: "Considering your clinical experience with this particular population how is the activity of disease at this time?" 0=normal, not at all ill; 1=mild; 2=moderate; 3=severe.

### **Chronic fatigue and arthralgia measurement**

Chronic fatigue and arthralgia were evaluated as present or not across all diseases by physician. Chronic fatigue was defined as deep fatigue with a significant reduction in functionality. Arthralgia was defined as joint pain with or without signs of inflammation (pain, stiffness and swelling). More information about joint involvement are given in the specific disease scores.

### **EuroQL-5D-5L**

The EuroQL-5D-5L questionnaire comprise a descriptive system and a visual analogue scale about the global health status. The descriptive system comprises five dimensions: mobility, self-care, usual activities, pain/discomfort and anxiety/depression. Each dimension has 5 levels: no problems, slight problems, moderate problems, severe problems and extreme problems.[31]

## REFERENCES

- 1 Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;**365**:2067–77. doi:10.1056/NEJMoa1105143
- 2 Churlaud G, Rosenzweig M, Cacoub P, *et al.* IL-2 antibodies in type 1 diabetes and during IL-2 therapy. *Diabetologia* Published Online First: 2 June 2018. doi:10.1007/s00125-018-4649-4
- 3 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;**62**:2569–81. doi:10.1002/art.27584
- 4 van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:1845–50. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1845::AID-ART17>3.0.CO;2-K
- 5 Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, *et al.* The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:777–83. doi:10.1136/ard.2009.108233
- 6 Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, *et al.* A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;**21**:2286–91.
- 7 Classification Criteria for Psoriatic Arthritis: CASPAR | Rheumatology Network. <http://www.rheumatologynetwork.com/psoriatic-arthritis/classification-criteria-psoriatic-arthritis-caspar> (accessed 30 Jul 2018).
- 8 Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978;**157**:238–44.
- 9 Ramsay B, Lawrence CM. Measurement of involved surface area in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 1991;**124**:565–70.
- 10 Petri M. Review of classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;**31**:245–54, vi. doi:10.1016/j.rdc.2005.01.009
- 11 Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, *et al.* Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;**35**:630–40.
- 12 Criteria for diagnosis of Behçet’s disease. International Study Group for Behçet’s Disease. *Lancet Lond Engl* 1990;**335**:1078–80.
- 13 International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet’s Disease (ITR-ICBD). The International Criteria for Behçet’s Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2014;**28**:338–47. doi:10.1111/jdv.12107
- 14 Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener’s granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:1101–7.
- 15 Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, *et al.* A disease-specific activity index for Wegener’s granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). *Arthritis Rheum* 2001;**44**:912–20. doi:10.1002/1529-0131(200104)44:4<912::AID-ANR148>3.0.CO;2-5

- 16 Arend WP, Michel BA, Bloch DA, *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:1129–34.
- 17 Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet Lond Engl* 1980;**1**:514.
- 18 Lewis JD, Chuai S, Nessel L, *et al.* Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:1660–6. doi:10.1002/ibd.20520
- 19 Liver EAFTSOT, others. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;**51**:237–267.
- 20 Shetty K, Rybicki L, Carey WD. The Child-Pugh classification as a prognostic indicator for survival in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1997;**25**:1049–1053.
- 21 Shetty K, Rybicki L, Carey WD. The Child-Pugh classification as a prognostic indicator for survival in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology Baltim Md* 1997;**25**:1049–53. doi:10.1002/hep.510250501
- 22 Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, *et al.* Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology Baltim Md* 2008;**48**:169–76. doi:10.1002/hep.22322
- 23 Rosenzwajg M, Churlaud G, Mallone R, *et al.* Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun* 2015;**58**:48–58. doi:10.1016/j.jaut.2015.01.001
- 24 Rosenzwajg M, Languille E, Debiec H, *et al.* B- and T-cell subpopulations in patients with severe idiopathic membranous nephropathy may predict an early response to rituximab. *Kidney Int* 2017;**92**:227–37. doi:10.1016/j.kint.2017.01.012
- 25 Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K, *et al.* Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. *Cytometry A*. 2018.
- 26 Law CW, Chen Y, Shi W, *et al.* voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* 2014;**15**:R29. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r29
- 27 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;**15**:550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- 28 Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, *et al.* A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). *Arthritis Rheum* 2001;**44**:912–20. doi:10.1002/1529-0131(200104)44:4<912::AID-ANR148>3.0.CO;2-5
- 29 Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, *et al.* Takayasu arteritis. *Ann Intern Med* 1994;**120**:919–29.
- 30 Busner J, Targum SD. The Clinical Global Impressions Scale. *Psychiatry Edgmont* 2007;**4**:28–37.
- 31 EQ-5D-5L – EQ-5D. <https://euroqol.org/eq-5d-instruments/eq-5d-5l-about/> (accessed 31 Jul 2018).

## 5 DISCUSSION

### 5.1 Investigations statiques de l'immunome dans les MAI

TRANSIMMUNOM est le résultat d'une approche multidisciplinaire appliquée à la conception, la mise en œuvre et l'analyse d'un protocole observationnel trans-MAI.

C'est un protocole innovant qui a permis l'inclusion de patients suivis dans différents services cliniques et à assurer l'exhaustivité, la standardisation et l'intégration des données. Toutes les données recueillies ont été intégrées dans une plateforme d'analyse afin de partager les informations entre tous les membres du Consortium.

Par rapport à d'autres projets d'immunologie des systèmes ("NECESSITY" n.d. ; "Precisesads, Investigating Systemic Autoimmune Diseases" n.d. ; Poland, Quill, and Toghiani 2013 ; Thomas et al. 2015 ; Barton and Pitzalis 2017), TRANSIMMUNOM (1) recueille également un grand nombre de données cliniques qui ont été codées de manière à permettre une analyse croisée entre les données cliniques et biologiques; (2) analyse les données de patients atteints de différentes MAI, de maladies contrôles et des volontaires sains et (3) étudie les interactions croisées entre les différentes données omiques.

Le codage des données cliniques présente d'énormes avantages puisqu'il (i) regroupe et harmonise les termes médicaux (ii) facilite l'identification d'ensembles de données communs pour l'évaluation des informations cliniques et (iii) permet l'analyse en *cluster* clinique et (iv) permet un gain de temps dans l'analyse des données. La Ligue Européenne Contre le Rhumatisme (EULAR) et l'« *International Consortium for Health Outcome* » (ICHOM) proposent des « CRF type » à utiliser dans les études cliniques sur la PR, la SpA et les rhumatismes associés au psoriasis (Radner et al. 2018 ; Boers et al. 2014 ; "ICHOM" n.d.).

Notre CRF couvre un large éventail de données cliniques et biologiques d'intérêt pour la plupart des MAI, et propose un ensemble pré-conçu de CRF qui peuvent être utilisés ensemble ou individuellement pour d'autres études cliniques.

Au total, un effort vraiment multidisciplinaire a conduit à la conception et à la mise en œuvre d'un panel de 21 CRF capturant plus de 5000 valeurs codées, d'ores et déjà utilisé dans TRANSIMMUNOM, et qui pourrait être utilisé dans de futures études.

Enfin, l'intégration de toutes ces données hautement standardisées, avec les données omiques dans la plateforme tranSMART (plateforme capable de générer des statistiques descriptives et des analyses avancées), permettra à tous les membres du consortium (cliniciens, biologistes et bioinformaticiens) d'avoir accès à la totalité des données, de pouvoir les analyser facilement et de stimuler des discussions entre les chercheurs et les cliniciens.

## 5.2 Investigations dynamiques de l'immunome dans les MAI

Etant donné l'effet pléiotrope de l'IL-2 sur le système immunitaire (Klatzmann and Abbas 2015), l'étude de l'immunome dans les essais visant à tester des fd d'IL-2 nous permet d'identifier précocement des marqueurs d'efficacité ainsi que les doses maximales tolérées.

### *Les fd IL-2 induit un milieu régulateur chez les patients DT1*

L'intégration des données omiques nous a permis de démontrer que de fd d'IL-2 induisent un milieu régulateur dose-dépendant caractérisé par de grands changements de l'immunome qui vont au-delà de l'augmentation des cellules Treg.

Grâce à un immunophénotypage approfondi, nous constatons qu'il y a non seulement une augmentation du nombre de Treg, mais également une activation accrue. Ces résultats montrent donc qu'une cure de 5 jours d'IL-2 à une dose comprise entre 0,33 et 3 MUI / jour est efficace dans l'expansion et l'activation des cellules Treg chez les patients affectés par DT1. Les doses de 0,33 et 1 MUI / jour d'IL-2 augmentent et activent efficacement les Treg sans effets sur les Teff ou les cellules NK. À la dose de 3 MUI / jour, l'effet sur les Treg est encore plus prononcé et surtout plus durable. A cette dose, nous avons également observé une expansion des cellules NK (Figure 2 en *supplementary* de l'article 3), une tendance à l'augmentation des cytokines et chimiokines (Figure 4 de l'article 3) et des effets secondaires plus fréquents. À la dose de 1 et 3 MUI / jour, nous avons observé une diminution significative et inattendue du pourcentage de cellules B (Figure 2 en *supplementary* de l'article 3). Un effet direct de l'IL-2 sur les cellules B matures est peu probable car elles n'expriment pas le récepteur de l'IL-2 (Boyman and Sprent 2012). Cette diminution a été décrite par 2 autres équipes : i) Koreth et ses collègues en 2016, ont publié les résultats à long terme (2 ans) de fd d'IL-2 chez des patients affectés par GVHD. Ils décrivent une diminution du nombre de cellules

B pendant la période initiale du traitement par l'IL-2, qui revient à des niveaux normaux au fur et à mesure que le traitement se poursuit (Koreth et al. 2016) ; ii) Humrich et ses collègues ont également observé une diminution significative du nombre de cellules B au cours des cycles 2, 3 et 4 d'IL-2 (cf Tableau 2 page 42) par rapport à la baseline chez des patients atteints de LES sans diminution des anticorps anti-ADN (Jens Y. Humrich et al. 2019).

La signification clinique de ces résultats reste à clarifier dans de futures études.

Dans notre étude DF-IL2, les fd d'IL-2 induisent un déplacement clair de l'environnement immunitaire vers un milieu régulateur, comme le reflètent les changements dans les proportions cellulaires, la protéomique plasmatique, l'analyse du transcriptome et les réponses Teff spécifiques à la maladie.

Toutes ces données nous indiquent que la dose optimale la plus efficace d'un point de vue biologique et la mieux tolérée est de 1 MUI/ jour. En outre, en utilisant les résultats de cet essai, nous avons effectué une modélisation qui a permis de montrer le maintien d'une augmentation <30% des Treg tout au long de la période de traitement à une dose de 1 MUI avec une cure d'induction de 5 jours suivie d'une injection toutes les deux semaines (Churlaud et al. 2018).

Chez la plupart des patients atteints de DT1, une fonction résiduelle des cellules bêta-pancréatiques est encore présente au moment du diagnostic clinique. L'immunothérapie pourrait réduire l'inflammation, favoriser la tolérance immunitaire et, à son tour, préserver la fonction des cellules bêta. Dans cette perspective, nous avons poursuivi nos recherches avec deux études d'efficacité chez les enfants et les adultes.

DF-IL2-Child (NCT01862120) était un essai multicentrique de phase I/II, en double aveugle, contrôlé vs placebo, visant à tester de fd d'IL-2 chez des enfants avec un DT1 récemment diagnostiqué (Rosenzwajg et al. 2020). Nous avons traité 24 enfants atteints de DT1, avec

0,125, 0,250 ou 0,500 MUI/m<sup>2</sup> d'IL-2 vs placebo administrées quotidiennement pendant 5 jours, puis toutes les 2 semaines pendant un an. Les résultats montrent que de fd d'IL-2 induisent une augmentation dose-dépendante de Treg, statistiquement significative par rapport au placebo pour tous les groupes des doses. Cependant, il a été observé une variabilité individuelle de la réponse Treg aux fd-d'IL-2. Dans les groupes 0,250 et 0,500 MIU/m<sup>2</sup>, sept patients ont présenté une augmentation plus marquée des Treg et ont été définis *high-responders*. Ces patients présentaient, à la baseline, un pourcentage de Treg inférieur aux patients *low-responders*. Bien qu'il n'y ait pas eu de changement significatif dans le contrôle glycémique dans aucun des groupes de doses par rapport au placebo, on a constaté une amélioration du maintien de la production du peptide C induite après un an de traitement chez les patients *high-responders* par rapport aux *low-responders* et au placebo. Les fd d'IL-2 ont été bien tolérées dans tous les groupes de doses (Rosenzwaig et al. 2020). La meilleure préservation de la sécrétion d'insuline chez les enfants ayant une réponse Treg élevée soutient le potentiel des Treg dans la régulation de l'auto-immunité dans le DT1, et justifie la poursuite des recherches dans ce domaine.

Nous poursuivons nos recherches avec notre essai d'efficacité de fd IL-2 chez les patients adultes atteints de DT1 de diagnostic récent (DIABIL-2, NCT01862120).

### ***L'effet hautement sélectif trans-pathologies des fd d'IL-2***

Les analyses de l'immunome supervisées et non supervisées indiquent qu'avec la dose et le schéma thérapeutique utilisé, l'IL-2 induit un effet hautement spécifique et « universel » sur les Treg sans aucun effet sur les Teff quelle que soit la maladie dans un groupe de patients très hétérogène.

Les résultats publiés sur les 46 premiers patients inclus, semblent être confirmés par les premières analyses de l'immunomonitoring et des données cliniques, si on considère

l'ensemble des 81 patients inclus au total. Tous les patients inclus ont désormais terminé leur traitement mais le monitoring des données est toujours en cours ; l'analyse finale des données est prévue pour le premier trimestre 2021.

Dans l'ensemble, notre étude met en évidence la sécurité « universelle », l'efficacité biologique et l'efficacité clinique possible de fd d'IL-2 dans un groupe de patients très hétérogène. Elle souligne également que le schéma thérapeutique utilisé est satisfaisant et autorise donc le lancement d'essais d'efficacité de phase II, qui sont désormais nécessaires pour déterminer le potentiel thérapeutique de fd d'IL-2 dans les MAI.

Ces évaluations convergentes suggèrent un large potentiel des fd d'IL-2 et ont contribué à la sélection du LES comme maladie cible d'un essai de phase II en cours d'analyse (LUPIL-2 trial NCT02955615).

Enfin, les fd d'IL-2 ont été utilisées avec succès dans différentes MAI: LES, cryoglobulinémie, DT1, *alopecia areata*, GS dans la dermatomyosite /polymyosite et dans la GVHD (Miao et al. 2018; S.-X. Zhang et al. 2019 ; Koreth et al. 2011 ; Kennedy-Nasser et al. 2014; Koreth et al. 2016 ; Saadoun et al. 2011 ; Hartemann et al. 2013 ; Castela et al. 2014 ; Jens Y. Humrich et al. 2017 ; J. He et al. 2020 ; J. Y. Humrich et al. 2016; Jens Y. Humrich et al. 2019) (cf Tableau 2 page 42). Les résultats de ces études montrent que les fd d'IL-2 n'ont pas seulement un effet ciblé sur les Treg mais aussi une influence régulatrice plus large sur l'homéostasie du système immunitaire.

Les résultats des études de phase précoce sont très prometteurs. Actuellement seulement une étude de phase II dans le LES a été publiée. Les résultats montrent une amélioration clinique (notamment dans la néphrite lupique) et biologique (diminution des anticorps anti-ADN) à la semaine 12, démontrée ainsi par une diminution du score SLEDAI. En revanche, le critère principal d'efficacité (SRI-4) n'a pas été atteint (J. He et al. 2020).

Les futures études devraient définir de nouveaux schémas thérapeutiques efficaces de fd d'IL-2, en prenant en compte la population de patients, l'expansion dose-dépendante des Treg et la durée du traitement. Il est probable que les maladies chroniques nécessitent de maintenir une proportion accrue de Treg au fil du temps.

De nombreuses études visant à tester des fd d'IL-2 dans le MAI sont toujours en cours, notamment sur le diabète de type 1 ("Search of: Low Dose IL-2" n.d.), le LES ("Search of: Low Dose IL 2" n.d.), la sclérose en plaque ("Biological Activity and Safety of Low Dose IL2 in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov" n.d.), la sclérose latérale amyotrophique ("Search of: Low Dose IL 2" n.d.), la rectocolite hémorragique ("Search of: Low Dose IL 2" n.d.), la maladie de Behçet ("Low-Dose IL-2 Treatment on Behcet's Disease" n.d.), la maladie de Crohn ("LOW DOSE IL-2 FOR THE TREATMENT OF CROHN'S DISEASE" n.d.), la polyarthrite rhumatoïde ("Low-Dose Recombinant Human IL-2 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis" n.d.) et les myosites ("Low-Dose Interleukin-2 Treatment on Idiopathic Inflammatory Myopathy" n.d.).

### 5.3 Discussion finale et perspectives

Les données omiques nous permettent de comprendre un système biologique en termes de réseau, de fonction cellulaire et moléculaire. Une approche holistique dans l'étude des MAI est aujourd'hui indispensable et l'intégration des données omiques avec les données cliniques nous offre une grande opportunité.

Dans nos différents travaux, nous avons étudié de façon statique et dynamique l'immunome dans les maladies autoimmunes et inflammatoires chroniques.

Nous avons montré la complexité d'étudier ces maladies ensemble de par leur nature hétérogène et l'avantage de cette approche dans des études cliniques de phase précoce.

Nous avons obtenu :

1. plus de 5000 variables cliniques codées qui pourront servir à des études ultérieures,
2. l'intégration des données hétérogènes dans la plateforme tranSMART, accessible à tous les membres du consortium, et permettant d'analyser facilement les données et de stimuler la discussion entre les cliniciens et les chercheurs,
3. des marqueurs précoces de dose maximale,
4. les données nécessaires pour modéliser le schéma thérapeutique le plus adapté et sa validation sur différentes maladies,
5. des marqueurs précoces de l'effet hautement sélectif des fd d'IL-2 sur les Treg,
6. des données montrant la sécurité « universelle » des fd d'IL-2 dans diverses MAI et en association avec différents traitements de fond,
7. des données montrant l'efficacité clinique possible de fd d'IL-2 dans un groupe de patients très hétérogène.

Néanmoins, des études avec des données omiques ont des limites de faisabilité : i) limites préanalytiques liées : à l'hétérogénéité des données, aux prélèvements (les échantillons sont

très sensibles), à leur préparation (déplétion en protéines majoritaires) et à leur conservation, ii) limites liées à la validation (la reproductibilité des analyses), iii) limites liées aux coûts et aux ressources humaines nécessaires à la réalisation de l'étude.

Dans ce contexte, notre laboratoire de recherche a fait des efforts importants avec i) la normalisation des procédures de prélèvements et du circuit des échantillons, ii) l'harmonisation et le codage des variables cliniques ainsi que leur curation, iii) des analyses comparatives des méthodes de séquençage génétique (notamment pour l'analyse du répertoire des récepteurs des cellules T) (Barenes et al. 2020), iv) la normalisation des protocoles de traitement des données de cytométrie (Pitoiset et al. 2018), v) l'élaboration d'un plan d'analyses statistiques, supervisées et non supervisées, adapté à ces études, et vi) la création d'un consortium englobant des experts dans chacun de ces domaines.

Tout ce travail a été rendu possible grâce aussi à deux subventions importantes : le Labex TRANSIMMUNOM et le RHU iMAP.

En tant que médecin de recherche clinique, j'ai eu un rôle majeur dans tous les aspects médicaux (y compris les inclusions et le suivi des patients) nécessaires au déroulement des études mentionnées dans cette thèse.

Dans la figure 23 sont résumés : les limites et les points forts de toutes les actions menées pendant la conception des protocoles, le déroulement et l'analyse des données.

PHASE	ACTIONS	LIMITES	POINTS FORTS
CONCEPTION DU PROTOCOLE	Sélection des MAI (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Difficulté de recrutement pour les pathologies rares (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Pathologies représentatives de tout le CONTINUUM (TRANREG et TRANSIMMUNOM)
	Sélection des critères d'évaluation de la maladie (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Scores cliniques peu adaptés à la population (activité faible ou modérée de la maladie) (TRANSREG)	Score d'évaluation trans-pathologies (CGI); Recueil de l'évolution des symptômes individuels (TRANSREG)
	Sélection des items à recueillir	Le CRF étant très exhaustif, l'ensemble des items ne sont pas toujours applicables à la population recrutée (TRANSIMMUNOM)	Le CRF étant très exhaustif, il permet d'identifier des phénotypes rares; peut être réutilisé
	Coding des termes cliniques	Le precoding de la posologie des biothérapies ne permet de prendre en compte les éventuelles adaptations de doses requises chez certains patients	Harmonisation du recueil des données (NON-investigateur dépendent), gain de temps dans l'analyse
DÉROULEMENT	Screening actif	Plusieurs services impliqués dans différents GH (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Lien continu avec les différents équipes investigatrices
	Collection des données	Plusieurs GH pour le suivi des patients, dossier médical incomplet (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Exhaustivité des données collectées grâce au médecin de recherche clinique
ANALYSE	Curation des données	5835 données codées = 1000 queries (TRANSIMMUNOM)	Données fiables
	Intégration des données dans transSMART		Accessible à tous les membres du consortium, Easy-to-use pour les analyses avancées
	Analyse	Petits effectifs dans certaines cohortes (TRANREG et TRANSIMMUNOM)	Grands variété des données obtenues (IMMUNOME), analyse en clustering permettant de relier les phénotypes cliniques et les omiques

**Figure 23** : Limites et points fort de l'approche holistique dans les essais cliniques

Les résultats décrits dans cette thèse sont encore des résultats préliminaires.

Pour ce qui concerne l'étude TRANSREG, l'analyse statistique, supervisée et non supervisée, des données préliminaires nous a déjà fourni des informations précieuses. Néanmoins, en plus des analyses des données clinico-biologiques des patients récemment inclus, nous aurons également les données du transcriptome, du répertoire des cellules triées Treg et Teff ainsi que celles du microbiote à intégrer.

L'analyse du répertoire TCR des lymphocytes Treg et Teff a pour but de caractériser le degré de perturbation de la diversité du répertoire T dans les MAI. Elle nous permettra de mieux comprendre comment les répertoires sont sélectionnés dans des contextes inflammatoires ou auto-immuns et à identifier des signatures TCR spécifiques des patients répondeurs ou non aux fd d'IL-2.

L'analyse du microbiote intestinal nous permettra d'étudier son implication dans les mécanismes physiopathologiques des MAI, d'évaluer sa composition chez des patients avec

des traitements immuno-modulateurs, et ses changements suite à l'administration des fd d'IL-2.

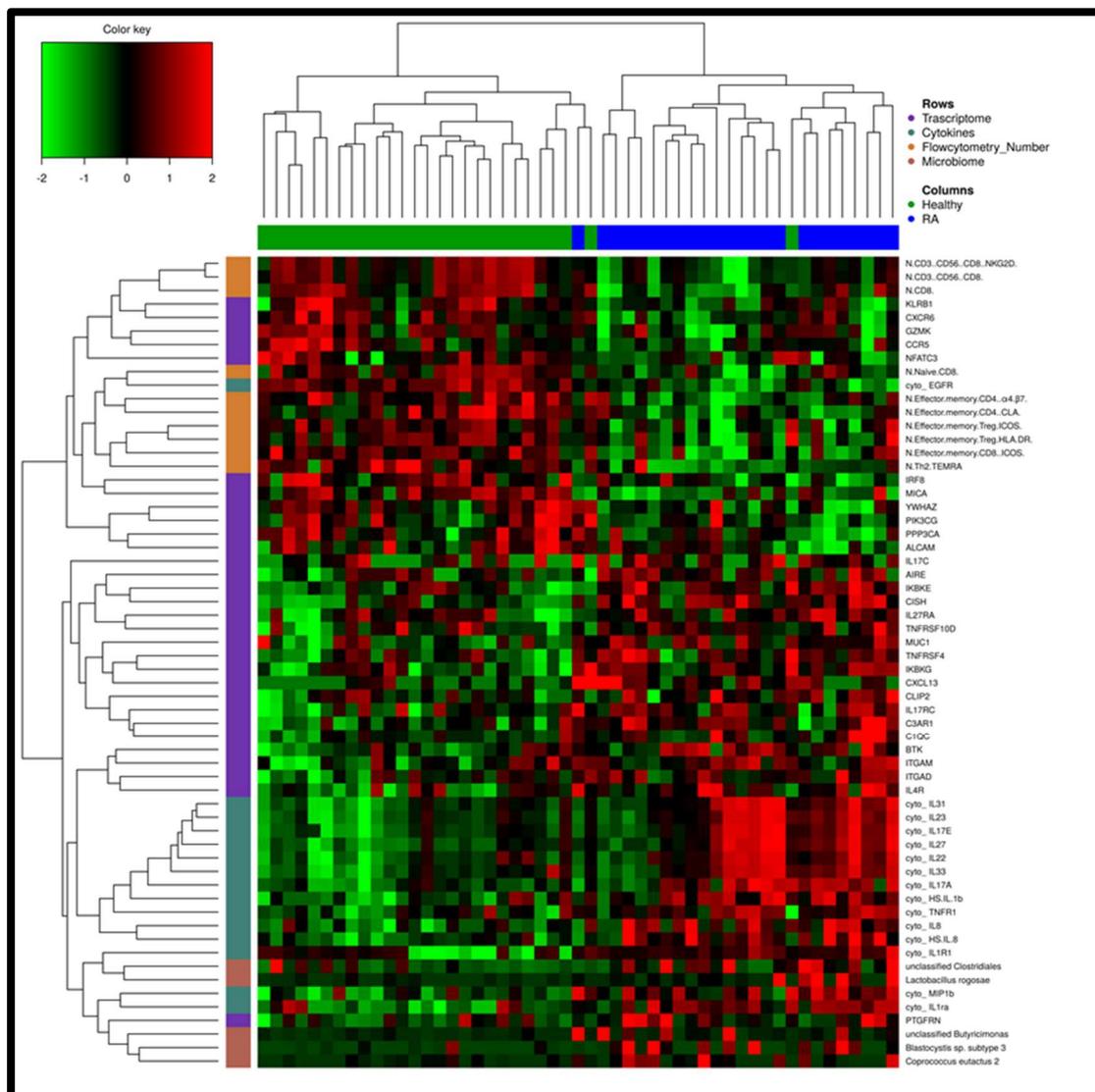
Pour ce qui concerne TRANSIMMUNOM, la fin des inclusions est prévue en janvier 2021 et la curation et l'intégration des données sur la plateforme tranSMART pour le premier quadrimestre 2021.

Les données de l'étude TRANSIMMUNOM seront analysées avec des méthodes d'analyses statistiques (supervisées et non supervisées), adaptées à chaque typologie de données, et avec une approche d'intégration des données multi-omiques (analyse *multi blocks mix-omics*) (Günther et al. 2014; "Publications" n.d.) . Cette approche nous permet de combiner les informations provenant des différents types de données dans un cadre multibloc, d'étudier les relations entre les variables à travers les réseaux de similarité et de trouver des signatures spécifiques. La Figure 24 montre un exemple d'analyses multi-omiques (avec des données d'immunophénotypage, cytokines, transcriptome et microbiote de patients PR et de VS) sur des données préliminaires TRANSIMMUNOM. L'approche *multi blocks mix-omics* nous permet de distinguer les patients sur la base d'une signature composite incluant des données de transcriptome, de cytométrie, de cytokines et du microbiote. Dans la Figure 24, nous constatons que la contribution majeure à la signature est apportée par le transcriptome, ensuite par les cytokines puis par les données de cytométrie et du microbiote. Cette signature est déterminée en majeure partie par des transcrits inflammatoires qui sont régulés à la hausse chez les patients affectés par PR. Les données cliniques seront incluses dans cette typologie d'analyse *multi blocks mix-omics*.

Les résultats de TRANSREG et TRANSIMMUNOM seront ensuite intégrés dans une analyse globale des données du projet iMAP (incluant les études LUPIL-2, MS-IL-2, DIABIL-2 et

HEALTHIL-2 visant à tester des fd d'IL-2 chez des patients atteints respectivement de LES, de sclérose en plaque et de DT1 récemment diagnostiqué ainsi que chez les volontaires sains).

L'intégration des données provenant de ces différents essais nous permettra: (i) d'élucider les mécanismes qui relie le génome humain à des syndromes complexes avec différents phénotypes de maladie ; ii) de cibler la dose d'IL-2 ayant le meilleur rapport bénéfice/risque ; iii) de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette molécule ; iv) de suivre l'évolution de la signature dans le temps et v) d'étudier les changements dans les relations entre les variables définissant la signature (avec notamment l'approche *multi blocks mix-omics*).



**Figure 24** : Analyse *multi blocks mix-omics* des données TRANSIMMUNOM

## 6 CONCLUSION

Les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires (MAI) sont la deuxième plus grande cause de maladie chronique et de handicap dans le monde occidental.

D'où l'intérêt particulier porté à la découverte de biomarqueurs précoces de diagnostic, de progression et de réponse au traitement. Étant donné la complexité du système immunitaire et le degré élevé de l'interaction entre ces composants, la simple analyse des résultats séparément ne suffit pas. Le résultat possible d'une analyse combinée est que le biomarqueur ne soit pas une mesure unique mais une signature résultant des relations entre les composants.

Pour l'avancement des connaissances dans les MAI, il est donc essentiel d'avoir une approche holistique, intégrant des données cliniques avec des données multi-omiques. Sur ce point, un effort plus important doit être porté dans le domaine clinique sur l'harmonisation, la normalisation et la collecte des données, ainsi que sur l'utilisation de plateformes d'intégration de données dans les services hospitaliers et universitaires.

L'avantage de cette approche est à la fois :

- i. dans des essais observationnels pour mieux comprendre la physiopathologie des maladies et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour un certain type de patients
- ii. et dans les essais interventionnels de phase précoce pour avancer plus rapidement dans les étapes ultérieures car elle permet de diminuer les effectifs nécessaires.

La conception et les méthodes utilisées dans nos essais peuvent être appliquées, en pratique clinique courante, pour étudier la population des patients « tout-venant », en appliquant une approche de médecine personnalisée ainsi que pour étudier de nombreux médicaments en cours de développement dans les MAI.

## 7 RÉFÉRENCE

- Abbas, Abul K., and Andrew H. Lichtman. 2008. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier Masson.
- Abbas, Abul K., Eleonora Trotta, Dimitre R. Simeonov, Alexander Marson, and Jeffrey A. Bluestone. 2018. "Revisiting IL-2: Biology and Therapeutic Prospects." *Science Immunology*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>.
- Aguiar, R., C. Araújo, G. Martins-Coelho, and D. Isenberg. 2017. "Use of Rituximab in Systemic Lupus Erythematosus: A Single Center Experience Over 14 Years." *Arthritis Care & Research* 69 (2): 257–62.
- Ahmadzadeh, Mojgan, and Steven A. Rosenberg. 2006. "IL-2 Administration Increases CD4 CD25hi Foxp3 Regulatory T Cells in Cancer Patients." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2399>.
- Allenbach, Yves, Wahiba Chacara, Michelle Rosenzweig, Adrien Six, Nicolas Prevel, Federico Mingozi, Julia Wanschitz, et al. 2014. "Th1 Response and Systemic Treg Deficiency in Inclusion Body Myositis." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088788>.
- American Pathologists, College of, and Others. n.d. "SNOMED Home Page." <http://www.snomed.org/>.
- Antony, Paul Andrew, and Nicholas P. Restifo. 2005. "CD4+CD25+ T Regulatory Cells, Immunotherapy of Cancer, and Interleukin-2." *Journal of Immunotherapy* 28 (2): 120–28.
- Appel, Heiner, Peihua Wu, Rebecca Scheer, Claudia Kedor, Birgit Sawitzki, Andreas Thiel, Andreas Radbruch, Joachim Sieper, and Uta Syrbe. 2011. "Synovial and Peripheral Blood CD4+FoxP3+ T Cells in Spondyloarthritis." *The Journal of Rheumatology* 38 (11): 2445–51.
- Arazi, Arnon, the Accelerating Medicines Partnership in SLE network, Deepak A. Rao, Celine C. Berthier, Anne Davidson, Yanyan Liu, Paul J. Hoover, et al. 2019. "The Immune Cell Landscape in Kidneys of Patients with Lupus Nephritis." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0398-x>.
- Arbuckle, Melissa R., Micah T. McClain, Mark V. Rubertone, R. Hal Scofield, Gregory J. Dennis, Judith A. James, and John B. Harley. 2003. "Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus." *The New England Journal of Medicine* 349 (16): 1526–33.
- Aringer, Martin, Karen Costenbader, David Daikh, Ralph Brinks, Marta Mosca, Rosalind Ramsey-Goldman, Josef S. Smolen, et al. 2019. "2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 71 (9): 1400–1412.
- Arnsion, Yoav, Howard Amital, Serena Guiducci, Marco Matucci-Cerinic, Gabriele Valentini, Ori Barzilai, Ram Maya, and Yehuda Shoenfeld. 2009. "The Role of Infections in the Immunopathogenesis of Systemic Sclerosis-Evidence from Serological Studies." *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04808.x>.
- Ashley, Euan A. 2016. "Towards Precision Medicine." *Nature Reviews. Genetics* 17 (9): 507–22.
- Azimi, Taher, Mohammad Javad Nasiri, Alireza Salimi Chirani, Ramin Pouriran, and Hossein Dabiri. 2018. "The Role of Bacteria in the Inflammatory Bowel Disease Development: A Narrative Review." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 126 (4): 275–83.
- Baarsen, Lisa Gm van, Carla A. Wijbrandts, François Rustenburg, Tineke Cantaert, Tineke Ctm van der Pouw Kraan, Dominique L. Baeten, Ben Ac Dijkmans, Paul P. Tak, and Cornelis L. Verweij. 2010. "Regulation of IFN Response Gene Activity during Infliximab Treatment in Rheumatoid Arthritis Is Associated with Clinical Response to Treatment." *Arthritis Research & Therapy* 12 (1): R11.
- Baechler, Emily C., Jason W. Bauer, Catherine A. Slattery, Ward A. Ortmann, Karl J. Espe, Jill Novitzke, Steven R. Ytterberg, Peter K. Gregersen, Timothy W. Behrens, and Ann M. Reed. 2007. "An Interferon Signature in the Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients Is Associated with Disease Activity." *Molecular Medicine* 13 (1-2): 59–68.
- Banchereau, Jacques, and Virginia Pascual. 2006. "Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus

- and Other Autoimmune Diseases." *Immunity* 25 (3): 383–92.
- Banchereau, Romain, Seunghee Hong, Brandi Cantarel, Nicole Baldwin, Jeanine Baisch, Michelle Edens, Alma-Martina Cepika, et al. 2016. "Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks That Stratify Lupus Patients." *Cell* 165 (6): 1548–50.
- Banica, Leontina, Alina Besliu, Gina Pistol, Crina Stavaru, Ruxandra Ionescu, Ana-Maria Forsea, Cristina Tanaseanu, et al. 2009. "Quantification and Molecular Characterization of Regulatory T Cells in Connective Tissue Diseases." *Autoimmunity* 42 (1): 41–49.
- Baráth, S., P. Soltész, E. Kiss, M. Aleksza, M. Zeher, G. Szegedi, and S. Sipka. 2007. "The Severity of Systemic Lupus Erythematosus Negatively Correlates with the Increasing Number of CD4+CD25(high)FoxP3+ Regulatory T Cells during Repeated Plasmapheresis Treatments of Patients." *Autoimmunity* 40 (7): 521–28.
- Barennes, Pierre, Valentin Quiniou, Mikhail Shugay, Evgeniy S. Egorov, Alexey N. Davydov, Dmitriy M. Chudakov, Imran Uddin, et al. 2020. "Benchmarking of T Cell Receptor Repertoire Profiling Methods Reveals Large Systematic Biases." *Nature Biotechnology*, September. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0656-3>.
- Barton, Anne, and Costantino Pitzalis. 2017. "Stratified Medicine in Rheumatoid Arthritis—the MATURA Programme." Oxford University Press. <https://academic.oup.com/rheumatology/article-pdf/doi/10.1093/rheumatology/kew369/24245805/kew369.pdf>.
- Barzilai, O., Y. Sherer, M. Ram, D. Izhaky, J. M. Anaya, and Y. Shoenfeld. 2007. "Epstein Barr Virus and Cytomegalovirus in Autoimmune Diseases: Are They Truly Notorious? A Preliminary Report." *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1422.059>.
- Bashford-Rogers, R. J. M., L. Bergamaschi, E. F. McKinney, D. C. Pombal, F. Mescia, J. C. Lee, D. C. Thomas, et al. 2019. "Analysis of the B Cell Receptor Repertoire in Six Immune-Mediated Diseases." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1595-3>.
- Battaglia, Manuela, and Maria-Grazia Roncarolo. 2011. "Immune Intervention with T Regulatory Cells: Past Lessons and Future Perspectives for Type 1 Diabetes." *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.07.007>.
- Bauer, Jason W., Michelle Petri, Franak M. Batliwalla, Thearith Koeuth, Joseph Wilson, Catherine Slattery, Angela Panoskaltis-Mortari, Peter K. Gregersen, Timothy W. Behrens, and Emily C. Baechler. 2009. "Interferon-Regulated Chemokines as Biomarkers of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity: A Validation Study." *Arthritis and Rheumatism* 60 (10): 3098–3107.
- Bennett, G. A., S. Cobb, R. Jacox, R. A. Jessar, and M. W. Ropes. 1956. "Proposed Diagnostic Criteria for Rheumatoid Arthritis." *Bulletin on the Rheumatic Diseases* 7 (4): 121–24.
- Bergallo, Massimiliano, Valentina Daprà, Renata Ponti, Pietro Quaglino, Mauro Novelli, Paolo Fava, Paola Montanari, Cristina Calvi, Ilaria Galliano, and Mariateresa Fierro. 2018. "HERV-E Expression in Peripheral Mononuclear Cells of Patient with Psoriasis." *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia: Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia E Sifilografia*, September. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.18.06133-3>.
- Bergot, Anne-Sophie, Wahiba Chaara, Eliana Ruggiero, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Sophie Dulauroy, Manfred Schmidt, Christof von Kalle, Adrien Six, and David Klatzmann. 2015. "TCR Sequences and Tissue Distribution Discriminate the Subsets of Naïve and Activated/memory Treg Cells in Mice." *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.201445269>.
- "Biological Activity and Safety of Low Dose IL2 in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov." n.d. Accessed November 27, 2020. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02424396?term=low+dose+IL+2&draw=2&rank=6>.
- Bluestone, Jeffrey A., Kevan Herold, and George Eisenbarth. 2010. "Genetics, Pathogenesis and Clinical Interventions in Type 1 Diabetes." *Nature* 464 (7293): 1293–1300.
- Boers, Maarten, John R. Kirwan, George Wells, Dorcas Beaton, Laure Gossec, Maria-Antonietta d'Agostino, Philip G. Conaghan, et al. 2014. "Developing Core Outcome Measurement Sets for Clinical Trials: OMERACT Filter 2.0." *Journal of Clinical Epidemiology*.

- <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2013.11.013>.
- Bos, C. L., L. G. M. van Baarsen, T. C. G. Timmer, M. J. Overbeek, N. M. Basoski, F. Rustenburg, J. M. C. Baggen, et al. 2009. "Molecular Subtypes of Systemic Sclerosis in Association with Anti-Centromere Antibodies and Digital Ulcers." *Genes and Immunity* 10 (3): 210–18.
- Boyman, Onur, and Jonathan Sprent. 2012. "The Role of Interleukin-2 during Homeostasis and Activation of the Immune System." *Nature Reviews. Immunology* 12 (3): 180–90.
- Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. Schatz, and M. A. Atkinson. 2005. "Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4 CD25 T-Cells in Type 1 Diabetes." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1407>.
- Brusko, Todd M., Amy L. Putnam, and Jeffrey A. Bluestone. 2008a. "Human Regulatory T Cells: Role in Autoimmune Disease and Therapeutic Opportunities." *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2008.00637.x>.
- . 2008b. "Human Regulatory T Cells: Role in Autoimmune Disease and Therapeutic Opportunities." *Immunological Reviews* 223 (June): 371–90.
- Brusko, Todd M., Clive H. Wasserfall, Michael J. Clare-Salzler, Desmond A. Schatz, and Mark A. Atkinson. 2005. "Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4+ CD25+ T-Cells in Type 1 Diabetes." *Diabetes* 54 (5): 1407–14.
- Burczynski, Michael E., Ron L. Peterson, Natalie C. Twine, Krystyna A. Zuberek, Brendan J. Brodeur, Lori Casciotti, Vasu Maganti, et al. 2006. "Molecular Classification of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Patients Using Transcriptional Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells." *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 8 (1): 51–61.
- Camara-Lemarroy, Carlos R., Luanne Metz, Jonathan B. Meddings, Keith A. Sharkey, and V. Wee Yong. 2018. "The Intestinal Barrier in Multiple Sclerosis: Implications for Pathophysiology and Therapeutics." *Brain: A Journal of Neurology* 141 (7): 1900–1916.
- Canuel, V., B. Rance, P. Avillach, P. Degoulet, and A. Burgun. 2015. "Translational Research Platforms Integrating Clinical and Omics Data: A Review of Publicly Available Solutions." *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu006>.
- Castela, Emeline, Florence Le Duff, Catherine Butori, Michel Tichioni, Paul Hofman, Philippe Bahadoran, Jean-Philippe Lacour, and Thierry Passeron. 2014. "Effects of Low-Dose Recombinant Interleukin 2 to Promote T-Regulatory Cells in Alopecia Areata." *JAMA Dermatology* 150 (7): 748–51.
- Chang, Alfred E., and Steven A. Rosenberg. 1989. "Overview of Interleukin-2 as an Immunotherapeutic Agent." In *Seminars in Surgical Oncology*, 5:385–90. Wiley Online Library.
- Chara, Luis, Ana Sánchez-Atrio, Ana Pérez, Eduardo Cuende, Fernando Albarrán, Ana Turrión, Julio Chevarria, et al. 2015. "The Number of Circulating Monocytes as Biomarkers of the Clinical Response to Methotrexate in Untreated Patients with Rheumatoid Arthritis." *Journal of Translational Medicine* 13 (January): 2.
- Chassagne, P., O. Mejjad, O. Gourmelen, N. Moore, X. Le Loet, and P. Deshayes. 1993. "Exacerbation of Systemic Lupus Erythematosus during Human Parvovirus B19 Infection." *British Journal of Rheumatology* 32 (2): 158–59.
- Chaussabel, Damien, Charles Quinn, Jing Shen, Pinakeen Patel, Casey Glaser, Nicole Baldwin, Dorothee Stichweh, et al. 2008. "A Modular Analysis Framework for Blood Genomics Studies: Application to Systemic Lupus Erythematosus." *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.012>.
- Chen, Jing, Huidi Zhang, Peirong Chen, Qiaoi Lin, Xiaochun Zhu, Lifang Zhang, and Xiangyang Xue. 2015. "Correlation between Systemic Lupus Erythematosus and Cytomegalovirus Infection Detected by Different Methods." *Clinical Rheumatology* 34 (4): 691–98.
- Chevrel, G., A. Calvet, V. Belin, and P. Miossec. 2000. "Dermatomyositis Associated with the Presence of Parvovirus B19 DNA in Muscle." *Rheumatology* 39 (9): 1037–39.
- Chiche, Laurent, Noémie Jourde-Chiche, Elizabeth Whalen, Scott Presnell, Vivian Gersuk, Kristen Dang, Esperanza Anguiano, et al. 2014. "Modular Transcriptional Repertoire Analyses of Adults with Systemic Lupus Erythematosus Reveal Distinct Type I and Type II Interferon Signatures."

- Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (6): 1583–95.
- Chiche, L., G. Penaranda, P. Savori, N. Jourde-Chiche, P. Halfon, and C. Camus. 2016. “THU0250 Dysregulation of Autophagy in Systemic Lupus Erythematosus Is Correlated To Transcriptional Interferon Signatures and Provides Candidate Biomarkers.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 75 (Suppl 2): 278–278.
- Christ, Anette, Mario Lauterbach, and Eicke Latz. 2019. “Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection.” *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>.
- Chung, Yeonseok, Shinya Tanaka, Fuliang Chu, Roza I. Nurieva, Gustavo J. Martinez, Seema Rawal, Yi-Hong Wang, et al. 2011. “Follicular Regulatory T Cells Expressing Foxp3 and Bcl-6 Suppress Germinal Center Reactions.” *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2426>.
- Churlaud, Guillaume, Chadi Abbara, Pierre-Axel Vinot, Gwladys Fourcade, Paul-Gydeon Ritvo, Roberta Lorenzon, Michelle Rosenzweig, Bertrand Diquet, and David Klatzmann. 2018. “Pharmacodynamics of Regulatory T Cells in Mice and Humans Treated with Low-Dose IL-2.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.006>.
- Concannon, Patrick, Stephen S. Rich, and Gerald T. Nepom. 2009. “Genetics of Type 1A Diabetes.” *The New England Journal of Medicine* 360 (16): 1646–54.
- Cooper, J. D., and the Type 1 Diabetes Genetics Consortium, N. M. Walker, B. C. Healy, D. J. Smyth, K. Downes, and J. A. Todd. 2009. “Analysis of 55 Autoimmune Disease and Type II Diabetes Loci: Further Confirmation of Chromosomes 4q27, 12q13.2 and 12q24.13 as Type I Diabetes Loci, and Support for a New Locus, 12q13.3–q14.1.” *Genes & Immunity*. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.98>.
- Cordiali-Fei, Paola, Anna Mussi, Giovanna D’Agosto, Elisabetta Trento, Valentina Bordignon, Silvana Trincone, Antonella Vento, Isabella Sperduti, Antonio Cristaudo, and Fabrizio Ensoli. 2013. “Assessment of T Regulatory Cells and Expanded Profiling of Autoantibodies May Offer Novel Biomarkers for the Clinical Management of Systemic Sclerosis and Undifferentiated Connective Tissue Disease.” *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2013/390563>.
- Costello, Christine M., Nancy Mah, Robert Häsler, Philip Rosenstiel, Georg H. Waetzig, Andreas Hahn, Tim Lu, et al. 2005. “Dissection of the Inflammatory Bowel Disease Transcriptome Using Genome-Wide cDNA Microarrays.” *PLoS Medicine* 2 (8): e199.
- Cotsapas, Chris, Benjamin F. Voight, Elizabeth Rossin, Kasper Lage, Benjamin M. Neale, Chris Wallace, Gonçalo R. Abecasis, et al. 2011. “Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease.” *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002254>.
- Crispin, Jose C., Araceli Martínez, and Jorge Alcocer-Varela. 2003. “Quantification of Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.” *Journal of Autoimmunity* 21 (3): 273–76.
- Crispín, José C., and George C. Tsokos. 2009. “Transcriptional Regulation of IL-2 in Health and Autoimmunity.” *Autoimmunity Reviews* 8 (3): 190–95.
- Crowson, A. Neil, A. Neil Crowson, Cynthia M. Magro, and Magdy R. Dawood. 2000. “A Causal Role for Parvovirus B19 Infection in Adult Dermatomyositis and Other Autoimmune Syndromes.” *Journal of Cutaneous Pathology*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2000.027010505.x>.
- Daien, Claire I., Sarah Gailhac, Thibault Mura, Bernard Combe, Michael Hahne, and Jacques Morel. 2014. “High Levels of Memory B Cells Are Associated with Response to a First Tumor Necrosis Factor Inhibitor in Patients with Rheumatoid Arthritis in a Longitudinal Prospective Study.” *Arthritis Research & Therapy* 16 (2): R95.
- Deane, Kevin D., Colin I. O’Donnell, Wolfgang Hueber, Darcy S. Majka, Ann A. Lazar, Lezlie A. Derber, William R. Gilliland, et al. 2010. “The Number of Elevated Cytokines and Chemokines in Preclinical Seropositive Rheumatoid Arthritis Predicts Time to Diagnosis in an Age-Dependent Manner.” *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.27638>.
- Delgado-Vega, Angélica, Elena Sánchez, Sara Löfgren, Casimiro Castillejo-López, and Marta E. Alarcón-Riquelme. 2010. “Recent Findings on Genetics of Systemic Autoimmune Diseases.” *Current Opinion in Immunology* 22 (6): 698–705.
- Dendrou, Calliope A., Vincent Plagnol, Erik Fung, Jennie H. M. Yang, Kate Downes, Jason D. Cooper,

- Sarah Nutland, et al. 2009. "Cell-Specific Protein Phenotypes for the Autoimmune Locus IL2RA Using a Genotype-Selectable Human Bioresource." *Nature Genetics* 41 (9): 1011–15.
- Deng, Yun, and Betty P. Tsao. 2010. "Genetic Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in the Genomic Era." *Nature Reviews Rheumatology*. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.176>.
- . 2014. "Advances in Lupus Genetics and Epigenetics." *Current Opinion in Rheumatology* 26 (5): 482–92.
- Dennis, Glynn, Jr, Cécile T. J. Holweg, Sarah K. Kummerfeld, David F. Choy, A. Francesca Setiadi, Jason A. Hackney, Peter M. Haverty, et al. 2014. "Synovial Phenotypes in Rheumatoid Arthritis Correlate with Response to Biologic Therapeutics." *Arthritis Research & Therapy* 16 (2): R90.
- "DIAGNOSTIC Criteria for Rheumatoid Arthritis: 1958 Revision by a Committee of the American Rheumatism Association." 1959. *Annals of the Rheumatic Diseases* 18 (1): 49–51; French transl 51–52; Spanish transl 52–53.
- Diaz-Torne, Cesar, Maria Dels Angels Ortiz, Patricia Moya, Maria Victoria Hernandez, Delia Reina, Ivan Castellvi, Juan Jose De Agustin, et al. 2018. "The Combination of IL-6 and Its Soluble Receptor Is Associated with the Response of Rheumatoid Arthritis Patients to Tocilizumab." *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.10.022>.
- Dinesh, Ravi K., Brian J. Skaggs, Antonio La Cava, Bevera H. Hahn, and Ram Pyare Singh. 2010. "CD8+ Tregs in Lupus, Autoimmunity, and beyond." *Autoimmunity Reviews* 9 (8): 560–68.
- Doorenspleet, M. E., P. L. Klarenbeek, M. J. H. de Hair, B. D. C. van Schaik, R. E. E. Esveltd, A. H. C. van Kampen, D. M. Gerlag, et al. 2014. "Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue Harbours Dominant B-Cell and Plasma-Cell Clones Associated with Autoreactivity." *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (4): 756–62.
- Dorsch, Simone, Gerhard Liebisch, Bärbel Kaufmann, Philipp von Landenberg, Jörg H. Hoffmann, Wolfgang Drobnik, and Susanne Modrow. 2002. "The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and Its Constituent Phospholipase A2-like Activity." *Journal of Virology* 76 (4): 2014–18.
- Dozmorov, Mikhail G., Jonathan D. Wren, and Marta E. Alarcón-Riquelme. 2014. "Epigenomic Elements Enriched in the Promoters of Autoimmunity Susceptibility Genes." *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 9 (2): 276–85.
- Eastaff-Leung, Nicola, Nicholas Mabarrack, Angela Barbour, Adrian Cummins, and Simon Barry. 2010. "Foxp3+ Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells, and Cytokine Environment in Inflammatory Bowel Disease." *Journal of Clinical Immunology* 30 (1): 80–89.
- Ehrlich, Paul. 1906. *Collected Studies on Immunity*. J. Wiley & sons.
- Elkon, Keith B., and Vivian V. Stone. 2011. "Type I Interferon and Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31 (11): 803–12.
- Emami-Shahri, N., and T. Hagemann. 2012. "Resistance--the True Face of Biological Defiance." *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker326>.
- Esen, Bahar Artım, Gülden Yılmaz, Sami Uzun, Melda Özdamar, Alper Aksözek, Sevil Kamalı, Salih Türkoğlu, et al. 2012. "Serologic Response to Epstein-Barr Virus Antigens in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Controlled Study." *Rheumatology International*. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1573-4>.
- Feltkamp, T. E. W. 1990. "HLA and Uveitis." *International Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1007/bf00163552>.
- Fenoglio, Daniela, Florinda Battaglia, Alessia Parodi, Silvia Stringara, Simone Negrini, Nicoletta Panico, Marta Rizzi, et al. 2011. "Alteration of Th17 and Treg Cell Subpopulations Co-Exist in Patients Affected with Systemic Sclerosis." *Clinical Immunology* 139 (3): 249–57.
- Ferraro, Alessandra, Carlo Socci, Angela Stabilini, Andrea Valle, Paolo Monti, Lorenzo Piemonti, Rita Nano, et al. 2011. "Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db11-0090>.
- Ferreira, Ricardo C., Hui Guo, Richard M. R. Coulson, Deborah J. Smyth, Marcin L. Pekalski, Oliver S. Burren, Antony J. Cutler, et al. 2014. "A Type I Interferon Transcriptional Signature Precedes

- Autoimmunity in Children Genetically at Risk for Type 1 Diabetes." *Diabetes* 63 (7): 2538–50.
- Ferri, Clodoveo, Dilia Giuggioli, Marco Sebastiani, Susi Panfilo, Giovanni Abatangelo, Krystyna Zakrzewska, and Alberta Azzi. 2002. "Parvovirus B19 Infection of Cultured Skin Fibroblasts from Systemic Sclerosis Patients: Comment on the Article by Ray et Al." *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.10346>.
- Filaci, Gilberto, Sabrina Bacilieri, Marco Fravega, Monia Monetti, Paola Contini, Massimo Ghio, Maurizio Setti, Francesco Puppo, and Francesco Indiveri. 2001. "Impairment of CD8 T Suppressor Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6452>.
- Folkersen, Lasse, Boel Brynedal, Lina Marcela Diaz-Gallo, Daniel Ramsköld, Klementy Shchetynsky, Helga Westerlind, Yvonne Sundström, et al. 2016. "Integration of Known DNA, RNA and Protein Biomarkers Provides Prediction of Anti-TNF Response in Rheumatoid Arthritis: Results from the COMBINE Study." *Molecular Medicine* 22 (September): 322–28.
- Fontana, L., M. J. Marion, and P. Catilina. 2004. "Persistent Raynaud's Phenomenon after Exposure to Vinyl Chloride Monomer: Assessment of Endothelial Damage." *Clinical and Experimental Rheumatology* 22 (1): 132–33.
- Franklin, Joshua D., Alicia Guidry, and James F. Brinkley. 2011. "A Partnership Approach for Electronic Data Capture in Small-Scale Clinical Trials." *Journal of Biomedical Informatics*. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.008>.
- Furie, Richard A., Eric F. Morand, Ian N. Bruce, Susan Manzi, Kenneth C. Kalunian, Edward M. Vital, Theresa Lawrence Ford, et al. 2019. "Type I Interferon Inhibitor Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus (TULIP-1): A Randomised, Controlled, Phase 3 Trial." *The Lancet Rheumatology* 1 (4): e208–19.
- Furie, Richard, Munther Khamashta, Joan T. Merrill, Victoria P. Werth, Kenneth Kalunian, Philip Brohawn, Gabor G. Illei, et al. 2017. "Anifrolumab, an Anti-Interferon- $\alpha$  Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus." *Arthritis & Rheumatology*. <https://doi.org/10.1002/art.39962>.
- Gazeau, Pierre, Guillermo Carvajal Alegria, Valérie Devauchelle-Pensec, Christophe Jamin, Julie Lemerle, Boutahar Bendaoud, Wesley H. Brooks, Alain Saraux, Divi Cornec, and Yves Renaudineau. 2017. "Memory B Cells and Response to Abatacept in Rheumatoid Arthritis." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 53 (2): 166–76.
- Geri, Guillaume, Benjamin Terrier, Michelle Rosenzweig, Bertrand Wechsler, Maxime Touzot, Danielle Seilhean, Tu-Anh Tran, et al. 2011. "Critical Role of IL-21 in Modulating TH17 and Regulatory T Cells in Behçet Disease." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (3): 655–64.
- Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G. de Thé. 1985. "Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Type-I in Patients with Tropical Spastic Paraparesis." *The Lancet* 2 (8452): 407–10.
- Giedlin, M. A., and R. J. Zimmerman. 1993. "The Use of Recombinant Human Interleukin-2 in Treating Infectious Diseases." *Current Opinion in Biotechnology* 4 (6): 722–26.
- Gillis, S., and K. A. Smith. 1977. "Long Term Culture of Tumour-Specific Cytotoxic T Cells." *Nature* 268 (5616): 154–56.
- Goldstein, David B. 2009. "Common Genetic Variation and Human Traits." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmp0806284>.
- Graham, Robert R., Ward Ortmann, Peter Rodine, Karl Espe, Carl Langefeld, Ethan Lange, Adrienne Williams, et al. 2007. "Specific Combinations of HLA-DR2 and DR3 Class II Haplotypes Contribute Graded Risk for Disease Susceptibility and Autoantibodies in Human SLE." *European Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201827>.
- Grammer, A. C., M. M. Ryals, S. E. Heuer, R. D. Robl, S. Madamanchi, L. S. Davis, B. Lauwerys, M. D. Catalina, and P. E. Lipsky. 2016. "Drug Repositioning in SLE: Crowd-Sourcing, Literature-Mining and Big Data Analysis." *Lupus* 25 (10): 1150–70.
- Greenberg, Steven A. 2007. "A Gene Expression Approach to Study Perturbed Pathways in Myositis."

- Current Opinion in Rheumatology* 19 (6): 536–41.
- Grinberg-Bleyer, Yenkel, Audrey Baeyens, Sylvaine You, Rima Elhage, Gwladys Fourcade, Sylvie Gregoire, Nicolas Cagnard, et al. 2010. "IL-2 Reverses Established Type 1 Diabetes in NOD Mice by a Local Effect on Pancreatic Regulatory T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (9): 1871–78.
- Günther, Oliver P., Heesun Shin, Raymond T. Ng, W. Robert McMaster, Bruce M. McManus, Paul A. Keown, Scott J. Tebbutt, and Kim-Anh Lê Cao. 2014. "Novel Multivariate Methods for Integration of Genomics and Proteomics Data: Applications in a Kidney Transplant Rejection Study." *OmicS: A Journal of Integrative Biology* 18 (11): 682–95.
- Haas, Jürgen, Andreas Hug, Andrea Viehöver, Benedikt Fritzsching, Christine S. Falk, Andrea Filser, Tina Vetter, et al. 2005. "Reduced Suppressive Effect of CD4 CD25high Regulatory T Cells on the T Cell Immune Response against Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Patients with Multiple Sclerosis." *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.200526065>.
- Han, Hui, Yuying Li, Jun Fang, Gang Liu, Jie Yin, Tiejun Li, and Yulong Yin. 2018. "Gut Microbiota and Type 1 Diabetes." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040995>.
- Hartemann, Agnès, Gilbert Bensimon, Christine A. Payan, Sophie Jacqueminet, Olivier Bourron, Nathalie Nicolas, Michèle Fonfrede, Michelle Rosenzweig, Claude Bernard, and David Klatzmann. 2013. "Low-Dose Interleukin 2 in Patients with Type 1 Diabetes: A Phase 1/2 Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 1 (4): 295–305.
- He, Jing, Ruijun Zhang, Miao Shao, Xiaozhen Zhao, Miao Miao, Jiali Chen, Jiajia Liu, et al. 2020. "Efficacy and Safety of Low-Dose IL-2 in the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Annals of the Rheumatic Diseases* 79 (1): 141–49.
- He, Ye, and Amr H. Sawalha. 2018. "Drug-Induced Lupus Erythematosus: An Update on Drugs and Mechanisms." *Current Opinion in Rheumatology* 30 (5): 490–97.
- H., Hyöty, and Taylor K. 2002. "The Role of Viruses in Human Diabetes." *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0852-3>.
- Himmel, Megan E., Gijs Hardenberg, Ciriaco A. Piccirillo, Theodore S. Steiner, and Megan K. Levings. 2008. "The Role of T-Regulatory Cells and Toll-like Receptors in the Pathogenesis of Human Inflammatory Bowel Disease." *Immunology* 125 (2): 145–53.
- Hordinsky, Maria, and Daniel H. Kaplan. 2014. "Low-Dose Interleukin 2 to Reverse Alopecia Areata." *JAMA Dermatology*. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.510>.
- Horwitz, Marc S., Alex Ilic, Cody Fine, Balaji Balasa, and Nora Sarvetnick. 2004. "Coxsackieviral-Mediated Diabetes: Induction Requires Antigen-Presenting Cells and Is Accompanied by Phagocytosis of Beta Cells." *Clinical Immunology* 110 (2): 134–44.
- Horwitz, Marc S., Alex Ilic, Cody Fine, Enrique Rodriguez, and Nora Sarvetnick. 2002. "Presented Antigen from Damaged Pancreatic  $\beta$  Cells Activates Autoreactive T Cells in Virus-Mediated Autoimmune Diabetes." *The Journal of Clinical Investigation* 109 (1): 79–87.
- Hugot, Jean-Pierre, Mathias Chamaillard, Habib Zouali, Suzanne Lesage, Jean-Pierre Cézard, Jacques Belaiche, Sven Almer, et al. 2001. "Association of NOD2 Leucine-Rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35079107>.
- Humrich, Jens Y., Caroline von Spee-Mayer, Elise Siegert, Martina Bertolo, Dimas Abdirama, Angelika Rose, Philipp Enghard, et al. 2017. "06.08 Low-Dose IL-2 Therapy in Refractory SLE: Results from a Single Centre Phase I/IIa Clinical Trial." *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (Suppl 1): A62–63.
- Humrich, Jens Y., Caroline von Spee-Mayer, Elise Siegert, Martina Bertolo, Angelika Rose, Dimas Abdirama, Philipp Enghard, et al. 2019. "Low-Dose Interleukin-2 Therapy in Refractory Systemic Lupus Erythematosus: An Investigator-Initiated, Single-Centre Phase 1 and 2a Clinical Trial." *The Lancet Rheumatology* 1 (1): e44–54.
- Humrich, J. Y., C. von Spee-Mayer, E. Siegert, M. Bertolo, D. Abdirama, A. Rose, P. Enghard, A. Radbruch, G. R. Burmester, and G. Riemekasten. 2016. "A7.06 Low-Dose IL-2 Therapy in

- Refractory SLE: Insights from a Phase I/IIA Clinical Trial." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209124.137>.
- Hussein, Hadi M., and Elias A. Rahal. 2019. "The Role of Viral Infections in the Development of Autoimmune Diseases." *Critical Reviews in Microbiology* 45 (4): 394–412.
- "ICHOM." n.d. Accessed November 27, 2020a. <https://www.ichom.org/>.
- . n.d. Accessed November 27, 2020b. <https://www.ichom.org/>.
- Ilowite, Norman T., Kristi Prather, Yuliya Lokhnygina, Laura E. Schanberg, Melissa Elder, Diana Milojevic, James W. Verbsky, et al. 2014. "Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Efficacy and Safety of Riloncept in the Treatment of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (9): 2570–79.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, David A. Hafler, Alastair Compston, Stephen Sawcer, Eric S. Lander, Mark J. Daly, Philip L. De Jager, et al. 2007. "Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study." *The New England Journal of Medicine* 357 (9): 851–62.
- Iorio, Francesco, Timothy Rittman, Hong Ge, Michael Menden, and Julio Saez-Rodriguez. 2013. "Transcriptional Data: A New Gateway to Drug Repositioning?" *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.07.014>.
- Irigoyen, Antonio, Cristina Jimenez-Luna, Manuel Benavides, Octavio Caba, Javier Gallego, Francisco Manuel Ortuño, Carmen Guillen-Ponce, et al. 2018. "Integrative Multi-Platform Meta-Analysis of Gene Expression Profiles in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients for Identifying Novel Diagnostic Biomarkers." *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194844>.
- Ito, Sawa, Catherine M. Bollard, Mattias Carlsten, Jan Joseph Melenhorst, Angélique Biancotto, Ena Wang, Jinguo Chen, et al. 2014. "Ultra-Low Dose Interleukin-2 Promotes Immune-Modulating Function of Regulatory T Cells and Natural Killer Cells in Healthy Volunteers." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (7): 1388–95.
- James, J. A., K. M. Kaufman, A. D. Farris, E. Taylor-Albert, T. J. Lehman, and J. B. Harley. 1997. "An Increased Prevalence of Epstein-Barr Virus Infection in Young Patients Suggests a Possible Etiology for Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci119856>.
- James, Judith A., Barbara R. Neas, Kathy L. Moser, Teresa Hall, Gail R. Bruner, Andrea L. Sestak, and John B. Harley. 2001. "Systemic Lupus Erythematosus in Adults Is Associated with Previous Epstein-Barr Virus Exposure." *Arthritis & Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200105\)44:5<1122::aid-anr193>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200105)44:5<1122::aid-anr193>3.0.co;2-d).
- Jin, Yulan, Ashok Sharma, Shan Bai, Colleen Davis, Haitao Liu, Diane Hopkins, Kathy Barriga, Marian Rewers, and Jin-Xiong She. 2014. "Risk of Type 1 Diabetes Progression in Islet Autoantibody-Positive Children Can Be Further Stratified Using Expression Patterns of Multiple Genes Implicated in Peripheral Blood Lymphocyte Activation and Function." *Diabetes* 63 (7): 2506–15.
- Kagnoff, Martin F. 2007. "Celiac Disease: Pathogenesis of a Model Immunogenetic Disease." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci30253>.
- Kallionpää, H., L. L. Elo, E. Laajala, J. Mykkanen, I. Ricano-Ponce, M. Vaarma, T. D. Laajala, et al. 2014. "Innate Immune Activity Is Detected Prior to Seroconversion in Children With HLA-Conferred Type 1 Diabetes Susceptibility." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db13-1775>.
- Kalunian, Kenneth C., Joan T. Merrill, Romeo Maciuga, Jacqueline M. McBride, Michael J. Townsend, Xiaohui Wei, John C. Davis Jr, and William P. Kennedy. 2016. "A Phase II Study of the Efficacy and Safety of Rontalizumab (rhuMAb Interferon- $\alpha$ ) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (ROSE)." *Annals of the Rheumatic Diseases* 75 (1): 196–202.
- Kang, Insoo, Timothy Quan, Helena Nolasco, Sung-Hwan Park, Myung Sun Hong, Jill Crouch, Eric G. Pamer, John Greg Howe, and Joe Craft. 2004. "Defective Control of Latent Epstein-Barr Virus Infection in Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Immunology* 172 (2): 1287–94.
- Katsiari, Christina G., Vasileios C. Kyttaris, Yuang-Taung Juang, and George C. Tsokos. 2005. "Protein Phosphatase 2A Is a Negative Regulator of IL-2 Production in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11): 3193–3204.

- Kennedy-Nasser, A. A., S. Ku, P. Castillo-Caro, Y. Hazrat, M. -F. Wu, H. Liu, J. Melenhorst, et al. 2014. "Ultra Low-Dose IL-2 for GVHD Prophylaxis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Mediates Expansion of Regulatory T Cells without Diminishing Antiviral and Antileukemic Activity." *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-3205>.
- Kennedy, William P., Romeo Maciucă, Kristen Wolslegel, Wei Tew, Alexander R. Abbas, Christina Chaivorapol, Alyssa Morimoto, et al. 2015. "Association of the Interferon Signature Metric with Serological Disease Manifestations but Not Global Activity Scores in Multiple Cohorts of Patients with SLE." *Lupus Science & Medicine* 2 (1): e000080.
- Kerr, J. R., P. V. Coyle, R. J. DeLeys, and C. C. Patterson. 1996. "Follow-up Study of Clinical and Immunological Findings in Patients Presenting with Acute Parvovirus B19 Infection." *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/3.0.co;2-2>>10.1002/(sici)1096-9071(199601)48:1<68::aid-jmv11>3.0.co;2-2.
- Kim, Jeong M., Jeffrey P. Rasmussen, and Alexander Y. Rudensky. 2007. "Regulatory T Cells Prevent Catastrophic Autoimmunity throughout the Lifespan of Mice." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1428>.
- Kim, Rosa S., Nicolas Goossens, and Yujin Hoshida. 2016. "Use of Big Data in Drug Development for Precision Medicine." *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* 1 (3): 245–53.
- Kitas, G. D., M. Salmon, M. Farr, J. S. Gaston, and P. A. Bacon. 1988. "Deficient Interleukin 2 Production in Rheumatoid Arthritis: Association with Active Disease and Systemic Complications." *Clinical and Experimental Immunology* 73 (2): 242–49.
- Klatzmann, David, and Abul K. Abbas. 2015. "The Promise of Low-Dose Interleukin-2 Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases." *Nature Reviews. Immunology* 15 (5): 283–94.
- Koreth, John, Haesook T. Kim, Kyle T. Jones, Paulina B. Lange, Carol G. Reynolds, Marie J. Chammas, Katherine Dusenbury, et al. 2016. "Efficacy, Durability, and Response Predictors of Low-Dose Interleukin-2 Therapy for Chronic Graft-versus-Host Disease." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-702852>.
- Koreth, John, Ken-Ichi Matsuoka, Haesook T. Kim, Sean M. McDonough, Bhavjot Bindra, Edwin P. Alyea 3rd, Philippe Armand, et al. 2011. "Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease." *The New England Journal of Medicine* 365 (22): 2055–66.
- Koreth, John, MBBS, Jerome Ritz MD, George C. Tsokos MD, Alberto Pugliese MD, Thomas R. Malek PhD, Michelle Rosenzweig PhD, and David Klatzmann PhD. 2014. "Low-Dose Interleukin-2 in the Treatment of Autoimmune Disease." *Oncology & Hematology Review* 10 (02): 157.
- Korman, B. D., M. I. Alba, J. M. Le, I. Alevizos, J. A. Smith, N. P. Nikolov, D. L. Kastner, E. F. Remmers, and G. G. Illei. 2008. "Variant Form of STAT4 Is Associated with Primary Sjögren's Syndrome." *Genes & Immunity* 9 (3): 267–70.
- Krishnankutty, Binny, Shantala Bellary, Naveen B. R. Kumar, and Latha S. Moodahadu. 2012. "Data Management in Clinical Research: An Overview." *Indian Journal of Pharmacology* 44 (2): 168–72.
- Krupińska, Janina, Marta Wawrzynowicz-Syczewska, Waldemar Urbanowicz, Jakub Pobłocki, and Anhelli Syrenicz. 2011. "The Influence of Interferon Alpha on the Induction of Autoimmune Thyroiditis in Patients Treated for Chronic Viral Hepatitis Type C." *Endokrynologia Polska* 62 (6): 517–22.
- Kuhn, Annegret, Jörg Wenzel, and Heiko Weyd. 2014. "Photosensitivity, Apoptosis, and Cytokines in the Pathogenesis of Lupus Erythematosus: A Critical Review." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 47 (2): 148–62.
- Laifenfeld, Daphna, David A. Drubin, Natalie L. Catlett, Jennifer S. Park, Aaron A. Van Hooser, Brian P. Frushour, David de Graaf, David A. Fryburg, and Renée Deehan. 2012. "Early Patient Stratification and Predictive Biomarkers in Drug Discovery and Development: A Case Study of Ulcerative Colitis Anti-TNF Therapy." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 736: 645–53.
- Larsen, Martin, Delphine Sauce, Claire Deback, Laurent Arnaud, Alexis Mathian, Makoto Miyara, David Boutolleau, et al. 2011. "Exhausted Cytotoxic Control of Epstein-Barr Virus in Human

- Lupus." *PLoS Pathogens* 7 (10): e1002328.
- Lee, H-Y, Y-K Hong, H-J Yun, Y-M Kim, J-R Kim, and W-H Yoo. 2008. "Altered Frequency and Migration Capacity of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Systemic Lupus Erythematosus." *Rheumatology* 47 (6): 789–94.
- Lee, James C., Paul A. Lyons, Eoin F. McKinney, John M. Sowerby, Edward J. Carr, Francesca Bredin, Hannah M. Rickman, et al. 2011. "Gene Expression Profiling of CD8+ T Cells Predicts Prognosis in Patients with Crohn Disease and Ulcerative Colitis." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (10): 4170–79.
- Lee, Jyh-Hong, Li-Chieh Wang, Yu-Tsan Lin, Yao-Hsu Yang, Dong-Tsamn Lin, and Bor-Luen Chiang. 2006. "Inverse Correlation between CD4+ Regulatory T-Cell Population and Autoantibody Levels in Paediatric Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Immunology* 117 (2): 280–86.
- Lemoine, François M., Mustapha Cherai, Camille Giverne, Dalia Dimitri, Michelle Rosenzweig, Helene Trebeden-Negre, Nathalie Chaput, et al. 2009. "Massive Expansion of Regulatory T-Cells Following Interleukin 2 Treatment during a Phase I-II Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Metastatic Renal Cancer." *International Journal of Oncology* 35 (3): 569–81.
- Lévy, Yves, Rodolphe Thiébaud, Marie-Lise Gougeon, Jean-Michel Molina, Laurence Weiss, Pierre-Marie Girard, Alain Venet, et al. 2012. "Effect of Intermittent Interleukin-2 Therapy on CD4+ T-Cell Counts Following Antiretroviral Cessation in Patients with HIV." *AIDS* 26 (6): 711–20.
- Lewkonja, R. M., D. Horne, and M. R. Dawood. 1995. "Juvenile Dermatomyositis in a Child Infected with Human Parvovirus B19." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 21 (2): 430–32.
- Liao, Wei, Jian-Xin Lin, and Warren J. Leonard. 2013. "Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy." *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>.
- Libbrecht, Maxwell W., and William Stafford Noble. 2015. "Machine Learning Applications in Genetics and Genomics." *Nature Reviews. Genetics* 16 (6): 321–32.
- Lieberman, Linda A., and George C. Tsokos. 2010. "The IL-2 Defect in Systemic Lupus Erythematosus Disease Has an Expansive Effect on Host Immunity." *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010 (June): 740619.
- Lindley, S., C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, and T. I. M. Tree. 2005. "Defective Suppressor Function in CD4 CD25 T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.92>.
- Linterman, Michelle A., Wim Pierson, Sau K. Lee, Axel Kallies, Shimpei Kawamoto, Tim F. Rayner, Monika Srivastava, et al. 2011. "Foxp3 Follicular Regulatory T Cells Control the Germinal Center Response." *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>.
- Liu, Ruolan, Qinghua Zhou, Antonio La Cava, Denise I. Campagnolo, Luc Van Kaer, and Fu-Dong Shi. 2010. "Expansion of Regulatory T Cells via IL-2/anti-IL-2 mAb Complexes Suppresses Experimental Myasthenia." *European Journal of Immunology* 40 (6): 1577–89.
- Li, Wenli, Chuiwen Deng, Hanbo Yang, and Guochun Wang. 2019. "The Regulatory T Cell in Active Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis." *Frontiers in Immunology* 10 (February): 159.
- Longhi, Maria Serena, Munther J. Hussain, Ragai R. Mitry, Sunil K. Arora, Giordina Mieli-Vergani, Diego Vergani, and Yun Ma. 2006. "Functional Study of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Health and Autoimmune Hepatitis." *Journal of Immunology* 176 (7): 4484–91.
- Longhi, Maria Serena, Yun Ma, Dimitrios P. Bogdanos, Paul Cheeseman, Giordina Mieli-Vergani, and Diego Vergani. 2004. "Impairment of CD4(+)CD25(+) Regulatory T-Cells in Autoimmune Liver Disease." *Journal of Hepatology* 41 (1): 31–37.
- Longhi, Maria Serena, Yun Ma, Ragai R. Mitry, Dimitrios P. Bogdanos, Michael Heneghan, Paul Cheeseman, Giordina Mieli-Vergani, and Diego Vergani. 2005. "Effect of CD4+ CD25+ Regulatory T-Cells on CD8 T-Cell Function in Patients with Autoimmune Hepatitis." *Journal of Autoimmunity* 25 (1): 63–71.
- "LOW DOSE IL-2 FOR THE TREATMENT OF CROHN'S DISEASE." n.d. Accessed November 27, 2020.

- <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04263831?term=low+dose+IL+2&draw=3&rank=19>
- “Low-Dose IL-2 Treatment on Behcet’s Disease.” n.d. Accessed November 27, 2020.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04065672?term=low+dose+IL+2&draw=2&rank=2>.
- “Low-Dose Interleukin-2 Treatment on Idiopathic Inflammatory Myopathy.” n.d. Accessed November 27, 2020.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04062019?term=low+dose+IL+2&draw=9&rank=80>
- “Low-Dose Recombinant Human IL-2 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis.” n.d. Accessed November 27, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02467504>.
- Maaten, Laurens van der. 2008. “Visualizing Data Using T-SNE.” *Journal of Machine Learning Research: JMLR* 9: 2579–2605.
- Maeda, Yuichi, and Kiyoshi Takeda. 2017. “Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis.” *Journal of Clinical Medicine Research* 6 (6). <https://doi.org/10.3390/jcm6060060>.
- Mariette, X., J. Gozlan, D. Clerc, M. Bisson, and F. Morinet. 1991. “Detection of Epstein-Barr Virus DNA by in Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction in Salivary Gland Biopsy Specimens from Patients with Sjögren’s Syndrome.” *The American Journal of Medicine* 90 (3): 286–94.
- Mathian, Alexis, Suzanne Mouries-Martin, Karim Dorgham, Hervé Devilliers, Hans Yssel, Laura Garrido Castillo, Fleur Cohen-Aubart, et al. 2019. “Ultrasensitive Serum Interferon- $\alpha$  Quantification during SLE Remission Identifies Patients at Risk for Relapse.” *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215571>.
- Matzinger, P. 1994. “Tolerance, Danger, and the Extended Family.” *Annual Review of Immunology* 12: 991–1045.
- Maynard, Craig L., Laurie E. Harrington, Karen M. Janowski, James R. Oliver, Carlene L. Zindl, Alexander Y. Rudensky, and Casey T. Weaver. 2007. “Regulatory T Cells Expressing Interleukin 10 Develop from Foxp3 and Foxp3– Precursor Cells in the Absence of Interleukin 10.” *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1504>.
- McDermott, M., M. Molloy, J. Buckley, and J. Grealley. 1989. “Antibodies to Epstein-Barr Viral Antigens in Familial Rheumatoid Arthritis.” *Irish Journal of Medical Science*. <https://doi.org/10.1007/bf02943612>.
- McGonagle, Dennis, and Michael F. McDermott. 2006. “A Proposed Classification of the Immunological Diseases.” *PLoS Medicine* 3 (8): e297.
- McKinney, Eoin F., James C. Lee, David R. W. Jayne, Paul A. Lyons, and Kenneth G. C. Smith. 2015. “T-Cell Exhaustion, Co-Stimulation and Clinical Outcome in Autoimmunity and Infection.” *Nature* 523 (7562): 612–16.
- McKinney, Eoin F., Paul A. Lyons, Edward J. Carr, Jane L. Hollis, David R. W. Jayne, Lisa C. Willcocks, Maria Koukoulaki, et al. 2010. “A CD8+ T Cell Transcription Signature Predicts Prognosis in Autoimmune Disease.” *Nature Medicine* 16 (5): 586–91, 1p following 591.
- “MedDRA |.” n.d. Accessed January 3, 2020. <https://www.meddra.org/>.
- Mellitus, The Expert Committee on The Diagnosis And Classification of Diabetes, and The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. “Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.” *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.7.1183>.
- Mellor-Pita, S., M. J. Citores, R. Castejon, P. Tutor-Ureta, M. Yebra-Bango, J. L. Andreu, and J. A. Vargas. 2006. “Decrease of Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (4): 553–54.
- Mesarovic, M. D., S. N. Sreenath, and J. D. Keene. 2004. “Search for Organising Principles: Understanding in Systems Biology.” *Systems Biology* 1 (1): 19–27.
- Mesarović, Mihajlo D. 1968. “Systems Theory and Biology—View of a Theoretician.” In *Systems Theory and Biology*, 59–87. Springer Berlin Heidelberg.
- Miao, Miao, Zhenye Hao, Yingying Guo, Xiaoying Zhang, Shengxiao Zhang, Jing Luo, Xiangcong Zhao, et al. 2018. “Short-Term and Low-Dose IL-2 Therapy Restores the Th17/Treg Balance in the

- Peripheral Blood of Patients with Primary Sjögren's Syndrome." *Annals of the Rheumatic Diseases* 77 (12): 1838–40.
- Miyara, Makoto, Guy Gorochov, Michael Ehrenstein, Lucile Musset, Shimon Sakaguchi, and Zahir Amoura. 2011. "Human FoxP3+ Regulatory T Cells in Systemic Autoimmune Diseases." *Autoimmunity Reviews* 10 (12): 744–55.
- Miyasaka, N., K. Yamaoka, M. Tateishi, K. Nishioka, and K. Yamamoto. 1989. "Possible Involvement of Epstein-Barr Virus (EBV) in Polyclonal B-Cell Activation in Sjögren's Syndrome." *Journal of Autoimmunity* 2 (4): 427–32.
- Mizui, M., T. Koga, L. A. Lieberman, and J. Beltran. 2014. "IL-2 Protects Lupus-Prone Mice from Multiple End-Organ Damage by Limiting CD4+ CD8+ IL-17-Producing T Cells." *The Journal of* <https://www.jimmunol.org/content/193/5/2168.short>.
- Moon, Myungjin, and Kenta Nakai. 2018. "Integrative Analysis of Gene Expression and DNA Methylation Using Unsupervised Feature Extraction for Detecting Candidate Cancer Biomarkers." *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. <https://doi.org/10.1142/s0219720018500063>.
- Moraes-Vasconcelos, D., B. T. Costa-Carvalho, T. R. Torgerson, and H. D. Ochs. 2008. "Primary Immune Deficiency Disorders Presenting as Autoimmune Diseases: IPEX and APECED." *Journal of Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9176-5>.
- Morand, Eric F., Richard Furie, Yoshiya Tanaka, Ian N. Bruce, Anca D. Askanase, Christophe Richez, Sang-Cheol Bae, et al. 2020. "Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1912196>.
- Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo. 1976. "Selective in Vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows." *Science* 193 (4257): 1007–8.
- Morgan, Matthew D., Clara J. Day, Karen P. Piper, Naeem Khan, Lorraine Harper, Paul A. Moss, and Caroline O. S. Savage. 2010. "Patients with Wegener's Granulomatosis Demonstrate a Relative Deficiency and Functional Impairment of T-Regulatory Cells." *Immunology* 130 (1): 64–73.
- Morran, Michael P., Andrew Vonberg, Anmar Khadra, and Massimo Pietropaolo. 2015. "Immunogenetics of Type 1 Diabetes Mellitus." *Molecular Aspects of Medicine* 42 (April): 42–60.
- Mousavi-Jazi, M., L. Boström, C. Lövmark, A. Linde, M. Brytting, and V. A. Sundqvist. 1998. "Infrequent Detection of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus DNA in Synovial Membrane of Patients with Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 25 (4): 623–28.
- Murai, C., Y. Munakata, Y. Takahashi, T. Ishii, S. Shibata, T. Muryoi, T. Funato, M. Nakamura, K. Sugamura, and T. Sasaki. 1999. "Rheumatoid Arthritis after Human Parvovirus B19 Infection." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.58.2.130>.
- Nanke, Yuki, Shigeru Kotake, Mari Goto, Hiroshi Ujihara, Masao Matsubara, and Naoyuki Kamatani. 2008. "Decreased Percentages of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Behcet's Disease before Ocular Attack: A Possible Predictive Marker of Ocular Attack." *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 18 (4): 354–58.
- Nazareth, Nair, Fernando Magro, Elisabete Machado, Teresa Gonçalves Ribeiro, António Martinho, Pedro Rodrigues, Rita Alves, et al. 2015. "Prevalence of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis and Escherichia Coli in Blood Samples from Patients with Inflammatory Bowel Disease." *Medical Microbiology and Immunology* 204 (6): 681–92.
- "NECESSITY." n.d. NECESSITY. Accessed January 3, 2020. <https://www.necessity-h2020.eu/>.
- Nehar-Belaid, Djamel, Tristan Courau, Nicolas Dérian, Laura Florez, Maria Grazia Ruocco, and David Klatzmann. 2016. "Regulatory T Cells Orchestrate Similar Immune Evasion of Fetuses and Tumors in Mice." *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501834>.
- Nielen, M. M. 2004. "Van SD, Reesink HW, van de Stadt RJ, van Der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et Al. Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors." *Arthritis and Rheumatism* 50 (2): 380–86.
- Niu, Qian, Bei Cai, Zhuo-Chun Huang, Yun-Ying Shi, and Lan-Lan Wang. 2012. "Disturbed Th17/Treg Balance in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Rheumatology International* 32 (9): 2731–36.
- Noack, Mélissa, and Pierre Miossec. 2014. "Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and

- Inflammatory Diseases." *Autoimmunity Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004>.
- Noda, Shinji, James G. Krueger, and Emma Guttman-Yassky. 2015. "The Translational Revolution and Use of Biologics in Patients with Inflammatory Skin Diseases." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (2): 324–36.
- Noort, J. M. van, J. J. Bajramovic, A. C. Plomp, and M. J. van Stipdonk. 2000. "Mistaken Self, a Novel Model That Links Microbial Infections with Myelin-Directed Autoimmunity in Multiple Sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* 105 (1): 46–57.
- Nordmark, G., G. Kristjansdottir, E. Theander, P. Eriksson, J. G. Brun, C. Wang, L. Padyukov, et al. 2009. "Additive Effects of the Major Risk Alleles of IRF5 and STAT4 in Primary Sjögren's Syndrome." *Genes and Immunity* 10 (1): 68–76.
- Novikoff, A. B. 1945. "THE CONCEPT OF INTEGRATIVE LEVELS AND BIOLOGY." *Science* 101 (2618): 209–15.
- Odhams, Christopher A., Amy L. Roberts, Susan K. Vester, Carolina S. T. Duarte, Charlie T. Beales, Alexander J. Clarke, Sonja Lindinger, et al. 2019. "Interferon Inducible X-Linked Gene CXorf21 May Contribute to Sexual Dimorphism in Systemic Lupus Erythematosus." *Nature Communications* 10 (1): 2164.
- Ogura, Yasunori, Denise K. Bonen, Naohiro Inohara, Dan L. Nicolae, Felicia F. Chen, Richard Ramos, Heidi Britton, et al. 2001. "A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35079114>.
- Ollier, W., and W. Thomson. 1992. "Population Genetics of Rheumatoid Arthritis." *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 18 (4): 741–59.
- Olnes, Matthew J., The CHI Consortium, Yuri Kotliarov, Angélique Biancotto, Foo Cheung, Jinguo Chen, Rongye Shi, et al. 2016. "Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immunome." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep23002>.
- Ortutay, Csaba, and Mauno Vihinen. 2006. "Immunome: A Reference Set of Genes and Proteins for Systems Biology of the Human Immune System." *Cellular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.01.012>.
- Papp, G., I. F. Horvath, S. Barath, E. Gyimesi, S. Sipka, P. Szodoray, and M. Zeher. 2011. "Altered T-Cell and Regulatory Cell Repertoire in Patients with Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 40 (3): 205–10.
- Pascual, Virginia, Florence Allantaz, Edsel Arce, Marilyn Punaro, and Jacques Banchereau. 2005. "Role of Interleukin-1 (IL-1) in the Pathogenesis of Systemic Onset Juvenile Idiopathic Arthritis and Clinical Response to IL-1 Blockade." *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20050473>.
- Pender, Michael P. 2003. "Infection of Autoreactive B Lymphocytes with EBV, Causing Chronic Autoimmune Diseases." *Trends in Immunology* 24 (11): 584–88.
- Pender, Michael P., and Scott R. Burrows. 2014. "Epstein–Barr Virus and Multiple Sclerosis: Potential Opportunities for Immunotherapy." *Clinical & Translational Immunology* 3 (10): e27.
- Pérez-De-Lis, Marta, Soledad Retamozo, Alejandra Flores-Chávez, Belchin Kostov, Roberto Perez-Alvarez, Pilar Brito-Zerón, and Manuel Ramos-Casals. 2017. "Autoimmune Diseases Induced by Biological Agents. A Review of 12,731 Cases (BIOGEAS Registry)." *Expert Opinion on Drug Safety* 16 (11): 1255–71.
- Perron, H., and J. M. Seigneurin. 1999. "Human Retroviral Sequences Associated with Extracellular Particles in Autoimmune Diseases: Epiphenomenon or Possible Role in Aetiopathogenesis?" *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1 (4): 309–22.
- Pham, Hang Phuong, Nicolas Dérian, Wahiba Chaara, Bertrand Bellier, David Klatzmann, and Adrien Six. 2014. "A Novel Strategy for Molecular Signature Discovery Based on Independent Component Analysis." *International Journal of Data Mining and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1504/ijdmb.2014.060052>.
- Pitoiset, Fabien, Lydie Cassard, Karim El Soufi, Lisa Boselli, Jonathan Grivel, Alexandra Roux, David Klatzmann, Nathalie Chaput, and Michelle Rosenzweig. 2018. "Deep Phenotyping of Immune Cell Populations by Optimized and Standardized Flow Cytometry Analyses." *Cytometry. Part A*:

- The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 93 (8): 793–802.
- Plessy, Charles, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Ri-Ichiroh Manabe, and Shohei Hori. n.d. “clonotypeR-- High Throughput Analysis of T Cell Antigen Receptor Sequences.” <https://doi.org/10.1101/028696>.
- Pociot, Flemming, and Åke Lernmark. 2016. “Genetic Risk Factors for Type 1 Diabetes.” *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30582-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30582-7).
- Poland, Gregory A., Helen Quill, and Alkis Togias. 2013. “Understanding the Human Immune System in the 21st Century: The Human Immunology Project Consortium.” *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.043>.
- Porras, David, Esther Nistal, Susana Martínez-Flórez, Javier González-Gallego, María Victoria García-Mediavilla, and Sonia Sánchez-Campos. 2018. “Intestinal Microbiota Modulation in Obesity-Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Frontiers in Physiology* 9 (December): 1813.
- Pradeu, Thomas, and Eric Vivier. 2016. “The Discontinuity Theory of Immunity.” *Science Immunology*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag0479>.
- “Precisesads, Investigating Systemic Autoimmune Diseases.” n.d. PRECISESADS. Accessed January 3, 2020. <http://www.precisesads.eu/>.
- “Publications.” n.d. Accessed December 4, 2020. <http://mixomics.org/a-propos/publications/>.
- Quartier, P., F. Allantaz, R. Cimaz, P. Pillet, C. Messiaen, C. Bardin, X. Bossuyt, et al. 2011. “A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial with the Interleukin-1 Receptor Antagonist Anakinra in Patients with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis (ANAJIS Trial).” *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.134254>.
- Radner, Helga, Katerina Chatzidionysiou, Elena Nikiphorou, Laure Gossec, Kimme L. Hyrich, Condruta Zabalan, Yvonne van Eijk-Hustings, et al. 2018. “2017 EULAR Recommendations for a Core Data Set to Support Observational Research and Clinical Care in Rheumatoid Arthritis.” *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212256>.
- Ramos-Casals, Manuel, Ricard Cervera, Mario García-Carrasco, Josep Vidal, Olga Trejo, Sonia Jiménez, Josep Costa, Josep Font, and Miguel Ingelmo. 2000. “Cytopenia and Past Human Parvovirus P19 Infection in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome.” *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 29 (6): 373–78.
- Raterman, Hennie G., Saskia Vosslamber, Sander de Ridder, Michael T. Nurmohamed, Willem F. Lems, Maarten Boers, Mark van de Wiel, Ben A. C. Dijkmans, Cornelis L. Verweij, and Alexandre E. Voskuyl. 2012. “The Interferon Type I Signature towards Prediction of Non-Response to Rituximab in Rheumatoid Arthritis Patients.” *Arthritis Research & Therapy* 14 (2): R95.
- Raza, Karim, Francesco Falciani, S. John Curnow, Emma J. Ross, Chi-Yeung Lee, Arne N. Akbar, Janet M. Lord, Caroline Gordon, Christopher D. Buckley, and Mike Salmon. 2005. “Early Rheumatoid Arthritis Is Characterized by a Distinct and Transient Synovial Fluid Cytokine Profile of T Cell and Stromal Cell Origin.” *Arthritis Research & Therapy*. <https://doi.org/10.1186/ar1733>.
- Redig, Amanda J., and Pasi A. Jänne. 2015. “Basket Trials and the Evolution of Clinical Trial Design in an Era of Genomic Medicine.” *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.59.8433>.
- Rioux, John D., and Abul K. Abbas. 2005. “Paths to Understanding the Genetic Basis of Autoimmune Disease.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03723>.
- Roda, Giulia, Bindia Jharap, Narula Neeraj, and Jean-Frederic Colombel. 2016. “Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management.” *Clinical and Translational Gastroenterology* 7 (January): e135.
- Rohart, Florian, Benoît Gautier, Amrit Singh, and Kim-Anh Lê Cao. n.d. “mixOmics: An R Package for ‘omics Feature Selection and Multiple Data Integration.” <https://doi.org/10.1101/108597>.
- Romanelli, Luiz Cláudio Ferreira, Paulo Caramelli, Anna Barbara, and Freitas Carneiro Proietti. 2010. “HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE-: WHEN TO SUSPECT INFECTION?” *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 56 (3): 340–47.
- Rosenberg, Steven A. 1994. “Treatment of 283 Consecutive Patients With Metastatic Melanoma or Renal Cell Cancer Using High-Dose Bolus Interleukin 2.” *JAMA: The Journal of the American*

- Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.1994.03510360033032>.
- Rosenzweig, Michelle, Guillaume Churlaud, Roberto Mallone, Adrien Six, Nicolas Dérian, Wahiba Chaara, Roberta Lorenzon, et al. 2015. "Low-Dose Interleukin-2 Fosters a Dose-Dependent Regulatory T Cell Tuned Milieu in T1D Patients." *Journal of Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.001>.
- Rosenzweig, Michelle, Randa Salet, Roberta Lorenzon, Nicolas Tchitchek, Alexandra Roux, Claude Bernard, Jean-Claude Carel, et al. 2020. "Low-Dose IL-2 in Children with Recently Diagnosed Type 1 Diabetes: A Phase I/II Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Finding Study." *Diabetologia* 63 (9): 1808–21.
- Rubbert-Roth, Andrea, and Axel Finckh. 2009. "Treatment Options in Patients with Rheumatoid Arthritis Failing Initial TNF Inhibitor Therapy: A Critical Review." *Arthritis Research & Therapy* 11 Suppl 1 (April): S1.
- Rubin, Robert L. 2005. "Drug-Induced Lupus." *Toxicology* 209 (2): 135–47.
- Saadoun, David, Michelle Rosenzweig, Florence Joly, Adrien Six, Fabrice Carrat, Vincent Thibault, Damien Sene, Patrice Cacoub, and David Klatzmann. 2011. "Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis." *The New England Journal of Medicine* 365 (22): 2067–77.
- Sakaguchi, Shimon, Fiona Powrie, and Richard M. Ransohoff. 2012. "Re-Establishing Immunological Self-Tolerance in Autoimmune Disease." *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2622>.
- Sakaguchi, Shimon, Noriko Sakaguchi, Jun Shimizu, Sayuri Yamazaki, Toshiko Sakihama, Misako Itoh, Yuhshi Kuniyasu, Takashi Nomura, Masaaki Toda, and Takeshi Takahashi. 2001. "Immunologic Tolerance Maintained by CD25 CD4 Regulatory T Cells: Their Common Role in Controlling Autoimmunity, Tumor Immunity, and Transplantation Tolerance." *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1820102.x>.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. "Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases." *Journal of Immunology* 155 (3): 1151–64.
- Scarsi, Mirko, Tamara Ziglioli, and Paolo Airo'. 2011. "Baseline Numbers of Circulating CD28-Negative T Cells May Predict Clinical Response to Abatacept in Patients with Rheumatoid Arthritis." *The Journal of Rheumatology* 38 (10): 2105–11.
- Schneider, Hans-Christoph, and Thomas Klabunde. 2013. "Understanding Drugs and Diseases by Systems Biology?" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.031>.
- "Search of: Anakinra." n.d. Accessed November 27, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=JIA&term=anakinra&cntry=&state=&city=&dist=>.
- "Search of: Low Dose IL-2." n.d. Accessed November 27, 2020. [https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=low+dose+IL-2&cond=type+1+diabetes&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=low+dose+IL-2&cond=type+1+diabetes&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&age_v=&gndr=&type=&rslt=).
- "Search of: Low Dose IL 2." n.d. Accessed November 27, 2020a. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Lupus+Erythematosis&term=low+dose+IL+2&cntry=&state=&city=&dist=>.
- . n.d. Accessed December 4, 2020b. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Amyotrophic+Lateral+Sclerosis&term=low+dose+IL+2&cntry=&state=&city=&dist=>.
- . n.d. Accessed November 27, 2020c. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Ulcerative+Colitis&term=low+dose+IL+2&cntry=&state=&city=&dist=>.
- "Search of: Rilonacept." n.d. Accessed November 27, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=JIA&term=rilonacept&cntry=&state=&city=&dist=>.
- "Search of: Ustekinumab." n.d. Accessed November 27, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Lupus&term=ustekinumab&cntry=&state=&city=&dis>

t=.

- Sebbag, Eden, Renaud Felten, Flora Sagez, Jean Sibilia, Hervé Devilliers, and Laurent Arnaud. 2019. "The World-Wide Burden of Musculoskeletal Diseases: A Systematic Analysis of the World Health Organization Burden of Diseases Database." *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (6): 844–48.
- Sellam, Jérémie, Sandrine Marion-Thore, Florent Dumont, Sébastien Jacques, Henri-Jean Garchon, Stéphanie Rouanet, Yassine Taoufik, et al. 2014. "Use of Whole-Blood Transcriptomic Profiling to Highlight Several Pathophysiologic Pathways Associated with Response to Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis: Data from a Randomized, Controlled, Open-Label Trial." *Arthritis & Rheumatology* 66 (8): 2015–25.
- Sellam, Jérémie, Elodie Rivièrè, Alice Courties, Paul-Olivier Rouzàire, Barbara Tolusso, Edward M. Vital, Paul Emery, et al. 2016. "Serum IL-33, a New Marker Predicting Response to Rituximab in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 18 (1): 294.
- Selmi, Carlo. 2010. "The Worldwide Gradient of Autoimmune Conditions." *Autoimmunity Reviews* 9 (5): A247–50.
- Sempere-Ortells, José Miguel, Vicente Pérez-García, Gema Marín-Alberca, Alejandra Peris-Pertusa, José Miguel Benito, Francisco Manuel Marco, José Jacobo Zubcoff, and Francisco Javier Navarro-Blasco. 2009. "Quantification and Phenotype of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis according to Disease Activity Score-28." *Autoimmunity* 42 (8): 636–45.
- Serafini, Barbara, Barbara Rosicarelli, Diego Franciotta, Roberta Magliozzi, Richard Reynolds, Paola Cinque, Laura Andreoni, et al. 2007. "Dysregulated Epstein-Barr Virus Infection in the Multiple Sclerosis Brain." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (12): 2899–2912.
- Sharma, Reena K., Anjna K. Sharma, and Anuj Sharma. 2018. "Erasmus Syndrome: Association of Silicosis and Systemic Sclerosis." *Indian Dermatology Online Journal* 9 (3): 185–87.
- Shevach, Ethan M., and Angela M. Thornton. 2014. "tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences." *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/imr.12160>.
- Shi, Rui, Muzhi Chen, and Bahaerguli Litifu. 2018. "Serum Interleukin-6 and Survivin Levels Predict Clinical Response to Etanercept Treatment in Patients with Established Rheumatoid Arthritis." *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 28 (1): 126–32.
- Siebert, Stefan, Alexander Tsoukas, Jamie Robertson, and Iain McInnes. 2015. "Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases." *Pharmacological Reviews* 67 (2): 280–309.
- Simmonds, M., and S. Gough. 2007. "The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action." *Current Genomics*. <https://doi.org/10.2174/138920207783591690>.
- Smith, K. A. 1988. "Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications." *Science* 240 (4856): 1169–76.
- Sørensen, Jan, Merete Lund Hetland, and all departments of rheumatology in Denmark. 2015. "Diagnostic Delay in Patients with Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Ankylosing Spondylitis: Results from the Danish Nationwide DANBIO Registry." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (3): e12.
- Spee-Mayer, Caroline von, Caroline von Spee-Mayer, Elise Siegert, Dimas Abdirama, Angelika Rose, Anika Klaus, Tobias Alexander, et al. 2016. "Low-Dose Interleukin-2 Selectively Corrects Regulatory T Cell Defects in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207776>.
- Stadt, Lotte A. van de, Lotte A. van de Stadt, Margret H. M. T. de Koning, Rob J. van de Stadt, Gertjan Wolbink, Ben A. C. Dijkmans, Dörte Hamann, and Dirkjan van Schaardenburg. 2011. "Development of the Anti-Citrullinated Protein Antibody Repertoire prior to the Onset of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.30537>.
- Stegeman, Coen A., Jan Willem Cohen Tervaert, Paul E. de Jong, and Cees G. M. Kallenberg. 1996. "Trimethoprim–Sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) for the Prevention of Relapses of Wegener’s Granulomatosis." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejm199607043350103>.
- Sugiyama, Hideaki, Rolland Gyulai, Eiko Toichi, Edina Garaczi, Shinji Shimada, Seth R. Stevens,

- Thomas S. McCormick, and Kevin D. Cooper. 2005. "Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4+CD25high Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic Effector T Cell Proliferation." *Journal of Immunology* 174 (1): 164–73.
- Tak, Paul P., Marieke E. Doorenspleet, Maria J. H. de Hair, Paul L. Klarenbeek, Marian H. van Beers-Tas, Antoine H. C. van Kampen, Dirkjan van Schaardenburg, Danielle M. Gerlag, Frank Baas, and Niek de Vries. 2017. "Dominant B Cell Receptor Clones in Peripheral Blood Predict Onset of Arthritis in Individuals at Risk for Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (11): 1924–30.
- Talotta, Rossella, Piercarlo Sarzi-Puttini, Magdalena Janina Laska, and Fabiola Atzeni. 2019. "Retrotransposons Shuttling Genetic and Epigenetic Information from the Nuclear to the Mitochondrial Compartment: Do They Play a Pathogenetic Role in Scleroderma?" *Cytokine & Growth Factor Reviews* 49 (October): 42–58.
- Tan, Yann-Chong, Sarah Kongpachith, Lisa K. Blum, Chia-Hsin Ju, Lauren J. Lahey, Daniel R. Lu, Xiaoyong Cai, et al. 2014. "Barcode-Enabled Sequencing of Plasmablast Antibody Repertoires in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (10): 2706–15.
- Tenenhaus, A., C. Philippe, V. Guillemot, K-A Le Cao, J. Grill, and V. Frouin. 2014. "Variable Selection for Generalized Canonical Correlation Analysis." *Biostatistics*.  
<https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxu001>.
- Tenenhaus, Arthur, Cathy Philippe, and Vincent Frouin. 2015. "Kernel Generalized Canonical Correlation Analysis." *Computational Statistics & Data Analysis*.  
<https://doi.org/10.1016/j.csda.2015.04.004>.
- Tenenhaus, Arthur, and Michel Tenenhaus. 2011. "Regularized Generalized Canonical Correlation Analysis." *Psychometrika*. <https://doi.org/10.1007/s11336-011-9206-8>.
- . 2014. "Regularized Generalized Canonical Correlation Analysis for Multiblock or Multigroup Data Analysis." *European Journal of Operational Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejor.2014.01.008>.
- Terrier, Benjamin, Wahiba Chaara, Laurent Dufat, Guillaume Geri, Michelle Rosenzweig, Lucile Musset, Damien Sène, et al. 2014. "Serum Biomarker Signature Identifies Patients with B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Associated with Cryoglobulinemia Vasculitis in Chronic HCV Infection." *Autoimmunity Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.11.001>.
- Terrier, Benjamin, Guillaume Geri, Wahiba Chaara, Yves Allenbach, Michelle Rosenzweig, Nathalie Costedoat-Chalumeau, Pierre Fouret, et al. 2012. "Interleukin-21 Modulates Th1 and Th17 Responses in Giant Cell Arteritis." *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.34327>.
- think.com. n.d. "Home." Accessed November 27, 2020. <https://transmartfoundation.org/>.
- Thomas, Stéphanie, Vincent Rouilly, Etienne Patin, Cécile Alanio, Annick Dubois, Cécile Delval, Louis-Guillaume Marquier, et al. 2015. "The Milieu Intérieur Study — An Integrative Approach for Study of Human Immunological Variance." *Clinical Immunology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.12.004>.
- Thorsby, Erik, and Benedicte A. Lie. 2005. "HLA Associated Genetic Predisposition to Autoimmune Diseases: Genes Involved and Possible Mechanisms." *Transplant Immunology* 14 (3-4): 175–82.
- Thurlings, Rogier M., Marie Boumans, Janneke Tekstra, Joel A. van Roon, Koen Vos, Daisy Marie van Westing, Lisa G. van Baarsen, et al. 2010. "Relationship between the Type I Interferon Signature and the Response to Rituximab in Rheumatoid Arthritis Patients." *Arthritis and Rheumatism* 62 (12): 3607–14.
- Todd, John A. 2010. "Etiology of Type 1 Diabetes." *Immunity* 32 (4): 457–67.
- Todd, John A., Neil M. Walker, Jason D. Cooper, Deborah J. Smyth, Kate Downes, Vincent Plagnol, Rebecca Bailey, et al. 2007. "Robust Associations of Four New Chromosome Regions from Genome-Wide Analyses of Type 1 Diabetes." *Nature Genetics* 39 (7): 857–64.
- Topol, Eric J. 2014. "Individualized Medicine from Prewomb to Tomb." *Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.012>.
- Toro-Domínguez, Daniel, Pedro Carmona-Sáez, and Marta E. Alarcón-Riquelme. 2014. "Shared Signatures between Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's

- Syndrome Uncovered through Gene Expression Meta-Analysis." *Arthritis Research & Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13075-014-0489-x>.
- Tsumiyama, Ken, Yumi Miyazaki, and Shunichi Shiozawa. 2009. "Self-Organized Criticality Theory of Autoimmunity." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008382>.
- Tulunay, A., S. Yavuz, H. Direskeneli, and E. Eksioğlu-Demiralp. 2008. "CD8 CD28<sup>-</sup>, Suppressive T Cells in Systemic Lupus Erythematosus." *Lupus*. <https://doi.org/10.1177/0961203308089400>.
- "UMC | WHODrug Global." n.d. Accessed January 3, 2020. <https://www.who-umc.org/whodrug/whodrug-portfolio/whodrug-global/>.
- Ungethüem, U., T. Haeupl, H. Witt, D. Koczan, V. Krenn, H. Huber, T. M. von Helversen, et al. 2010. "Molecular Signatures and New Candidates to Target the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." *Physiological Genomics* 42A (4): 267–82.
- Valencia, Xavier, Cheryl Yarboro, Gabor Illei, and Peter E. Lipsky. 2007. "Deficient CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Immunology* 178 (4): 2579–88.
- Viglietta, Vissia, Clare Baecher-Allan, Howard L. Weiner, and David A. Hafler. 2004. "Loss of Functional Suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20031579>.
- Vignali, Dario A. A., Lauren W. Collison, and Creg J. Workman. 2008. "How Regulatory T Cells Work." *Nature Reviews. Immunology* 8 (7): 523–32.
- Vollenhoven, Ronald F. van, Bevra H. Hahn, George C. Tsokos, Carrie L. Wagner, Peter Lipsky, Zahi Touma, Victoria P. Werth, et al. 2018. "Efficacy and Safety of Ustekinumab, an IL-12 and IL-23 Inhibitor, in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus: Results of a Multicentre, Double-Blind, Phase 2, Randomised, Controlled Study." *The Lancet* 392 (10155): 1330–39.
- Walsh, S. J., and L. M. Rau. 2000. "Autoimmune Diseases: A Leading Cause of Death among Young and Middle-Aged Women in the United States." *American Journal of Public Health* 90 (9): 1463–66.
- Wang, Wenhong, Shihe Shao, Zhijun Jiao, Mingquan Guo, Huaxi Xu, and Shengjun Wang. 2012. "The Th17/Treg Imbalance and Cytokine Environment in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis." *Rheumatology International* 32 (4): 887–93.
- Wang, William Y. S., Bryan J. Barratt, David G. Clayton, and John A. Todd. 2005. "Genome-Wide Association Studies: Theoretical and Practical Concerns." *Nature Reviews. Genetics* 6 (2): 109–18.
- Whangbo, Jennifer S., Haesook T. Kim, Sarah Nikiforow, John Koreth, Ana C. Alho, Bryn Falahee, Soomin Kim, et al. 2019. "Functional Analysis of Clinical Response to Low-Dose IL-2 in Patients with Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease." *Blood Advances* 3 (7): 984–94.
- White, D. G., A. D. Woolf, P. P. Mortimer, B. J. Cohen, D. R. Blake, and P. A. Bacon. 1985. "Human Parvovirus Arthropathy." *The Lancet* 1 (8426): 419–21.
- Wing, Kajsa, and Shimon Sakaguchi. 2010. "Regulatory T Cells Exert Checks and Balances on Self Tolerance and Autoimmunity." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1818>.
- Wolkenhauer, O. 2001. "Systems Biology: The Reincarnation of Systems Theory Applied in Biology?" *Briefings in Bioinformatics* 2 (3): 258–70.
- Woodcock, Janet, and Lisa M. LaVange. 2017. "Master Protocols to Study Multiple Therapies, Multiple Diseases, or Both." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmra1510062>.
- Xiao, Hong, Shun Wang, Runsheng Miao, and Wusheng Kan. 2011. "TRAIL Is Associated with Impaired Regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells by Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis." *Journal of Clinical Immunology* 31 (6): 1112–19.
- Yu, Aixin, Isaac Snowwhite, Francesco Vendrame, Michelle Rosenzweig, David Klatzmann, Alberto Pugliese, and Thomas R. Malek. 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 (6): 2172–83.
- Yu, Yating, Xinbo Ma, Rufeí Gong, Jianmeng Zhu, Lihua Wei, and Jinguang Yao. 2018. "Recent

- Advances in CD8+ Regulatory T Cell Research." *Oncology Letters* 15 (6): 8187–94.
- Zakrzewska, Krystyna, Fabiana Corcioli, Karen M. Carlsen, Dilia Giuggioli, Rosa Fanci, Alessio Rinieri, Clodoveo Ferri, and Alberta Azzi. 2009. "Human Parvovirus B19 (B19V) Infection in Systemic Sclerosis Patients." *Intervirology* 52 (5): 279–82.
- Zhang, B., X. Zhang, F. Tang, L. Zhu, and Y. Liu. 2008. "Reduction of Forkhead Box P3 Levels in CD4+CD25high T Cells in Patients with New-Onset Systemic Lupus Erythematosus." *Clinical and Experimental Immunology* 153 (2): 182–87.
- Zhang, Li, Yan-Jie Zhang, Jin Chen, Xiao-Lei Huang, Gong-Si Fang, Li-Juan Yang, Yu Duan, and Jing Wang. 2018. "The Association of HLA-B27 and Klebsiella Pneumoniae in Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review." *Microbial Pathogenesis* 117 (April): 49–54.
- Zhang, Sheng-Xiao, Jia Wang, He-Hua Sun, Jia-Qian Zhang, Guang-Ying Liu, Jing Luo, Pei-Feng He, and Xiao-Feng Li. 2019. "Circulating Regulatory T Cells Were Absolutely Decreased in Dermatomyositis/polymyositis Patients and Restored by Low-Dose IL-2." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216246>.
- Zhao, Hengqiang, and Hehe Li. 2018. "Network-Based Meta-Analysis in the Identification of Biomarkers for Papillary Thyroid Cancer." *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.096>.
- Zier, K. S., M. M. Leo, R. S. Spielman, and L. Baker. 1984. "Decreased Synthesis of Interleukin-2 (IL-2) in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus." *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diab.33.6.552>.