

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5

Ecole de médecine René Descartes – Site Cochin

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Présentée par :

Claire BRIET

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5

Sujet de la thèse :

Déviations de l'auto-immunité chez la souris NOD invalidée pour la voie ICOS/ICOSL

Soutenue le lundi 8 octobre 2012 devant le jury composé de :

M. le Dr. Roberto MALLONE	Président du jury
M. le Pr. Christian BOITARD	Directeur de thèse
M. le Dr. Benoît SALOMON	Rapporteur
M. le Dr. Jean François BUREAU	Rapporteur
M. le Pr. Olivier BOYER	Examineur
M. le Dr. Charbel MASSAAD	Examineur
M. le Pr Etienne LARGER	Invité

That is the essence of science: ask an impertinent question, and you are on the way to a pertinent answer.

Bronowski, Jacob

REMERCIEMENTS

Ecrire cette page me ramène à mes débuts en immunologie. Je dois remercier mes professeurs qui m'ont donné goût à cette spécialité en DCEM1, à l'occasion du MSBM, puis pendant mon master 2. Je citerais le Dr Chevailler et le Dr Gardembas, pour mes débuts à Angers. Pendant mon master, j'ai découvert ce qu'était la recherche fondamentale. Je remercie Roberto de m'avoir donné confiance en mes « capacités scientifiques », et de m'avoir dit à la fin de mon année de master « si tu veux faire une thèse un jour, pas de problème, tu en es capable ». Roberto, cette petite phrase est restée dans un coin de ma tête, et quand l'occasion s'est présentée, je n'ai pas hésité à te contacter, et j'ai bien fait! Tu m'as dirigé vers Christian et m'as soutenu tout au long de cette thèse, et je t'en remercie. Merci d'avoir accepté d'être président de mon jury.

Christian, je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse, et de m'avoir aidé à trouver les financements un peu « en urgence ». J'ai beaucoup appris pendant ces quatre années. La transition avec le monde médical a été un peu difficile au départ, j'ai appris la patience, la répétition et l'humilité nécessaire à ce nouvel univers. Vous m'avez mis sur une nouvelle voie, vous m'y avez donné goût, et vous m'avez donné les outils pour m'y faire progresser. J'espère pouvoir intégrer cet aspect de la médecine dans mon futur métier. Je vous remercie également de la confiance que vous m'avez accordée dans ce projet.

Isabelle, j'ai été très contente de travailler avec toi, mais aussi de papoter autour d'un chocolat ou d'échanger les recettes de notre popote respective du midi. Tu mets dans ce labo l'ambiance et la joie nécessaire et qui nous manque tellement le mercredi !! Merci pour ces années à tes côtés, espérant travailler encore avec toi jusqu'à ta retraite!

Joëlle, on n'a pas beaucoup travaillé ensemble, mais tu m'as aidé et soutenu dans mes débuts de paillasse qui ne sont pas tous les jours faciles. Merci de ton soutien et de ta présence discrète et efficace quand tu étais au labo, et je suis très heureuse que cela continue!

Nicolas, c'est grâce à toi si ce projet ICOS/ICOSL en est là. Tu m'as appris beaucoup, depuis le maniement de la pipette et du facs que j'avais oublié depuis mon master jusqu'au raisonnement scientifique. J'ai eu du mal à m'adapter à ton rythme...mais j'ai retenu et intégré tes idées jusqu'à développer les miennes. J'espère avoir fait avancer le projet comme tu attendais...mais comme tu peux le lire, il reste encore beaucoup de choses à comprendre!

Sandrine, merci de tes conseils et de tes petites attentions au quotidien.

Chantal, tu as rejoint le projet depuis peu. Les discussions que nous avons dans la salle de culture, dos à dos, chacune devant notre hotte les années précédentes m'ont bien aidé ! J'étais ravie de savoir que tu allais reprendre une partie de ce projet. Il y a encore plein de chose à faire, j'espère que tu vas prendre plaisir à ce projet passionnant.

A tous les autres membres du labo, de l'équipe Lehuen, de Roberto ou de Sophie, je vous remercie de m'avoir conseillée dans les différentes étapes de ce projet. Vos réponses m'ont toujours bien aidé.

A mes amis amiénois, ex-angevins, choletais et parisiens, merci d'avoir eu confiance en moi, de m'avoir soutenu dans ce projet un peu fou à vos yeux.... « Quoi? Tu *re*-signes pour 3/4 ans?? ».

Marie, ma grande sœur, merci de ton soutien au quotidien: avant, pendant et après!

A mes parents, je sais que vous avez eu du mal à comprendre ma décision de faire cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait confiance dans ce choix, même si il vous a surpris et que vous ne l'approuviez pas vraiment au début. Je me rappellerais de cette discussion au resto d'ikea, après 3 ans et demi de travail... ça m'a fait plaisir que vous vous rendiez compte que ce projet scientifique était « hyper intéressant » comme vous avez dit. Et oui, c'est pour ça que j'y ai consacré 4 ans, et que je ne compte pas arrêter à la fin de cette thèse! C'est juste un diplôme, que je prends comme un tremplin pour aller plus loin.

Aux membres du jury, et plus spécifiquement aux rapporteurs, merci d'avoir accepté de juger ce travail au cours de votre été.

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
1. LE DIABÈTE DE TYPE 1	9
1.1 Généralités	9
1.2 Epidémiologie	9
1.3 Une maladie auto-immune	10
1.4 Une maladie multifactorielle	12
1.4.1 La génétique	12
1.4.2 Les facteurs environnementaux	13
1.5 Les auto-antigènes	13
2. LA SOURIS NOD	15
2.1 Généralités	15
2.2 Génétiques	15
2.3 Rôles pathogènes des lymphocytes B	17
2.4 Rôles pathogènes des lymphocytes T	18
2.5 Défaut de tolérance périphérique	18
2.6 Déviations de l'auto-immunité chez la souris NOD	19
3. LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES ET LES NEUROPATHIES AUTO-IMMUNES	21
3.1 Les myopathies inflammatoires	21
3.1.1 Introduction	21
3.1.2 Epidémiologie	22
3.1.3 Diagnostic	22
3.1.4 Physiopathologie des myosites inflammatoires	24
3.1.5 Les modèles expérimentaux de myosites	24
3.1.6 Spécificités des différentes myosites inflammatoires	25
3.2 Les neuropathies auto-immunes	30
3.2.1 Le syndrome de Stiff-Person et auto-anticorps anti-GAD	30
3.2.2 Le syndrome de Guillain Barré	31
3.2.3 Le syndrome de Fisher	34
3.2.4 La polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante	35
3.2.5 La neuropathie axonale sensitive et motrice	35
3.2.6 La neuropathie axonale motrice	36
3.2.7 Modèles expérimentaux	36

4.	LES VOIES DE COSTIMULATION	37
4.1	Principe de la costimulation lymphocytaire T	37
4.2	Les voies TNF/TNFR	39
4.2.1	Généralités	39
4.2.2	La voie CD40/CD40L	43
4.2.3	La voie CD27/CD70	44
4.2.4	La voie OX40/OX40L	45
4.2.5	La voie 4-1BB/4-1BBL	46
4.2.6	La voie HVEM/LIGHT	47
4.2.7	La voie CD30/CD30L	48
4.2.8	La voie GITR/GITRL	49
4.2.9	Les autres voies TNF/TNFR	50
4.3	Les voies de la famille TIM	51
4.4	Les voies de la superfamille CD28/B7	52
4.4.1	La voie CD28/B7	53
4.4.2	La voie PD-1/PDL-1	60
4.4.3	La voie ICOS/ICOSL	61
	PROJET DE RECHERCHE EXPÉRIMENTALE	74
	RÉSULTATS	75
	RÉSULTATS COMPLEMENTAIRES	76
	DISCUSSION	81
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	87
	ANNEXES	89
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
	RÉSUMÉ DE LA THÈSE	112

ABREVIATIONS

AICD	<i>activation induced cell death</i>
ALN	<i>axillary lymph nodes</i>
AMAN	neuropathie axonale motrice
AMSAN	Neuropathie axonale sensitive et motrice
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BCMA	<i>B cell maturation</i>
BB	<i>biobreeding</i>
CFA	<i>complet Freund's adjuvant</i>
CIDP	polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
Dt1	diabète de type 1
EAE	<i>experimental auto-immune encephalomyelitis</i>
EAN	Neuropathie allergique expérimentale
Foxp3	<i>forkhead box family transcription factor 3</i>
GAD	<i>glutamic acid decarboxylase</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein</i>
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
HMGCoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-conenzyme A</i>
HVEM	<i>herpes virus entry mediator</i>
IAA	<i>insulin autoantibodies</i>
IA-2	<i>insulinoma-associated protein 2</i>

ICOS	<i>inducible costimulator</i>
ICOSL	ICOS ligand
Idd	<i>insulin dependent diabetes</i>
IGRP	<i>islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein</i>
IFN	interféron
IL	interleukine
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LIGHT	<i>lymphotoxin-like receptor expressed by T lymphocytes</i>
LT	Lymphocytes T
LB	Lymphocytes B
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MP0	<i>myelin protein zero</i>
NOD	<i>non obese diabetic</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKT	<i>natural killer T cell</i>
PD-1	<i>programmed death-1</i>
SGB	syndrome de Guillain-Barré
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SPS	<i>Syndrome de stiff person</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFH	<i>T follicular helper</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Incidence du Dt1 chez les enfants de moins de 14 ans.	10
Figure 2	Différents stades d'infiltration des îlots chez la souris NOD.	12
Figure 3	La pro-insuline, un auto-antigène majeur du Dt1.	14
Figure 4	La molécule I-Ag ⁷ est caractéristique de la souris NOD.	17
Figure 5	Principales caractéristiques des myopathies auto-immunes.	21
Figure 6	Anticorps spécifiques et/ou associés aux myosites.	23
Figure 7	Analyse histologique d'un patient atteint d'un SGB.	32
Figure 8	Anomalies électrophysiologiques observées lors d'un SGB.	33
Figure 9	Principe de la costimulation lymphocytaire T.	38
Figure 10	Rôles des différents membres de la superfamille des TNF/TNFR.	40
Figure 11	Expressions cellulaires des ligands et des récepteurs TNF/TNFR	41
Figure 12	Implication des TNF/TNFR en pathologie	43
Figure 13	Les différents membres de la voie CD28/B7	53
Figure 14	La souris B7.2 ^{-/-} .	59
Figure 15	Rôle de la voie ICOS/ICOSL dans le modèle de la souris BDC2.5.	70
Figure 16	Effet de l'anticorps anti-ICOS chez la souris NOD	71
Figure 17	Résumé du rôle des différentes voies de costimulation dans le Dt1	72
Figure 18	Résumé du rôle des différentes voies de costimulation dans l'EAE	73
Figure 19	Identification d'antigènes du muscle périphérique spécifiques des anticorps présent dans le sérum des souris NOD ICOSL ^{-/-}	78
Figure 20	Anomalies histologiques précoces des nerfs et des muscles de souris NOD ICOSL ^{-/-} de 12 semaines.	80

INTRODUCTION

1 LE DIABÈTE DE TYPE 1 chez l'homme

1.1 Généralités

Le diabète est défini par une glycémie supérieure à 1.26 g/l à jeun ou 2 g/l après un test de charge de glucose. Les différents types de diabète apparaissent à la faveur d'un défaut d'insulinosécrétion, éventuellement révélé par une insulino-résistance périphérique.

Le diabète de type 1 (Dt1) est une maladie auto-immune, survenant le plus souvent chez l'enfant et l'adulte jeune, liée à une destruction des cellules bêta sécrétant l'insuline par des lymphocytes T (LT) (Galli-Tsinopoulou 2011). Le Dt1 n'est pas le plus fréquent puisqu'il concerne seulement 5 à 10% de l'ensemble des patients diabétiques. Le traitement est «palliatif», nécessitant de multiples injections sous cutanée d'insuline par jour. Malgré les progrès réalisés ces vingt dernières années, ce traitement ne permet pas d'obtenir un équilibre glycémique optimal. Les complications liées à l'hyperglycémie chronique sont fréquentes et relativement précoces. Une meilleure compréhension de la maladie est donc indispensable pour trouver des thérapies plus ciblées.

1.2 Epidémiologie

L'incidence du Dt1 est en constante augmentation (+3-4% par an dans tous les pays observés). D'après le registre européen EURODIAB, l'augmentation de l'incidence est particulièrement importante chez les enfants de 0 à 4 ans (Vehik and Dabelea 2011).

Il existe un gradient nord /sud dans l'incidence du Dt1. Ainsi, l'incidence est beaucoup plus élevée dans le nord de l'Europe (60/10⁶/an en Finlande) que dans le sud (0.4/10⁶/an en Macédoine) et que dans la région des tropiques (0,05/10⁶/an au Pérou) (Figure 1) (2006).

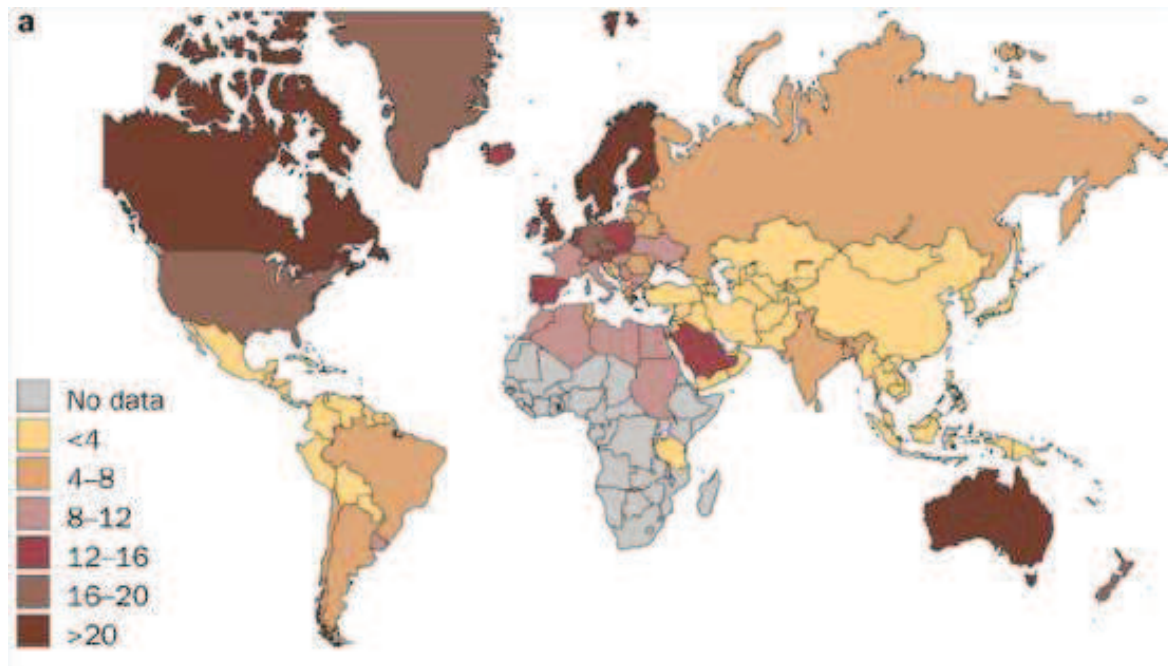


Figure 1: Incidence du Dt1 chez les enfants de moins de 14 ans (pour 10^5 individus/an). Cette carte du monde met en évidence le gradient nord-sud pour l'incidence du Dt1 notamment en Europe, qui suggère le rôle des facteurs environnementaux. D'après IDF Diabetes Atlas, 4th Edition.

1.3 Une maladie auto-immune

Le Dt1 est une maladie auto-immune à médiation cellulaire où les cellules bêta sécrétant l'insuline sont détruites par des LT autoréactifs (von Herrath, Sanda et al. 2007). Les LT autoréactifs sont éliminés lors de la sélection négative qui se déroule dans le thymus. On parle de tolérance centrale (Klein, Hinterberger et al. 2009). Cependant, certains lymphocytes autoréactifs échappent à la sélection négative. Des mécanismes de tolérance périphérique impliquant notamment des LT régulateurs sont alors mis en jeu pour éviter le développement de maladies auto-immunes (Goodnow 1996; Gardner, Devoss et al. 2008).

On distingue différents stades chronologiques dans l'atteinte du pancréas:

- la péri-insulite: infiltration cellulaire initiale autour des îlots de cellules β associée à la présence d'anticorps anti-insuline dans le sérum,

- l'insulite: l'infiltration à l'intérieur de l'îlot,

- puis l'apparition clinique de la maladie avec diminution du nombre d'îlot (figure 2).

Cet infiltrat comporte des cellules mononuclées (macrophages, cellules Natural Killer, lymphocytes) avec une prédominance de LT-CD8⁺ chez l'homme (Bach 1994). L'étude histologique des îlots a également apporté une information importante pour la compréhension de la maladie: tous les îlots ne sont pas atteints. Sur une même coupe histologique d'un pancréas humain coexistent des îlots normaux, des îlots avec péri-insulite, et des îlots avec insulite invasive. Le diagnostic du Dt1, évoqué sur des arguments cliniques et la mise en évidence d'une hyperglycémie, est affirmé par la présence d'auto-anticorps:

- anticorps anti-«Glutamic acid decarboxylase» (GAD) présents dans 80 à 90% des cas,

- anticorps anti-«tyrosine phosphatase-like autoantigen» (IA2) présents dans 50 à 85% des cas,

- anticorps anti-îlots (ICA) présents dans 60 à 90 % des cas,

- anticorps anti-insuline présents dans 30 à 50 % des cas (Barmeier, Ahlmen et al. 1992; Taplin and Barker 2008).

Plus récemment, les anticorps anti-ZNT8 (protéine de transport du zinc) ont été mis en évidence dans 60 à 80% des cas (Wenzlau, Juhl et al. 2007). Cependant, ces anticorps ne sont pas responsables de la progression de la maladie mais simplement révélateur de la présence d'une réaction auto-immune. En effet, le transfert des auto-anticorps n'induit pas la maladie (Lieberman and DiLorenzo 2003). De plus, les lymphocytes B (LB) ne semblent pas être indispensables à la pathologie chez l'homme, puisqu'un Dt1 a été diagnostiqué chez un patient présentant une agammaglobulinémie liée à l'X, donc dépourvu de LB fonctionnels (Martin, Wolf-Eichbaum et al. 2001).

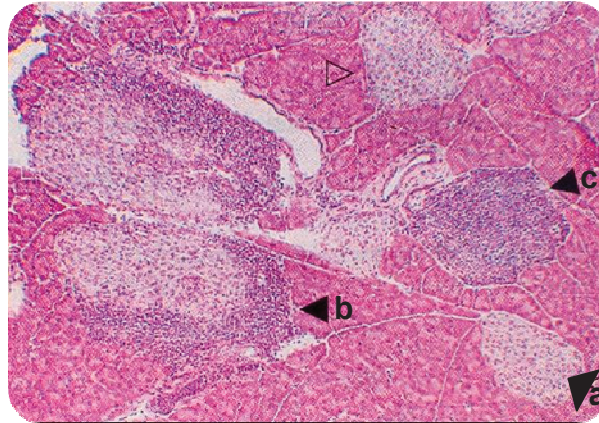


Figure 1: Différents stades d'infiltration des îlots de Langerhans chez la souris NOD. Sur cette coupe histologique sont présents des îlots normaux (a), des îlots avec une péri-insulite où l'infiltrat lymphocytaire est présent en périphérie de l'îlot (b), et un îlot avec une insulite (c): l'infiltrat est présent à l'intérieur de l'îlot (Prevot, Briet et al. 2010).

1.4 Une maladie multifactorielle

1.4.1 La génétique

Le Dt1 est une maladie multifactorielle, multigénique, dont le développement suppose l'interaction d'un terrain génétique favorisant et de facteurs d'environnement (Thomson, Robinson et al. 1988). Les gènes du HLA confèrent le risque de survenue le plus élevé, principalement le gène HLA de classe II: HLA-DQ8 sur les haplotypes HLA-DR4-DQ8 (risque relatif: 10) (Thomson, Robinson et al. 1988; Eerligh, Koeleman et al. 2011; Steck and Rewers 2011). D'autres régions sont impliquées telles que la région en 5' du gène de l'insuline contenant un nombre variable de séquences nucléotidiques courtes répétées en tandem, nommé VNTR (variable number of tandem repeats), et de multiples régions nommées *Idd* (insulin Dependant Diabetes Loci) (van der Auwera, Heimberg et al. 1993).

Mais ces facteurs génétiques ne suffisent pas. En effet, la concordance pour la maladie chez les jumeaux homozygotes est de 35-50%, contre 0.4% de la population générale (Barnett, Eff et al. 1981; Olmos, A'Hern et al. 1988).

1.4.2 Les facteurs environnementaux

Nous avons vu précédemment qu'il existait un gradient nord sud dans l'incidence du Dt1. Ce gradient a fait émettre la théorie de l'hygiène qui propose un parallélisme entre une fréquence d'exposition aux agents pathogènes et une protection vis-à-vis du Dt1.

D'autres études épidémiologiques ont rapproché l'infection par certains virus tels que la rubéole congénitale ou les infections à entérovirus avec le diagnostic de Dt1 (Ginsberg-Fellner, Witt et al. 1984; Hyoty, Hiltunen et al. 1995). Des entérovirus sont capables, après sélection, d'infecter les cellules béta. L'inflammation produite dans le pancréas est susceptible d'entraîner une libération d'antigène, une production locale de cytokines pro-inflammatoires, une surexpression des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et une activation de cellules dendritiques. Tous ces phénomènes peuvent conduire à l'activation de LT autoréactifs vis-à-vis d'épitopes issus de la cellule béta (See and Tilles 1998; Roivainen 2006). Par ailleurs, il existe une homologie entre la protéine B2C du virus coxsackie B4 et la GAD65, autorisant l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire (Marttila, Juhela et al. 2001). Cependant, la preuve directe d'un lien entre infection virale et le Dt1 n'est pas établie.

L'étude des populations migrantes d'un pays ayant une faible incidence de diabète vers un pays d'accueil ayant une forte incidence a montré une augmentation de l'incidence du diabète, confirmant que l'environnement et le style de vie influe sur l'incidence de diabète (Hjern, Soderstrom et al. 2012).

Le rythme des saisons influe également sur l'incidence du Dt1. Une étude Finlandaise a montré que l'apparition des auto-anticorps dirigés contre les cellules béta était plus fréquente en hiver (Samuelsson, Carstensen et al. 2007; Kalliora, Vazeou et al. 2011).

1.5 Les auto-antigènes

La proinsuline est l'antigène majeur du Dt1 (figure 3). Les anticorps anti-insuline ont été mis en évidence chez des patients diabétiques lors du diagnostic, avant l'introduction de l'insulinothérapie (Palmer, Asplin et al. 1983). De plus, chez les sujets à risque familial de Dt1, les premiers auto-anticorps détectés sont les anticorps anti-insuline (Ziegler, Ziegler et al. 1989). Enfin, des LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺ spécifiques d'antigènes issus de la pro-insuline

ont été identifiés (Skowera, Ellis et al. 2008; Velthuis, Unger et al. 2010; Luce, Lemonnier et al. 2011).

Un autre auto-antigène jouant un rôle important dans le Dt1 est la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase). La GAD est une enzyme responsable de la synthèse d'acide α -aminobutyrique (GABA) à partir du glutamate. Le GABA entraîne une inhibition de la sécrétion de glucagon (Lieberman and DiLorenzo 2003). Cette enzyme n'est pas spécifique de la cellule bêta. Les anticorps anti-GAD sont très fréquemment retrouvés chez des patients diabétiques de type 1 récent (Barmeier, Ahlmen et al. 1992). Des épitopes issus de la GAD et reconnus par les LT-CD4⁺ et les LT-CD8⁺ ont également été mis en évidence dans le sang de patients diabétiques de type 1 (Bieg, Seissler et al. 1994).

Il existe d'autres anticorps dirigés notamment contre les protéines phosphatases IA-2 (insulinoma associated protein-2) et IA-2 β et contre la protéine transporteur du zinc ZNT8 qui sont également spécifiques du Dt1 (Wenzlau, Juhl et al. 2007).

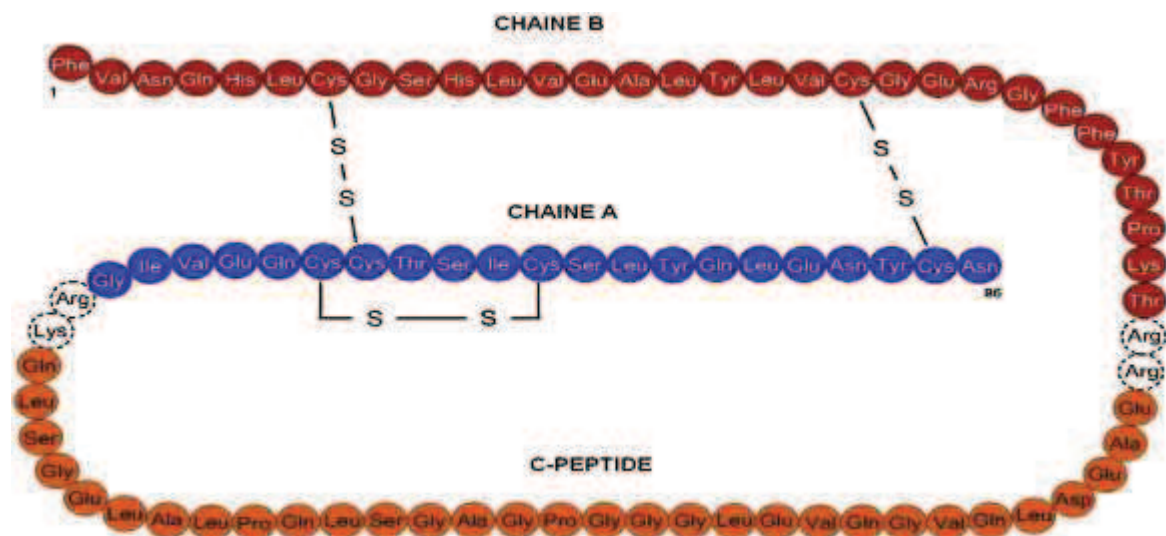


Figure 3: La pro-insuline, un auto-antigène majeur du Dt1. La pro-insuline est composée d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta, séparées par le C-peptide et reliées par deux ponts disulfures. La pro-insuline est clivée par les proconvertases 1 et 2 conduisant à l'excision du C-peptide et à la synthèse de la molécule d'insuline (Chevenne, Deghmoun et al. 2011).

2 LA SOURIS NOD

2.1 Généralités

La souris NOD est un modèle animal du Dt1 développé par l'équipe de Tochino il y a 30 ans (Makino, Kunimoto et al. 1980). Cette souris développe une insulite dès 4-5 semaines d'âge dont résulte une destruction sélective des cellules bêta et un diabète à partir de 12 semaines d'âge. L'incidence du diabète est de 60 à 80 % chez les femelles et 20 à 30 % chez les mâles, à 40 semaines d'âge selon les conditions sanitaires des animaleries (Makino, Kunimoto et al. 1980).

Il existe des différences entre le Dt1 humain et murin. La différence de prévalence entre les souris mâles et les femelles n'est pas retrouvée chez l'homme où le sex-ratio est de 1. L'homogénéité du terrain génétique NOD et la survenue de la maladie en l'absence de tout facteur déclenchant extérieur fait de cette souris un modèle particulier. Concernant les essais d'intervention, étant donné la connaissance et reproductibilité du diabète chez la souris en terme développement dans le temps, il est possible d'intervenir avant l'apparition de l'insulite, ou de l'activation initiale des cellules T, expliquant en partie les grandes discordances des essais d'immunothérapies chez l'homme et chez la souris (Chatenoud, Primo et al. 1997; Keymeulen, Vandemeulebroucke et al. 2005). De plus, la sécrétion résiduelle d'insuline au diagnostic est plus faible chez l'homme, les effets des traitements étiologiques sont donc plus discrets (von Herrath, Sanda et al. 2007).

2.2 Génétique

Le terrain très multigénique de survenue de la maladie est en revanche très similaire chez l'homme et chez la souris. L'analyse de souches recombinantes et de souches congéniques au niveau du CMH a confirmé chez la souris le rôle majeur du CMH de classe II (Todd, Acha-Orbea et al. 1988; Carnaud, Legrand et al. 1992).

La souris NOD n'exprime qu'une molécule CMH de classe II: I-A^{g7}. On ne retrouve ni la molécule I-E ni le RNA messenger du gène *I-e*. Cette absence de molécule I-E est importante pour la prédisposition à l'auto-immunité puisque l'expression transgénique du gène codant pour la molécule I-E chez la souris NOD entraînerait une protection vis-à-vis

du diabète, sous réserve que l'expression transgénique d'un gène contrôle n'entraîne pas cette même protection (Nishimoto, Kikutani et al. 1987).

La molécule I-A^{g7} est caractéristique de la souris NOD. Si la chaîne α est identique à celle de l'haplotype conventionnel I-A^d, la chaîne β est caractérisée par la présence de 5 substitutions nucléotidiques (figure 4). Ces substitutions se traduisent par l'expression d'une histidine en position 56 et d'une sérine en position 57 alors que la plupart des souches de souris conventionnelles sont porteuses d'une proline et d'un résidu aspartique respectivement (Acha-Orbea and McDevitt 1987). La molécule I-A^{g7} de la souris NOD est proche des allèles humains de classe II de prédisposition. Ces derniers possèdent une valine, une sérine ou une alanine en position 57, tandis que les allèles qui ne sont pas associés au Dt1 ou qui sont protecteurs sont porteurs d'un acide aspartique. Cette modification entraîne une expression instable du CMH II à la surface de la cellule, et une moins bonne affinité de liaison avec les peptides. Ceci pourrait expliquer un défaut de sélection négative des LT autoréactifs dans le thymus (Carrasco-Marin, Shimizu et al. 1996).

En dehors du gène codant pour la molécule I-A^{g7}, plus de 20 régions génétiques ont été identifiées comme favorisant l'apparition du Dt1 chez la souris NOD (Todd and Wicker 2001). Si les régions génétiques sont pour la plupart identifiées, les gènes responsables sont encore souvent inconnus. Dans l'ensemble, les gènes impliqués identifiés contrôlent des fonctions immunitaires majeures (sélection thymique, présentation de l'antigène, activation lymphocytaire T ...).

	10	20	30	40	50
d	G N S E R H F V V Q F K G E C Y Y T N G T Q R I R L V T R Y I Y N R E E Y V R Y D S D V G E Y R A V				
k	_____ H _____ Q P F _____ F _____ I _____ F _____				
b	- D _____ Y _____ M _____ F _____ Y _____				_____ H _____
u	- D _____ L _____ Q P F _____ F _____ Y _____ L - F _____				
s	- D _____ F _____ F _____ S - D _____ L - F _____				
q	_____ A - L _____ F _____ S - N _____ W _____ F _____				
f	_____ F _____ F _____ S - D _____ L - F _____				
NOD	- D _____ H _____ F _____ L - F _____				
	60	70	80	90	
d	T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R T R A E V D T A C R H N Y E G P E T S T S L R R L E				
k	_____ K - * Y * _____ L _____ V _____ K T _____ P _____				
b	_____ _____ L _____ V _____ _____ H _____				
u	_____ Y - K - * Y * _____ L _____ V _____ Y _____ E T - V P _____				
s	_____ Y - K - * Y * _____ Q _____ L _____ V _____ V _____ H _____				
q	_____ _____ V _____ _____ V _____ H _____				
f	_____ S _____ Y - K - * Y * _____ L _____ V _____ V _____ P _____				
NOD	_____ H S _____ Y - K - * Y * _____ L _____ E T - V P _____				

Figure 4: La molécule I-A^{g7} est caractéristique de la souris NOD. Lorsque l'on compare la séquence d'acides aminés de la chaîne β de la molécule I-A de plusieurs lignées de souris avec celle de la souris NOD, on observe chez la souris NOD, cinq mutations nucléotidiques qui se traduisent par l'expression d'une histidine en position 56 et d'une sérine en position 57 alors que la plupart des souches de souris conventionnelles sont porteuses d'une proline et d'un résidu aspartique respectivement (Acha-Orbea and McDevitt 1987).

2.3 Rôle pathogène des LB

Les LB sont présents dès les premiers stades de l'insulite. L'analyse des souris congéniques NOD dépourvues de LB (NOD.Ig μ^{null}) a démontré le rôle des LB dans l'initiation du diabète puisque ces souris ne présentent pas d'insulite (Serreze, Chapman et al. 1996). Le transfert des auto-anticorps tels que les anticorps anti-GAD ne transmettent pas la maladie (Serreze, Fleming et al. 1998). Il semble donc que le rôle pathogénique des LB dans le diabète de la souris NOD soit un rôle de cellules présentatrices d'antigènes pour les LT-CD4⁺.

2.4 Rôle pathogène des LT

Les travaux sur le Dt1 ont formellement prouvé qu'il s'agit d'une maladie dépendante des LT. Les souris NOD dépourvues de thymus (NOD-nu/nu) et donc de LT ne développent pas de diabète. Le transfert de LT-CD8⁺ dans ces souris n'induit pas la maladie. Seul le transfert de LT-CD4⁺ entraîne un transfert du diabète chez les souris NOD-nu/nu. Le transfert des deux populations lymphocytaires T-CD4⁺ et T-CD8⁺ permet un transfert de la maladie plus rapide et efficace (Yagi, Matsumoto et al. 1992). De plus, l'injection d'anticorps bloquant l'activité des LT permet de prévenir le développement du diabète (Kikutani and Makino 1992).

Les souris NOD dépourvues de LT-CD4⁺ par invalidation du facteur de transcription des gènes de classe II (CIITA) ou du gène de classe I (I-A bêta), ne développent pas de diabète bien qu'un léger infiltrat lymphocytaire soit observé dans les îlots de Langerhans (Katz, Benoist et al. 1993; Mora, Wong et al. 1999). Si les LT-CD4⁺ sont diabétogènes, il existe une sous-population régulatrice permettant, avec d'autres populations cellulaires telles que les cellules NKT (Natural Killer), la tolérance périphérique.

La sélection thymique joue un rôle capital dans le Dt1, comme le démontre l'étude des souris NOD invalidées pour les gènes de la proinsuline 2. La souris exprime deux isoformes de la pro-insuline dont l'expression tissulaire diffère. Si la pro-insuline 2 est exprimée dans le pancréas et le thymus, la pro-insuline 1 n'est exprimée que dans le pancréas. Les souris n'exprimant pas le gène de la proinsuline 2 développent un diabète accéléré alors que les souris n'exprimant pas le gène de la proinsuline 1 sont protégées de la maladie (Thebault-Baumont, Dubois-Laforgue et al. 2003).

2.5 Défaut de la tolérance périphérique

Le fond génétique de la souris NOD, notamment l'expression de la molécule I-A^{g7}, ainsi que le niveau variable d'expression du gène de l'insuline dans le thymus expliquent la présence en périphérie de lymphocytes autoréactifs. Un défaut de la sélection négative et des anomalies fonctionnelles des cellules T régulatrices ont été avancés chez la souris NOD.

En cas d'échappement à la sélection centrale et afin d'éviter les atteintes auto-immunes multi-organes, des mécanismes tels que l'AICD (activation-induced cell death), la sécrétion de cytokines orientant vers une réponse Th2 telles que l'IL-4, l'IL-10 par les LT régulateurs notamment sont normalement mis en place (Mellanby, Thomas et al. 2009). Or la souris NOD présente une résistance à l'AICD (Colucci, Cilio et al. 1996; Decallonne, van Etten et al. 2003). De plus un défaut qualitatif des LT régulateurs aurait été décrit chez la souris NOD (Pop, Wong et al. 2005; Mellanby, Thomas et al. 2007).

Le défaut de tolérance centrale et périphérique présenté par la souris NOD en fait un bon modèle pour les maladies auto-immunes. En dehors du diabète, cette souris a une prédisposition à d'autres atteintes auto-immunes: notamment vis-à-vis des glandes salivaires, et, à un moindre degré et selon les colonies, de la thyroïde et de la parathyroïde (Krug, Williams et al. 1991; Bernard, Ertug et al. 1992; Kikutani and Makino 1992). La souris NOD est un bon modèle pour l'induction expérimentale de maladies auto-immunes telles que la prostatite auto-immune expérimentale, la thyroïdite auto-immune expérimentale (Rivero, Cailleau et al. 1998; Hutchings, Hedlund et al. 1999).

2.6 Déviation de l'auto-immunité chez la souris NOD

L'auto-immunité chez la souris NOD peut être déviée lorsqu'on modifie soit le CMH, soit les voies de costimulation, soit des gènes de résistance au diabète dont la fonction n'est pas connue et qui ont été identifiés chez des souris double-congéniques.

Il a été démontré que lorsque l'on modifie le CMH II de la souris NOD, remplaçant I-A^{g7} par I-A^k (souris congénique NOD.H2^k) l'auto-immunité est déviée du pancréas vers la thyroïde (Slattery, Kjer-Nielsen et al. 1990). Lorsque l'on remplace I-Ag⁷ par I-A^g, l'auto-immunité est déviée vers les glandes salivaires et le rein (glomérulonéphrite lupique) (Lindqvist, Nakken et al. 2005). De même, lorsque l'on remplace I-Ag⁷ par l'haplotype humain DQ8 sur fond NOD, l'auto-immunité est déviée vers le cœur. Ces souris développent une cardiomyopathie auto-immune, dépendante des LT-CD4⁺, avec une cible antigénique dirigée contre la myosine cardiaque (Elliott, Liu et al. 2003; Hayward, Bautista-Lopez et al. 2006). De même, les souris NOD B7.2^{-/-} (molécule de costimulation se liant à CD28) sont protégées du diabète et développent une auto-immunité vis-à-vis des nerfs périphériques (Salomon, Rhee et al. 2001).

Des gènes de résistance ont été décrits chez la souris NOD tels que les gènes situés dans la région B6 ou B10 (*Idd*). L'insertion de plusieurs de ces loci *Idd* tels que B6 *Idd3/Idd5* induit une protection vis-à-vis du diabète et dévie l'auto-immunité vers les glandes salivaires (Cha, Nagashima et al. 2002). L'insertion des régions B6 *Idd3*, *Idd10*, *Idd17*, *Idd18* (sur le chromosome 3) et B10 *Idd9.1*, *Idd9.2*, *Idd9.4* (sur le chromosome 4) sur le fond génétique NOD induit une protection vis-à-vis du diabète et une cholangite auto-immune associée à une maladie lupique avec anticorps anti-DNA natifs et anti-Sm positifs (Lyons, Hancock et al. 2000; Koarada, Wu et al. 2004). La souris congénique NOD.B10 *Idd3/Idd9* a une faible incidence de diabète et développe une sialadénite (Lyons, Hancock et al. 2000).

Certaines infections peuvent également modifier la cible de l'auto-immunité. L'infection de la souris NOD par des mycobactéries (bacille de Calmette et Guérin) protège les souris vis-à-vis du diabète et favorise le développement d'un lupus, d'une anémie hémolytique et d'une sialadénite (Baxter, Horsfall et al. 1994).

La modification de l'affinité ou de l'avidité de liaison du TCR (T cell receptor) au peptide présenté par le CMH, la modification de l'environnement, le changement de présentation du peptide entraîné par une modification du CMH semble donc jouer un rôle dans la rupture de tolérance et dans la cible de l'auto-immunité.

3 LES MYOPATHIES INFLAMMATOIRES ET LES NEUROPATHIES AUTO-IMMUNES

3.1 Les myopathies inflammatoires

3.1.1 Introduction

Les myopathies inflammatoires sont des maladies auto-immunes touchant soit le muscle lui-même, soit les capillaires entraînant une ischémie musculaire.

Les myopathies inflammatoires sont classiquement divisées en trois entités: la dermatomyosite, la polymyosite, la myosite à inclusion. Plus récemment deux entités ont été décrites: les myosites associées aux connectivites et la myopathie nécrosante auto-immune. Les critères diagnostiques étaient initialement cliniques (critères de classification de Bohan et Peter), jusqu'à l'identification d'auto-anticorps qui ont permis de faciliter le diagnostic. Grâce au progrès de l'immunologie, de nombreux anticorps spécifiques ont été découverts et les caractéristiques histologiques de ces maladies ont pu être précisées (figure 5) (Trojanov, Targoff et al. 2005).

	Dermatomyosite	Polymyosite	Myosite à inclusions	Myopathie nécrosante auto-immune
Âge de début	Enfant et adulte	Adulte	> 50 ans	Adulte
Déficit musculaire	Proximal	Proximal	Proximal et distal, sélectif	Proximal
Atteinte cutanée	Oui	Non	Non	Non
Association aux cancers	Oui	Faible	Non	Oui
Association aux connectivites	Oui	Oui	Oui	Oui
Anticorps spécifiques des myosites	Oui	Oui	Rares	Anti-SRP
Réponse aux immunosuppresseurs	Oui	Oui	Non	Oui
Évolution	Chronique > monophasique	Chronique > monophasique	Chronique	Chronique > monophasique
Inflammation	Oui	Oui	Oui	Non
- Type	LT CD4+, LB, macrophages, CD	LT CD8+, macrophages, CD	LT CD8+, macrophages, CD	-
- Siège	Périmysial, périvasculaire	Endomysial	Endomysial	-
- Invasion de fibres non nécrotiques	Non	Oui	Oui	-
Micro-angiopathie (déplétion et altération capillaires, dépôts capillaires de C5b9)	Oui	Non	Non	Oui
Anomalies de la fibre musculaire				
- Nécrose/régénération	Oui	Oui	Oui	Oui, marquée
- Expression du CMH-I	Oui, renforcement périfasciculaire	Oui, diffuse	Oui, diffuse	Variable
- Atrophie	Périfasciculaire	Non périfasciculaire	Non périfasciculaire	Non périfasciculaire
- Vacuoles bordées, dépôts amyloïdes	Non	Non	Oui	Non

Figure 5: Principales caractéristiques cliniques, biologiques et histologiques des différentes myopathies auto-immunes (Dimitri 2009).

3.1.2 Epidémiologie

L'incidence annuelle des myopathies inflammatoires est de 5 à 10/10⁶/an, la dermatomyosite étant la plus fréquente et la polymyosite la plus rare. En fonction de l'âge, l'incidence de ces maladies est variable. Ainsi, si la myosite à inclusion est plus fréquente après l'âge de 50 ans, chez l'enfant, c'est la dermatomyosite qui est la plus fréquente (pic entre 5 et 14 ans). Il y a une prédominance féminine uniquement pour la myosite à inclusion (Dalakas and Hohlfeld 2003).

3.1.3 Diagnostic

Les myosites inflammatoires se traduisent par une faiblesse musculaire d'apparition lente. Initialement, les mouvements de la motricité globale tels que se lever d'une chaise, monter les escaliers sont atteints. La motricité fine n'est atteinte que plus tardivement. L'atteinte musculaire épargne les muscles de la face le plus souvent. Dans les cas très avancés, les muscles de la déglutition et les muscles respiratoires peuvent être atteints. Les myalgies sont rares (Dimitri 2009).

Sur le plan histologique, l'inflammation est un critère indispensable au diagnostic. La composition et la localisation de l'infiltrat inflammatoire permet de distinguer les différentes myopathies (Gallardo, Rojas-Garcia et al. 2001).

On distingue schématiquement les auto-anticorps spécifiques des myosites et les anticorps associés aux myosites (Sibilia, Chatelus et al. 2010). Les anticorps spécifiques sont classés selon la localisation cellulaire de l'auto antigène. Les plus caractéristiques sont les anticorps dirigés contre les antigènes cytoplasmiques:

- les anticorps anti-ARNt synthétase, enzyme responsable de l'amino-acétylation peptidique dans le cytoplasme: anti-Jo-1 (60 à 80% des cas), anti-PL-7(10-15%), anti-PL-12 (5-10%), anti-EJ, OJ, JS, KS, ZO et YRS (Vazquez-Abad and Rothfield 1996),
- les anticorps anti-SRP (Signal Recognition Particule) dirigés contre une ribonucléotide cytoplasmique, qui guide les ribosomes et les chaînes polypeptidiques vers le réticulum,
- les anticorps anti-MAS (facteur impliqué dans la translocation protéique),
- les anticorps anti-KJ (facteur impliqué dans la translocation protéique),

- les anticorps anti-Fer (eEF1) (facteurs d'élongation),
- les anticorps anti-Wa (facteurs d'élongation),
- les anticorps anti-CADM P140 (melanoma differentiation-associated gene 5 ou MDA 5),

D'autres auto-anticorps sont dirigés contre des auto-antigènes nucléaires: les anticorps anti-Mi-2 (impliqués dans la transcription), les anticorps anti-PMS (PMS1, PMS2) et apparentés (MLH1, DNAPKcs...), les anticorps anti-56 kDa, les anticorps anti-MJ (NPX-2), les anticorps anti-SAE (Small ubiquitine-like modifier Activating Enzyme) et les anticorps anti-p155/p140 (TIF-1 γ : Transcriptionnal Intermediating Factor-1 γ) (Sibilia, Chatelus et al. 2010; Casciola-Rosen and Mammen 2012).

Néanmoins, 30 à 50% des myopathies ne s'associent à aucun auto-anticorps détectable en pratique courante (figure 6).

Cible antigénique		Polymyosite, n = 198	Dematomyosite, n = 181	Myosite à inclusions, n = 38
Anticorps spécifiques des myosites				
Anti-cytoplasmiques				
Anti-ARN-t synthétases	Amino-acyl-ARNt synthétase			
Anti-JO1	Histidyl-ARNt synthétase	43 (22 %)	28 (16 %)	2 (5 %)
Autres : anti-PL7, -PL12, -EJ, -JS, -KS, -OJ	Thréonyl-, Alanyl-, Glycyl-, Glutaminyl-, Asparaginyl-, Isoleucyl- ARNt synthétases	6 (3 %)	5 (3 %)	1 (3 %)
Anti-SRP (« <i>signal recognition particle</i> »)	Ribonucléoprotéine associée aux ribosomes ; facteur de régulation de la translocation	14 (7 %)	5 (3 %)	1 (3 %)
Anti-Mas	ARNt formant un complexe serine-ARNt-protéine	6 (3 %)	2 (1 %)	0
Anti-nucléaires				
Anti-Mi-2	Complexe peptidique intervenant dans la transcription (activités hélicase, ATPase...)	17 (9 %)	38 (21 %)	3 (8 %)
Anti-PM/Scl	Complexe peptidique formant un exosome	17 (9 %)	38 (21 %)	3 (8 %)
Anticorps associés aux myosites				
- Anti-Ro60 (SSA)	Ribonucléoprotéine	5 (3 %)	8 (4 %)	4 (11 %)
- Anti-Ro52		24 (27 %)	44 (24 %)	8 (21 %)
- Anti-La (SSB)		12 (6 %)	6 (3 %)	3 (8 %)
- Anti-U1 RNP	Complexe ribonucléique	17 (9 %)	7 (4 %)	1 (3 %)

Figure 6: Anticorps spécifiques et/ou associés aux myosites (Dimitri 2009). L'imagerie telle que l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut aider au diagnostic, statuer de l'étendue de l'atteinte, et orienter la biopsie (Castro and Gourley 2012).

3.1.4 Physiopathologie des myosites inflammatoires

La physiopathologie des myosites inflammatoires n'est pas encore bien élucidée, de même que le rôle des anticorps. L'hypothèse la plus plausible met en avant une lésion musculaire initiale qui peut être non spécifique: virale, médicamenteuse, toxique (UV) ou ischémique. Cette lésion induit une surexpression d'auto-antigènes et une surexpression du CMH de classe I, notamment dans les myoblastes en régénération (Emslie-Smith, Arahata et al. 1989). De même que dans le Dt1, ce mécanisme initiateur n'est actuellement pas connu. Dans un deuxième temps, dans le muscle inflammatoire, les auto-antigènes pourraient subir des modifications conformationnelles qui les rendraient plus susceptibles à un clivage enzymatique par exemple par le granzyme B (Casciola-Rosen, Andrade et al. 1999). L'altération de ces auto-antigènes musculaires modifie leurs fonctions enzymatiques, aggravant ainsi le stress cellulaire et l'apoptose. De plus, certains fragments de ces auto-antigènes comme la portion NH2 terminal de Jo-1 peuvent se lier sur le récepteur CCR5 des cellules dendritiques et des lymphocytes expliquant le recrutement des populations immunitaires (Howard, Dong et al. 2002). D'autres fragments vont être internalisés par les cellules dendritiques, puis présentés et vont participer à l'activation des LT-CD4⁺, des LT-CD8⁺ et des LB autoréactifs. L'activation des lymphocytes induit la libération de cytokines, la destruction des cellules musculaires via les perforines, et la formation d'auto-anticorps, respectivement (Dalakas 2011; Castro and Gourley 2012).

3.1.5 Les modèles expérimentaux de myosites.

Un modèle de myosite a été créé chez la souris par l'induction d'une surexpression des molécules CMH de classe I dans le muscle, via un vecteur utilisant le promoteur de la créatine kinase, enzyme spécifique du muscle. Ces souris développent systématiquement une polymyosite associée à des auto-anticorps anti-histidyl-ARNt-synthétases dans 35% des cas. L'infiltrat musculaire est composé de macrophages, monocytes et de quelques lymphocytes T. L'atteinte musculaire est comparable aux myosites observées au cours des traitements par l'IFN- α chez l'homme (Nagaraju, Raben et al. 2000). Cependant, l'origine immunitaire de cette atteinte est débattue. En effet, l'inactivation des gènes *Rag* chez ces même souris accélère significativement la survenue de la myopathie que l'on qualifie alors de fulgurante. Cette observation suggère donc le système immunitaire adaptatif n'est pas pathogène le développement de la myopathie chez ces souris (O. Boyer et al. Non publié).

Un autre modèle de myosite induite chez la souris a été développé, via une technique d'immunisation. Les souris sont immunisées par de la myosine de lapin ou de souris, avec de l'adjuvant complet de Freund. Toutes les souris développent une myosite après immunisation. Cette myosite est plus sévère après déplétion en LT-CD4⁺ régulateurs. Dans ce modèle, on observe une surexpression du CMH de classe I dans le muscle, ainsi que la présence d'anticorps anti-Jo-1, PL-7 et Ku dans 19 % des cas (Allenbach, Solly et al. 2009).

Chez le rat, un modèle de myosite induite après immunisation par la protéine C humaine avec de l'adjuvant complet de Freund a été publié. Dans ce modèle, le traitement par anticorps anti-ICOS (Inducible costimulator) diminue la sévérité et l'incidence de la maladie (Katsumata and Ascherman 2008).

L'équipe du professeur Boyer a développé une souris transgénique exprimant l'ovalbumine dans le muscle (ova). Cependant, ces souris ne développent pas de myosite après immunisation, ni après expression transgénique d'un clone de LT anti-ova (Calbo, Delagreverie et al. 2008).

3.1.6 Spécificité des différentes myosites inflammatoires

3.1.6.1 Spécificité de la dermatomyosite

La dermatomyosite peut débuter dans l'enfance comme à l'âge adulte, parfois de façon aiguë. Le déficit musculaire est proximal bilatéral et symétrique. La maladie touche dans un premier temps la ceinture pelvienne puis la ceinture scapulaire. L'atteinte cardiaque est rare, asymptomatique dans 5 à 20 % des cas. Elle peut se manifester par des troubles du rythme, des troubles de la conduction, par une dysfonction myocardique ou par une péricardite. La dermatomyosite est souvent associée à une atteinte cutanée qui est simultanée dans 60 % des cas, la précède de plusieurs semaines à plusieurs mois dans 30% des cas et la suit dans 10 % des cas (Eymard 2003; Rider, Werth et al. 2011). Les lésions cutanées prédominent au niveau des zones exposées au soleil. Deux lésions cutanées sont spécifiques: l'érythème liliacé des paupières, œdémateux ou non, et les papules de Gottrons (aspect infiltré en bandes transversales érythémato-violacées sur la face dorsale des mains en regard des articulations métacarpo-phalangiennes et interphalangiennes). Il existe également un érythème péri-unguéal douloureux à la

pression. Le diagnostic différentiel est le lupus, mais la distribution des lésions cutanées est différente (Eymard 2003).

Selon les anticorps associés à la dermatomyosite, les atteintes peuvent varier. Lorsque les anticorps anti Mi-2 sont positifs, l'atteinte cutanée est constante, la réponse aux corticoïdes est bonne et le pronostic est meilleur. Lorsque les anticorps anti-MDA5 sont positifs, l'atteinte est plus souvent cutanée et articulaire que musculaire. Une atteinte pulmonaire interstitielle est fréquente (Casciola-Rosen and Mammen 2012). La dermatomyosite est la myopathie auto-immune la plus fréquemment associée au cancer, elle est alors associée aux anticorps anti TIF-1 γ (Hoshino, Muro et al. 2010; Casciola-Rosen and Mammen 2012). Il existe une prédisposition génétique liée à certains haplotypes HLA tel que HLA DQA1*0501 notamment pour la forme juvénile (Tezak, Hoffman et al. 2002). L'évolution de la maladie est parfois monophasique, le plus souvent chronique, sensible à la corticothérapie.

Sur le plan histologique, les biopsies musculaires mettent en évidence des fibres musculaires nécrotiques, et des fibres en régénération. A ceci s'ajoute trois lésions spécifiques :

- une micro-angiopathie avec déplétion des capillaires multifocaux associés à une dilatation des microvaisseaux restant,
- une atrophie péri-fasciculaire, avec surexpression du HLA de classe I et des zones de pertes myofibrillaires à l'emporte-pièce sont classiquement observées,
- un infiltrat inflammatoire composé de LT-CD4⁺, de LB, de macrophages et de cellules dendritiques plasmacytoïdes. Cet infiltrat est périnysal et périvasculaire, sans invasion des fibres nécrotiques (van der Pas, Hengstman et al. 2004).

Il s'agit donc d'une myopathie auto-immune où l'auto-immunité est dirigée contre les capillaires entraînant une ischémie musculaire. De façon précoce, le complément C3 est activé, induisant la formation de complexes d'activation macrophagiques (Castro and Gourley 2012).

Le traitement de première intention est la corticothérapie et les immunosuppresseurs tels que le méthotrexate et l'azathioprine. En cas de résistance à ces traitements, la cyclosporine et le tacrolimus peuvent être utilisés. Dans les formes réfractaires, les immunoglobulines intraveineuses, le mycophénolate mofétil (cellcept®), les anti-TNF- α , ou l'anticorps anti-CD20 (Rituximab®) peuvent être proposés (Aggarwal and Oddis 2012).

3.1.6.2 Spécificité de la polymyosite.

La présentation clinique de la polymyosite n'est pas spécifique (Bohan and Peter 1975; Bohan and Peter 1975). La polymyosite peut s'associer à des infections virales telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus H1N1, le human T cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV) ou à des connectivites, mais très rarement à des cancers (Ferri, Colaci et al. 2012). L'association avec certains allèles du HLA a été décrite (HLA DRB1*0301) (Buchbinder, Forbes et al. 2001).

L'évolution de la polymyosite est le plus souvent chronique. Elle est volontiers corticosensible. En cas de résistance à la corticothérapie, l'adjonction d'immunosuppresseurs tels que le méthotrexate, les immunoglobulines polyclonales ou le rituximab (anticorps anti-CD20) peut permettre de contrôler la maladie (Marie and Mouthon 2011).

Histologiquement, une triade caractéristique mais peu spécifique associe:

- un processus de nécrose et de régénération des fibres musculaires,
- un infiltrat inflammatoire de l'endomysium entourant les fibres non nécrotiques avec une invasion focale, composé de LT-CD8⁺, de macrophages et de cellules dendritiques myéloïdes. Cet infiltrat n'est pas spécifique de la polymyosite et est retrouvé très fréquemment dans les myosites à inclusions (Chahin and Engel 2008) (Greenberg, Pinkus et al. 2007).
- une expression sur les fibres musculaires du HLA de classe I.

Le traitement est similaire à celui des dermatomyosites. Les études jugeant de l'efficacité de ces traitements sont souvent réalisées sur de faibles cohortes, et ne sont pas toujours randomisées (Gordon, Winer et al. 2012).

3.1.6.3 Spécificité de la myosite à inclusion

La myosite à inclusion a été décrite pour la première fois en 1967 par Chou *et al.* chez un homme de 66 ans présentant une polymyosite chronique avec des inclusions amyloïdes dans le noyau et le cytoplasme des cellules musculaires (Chou 1967).

La myosite à inclusion est la myopathie la plus fréquente après 50 ans. Le ratio homme/femme est de 3/1. L'atteinte musculaire est asymétrique, proximale chez 90% des patients, mais peut également être distale (Lotz, Engel *et al.* 1989).

On retrouve une autre maladie auto-immune dans 15 à 30% des cas (Needham and Mastaglia 2007). Des associations à des gammopathies monoclonales, à des infections HIV et HTLV ont été rapportées, l'âge au diagnostic est alors inférieur à 50 ans (Dalakas 2005). La myosite à inclusion est associée à le HLA-DR3 (DRB1*0301/0302) dans 75% des cas (Garlepp, Laing *et al.* 1994).

Récemment, un anticorps spécifique d'une protéine de 43 kDa non encore identifiée a été mis en évidence dans 52% des cas de myosite à inclusion (13/25), et n'est pas retrouvé dans les autres myosites (Salajegheh, Lam *et al.* 2011).

Histologiquement, on observe un infiltrat de LT-CD8⁺, une augmentation de l'expression du HLA de classe I sur les fibres musculaires. On retrouve également des dépôts amyloïdes intracellulaires et des inclusions nucléaires ou cytoplasmiques de tubofilaments de 15 à 18 nm. Le muscle biopsié ne doit pas être trop atteint sous peine de ne voir qu'une inclusion graisseuse et une atrophie.

La myosite à inclusion est résistante aux corticoïdes et aux immunosuppresseurs. L'efficacité du traitement par immunoglobulines intraveineuse est controversée (Pequignot-Planche, De Gasquet *et al.* 1977; Walter, Lochmuller *et al.* 2000; Dalakas, Koffman *et al.* 2001). Un nouveau traitement luttant contre l'atrophie musculaire est actuellement à l'essai: le BYM338 (Greenberg 2012).

L'évolution de cette maladie est lente et inexorable, avec des périodes de stabilité spontanée (Rose, McDermott *et al.* 2001).

3.1.6.4 Spécificité de la myopathie nécrosante auto-immune

Cette maladie a longtemps été classée parmi les polymyosites (Hoogendijk, Amato et al. 2004). D'identification récente, la myopathie nécrosante auto-immune est plus fréquente que la polymyosite (Dimitri and Eymard 2012).

Parmi les myopathies nécrosantes auto-immunes, on distingue plusieurs sous types: les myopathies avec anticorps anti-SRP, celles associées à une néoplasie et celles liées à la prise de statine avec positivité de l'anticorps anti-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMGcoA) réductase (Christopher-Stine, Casciola-Rosen et al. 2010; Mammen, Chung et al. 2011).

Le déficit musculaire est le plus souvent aigu, sévère et proximal avec élévation des enzymes musculaires. Les cancers les plus fréquemment associés sont l'adénocarcinome mammaire, bronchique, colorectal et gastrique (Vosskamper, Korf et al. 1989; Levin, Mozaffar et al. 1998).

La positivité des anticorps anti-SRP n'est présente que dans 5% des cas. La sévérité de la maladie est alors variable, avec dans certains cas une atteinte cardiaque résistante aux immunosuppresseurs conduisant au décès, et plus fréquemment une atteinte pulmonaire de pronostic similaire aux polymyosites (pneumopathie interstitielle, sans atteinte cardiaque). La corticorésistance est fréquente, mais l'adjonction d'immunosuppresseur est souvent efficace (Targoff, Johnson et al. 1990; Love, Leff et al. 1991; Hengstman, ter Laak et al. 2006; Dimitri 2009; Dimitri and Eymard 2012).

Histologiquement, il n'y a pas d'inflammation ni surexpression du CMH-I, d'où la difficulté du diagnostic. La nécrose et les fibres de régénération sont présentes. Les lésions peuvent être focales, dispersées ou diffuses. Cependant, il existe un infiltrat macrophagique lié à la nécessaire phagocytose des fibres nécrotiques, sans invasion des fibres non nécrotiques. Des lésions de micro-angiopathie avec déplétion capillaire et élargissement microvasculaire, dépôt de complément sont également fréquentes mais inconstantes.

Ce type de myopathie est corticosensible.

3.2 Les neuropathies auto-immunes

3.2.1 Syndrome de stiff-person et auto-anticorps anti-GAD

Le syndrome de stiff-person (SPS) est lié à une hyperexcitabilité du système nerveux central. L'origine auto-immune de cette maladie est fortement suspectée, puisqu'elle est souvent associée au Dt1, et plus rarement à d'autres maladies auto-immunes. De plus, des auto-anticorps sont souvent présents (Rakocevic and Floeter 2012).

Le tableau clinique associe des courbatures, une fluctuante rigidité musculaire proximale et tronculaire prédominante au niveau abdominal et lombaire, des co-contractions douloureuses des muscles agonistes et antagonistes sans décontraction, des spasmes induits par des stimuli sonores, tactiles ou émotionnels, une absence de syndrome pyramidal ou extra pyramidal, une déformation du rachis, et une amélioration des symptômes par les benzodiazépines qui activent le récepteur GABA, réduisant l'excitabilité des neurones post synaptiques (Levy, Dalakas et al. 1999).

La GAD est une enzyme présynaptique responsable de la synthèse de gamma-aminobutyric acide (GABA) à partir du glutamate. Cette enzyme est principalement exprimée dans l'îlot et dans les neurones gabaminergiques. Les anticorps anti-GAD ont été initialement décrits en 1988 chez un patient porteur d'un SPS, d'une épilepsie et d'un diabète, puis dans le Dt1 (Solimena, Folli et al. 1988; Baekkeskov, Aanstoot et al. 1990; Christgau, Schierbeck et al. 1991; Ellis and Atkinson 1996). Ces anticorps sont retrouvés dans 90% des cas de SPS, et dans 80 à 90% des cas de Dt1 (Murinson, Butler et al. 2004; Taplin and Barker 2008).

Cependant, la spécificité antigénique des anticorps anti-GAD présents dans le SPS est différente de celle retrouvée dans le diabète. Par exemple, l'anticorps anti-GAD retrouvé dans le SPS se lie à la protéine GAD dénaturée, à la différence des anticorps anti-GAD présents dans le sérum de patients diabétiques (Baekkeskov, Aanstoot et al. 1990). Il existe deux isoformes de la GAD de 65 KD et 67 KD, codées par deux gènes différents. Si le sérum de patients atteints de SPS reconnaît la GAD 67, le sérum d'un patient diabétique de type 1 ne la reconnaît pas. Le sérum de patients atteints de SPS reconnaît avec une intensité cent fois supérieure la GAD 65 par rapport au sérum de patients diabétiques (Butler, Solimena et al. 1993; Daw, Ujihara et al. 1996).

De plus, l'activité de ces deux anticorps est différente. En effet, les anticorps anti-GAD d'un malade atteint de SPS sont capables d'inhiber l'activité de la GAD suggérant que l'anticorps se lie au site de l'activité enzymatique de la GAD ou de la transmission GABAminergique, contrairement aux anticorps anti-GAD de patients ayant un Dt1 isolé (Dinkel, Meinck et al. 1998; Ishida, Mitoma et al. 1999). D'autres auto-anticorps peuvent être retrouvés tels que les anticorps anti-gliadine, anti-RNP, anti-nucléaires (Rakocevic and Floeter 2012).

Sur le plan génétique, l'association avec le HLA DRB1 et DQB1 est retrouvée chez 75 % des patients ayant un Dt1 et un SPS (Rakocevic and Floeter 2012).

En dehors des benzodiazépines, les corticoïdes, les échanges plasmatiques, les immunoglobulines intraveineuses peuvent être efficaces. Plus récemment, le rituximab® (anti-CD20) a prouvé son efficacité dans le SPS (Baker, Das et al. 2005; Bacorro and Tehrani 2010).

3.2.2 Le syndrome de Guillain Barré

3.2.2.1 Introduction

Le syndrome de Guillain Barré (SGB) est une polyradiculonévrite inflammatoire aiguë avec démyélinisation segmentaire multifocale (figure 7). Cette maladie est caractérisée par une perte sensitive et motrice secondaire à une atteinte des nerfs périphériques. Elle a été décrite par Guillain, Barré et Stohl en 1916. L'incidence de cette maladie est de 1 à 2 pour 100 000 habitants par an. Le risque de développer un SGB augmente avec l'âge et touche plus souvent les hommes que les femmes (Sejvar, Baughman et al. 2011; Greenberg and Vearrier 2012).

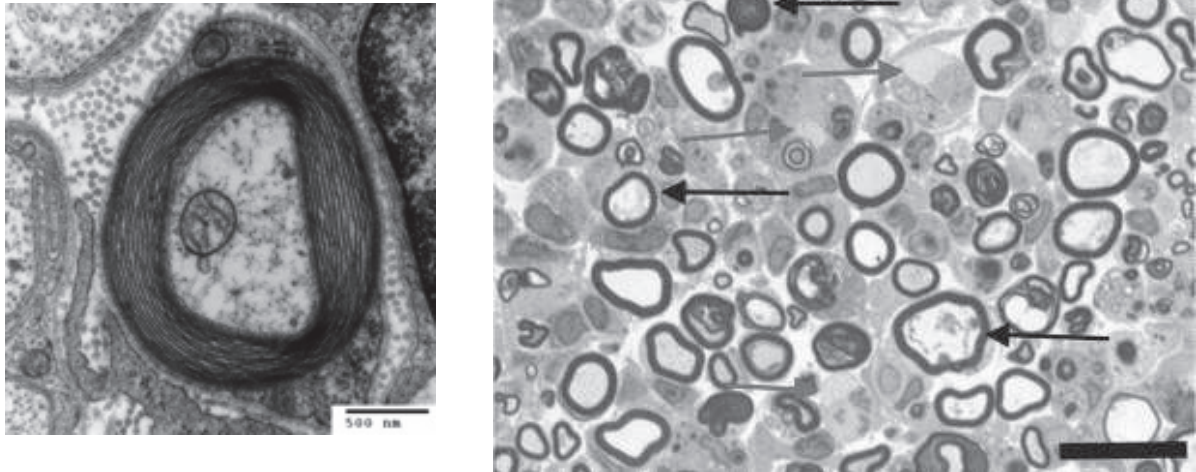


Figure 7: Analyse histologique d'un patient atteint d'un SGB, 8 jours après le début des symptômes. Il existe des axones démyélinisés (flèches pointant vers la droite) et des axones en voie de dégénération (flèches pointant vers la gauche). Coloration bleu de toluidine (— = 20 μ m) (Hadden, Gregson et al. 2001).

3.2.2.2 Tableau clinique

Les patients présentent une diminution progressive, symétrique et distale de la force musculaire des membres inférieurs, suivie d'une atteinte des bras, puis des nerfs crâniens et du bulbe rachidien. L'atteinte musculaire est parfois associée à des paresthésies. Les réflexes ostéotendineux sont faibles ou abolis. Dans un quart des cas, on note une atteinte des nerfs diaphragmatiques et intercostaux conduisant à une détresse respiratoire (Orlikowski, Prigent et al. 2004; Akbayram, Dogan et al. 2011).

Le plus souvent le SGB est réversible après 4 semaines environ. Une faiblesse musculaire peut persister dans 20% des cas. La mortalité est estimée à 3-12% des cas (Alshekhlee, Hussain et al. 2008) (Hughes and Cornblath 2005).

3.2.2.3 Examens complémentaires

Le diagnostic est principalement clinique et électrophysiologique (augmentation des latences distales sensitives et motrices, diminution des vitesses de conduction, bloc de conduction) (figure 8). Sur le plan biologique, un syndrome inflammatoire peut être retrouvé. Les sérologies virales sont effectuées de principe. La ponction lombaire retrouve un liquide clair, hyperprotéinorachique, avec une réaction inflammatoire modérée: entre 10 et 50 cellules par mm^3 , sans germe. Les anticorps anti-gangliosides (anti-GM1, GD1a, GD1b, GT1b et GQ1b) sont détectés dans 17 % des cas, mais ne sont pas spécifiques. En effet, ils sont retrouvés dans d'autres maladies neurologiques auto-immunes telles que la démyélinisation aiguë inflammatoire, (anti-GM1 positifs dans 25% des cas), ou le syndrome de Miller Fisher (anti-GQ1b positifs dans 95 % des cas) (Kusunoki and Kaida 2011).

Sur le plan histologique, on retrouve un infiltrat de cellules T et de macrophages dans les nerfs périphériques, ainsi qu'un dépôt d'anticorps et de complément (Meyer Zu Horste, Reiners et al. 2009).

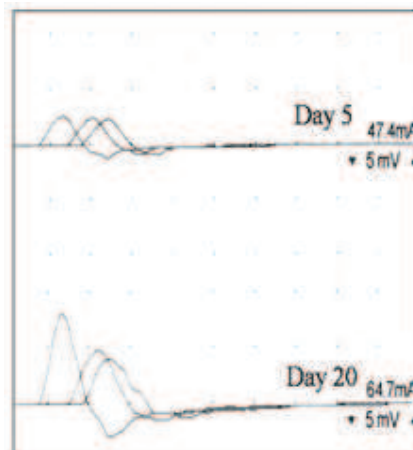


Figure 8: Anomalies électrophysiologiques observées lors d'un SGB. Les potentiels d'action sont diminués, ainsi que la vitesse de conduction, la latence distale est augmentée (Hong, Sung et al. 2011).

3.2.2.4 Physiopathologie

L'origine auto-immune du SGB est fortement suspectée. Le SGB survient dans 2/3 des cas après une infection bactérienne ou virale, le plus souvent digestive ou pulmonaire, par

exemple, après une infection à *Campylobacter jejuni*. Cette infection entraîne la formation d'anticorps qui croisent avec les résidus gangliosidiques des nerfs périphériques. C'est le concept du «mimétisme moléculaire». Des infections virales impliquant le virus influenza, le virus d'immunodéficience acquise, le mycoplasme pneumoniae, l'Epstein Barr virus, le cytomégalovirus sont parfois décrite précédant un SGB (Mori, Kuwabara et al. 1999; Susuki, Odaka et al. 2004; Tsugawa, Nikaido et al. 2004).

La relation avec l'infection à *Campylobacter jejuni* a été évoquée par une étude prospective retrouvant une infection dans 26% des cas lors d'un SGB contre 2% des cas chez les patients contrôles (Rees, Soudain et al. 1995; Poropatich, Walker et al. 2010). De plus, on retrouve des anticorps similaires à ceux retrouvés dans le SGB (anti-GM1 et anti-gangliosidique GD1a) après infection à *Campylobacter jejuni* (Yuki, Yoshino et al. 1990; Ho, Willison et al. 1999).

3.2.2.5 Traitement

Le traitement consiste en l'échange plasmatique ou en l'administration intra veineuse d'immunoglobulines polyclonales. Des études prospectives ont été menées démontrant l'efficacité des échanges plasmatiques, lorsqu'ils sont administrés dans les premières semaines (El-Bayoumi, El-Refaey et al. 2011; Hughes, Swan et al. 2012; Raphael, Chevret et al. 2012). Les traitements immunosupresseurs classiques tels que l'azathioprine, le methotrexate, le cyclophosphamide ont montré un effet bénéfique, mais les données sont peu nombreuses (Kieseier, Wiendl et al. 2006; Kieseier, Lehmann et al. 2012). L'efficacité des anticorps monoclonaux tels que l'anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) reste à démontrer (Wolf, Menge et al. 2010).

Il existe plusieurs syndromes proches du SGB: le syndrome de Fisher, la polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante (CIDP), la neuropathie axonale sensitive et motrice (AMSAN) et la neuropathie axonale motrice (AMAN) avec une dégénérescence axonale isolée sans inflammation ni démyélinisation (Hughes and Cornblath 2005).

3.2.3 Le syndrome de Miller-Fischer

Le syndrome de Miller-Fischer, décrit en 1956 associe la triade suivante: ataxie, ophtalmoplégie, aréflexie (Overell and Willison 2005). C'est une forme de syndrome de SGB où la faiblesse des membres inférieurs et supérieurs est absente, et où l'atteinte sensitive est mineure. On retrouve également une association fréquente de syndrome de Fischer avec l'infection à *Campylobacter jejuni* (18% des cas) (Rees, Soudain et al. 1995; Schmidt-Ott, Schmidt et al. 2006). Comme dans le SGB, des anticorps anti-gangliosides anti-GQ1b sont détectés dans 95% des cas (Chiba, Kusunoki et al. 1993; Kaida, Morita et al. 2007). La plupart des symptômes régressent en 6 mois. Le traitement est identique à celui du SGB (Lo 2007).

3.2.4 La polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante

Comme le SGB, la polyneuropathie chronique inflammatoire démyélinisante (CIDP) est une polyneuropathie médiée par le système immunitaire, entraînant une démyélinisation. Elle se caractérise également sur le plan clinique par une perte de la sensibilité et de la force musculaire, symétrique, progressive, à la fois proximale et distale, avec une aréflexie ostéo-tendineuse. L'installation est plus insidieuse (plus de deux mois). L'électromyogramme est en faveur d'une neuropathie démyélinisante et le liquide céphalo-rachidien montre une hypercellularité aseptique (Dalakas 2011). La biopsie nerveuse est négative dans 18% des cas. L'atteinte est le plus souvent moindre que pour le SGB. Une étude histologique sur 56 patients met en évidence une démyélinisation dans 48% des cas, une atteinte axonale dans 21% des cas, une atteinte mixte dans 13% des cas (Barohn, Kissel et al. 1989). La CIDP est dans 30% des cas associée à la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) (Bromberg, Feldman et al. 1992).

Le traitement consiste en l'administration d'immunoglobulines polyclonales et doit être commencé dans les 3 premières semaines (Nimmerjahn and Lunemann 2011).

3.2.5 La neuropathie axonale sensitive et motrice

La neuropathie axonale sensitive et motrice (AMSAN) a un début brutal avec des signes moteurs et sensitifs. L'atteinte respiratoire est très précoce et le pronostic est beaucoup plus péjoratif, avec des séquelles fréquentes. Seuls 20% des patients marchent après l'épisode aigu (Hughes and Cornblath 2005).

3.2.6 La neuropathie axonale motrice

La neuropathie axonale motrice (AMAN) se distingue du SGB tant sur le plan clinique que para-clinique. Le début de la maladie est plus brutal, et l'atteinte est purement motrice. De plus, le profil des anticorps anti-gangliosides dans l'AMAN est différent avec la présence des anticorps anti-GM1, GD1a, GD1b et l'absence de l'anticorps anti-GQ1b (Waksman and Adams 1955).

Sur le plan histologique, on n'observe pas de lésion des gaines de myéline, mais un infiltrat macrophagique au niveau des nœuds de ranvier. Les séquelles sont rares (3%).

3.2.7 Modèles expérimentaux

Il existe un modèle animal de neuropathie périphérique auto-immune chez le lapin, appelé neuropathie allergique expérimentale (EAN). Les lapins ont été immunisés par des extraits de nerfs sciatiques de lapin avec du bacille de Koch en guise d'adjuvant, induisant après 14 jours une faiblesse musculaire, des troubles de la statique et de la marche, et à un stade avancé des troubles respiratoires. L'intensité maximum des symptômes est atteinte en 3 jours. La majorité des lapins récupère en six jours. Une infiltration périvasculaire de lymphocytes et de cellules macrophagiques est présente dans les ganglions sensitifs, les nerfs périphériques et les racines nerveuses postérieures, mais n'est pas retrouvée dans le système nerveux central (Waksman and Adams 1955).

Une polyneuropathie auto-immune spontanée a été observée chez des souris exprimant une seule molécule de CMH de classe II: IA^b et surexprimant l'IL10 (Dace, Khan et al. 2009). Chez la souris NOD, l'invalidation de certaines molécules de costimulation des LT

induit une neuropathie auto-immune spontanée (détaillée plus loin) (Salomon, Rhee et al. 2001; Prevot, Briet et al. 2010).

4 LES VOIES DE COSTIMULATION

4.1 Principe de la costimulation lymphocytaire T

La réponse immunitaire adaptative est finement régulée. L'activation lymphocytaire nécessite plusieurs niveaux de signaux, contrôlant la réponse lors de la reconnaissance partielle ou complète d'un antigène par son TCR (Baxter and Hodgkin 2002).

Le premier signal est assuré par l'interaction du TCR avec le peptide présenté par le CMH induisant une activation partielle du LT conduisant, en l'absence de deuxième signal, à une anergie ou une ignorance immunitaire (Lafferty, Andrus et al. 1980). Les lymphocytes ne pourront plus être activés même s'ils rencontrent une nouvelle fois leur antigène en présence de signaux complémentaires (Schwartz 2003).

Lors d'une primo-activation, un deuxième signal, indépendant de l'antigène, est assuré par des voies de costimulation. Ce double signal permet l'activation et la prolifération d'un LT naïf. Plus récemment, il a été prouvé que ce deuxième signal était également important pour la survie et la prolifération des populations lymphocytaires mémoires (Chen 2004; Zehn, King et al. 2012). Ce concept de double signal permet d'expliquer tant l'activation lymphocytaire que l'induction d'une tolérance (figure 9) (Jenkins and Schwartz 1987). Les signaux de costimulation sont délivrés en situation physiologique par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les voies de costimulation peuvent transmettre un signal soit activateur soit inhibiteur (Carreno and Collins 2002). En cas d'inflammation, des cellules non-immunitaires peuvent exprimer des molécules de costimulation (Sharpe and Freeman 2002). Dans des cas rares de forte affinité du TCR pour le complexe peptide/CMH, le LT peut s'affranchir d'un signal de costimulation pour son activation.

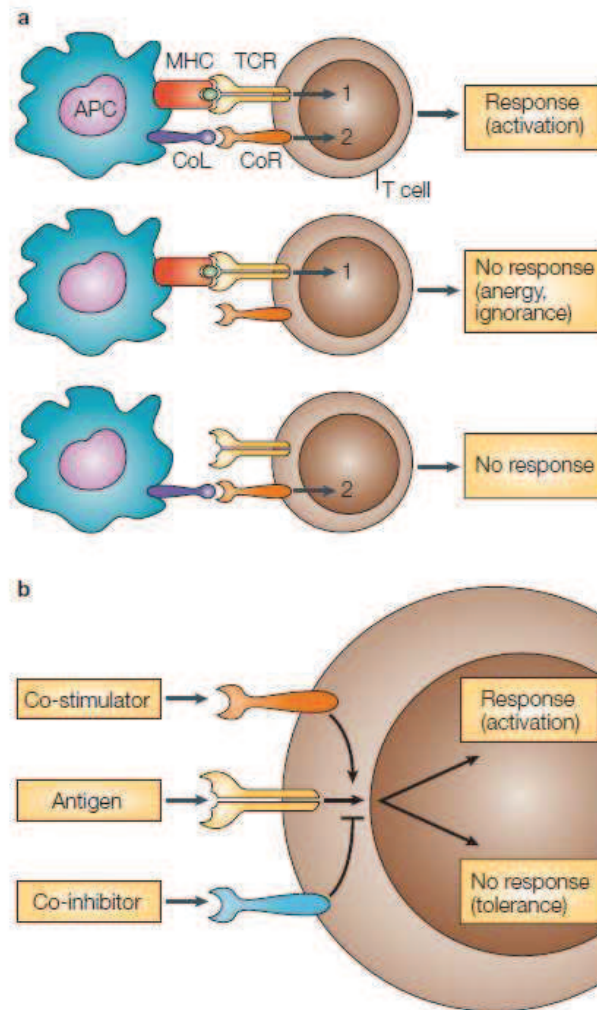


Figure 9: Principe de la costimulation lymphocytaire T. (a) L'activation lymphocytaire nécessite un premier signal assuré par le complexe CMH/peptide/TCR. Un deuxième signal est nécessaire à la primo-activation d'un lymphocyte T. Ce deuxième signal est assuré par les voies de costimulation. En l'absence de l'un ou l'autre de ces signaux, il n'y a pas d'activation lymphocytaire (anergie ou ignorance). (b) Les signaux de costimulation peuvent être activateurs ou inhibiteurs (Chen 2004).

Un troisième signal médié par les cytokines module la réponse T. La présence d'une cytokine qui peut être secondaire à l'engagement d'une voie de costimulation module le phénotype fonctionnel du LT. La présence d'IL-4 oriente le LT-CD4⁺ vers un phénotype Th2, alors que la présence d'interféron γ (IFN- γ) oriente vers un phénotype Th1 (Mosmann and Coffman 1989).

On distingue plusieurs superfamilles de voies de costimulation :

- la famille des *tumor necrosis factor* (TNF) et leurs récepteurs (TNFR),
- la famille TIM (T-cell Ig and mucin),
- la famille CD28/B7.

4.2 Les voies TNF/TNFR (TNFSF/TNFRSF)

4.2.1 Généralités

La superfamille des TNF comporte à ce jour 19 ligands et 29 récepteurs. Tous les membres de cette superfamille ont une activité pro-inflammatoire via l'activation, entre autre, du facteur de transcription NF- κ B. Certains membres de cette superfamille sont également impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules hématopoïétiques. Ainsi OX40L, CD40L, CD27L, APRIL (proliferation-inducing ligand) et BAFF (B-cell activating factor) stimulent la prolifération via l'activation de kinases tandis que TNF- α , TNF- β , FasL et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) contrôlent l'apoptose et tandis que EDA-A1, EDA-A2, TNF- α , et FasL régulent la morphogenèse (figure 10) (Aggarwal, Gupta et al. 2012).

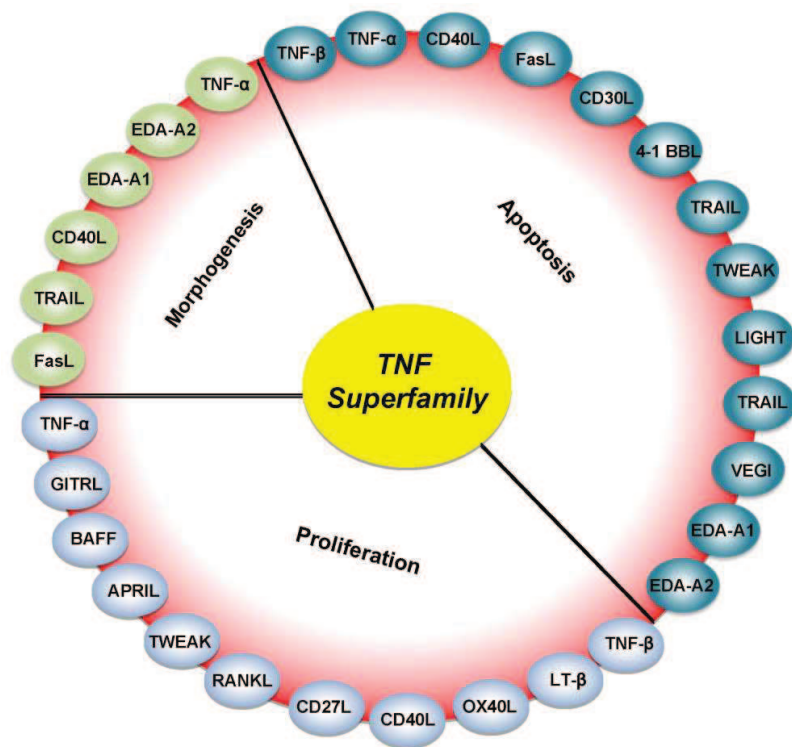


Figure 10: Rôles des différents membres de la superfamille des TNF/TNFR. Cette superfamille est impliquée dans l'inflammation, la prolifération, l'apoptose et la morphogenèse (Aggarwal, Gupta et al. 2012).

A ces ligands s'associe 29 récepteurs différents, nommé TNFR ou TNFRSF. L'expression sur les différents types cellulaires et l'interaction des différents membres de cette superfamille sont détaillées figure 11.

TNF family receptors			TNF family ligands		
Molecule (alternative names indicated)	Expressed by	Expression	Molecule (alternative names indicated)	Expressed by	Expression
CD27 (TNFRSF7)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells B cells (subset) NK cells (subset) FOXP3 ⁺ Treg cells NKT cells Hematopoietic progenitors	Constitutive Inducible Constitutive Constitutive/inducible Constitutive Constitutive	CD70 (TNFSF7)	APCs (DCs and B cells) CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Mast cells NK cells Smooth muscle Thymic epithelium	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Constitutive
DR3 (TNFRSF25)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells NK cells NKT cells FOXP3 ⁺ Treg cells LTI cells	Constitutive/inducible Inducible Constitutive Constitutive/inducible Constitutive	TL1A (TNFSF15)	APCs (DCs, B cells, macrophages) CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Endothelial cells	Inducible Inducible Inducible
OX40 (CD134 and TNFRSF4)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells NK cells NKT cells FOXP3 ⁺ Treg cells Neutrophils	Inducible Inducible Inducible Constitutive/inducible Inducible	OX40L (CD252 and TNFSF4)	APCs (DCs, B cells, macrophages) CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells LTI cells NK cells Mast cells Endothelial cells Smooth muscle	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible
4-1BB (CD137 and TNFRSF9)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells NK cells NKT cells Mast cells Neutrophils FOXP3 ⁺ Treg cells DCs Endothelial cells Eosinophils Osteoclast precursors	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Constitutive/inducible Inducible Inducible Inducible Inducible	4-1BBL (TNFSF9)	APCs (DCs, B cells, macrophages) CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Mast cells NK cells Smooth muscle Hematopoietic progenitors Osteoclast precursors	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Constitutive Inducible
CD30 (TNFRSF8)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells B cells NK cells Macrophages Eosinophils	Inducible (constitutive in transformed cells) Inducible (constitutive in transformed cells) Inducible Inducible Inducible Inducible	CD30L (CD153 and TNFSF8)	T cells B cells Mast cells Monocytes Neutrophils Eosinophils	Inducible Inducible Inducible Inducible Constitutive Inducible
CD40 (TNFRSF5)	Basophils APCs (DCs, B cells, Macrophages) Epithelial cells Endothelial cells Smooth muscle cells Fibroblasts	Constitutive Constitutive Inducible Constitutive Inducible Inducible	CD40L (CD154 and TNFSF5)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells B cells Eosinophils Mast cells Monocytes Macrophages NK cells Endothelial cells Smooth muscle cells Epithelial cells	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible
HVEM (CD270 and TNFRSF14)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells APCs (DCs, B cells, Macrophages) NK cells Neutrophils Mucosal epithelium FOXP3 ⁺ Treg cells	Constitutive Constitutive/inducible Constitutive Constitutive Constitutive Constitutive/inducible	LIGHT (CD258 and TNFSF14)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells B cells DCs NK cells Granulocytes and monocytes	Inducible Inducible Inducible Inducible Inducible
LTβR (TNFRSF3)	Stromal cells Epithelial cells DCs and macrophages Fibroblasts	Constitutive Constitutive Constitutive Constitutive	LTα1β2	T cells B cells NK cells	Inducible Constitutive Constitutive
GITR (CD387 and TNFRSF18)	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells NK cells NKT cells B cells FOXP3 ⁺ Treg cells Macrophages DCs	Constitutive/inducible Inducible Constitutive/inducible Constitutive/inducible Constitutive Constitutive/inducible Inducible	GITRL (TNFSF18)	APCs (DCs, B cells, macrophages) CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Endothelial cells	Constitutive Inducible Constitutive

Figure 11: Expression cellulaire des ligands et des récepteurs de la superfamille TNF/TNFR (Croft, Duan et al. 2012).

Les TNFR peuvent être classés en deux catégories :

- les récepteurs à domaine de mort (*death domain-containing receptor*), nommé DR1 (TNFR1), DR2 (Fas), DR3 (récepteur de VEGI (vascular endothelial cell-growth inhibitor)), DR4 et DR5 (se liant à TRAIL) et DR6. Ces récepteurs sont exprimés sur la plupart des cellules. L'engagement de ces récepteurs induit un signal d'apoptose via l'activation des caspases (Aggarwal 2003; Wu 2004).
- les récepteurs n'ayant pas de domaines de mort cellulaire, recrutant notamment les protéines TRAF (*TNF receptor associated factor*) (Cabal-Hierro and Lazo 2012).

La plupart des ligands de cette superfamille sont solubles et se lient aux récepteurs transmembranaires. Il existe quelques exceptions: FasL, Cd27L, CD30L, CD40L, OX40L et 4-1BBL qui sont des protéines transmembranaires. Le TNF- α est exprimé sous les deux formes (solubles et transmembranaires) alors que le TNF- β n'est exprimé que sous forme soluble (Aggarwal 2003; Richter, Messerschmidt et al. 2012).

Une particularité de cette voie est le signal inverse: le signal n'est pas transmis du ligand au récepteur mais du récepteur vers la cellule possédant le ligand dans sa forme transmembranaire (Watts, Hunt et al. 1999; Cabal-Hierro and Lazo 2012).

La voie TNF/TNFR est impliquée dans beaucoup de pathologies auto-immunes et inflammatoires (figure 12).

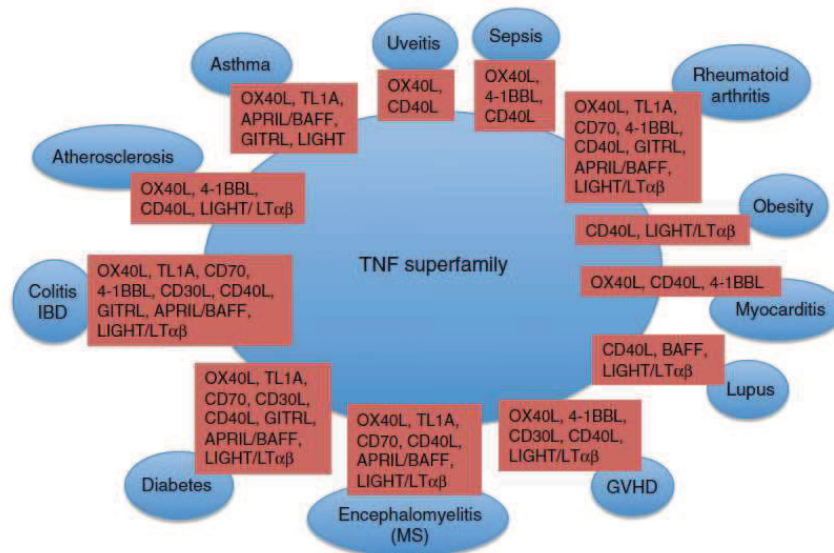


Figure 12: Implications des différents membres de la superfamille TNF/TNFR dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires (Croft, Duan et al. 2012).

4.2.2 La voie CD40/CD40L

CD40 a été initialement caractérisé à la surface des LB et le CD40L sur les LT, dans les années 1990 (Paulie, Rosen et al. 1989; Noelle, Roy et al. 1992). Cette voie apporte un signal de régulation de l'expansion clonale, de la production d'anticorps, de commutation isotypique des anticorps et de différenciation en réponse mémoire humorale (Bishop and Hostager 2003).

CD40 est exprimé sur les cellules basophiles, les APC, les DC, les plaquettes, les cellules béta, les cellules endothéliales de façon constitutive et sur le muscle lisse, les fibroblastes et cellules épithéliales de façon inductible (Klein, Barbe-Tuana et al. 2005; Barbe-Tuana, Klein et al. 2006; Engel, Seijkens et al. 2009). L'expression du CD40 augmente lors de la migration des DC de la périphérie vers le ganglion lymphatique drainant en réponse à une infection (Rau, Hildt et al. 2012).

CD40L est exprimé après activation sur les LT-CD8⁺, les LT-CD4⁺, les LB, les éosinophiles, les mastocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes, les cellules NK (natural killer), les cellules endothéliales, épithéliales et les cellules musculaires lisses. Il existe

également une forme soluble de CD40L, issue des LT et des plaquettes (Seijkens, Engel et al. 2010; Hachem, Yacoub et al. 2012).

L'engagement de cette voie entraîne une sécrétion d'IL-12 par les DC polarisant les LT-CD4⁺ vers une réponse Th1, une prolifération des LT-CD8⁺, ainsi qu'une activation des cellules NK (O'Sullivan and Thomas 2003). CD40 a également été retrouvé sur les LT-CD8⁺ activés, contribuant à renforcer l'immunité adaptative contre les agents pathogènes et sur les LT-CD4⁺ activés contribuant au maintien de la réponse anti-infectieuse ou auto-immune dans le modèle du Dt1 de la souris NOD, des maladies inflammatoires intestinales, du lupus et de la polyarthrite rhumatoïde (Lutgens, Gorelik et al. 1999; Munroe 2009; Inoue, Niikura et al. 2012; Rau, Hildt et al. 2012). La voie CD40/CD40L a également un rôle majeur dans l'athérosclérose, contribuant au développement des plaques d'athéromes (Tousoulis, Androulakis et al. 2010).

4.2.3 La voie CD27/CD70

CD27 est exprimé de façon constitutive sur les LT, les cellules NK et NKT, son expression augmente après engagement du TCR. L'expression du CD27 est inducible sur les LB et les LT régulateurs (de Jong, Loenen et al. 1991; Claus, Riether et al. 2012). Il existe une forme soluble du CD27, utilisée comme marqueur d'activation du système immunitaire. Une élévation du CD27 soluble est retrouvée chez des patients porteurs de lymphome B (Goto, Tsurumi et al. 2012).

L'expression de son ligand, le CD70 sur les LB, les LT, les NKT, les mastocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules dendritiques nécessite des signaux pro-inflammatoires ou de costimulation à l'exception des cellules thymiques où son expression est constitutive (Tesselaar, Xiao et al. 2003; Nolte, van Oeffen et al. 2009)

L'engagement de la voie CD27/CD70 favorise la prolifération, la survie des LT et des LB via Bcl-X(L) notamment (Song and Powell 2012). De plus cette voie favorise la formation de populations mémoires, et la collaboration entre les LT-CD4⁺ auxiliaires et les LT-CD8⁺ (Powell, Dudley et al. 2005; Xiao, Peperzak et al. 2008; Feau, Garcia et al. 2012).

Le blocage de la voie CD27/CD70 a été étudié dans le modèle de l'arthrite au collagène, de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) et entraîne une amélioration des symptômes (Nakajima, Oshima et al. 2000; Oflazoglu, Boursalian et al. 2009).

4.2.4 La voie OX40/OX40L

OX-40 est présent après activation à la surface des LT-CD4⁺, des LT-CD8⁺, des cellules NK, des NKT, et des neutrophiles, et de façon constitutive sur les LT régulateurs. Son ligand est exprimé par les LB, les LT, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK, les mastocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses après activation ou inflammation (Akiba, Oshima et al. 1999; Nakae, Asano et al. 2001).

L'engagement de la voie OX40/OX40L favorise à la fois la voie Th1 et Th2 (Jenkins, Perona-Wright et al. 2007; Qui, Hagymasi et al. 2011). Cette voie entraîne une augmentation de la production d'IL-2 et une inhibition du phénomène d'induction de mort cellulaire des LT activés (AICD), prolongeant leur survie via l'expression de molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X(L). Cette voie favorise la prolifération et l'activation des LT-CD8⁺ et des NKT, et l'orientation vers un phénotype mémoire (Croft 2003; Hirschhorn-Cymerman, Rizzuto et al. 2009). L'engagement de cette voie entraîne également une production importante d'IL-4, orientant les LT-CD4⁺ vers un phénotype Th2, conduisant à la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-13 et participant au maintien de la réponse B mémoire (Kaur and Brightling 2012). De plus, OX40 semble avoir un rôle dans l'homéostasie des LT régulateurs (Takeda, Ine et al. 2004). En effet, si la souris déficiente en OX40 a un nombre réduit de LT CD4⁺CD25⁺, une augmentation du nombre de LT CD4⁺CD25⁺ est observée chez la souris surexprimant OX40L (Piconese, Valzasina et al. 2008). L'engagement de la voie OX40/OX40L stimule Akt et stat5, induisant une prolifération des LT régulateurs qui expriment moins foxp3, et dont les propriétés suppressives sont moindres (Vu, Xiao et al. 2007; Xiao, Gong et al. 2012).

Par ailleurs, il a été démontré dans le modèle de l'EAE que l'inhibition de cette voie diminue les processus auto-immuns (Weinberg, Vella et al. 1998; Lathrop, Huddleston et al. 2004). Dans le modèle de la souris NOD, l'administration d'anticorps bloquant la voie OX40/OX40L diminue l'incidence du diabète lorsque ce traitement est administré à 12 semaines d'âge (Pakala, Bansal-Pakala et al. 2004). Cet effet a été confirmé chez la souris

NOD invalidée pour le gène OX40L qui est protégée du diabète (Martin-Orozco, Chen et al. 2003). Le rôle pathogène de cette voie a également été démontré dans des modèles d'uvéite, de colite inflammatoire, d'asthme, de polyarthrite, et de maladie du greffon contre l'hôte (Siddiqui, Mistry et al. 2010; Wu, Rosenbaum et al. 2011). Cette voie a également un rôle dans le sepsis sévère, les souris OX40L déficientes ont une meilleure survie et une diminution de la production de cytokines lors d'un sepsis sévère comparées aux souris témoins (Karulf, Kelly et al. 2010).

4.2.5 La voie 4-1BB/4-1BBL

4-1BB est exprimé sur les LT-CD4⁺, LT-CD8⁺, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les ostéoclastes et les cellules NK et NKT, après activation. L'expression de 4-1BB est constitutive sur les LT régulateurs.

L'engagement de la voie entraîne la sécrétion de cytokines, la prolifération des LT et la survie des LT mémoires (Lin, Edele et al. 2012). Cette voie favorise la production d'IFN- γ par les LT (Palma, Vendetti et al. 2010). Le ligand est présent sur les cellules présentatrices d'antigène 12 à 24 heures après l'engagement du TCR. L'engagement de cette voie entraîne l'activation des cellules dendritiques, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, et TNF- α), et augmentant leur survie (Choi, Kim et al. 2009). Cette voie est également impliquée dans la maturation et l'activation des LB dans les centres germinaux via les cellules dendritiques (Sun, Blink et al. 2005; Middendorp, Xiao et al. 2009). De plus, l'engagement de cette voie rend les LT résistant à l'effet suppresseur des LT régulateurs et inhiberait la conversion des LT effecteurs en LT régulateurs (Madireddi, Schabowsky et al. 2012). La voie 4-1BB/4-1BBL a un rôle majeur dans l'activité des cellules NK. Ces cellules expriment le ligand en présence d'IL-2 et d'IL-15, conduisant à la stimulation, la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ . Les cellules NK ainsi activées vont favoriser et stimuler la prolifération des LT-CD8⁺. Cette voie de costimulation est donc indispensable au dialogue entre immunité innée et adaptative (Vinay, Choi et al. 2004; Choi, Kim et al. 2010).

L'engagement de cette voie peut activer la cellule exprimant le ligand ou la cellule exprimant 4-1BB, c'est le signal inverse (Shao and Schwarz 2011).

En pathologie, la voie 4-1BB/4-1BBL est impliquée dans l'allergie notamment dans l'asthme, diminuant l'apoptose des éosinophiles et l'activation des Th17, majorant ainsi les phénomènes inflammatoires (Ai, Shi et al. 2012). L'utilisation de l'anticorps anti-4-1BB dans les pathologies cancéreuses (cancer rénal, mélanome) a montré des résultats préliminaires prometteurs (Vinay and Kwon 2012).

4.2.6 La voie HVEM/LIGHT

HVEM a été identifié comme le récepteur du virus herpes, facilitant l'entrée du virus dans la cellule (Stillwell and Tien 1977). HVEM est exprimé de façon constitutive à la surface des LT, des cellules NK, des neutrophiles, des monocytes et des cellules dendritiques immatures. HVEM est hautement exprimé sur les LB naïfs et les LB mémoires mais n'est pas présent sur les LB des centres germinatifs (Duhén, Pasero et al. 2004). A la différence des autres voies, HVEM est capable de se lier à plusieurs ligands LIGHT et LT α appartenant à la superfamille des TNF, mais aussi à d'autres ligands: BTLA (B and T lymphocyte Attenuator) et CD160 appartenant à la superfamille des immunoglobulines, et à une protéine virale (glycoprotéine D du virus herpès simplex) (Shui, Steinberg et al. 2011). HVEM ne possède pas de domaine de mort cellulaire (KroczeK, Mages et al. 2004).

LIGHT est une protéine de 29 KD formant un homotrimer à la surface cellulaire permettant de se fixer à HVEM et d'induire un signal activateur (Bodmer, Schneider et al. 2002). LIGHT se lie à deux récepteurs distincts chez la souris: HVEM, LT β R, et trois chez l'homme où se rajoute DcR3/TR6 (decoy receptor 3). LIGHT est exprimé sur les LT, les LB, les cellules NK, les granulocytes et les monocytes après activation (Morel, Schiano de Colella et al. 2000). Récemment, un nouveau rôle de LIGHT a été mis en évidence favorisant la différenciation des cellules mésenchymateuses en adipocytes (Liu, Ding et al. 2012).

La voie HVEM/LIGHT favorise la survie des LT et des LB mémoires (Simhadri, Hansen et al. 2012). L'engagement de HVEM par LIGHT sur les lymphocytes B naïfs induit la prolifération des LB et la production d'anticorps (Duhén, Pasero et al. 2004). L'engagement de HVEM par LIGHT sur les LT et les cellules NK conduit à leur activation et leur prolifération (Fan, Yu et al. 2006).

L'engagement de HVEM via BTLA, CD160 ou LIGHT induit un signal pro-inflammatoire de type Th1 via le recrutement de TRAF 2 conduisant à l'activation de NF- κ B dans la cellule exprimant HVEM (Cheung, Steinberg et al. 2009). L'engagement de BTLA via HVEM se fait sur un site différent du site de liaison de LIGHT et est capable d'induire un signal inverse pour la cellule exprimant BTLA, conduisant à inhiber les LB et les LT via le recrutement de tyrosine phosphatase SHP2. Il s'agit donc d'un signal inverse vers un ligand n'appartenant pas à la famille des TNF (Sedy, Gavrieli et al. 2005).

HVEM est surexprimé dans des pathologies tumorales telles que la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome ou le mélanome, laissant évoquer une possibilité de traitement anti-cancéreux en bloquant le signal inverse inhibiteur induit par BTLA (Pasero, Speiser et al. 2012).

L'engagement de la voie HVEM/LIGHT est un initiateur de la costimulation des lymphocytes cytotoxiques conduisant au rejet de greffe, et à la réaction du greffon contre l'hôte (Briones, Novelli et al. 2011). L'expression constitutive de LIGHT entraîne une augmentation de la production d'IL-12 par les DC et de cytokines de type Th1 par les LT-CD4⁺, et favorise les maladies auto-immunes notamment intestinales (Xu, Liu et al. 2007; Schaer, Hiltbrunner et al. 2011). L'administration d'anticorps bloquant la molécule LIGHT à des souris NOD de 6 semaines entraîne une diminution de l'incidence du Dt1 (Wang, Lo et al. 2001). Dans d'autres pathologies auto-immunes telles que l'arthrite au collagène ou l'EAE, l'inactivation du gène codant pour HVEM augmente la sévérité de la maladie (Wang, Subudhi et al. 2005).

4.2.7 La voie CD30/CD30L

CD30 est exprimé après activation sur les LT- $\gamma\delta$, les LB, les cellules NK, les macrophages, les éosinophiles et par certains LT-CD4⁺ sécrétant des cytokines de type Th2. Son ligand est présent sur les LT, les LB, les mastocytes, les monocytes, et les éosinophiles après activation, et de façon constitutive sur les neutrophiles. Son expression est fortement dépendante de la voie CD28/B7 ou de la sécrétion d'IL-4 (Shipkova and Wieland 2012).

Le CD30 recrute les protéines TRAF1, 2, 3 et 5 induisant l'activation la voie NF- κ B (Wright, Rumble et al. 2007; Watanabe, Nakano et al. 2011). Comme les autres voies de la famille des TNF/TNFR, l'engagement de la voie CD30/CD30L induit la sécrétion de diverses cytokines: une sécrétion de cytokines de type Th1 par les DC, d'IL-2 par les LT-CD4⁺

diminuant la différenciation des Th17, d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK (Sun, Yamada et al. 2010; Simhadri, Hansen et al. 2012).

L'engagement de cette voie induit également une prolifération lymphocytaire, une activation des cellules NK, une maturation des DC et la survie des LT mémoires (Biswas, Rovere et al. 2000; Umeda, Sun et al. 2011).

En physiopathologie, l'expression du CD30/CD30L est augmentée dans les pathologies malignes telles que la maladie de Hodgkin, les lymphomes malins non hodgkinien et dans les pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le lupus (Oflazoglu, Grewal et al. 2009; Somada, Muta et al. 2012). Elle a un rôle dans les phénomènes immuno-allergiques puisqu'elle induit l'apoptose des éosinophiles (Matsumoto, Terakawa et al. 2004). Concernant le diabète auto immun, l'administration d'anticorps bloquant anti-CD30L inhibe le développement du diabète spontané chez la souris NOD et inhibe le transfert du diabète dans une souris NOD.*scid*. Ces résultats suggèrent que la voie CD30/CD30L a un rôle dans l'induction et dans la phase effectrice du diabète chez la souris NOD (Nandedkar 1992).

4.2.8 La voie GITR/GITRL

GITR a été découvert en 1997 chez la souris (Nocentini, Cuzzocrea et al. 2008). GITR est exprimé à la surface des LT après engagement de la voie CD28/B7, des LB, des cellules NK et NKT, des DC, des macrophages (Ronchetti, Nocentini et al. 2007). Une forme soluble a également été décrite (Nocentini, Ronchetti et al. 2000). Son ligand est une protéine transmembranaire exprimée sur les cellules dendritiques matures et immatures, sur les LB et les macrophages (Yu, Kim et al. 2003). D'autres tissus expriment également GITR tels que les os, la peau, le cerveau et le poumon (Nocentini, Ronchetti et al. 2000; Shin, Kim et al. 2005; Motta, Vissers et al. 2009; Kim, Sonawane et al. 2010).

La voie GITR/GITRL est capable de produire le signal inverse (Placke, Kopp et al. 2010). L'engagement de la voie GITR/GITRL est capable d'induire un stimuli tolérogène via les DC ou pro-inflammatoire via les macrophages (Placke, Kopp et al. 2010).

L'effet de cette voie sur les lymphocytes T est complexe et différent selon les sous populations lymphocytaires T. L'engagement de GITR/GITRL entraîne une diminution de l'AICD (Nocentini and Riccardi 2009). GITR a un rôle dans l'activation, la prolifération et la survie des LT-CD8⁺ qui est indépendant de la voie CD28 (Ronchetti, Nocentini et al. 2007).

L'activation des LT-CD8⁺ via GITR permet une optimisation de la réponse antivirale et anti-tumorale (Snell, McPherson et al. 2010; Cote, Zhang et al. 2011). Le rôle de GITR sur les LT-CD4⁺ est différent. En effet, dans la maladie du greffon contre l'hôte, si la stimulation par un anticorps de la voie GITR entraîne une activation des LT-CD8⁺ alloréactifs du donneur, le même traitement induit un signal tolérogène vis à vis des LT-CD4⁺ alloréactifs du donneur (Muriglian, Ramirez-Montagut et al. 2004).

L'engagement de la voie GITR peut induire l'apoptose des LT-CD4⁺, mais peut également rendre cette population cellulaire moins sensible à l'effet suppresseur des LT régulateurs (Spinicelli, Nocentini et al. 2002; Schaer, Cohen et al. 2010). Pour autant, l'interaction entre les LB et les LT régulateurs via GITR ne diminue pas l'activité suppressive des LT régulateurs, mais entraîne leur prolifération et augmente leur capacité à sécréter de l'IL-10 (Zhou, L'Italien et al. 2007; Ray, Basu et al. 2012).

GITR a également des rôles non immunitaires tels que la croissance du système nerveux sympathique (O'Keeffe, Gutierrez et al. 2008).

En pathologie, l'inhibition de GITR induit l'amélioration de pathologies inflammatoires telles que la pancréatite, la fibrose pulmonaire, la pleurésie (Cuzzocrea, Nocentini et al. 2006; Galuppo, Nocentini et al. 2011). En pathologie auto-immune, le blocage de la voie améliore l'EAE, la thyroïdite (Morris and Kong 2006; Ray, Basu et al. 2012). Chez la souris NOD, l'administration d'un agoniste de GITR augmente l'incidence de diabète, alors que l'administration de l'anticorps bloquant la diminue (You, Poulton et al. 2009). Dans les greffes de peau, l'administration d'anticorps bloquant GITR améliore la survie du greffon (Kim, Sonawane et al. 2010).

4.2.9 Les autres voies TNF

Parmi les autres voies de la famille TNF, la voie APRIL-BAFF se liant à BAFF-R, TACI (transmembrane activator and CAML-interactor), BCMA (B cell maturation) est impliquée dans la survie, la maturation et l'activation des LB (Planelles, Medema et al. 2008; Liu and Davidson 2011). TRAIL et ses récepteurs TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR3) Decoy receptor (DcR1, DcR2) ont un rôle dans l'induction de l'apoptose (Abdulghani and El-Deiry 2010). Les autres voies sont détaillées dans la figure 11.

4.3 Les voies de la famille TIM

TIM est une molécule de costimulation transmembranaire contenant un domaine « V » variable des immunoglobulines, un domaine *mucine-like* (Kuchroo, Umetsu et al. 2003).

Il existe dix molécules TIM chez la souris et trois chez l'homme (*de Souza and Kane 2006*).

TIM1 a été initialement décrit comme un récepteur du virus de l'hépatite A (Kaplan, Totsuka et al. 1996). TIM1 est exprimé dans le foie, les cellules épithéliales du tubule proximal du rein après ischémie, les LT, les LB, les DC et les macrophages (Kuchroo, Umetsu et al. 2003). La partie extracellulaire de TIM1 peut être clivée, conduisant à une forme soluble. Le gène codant pour TIM1 est localisé à proximité des gènes codant pour les cytokines de type Th2, laissant supposer un lien entre TIM1 et la réponse Th2 (Freeman, Casanovas et al. 2010). Ce lien a été démontré dans un modèle d'asthme allergique chez des souris TIM1 KO où l'engagement de TIM1 favorise la voie Th2 (Curtiss, Gorman et al. 2012). TIM4 est le ligand de TIM1, exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes et les macrophages (Rodriguez-Manzanet, Meyers et al. 2008). TIM4 lie également les résidus de phosphatidylsérine présents sur les cellules apoptotiques favorisant la phagocytose de ces cellules par les macrophages (Miyashita, Segawa et al. 2012).

L'engagement de la voie est secondaire à la voie CD28 et entraîne une prolifération lymphocytaire T (Meyers, Chakravarti et al. 2005; Nurtanio and Yang 2011). L'engagement de TIM1 a également un rôle dans l'activité suppressive des LB régulateurs, la modification du domaine *mucine-like* de TIM1 induit une diminution de sécrétion d'IL-10 par ces cellules, une diminution de leur capacité suppressive majorant les manifestations auto-immunes (Xiao, Brooks et al. 2012).

TIM2 est fortement exprimé sur les lymphocytes après une différenciation de type Th2, sur les LB et les cellules épithéliales du foie et du rein (Chakravarti, Sabatos et al. 2005). Initialement décrit comme récepteur de la ferritine, il fait partie des voies de costimulation. Son ligand est la sémaphorine 4A, exprimée sur les macrophages, les LB, les cellules dendritiques et à un moindre degré sur les LT activés (Kumanogoh, Marukawa et al. 2002; Chen, Li et al. 2005; Rodriguez-Manzanet, DeKruyff et al. 2009). La liaison de TIM2 avec la sémaphorine entraîne la production des cytokines IL-2, IL-4 et IL-10. TIM2 diminue la réponse Th2 lors de phénomènes inflammatoires via NFAT-AP1 (Knickelbein, de Souza et al. 2006; Rennert, Ichimura et al. 2006). L'administration d'anticorps bloquant la

sémaphorine inhibe le développement de l'EAE lorsqu'il est administré tôt, inhibant la formation de clones antigènes-spécifiques (Kumanogoh, Marukawa et al. 2002).

TIM3 est exprimé sur les LT-CD4⁺ de type Th1, les DC, les monocytes et les LT-CD8⁺ (Anderson, Anderson et al. 2007). Le ligand de TIM3: la galectine 9 est présent sur les macrophages et les cellules dendritiques. L'engagement de la voie TIM3/galectine 9 bloque la différenciation des Th17, diminue la synthèse d'IFN- γ , induit l'apoptose des cellules Th1 et Th17 et augmente la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Seki, Oomizu et al. 2008). La galectine 9 a également un rôle inhibiteur des Th17 qui lui est propre, par une voie IL-2 dépendante, TIM3 indépendante (Oomizu, Arikawa et al. 2012). Le blocage de TIM3 accélère le diabète chez la souris NOD, bloquant l'activité immunosuppressive des LT régulateurs (Sanchez-Fueyo, Tian et al. 2003).

4.4 Les voies de la superfamille CD28/B7

La superfamille CD28/B7 contient plusieurs voies de costimulation :

- la voie B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4,
- la voie ICOS-ICOSL,
- la voie PD1-PDL1/PDL2 (figure 13).

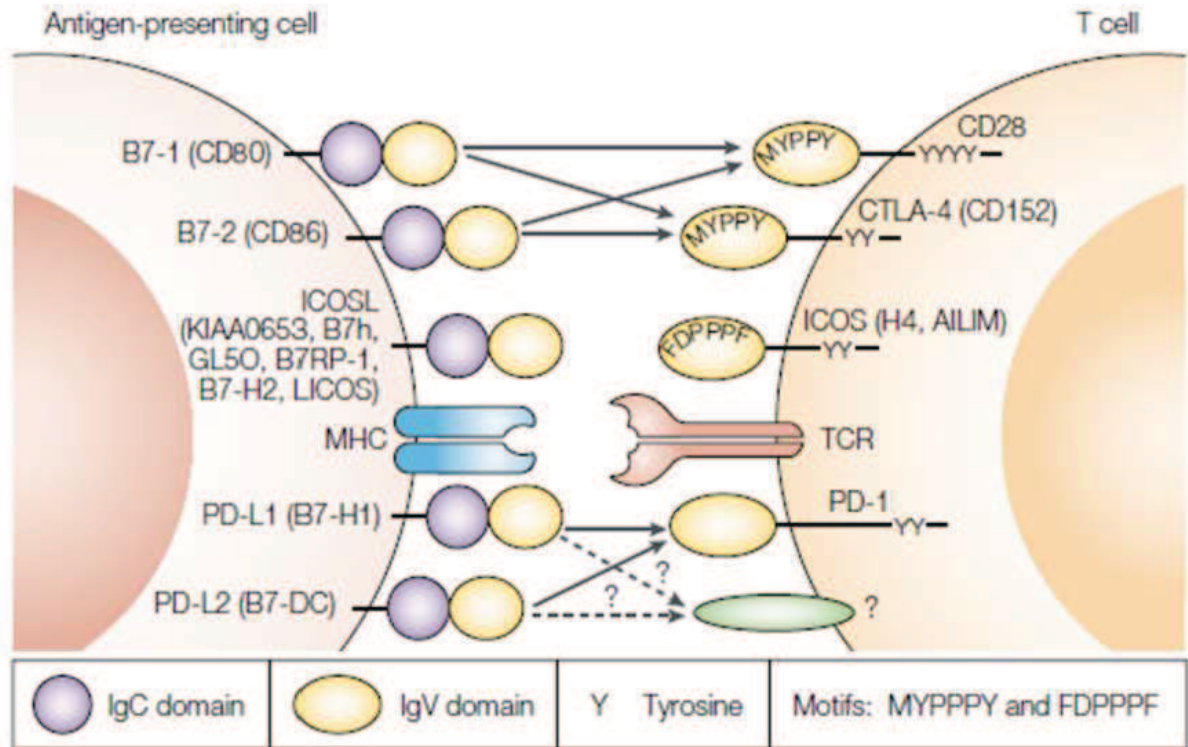


Figure 13: Les différents membres de la voie CD28/B7 (Sharpe and Freeman 2002).

4.4.1 La voie CD28/B7

La voie B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 est la voie de costimulation la mieux décrite. L'activation de la voie CD28/B7 permet de diminuer le nombre de TCR engagés pour induire l'activation du LT (Viola and Lanzavecchia 1996). Il s'agit bien d'un deuxième signal car l'engagement de cette voie sans l'engagement du TCR n'a pas d'effet.

4.4.1.1 La molécule CD28

La molécule CD28 est une molécule glycosylée de 44 kD, appartenant à la superfamille des immunoglobulines. La partie extracellulaire présente un motif MYPPPY permettant l'interaction avec la molécule B7. Dans le domaine intra-cytoplasmique, la présence du motif YNMN permet d'interagir avec la PI3 kinase et la PP2A (Viola and Lanzavecchia

1996). CD28 est constitutivement exprimé à la surface des cellules T, colocalisé avec le TCR (Bromley, Laboni et al. 2001). L'activation de ce récepteur entraîne un signal activateur avec induction de l'expansion clonale et de la sécrétion d'IL-2 (Gonsky, Deem et al. 1999; Salomon and Bluestone 2001; Crispin and Tsokos 2009). Le contrôle de l'expansion cellulaire induit par CD28 est médié par des cyclines dépendantes des kinases, par la dégradation de l'inhibiteur de ces kinases: p27kip1, et par la production d'IL2 (Appleman, Berezovskaya et al. 2000; Rowell, Walsh et al. 2005). L'engagement de CD28 induit un signal de survie vis-à-vis des LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺, notamment les populations mémoires en stimulant le facteur anti-apoptotique Bcl-X(L) (Appleman, Berezovskaya et al. 2000; Ndejmbi, Teijaro et al. 2006). La liaison de CD28 à son récepteur B7 active également les LB en augmentant la production d'IgG1 et d'IgE (Podojil and Sanders 2003).

4.4.1.2 La molécule CTLA-4

CTLA-4 a 30% d'homologie avec la molécule CD28. Son expression est rapidement induite après reconnaissance de l'antigène (Linsley, Bradshaw et al. 1996). Son affinité pour B7-1 et B7-2 est dix fois supérieure à celle de la molécule CD28 (Linsley, Greene et al. 1992).. L'engagement de CTLA-4 inhibe la production d'IL-2 et bloque les cellules en phase G1, arrêtant ainsi la prolifération lymphocytaire après une phase d'activation (Wing, Yamaguchi et al. 2011). CTLA-4 peut bloquer la réponse T par inhibition compétitive de la liaison de CD28 à B7, ou par inhibition de la transduction de signal induite par l'engagement de CD28, ou en capturant son ligand, par trans-endocytose. Le ligand est alors détruit dans la cellule exprimant CTLA-4, induisant une diminution de la costimulation via CD28/B7 (Qureshi, Zheng et al. 2011). Les souris CTLA-4^{-/-} développent un syndrome lymphoprolifératif important avec accumulation de LT dans les ganglions mais aussi dans les organes tels que le cœur, le foie, le pancréas conduisant à la mort entre 3 et 5 semaines d'âge démontrant l'importance du signal inhibiteur de la réponse T délivré par cette molécule (Tivol, Borriello et al. 1995; Waterhouse, Penninger et al. 1995).

Par ailleurs, CTLA4 inhibe la différenciation des Th17, et diminue les maladies auto-immunes médiées par les Th17 telles que la myocardite auto-immune expérimentale ou l'EAE (Racke, Scott et al. 1995; Bouguermouh, Fortin et al. 2009; Ying, Yang et al. 2010).

CTLA-4 est constitutivement exprimé sur les LT régulateurs foxp3⁺, alors que cette molécule est inductible sur les autres populations lymphocytaires, ce qui laisse supposer un rôle majeur de cette molécule dans la fonction suppressive de cette sous-population (Bour-Jordan and Bluestone 2009). Afin d'étudier le rôle de CTLA-4 sur les LT régulateurs, l'expression de CTLA-4 a été invalidée sur cette population chez des souris BALB/c. Ces souris présentent une prolifération lymphocytaire, des maladies auto-immunes telles que la gastrite et la myocardite, et une hyperproduction d'IgG et d'IgE. Il a été ainsi démontré que l'absence de CTLA-4 à la surface des LT régulateurs diminue leur potentiel suppresseur in vivo et in vitro, en perdant en particulier la capacité à diminuer l'expression membranaire des molécules B7 sur les CPA par trans-endocytose. Ainsi, l'action immunosuppressive des LT régulateurs dépendante de CTLA-4 passe par une diminution de l'efficacité de présentation de l'antigène par les CPA (Wing, Onishi et al. 2008). Chez ces souris, le nombre de LT régulateurs foxp3⁺ est similaire aux souris contrôles, CTLA-4 ne semble donc pas être nécessaire à la survie et l'homéostasie de cette population. Pourtant, l'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 dans d'autres études a montré une diminution de l'expansion des LT régulateurs IL-2 dépendante (Charbonnier, Vokaer et al. 2012; Riella, Liu et al. 2012).

Le blocage in vivo de la molécule CTLA-4 par un anticorps entraîne une augmentation de la réponse anti-tumorale et exacerbe les réponses auto-immunes. Cet anticorps est actuellement utilisé en thérapeutique dans les mélanomes résistants aux autres traitements, l'émergence de maladies auto-immunes survient dans 10% des cas (Lioussis and Sfikakis 2004; Kaehler, Piel et al. 2010; Kwek, Dao et al. 2012; Marti, Sorolla et al. 2012; Waitz, Fasso et al. 2012).

4.4.1.3 Les molécules B7.1 et B7.2

Les molécules B7 possèdent un domaine extracellulaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Ces deux molécules sont retrouvées à la surface des mêmes cellules (LT, LB, macrophages et cellules dendritiques) et se lient aux mêmes récepteurs: CD28 et CTLA-4 (Collins, Ling et al. 2005). Pourtant, elles sont bien distinctes et ont des rôles spécifiques. La cinétique d'expression de B7.1 et de B7.2 est différente. B7-2 est constitutivement exprimée à la surface de la plupart des cellules présentatrices d'antigènes, à un niveau faible et son expression est rapidement induite après activation (Hathcock, Laszlo et al. 1994). B7-1 est exprimée plus tardivement après activation (Inaba, Witmer-

Pack et al. 1994). Cette molécule va former des homodimères et se lier préférentiellement à CTLA-4 pour induire un signal inhibiteur, alors que B7.2 va se lier préférentiellement à CD28 (Ikemizu, Gilbert et al. 2000; Bhatia, Edidin et al. 2006). L'affinité de liaison de B7.1 avec CD28 et CTLA-4 est 5 à 10 fois supérieure à celle de B7.2 (Collins, Brodie et al. 2002)

Ces données impliqueraient que B7-2 soit la molécule de costimulation importante pour l'initiation de la réponse immunitaire, alors que B7-1 permettrait d'éviter l'emballement de la réponse immunitaire (Greenwald, Freeman et al. 2005).

4.4.1.4 Transduction du signal CD28/B7

Signal activateur

Le signal CD28 entraîne l'activation, la prolifération et la survie des LT ainsi que la production d'IL-2. Le domaine intra cellulaire de la molécule CD28 contient un domaine hautement conservé dans l'évolution: YMNM. Lorsque la voie CD28 n'est pas engagée, ce domaine est non phosphorylé et est un point d'ancrage pour la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Chuang, Fisher et al. 2000). L'interaction CD28-B7 entraîne la phosphorylation du domaine YMNM par des kinases de la famille des SRC (King, Sadra et al. 1997) conduisant au recrutement de domaines Src-homology 2 (SH2), de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K), de Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) et Gads (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*) (Harada, Tokushima et al. 2001; Watanabe, Harada et al. 2006). L'interaction de Grb2 et Gads avec CD28 est stabilisée par le domaine SH3 de ces molécules se liant au domaine N-terminal PXXP de CD28 (Okkenhaug and Rottapel 1998). Le recrutement de Gads permet une activation du facteur de transcription NF- κ B plus efficace que Grb2 et que la PI3K (Watanabe, Harada et al. 2006). L'activation du NF- κ B via Gads et Grb2 est liée au recrutement du complexe CARMA1, Bcl10 and MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma translocation gene 1) (Takeda, Harada et al. 2008). Cette activation de NF- κ B induit l'expression de Bcl-X(L) et bcl-2 qui favorisent la survie cellulaire (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). Le recrutement de Grb2 et l'activation d'Akt induit la production d'IL-2 (Alegre, Frauwirth et al. 2001).

Le signal inhibiteur

Le domaine intracytoplasmique est indispensable à la transduction du signal. Ainsi, l'expression transgénique d'une molécule CTLA-4 tronquée dans sa partie intracellulaire chez la souris CTLA-4^{-/-} ne prévient pas la maladie lymphoproliférative (Masteller, Chuang et al. 2000). De même que la molécule CD28, la partie intracellulaire de la molécule CTLA-4 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque. L'engagement du TCR va provoquer la phosphorylation de deux tyrosines en position 201 et 218. Cette phosphorylation induit une cascade enzymatique intracellulaire conduisant au recrutement de SHP2 notamment qui va secondairement déphosphoryler le TCR, ainsi qu'au recrutement de MAP kinases. Le signal inhibiteur médié par la molécule CTLA-4 est donc lié en partie à ces déphosphorylations (Alegre, Frauwirth et al. 2001).

4.4.1.5 La voie CD28/B7 dans le modèle de la souris NOD

Nous avons vu précédemment que la voie CD28/B7 joue un rôle important dans la tolérance périphérique. Pour étudier le rôle de la voie CD28/B7, un traitement par anticorps monoclonaux a été dans un premier temps utilisé. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 et anti-B7.2 chez la souris NOD a montré une protection vis-à-vis du diabète mais pas de l'insulite, sous réserve d'administrer le traitement avant l'âge de 10 semaines. Au contraire, l'administration d'anticorps anti-B7.1 seul ou couplé à l'anticorps B7.2 accélère l'incidence de diabète et la sévérité de l'insulite chez la souris NOD (Lenschow, Ho et al. 1995).

Les souris NOD invalidées pour la molécule CD28, ou pour les molécules B7.1 et B7.2 présentent un diabète accéléré. Dans le cas des souris NOD CD28^{-/-}, la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène est orientée vers un profil Th1. Cette altération de la balance Th1/Th2 peut expliquer l'accélération du diabète (Lenschow, Herold et al. 1996). Dans le cas de la souris B7.1/B7.2^{-/-} et de la souris NOD CD28^{-/-}, un défaut quantitatif de LT régulateurs a été mis en évidence (Salomon, Lenschow et al. 2000; Zeng, Guinet et al. 2009).

4.4.1.6 La souris B7.2^{-/-}

L'étude de la souris NOD B7.2^{-/-} a montré une protection vis-à-vis du diabète, contrairement aux souris invalidées pour les autres molécules de la voie CD28/B7. En revanche, ces souris développent une neuropathie auto-immune caractérisée par une paralysie progressive des pattes avant et des pattes arrière. Cette neuropathie atteint toutes les femelles et 30% des mâles à 35 semaines. Elle s'accompagne d'un infiltrat de cellules dendritiques, de LB, de LT-CD4⁺ et de LT-CD8⁺ dans les nerfs périphériques. Le système nerveux central et les muscles ne sont pas atteints. Le transfert de LT issus de souris NOD B7.2^{-/-} malades reproduit la maladie dans un receveur NOD.scid. Les LT-CD4⁺ sont nécessaires et suffisants au transfert de la maladie. Il s'agit donc d'une maladie auto-immune LT-CD4⁺ dépendante (Salomon, Rhee et al. 2001).

Le mécanisme de destruction de la myéline chez ces souris dépend de l'IFN- γ mais pas de la voie FAS/FASL ni des perforines. En effet les souris NOD B7.2^{-/-}IFN- γ ^{-/-} ne développent pas de neuropathie (Bour-Jordan, Thompson et al. 2005). Les LT-CD4⁺ reconnaissent de nombreux antigènes dont la *myelin protein zero* (MPO). La réalisation d'une souris transgénique dont les TCR sont spécifiques de la MPO a montré que la réponse T spécifique de cet antigène est suffisante pour reproduire la neuropathie. De plus, l'immunisation des souris à 10 semaines d'âge avec la MPO protège la souris de la neuropathie (Louvet, Kabre et al. 2009).

L'étude de la voie CD28/B7 chez la souris NOD a conduit à une démonstration de déviation de l'auto-immunité lorsque l'on modifie une voie de costimulation (figure 14).

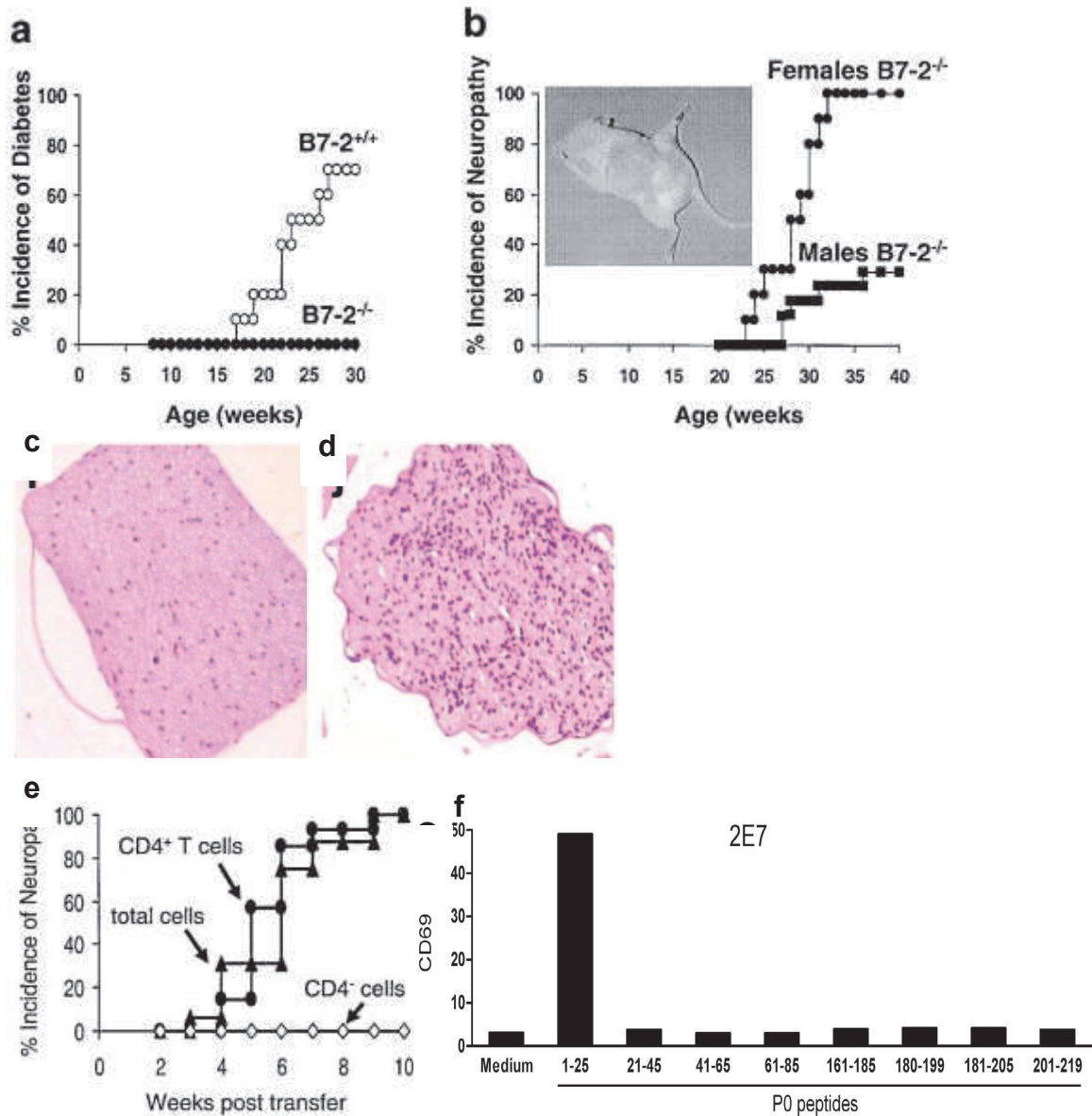


Figure 14: La souris B7.2^{-/-}. Les souris B7.2^{-/-} sont protégées du diabète (a) et développent une neuropathie auto-immune à partir de 25 semaines d'âge (b). Histologiquement, les nerfs sciatiques des souris B7.2^{-/-} sont infiltrés de cellules mononucléées (d) alors que les nerfs des souris B7.2^{+/+} ne le sont pas, le muscle squelettique n'est pas infiltré. La neuropathie est transmise pas les LT-CD4⁺ (e) qui sont spécifiques, entre autre, de la MPO, notamment le peptide 1-25 de la MPO (f) (Salomon, Rhee et al. 2001; Louvet, Kabre et al. 2009)

4.4.2 La voie PD-1/PDL-1

4.4.2.1 La molécule PD-1

PD-1 (programmed death-1) est une protéine transmembranaire de 55kD appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Nishimura, Honjo et al. 2000). PD-1 est exprimée sur les cellules immatures doubles négatives dans le thymus et en périphérie sur les LB et les LT après activation. Sa structure est similaire à celle de CTLA-4 mais PD-1 ne possède pas de motif MYPPPY permettant la liaison à B7.2 et B7.1. Son domaine intracytoplasmique est couplé à un récepteur ITIM (Immunorecepteur Tyrosine-based Inhibitory Motif) (Okazaki, Maeda et al. 2001). Après reconnaissance de l'antigène par le TCR, la phosphorylation des résidus tyrosine d'ITIM permet le recrutement de SHP-2, menant à la désactivation des lymphocytes (Okazaki, Maeda et al. 2001).

Cette voie de costimulation est importante dans la tolérance périphérique. L'inactivation de PD-1^{-/-} sur un fond C57BL/6 conduit à une glomérulonéphrite et une polyarthrite destructive proche de celle retrouvée dans le lupus (Nishimura, Nose et al. 1999). Les souris PD-1^{-/-} sur fond BALB/c développent une cardiomyopathie dilatée avec une anomalie de la contraction musculaire et un dépôt d'IgG à la surface des cardiomyocytes. Ces souris malades présentent des anticorps spécifiques d'une protéine de 33 kD: l'isoforme cardiaque de la troponine I. Ces anticorps sont responsables d'un transfert de la maladie (Nishimura, Honjo et al. 2000; Okazaki, Tanaka et al. 2003). De plus, les souris PD1^{-/-} sur fond NOD développent un diabète accéléré (Wang, Yoshida et al. 2005).

4.4.2.2 Les molécules PDL-1 et PDL-2

PDL-1 est exprimé de façon constitutive sur certains précurseurs: sur les lymphocytes préB et les cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, dans une fraction des thymocytes, et sur les cellules souches; et sur les cellules matures: LT et APC. PDL-1 est également exprimé sur des cellules non lymphoïdes telles que les cellules bêta des îlots de Langerhans, les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les pneumocytes (Bour-Jordan, Esensten et al. 2011). PDL-1 est induit par l'IFN- γ et le TNF- α . PDL-2 est exprimé sur les cellules dendritiques et les macrophages activés (Ishida, Iwai et al. 2002). L'engagement de PD1-

PDL1 conduit à l'inhibition de la prolifération par arrêt du cycle cellulaire en phase G0, tandis que PDL2 diminue l'activation lymphocytaire en diminuant la production de cytokines, ce qui confère à cette voie un rôle dans l'induction de la tolérance périphérique (Nishimura and Honjo 2001; Keir, Butte et al. 2008). L'absence de PDL1 ou PDL2 augmente l'activation des LT-CD4⁺ et des LT-CD8⁺ (Rodig, Ryan et al. 2003; Zhang, Chung et al. 2006; Wang, Carper et al. 2008). La voie PD-1 a également un rôle dans la maturation thymique des LT et dans la tolérance centrale (Nishimura, Honjo et al. 2000; Blank, Brown et al. 2003)

4.4.3 La voie ICOS/ICOSL

4.4.3.1 La molécule ICOS

La molécule ICOS a été découverte en 1999 par l'équipe de Kroczeck. Elle appartient à la famille CD28/B7. Elle est exprimée à la surface cellulaire sous forme d'homodimère d'une masse de 55 kD. Sa structure comporte 39% d'homologie avec la molécule CD28 (Ansari, Salama et al. 2003). La molécule ICOS a un domaine immunoglobine « V » variable dans sa portion extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique proche de celui de CD28 et CTLA-4. Le résidu cystéine présent en position 141 de la molécule CD28 et CTLA-4 est présent en position 136 sur la molécule ICOS. Ce résidu est indispensable à la formation de ponts disulfures entre deux chaînes homodimériques. En revanche, le motif MYPPPY retrouvé sur les molécules CTLA-4 et CD28 permettant la liaison à B7 n'est pas retrouvé sur la molécule ICOS qui ne peut donc pas se lier aux molécules B7.1 ou B7.2.

ICOS est exprimé à la surface des LT, après une stimulation antigénique d'un lymphocyte naïf. L'expression maximale d'ICOS est obtenue après engagement de la voie CD28/B7, mais peut également suivre l'activation du TLR4 (Shalaby, Jo et al. 2012). L'expression d'ICOS est induite par le facteur de transcription AP-1 (activator protein 1) qui se lie via un complexe de protéines sur le promoteur d'ICOS (Watanabe, Nakajima et al. 2012). ICOS est très présent à la surface des LT ayant un phénotype Th2 (Yagi, Arimura et al. 2003). *In vivo*, l'expression d'ICOS est dépendante d'une ubiquitine ligase nommée Roquin qui oriente l'ARN messager d'ICOS vers le protéasome, conduisant à sa dégradation et inhibant ainsi son expression (Linterman, Rigby et al. 2009). *In vitro*, l'expression de la

molécule ICOS sur les lymphocytes activés est diminuée par un cannabinoïde dérivé des plantes: le delta-9-tétrahydrocannabinol (Lu, Kaplan et al. 2009). Après activation ICOS est down régulé, son expression est moindre sur les cellules mémoires que sur les cellules activées (McKinstry, Strutt et al. 2008; Strutt, McKinstry et al. 2012).

4.4.3.2 La molécule ICOSL

ICOSL également appelé B7RP1 ou B7h pour son homologie à B7 a été découvert par l'équipe de Mak et Senaldi en 1999. Sa séquence protidique présente 19% d'homologie à celle de CD28 et 26% à celle de CTLA-4. ICOSL conserve, comme CD28 et CTLA-4 les cystéines en position 42, 63, 83, 109 et 137 permettant la formation des ponts disulfures indispensables aux interactions intra et inter-moléculaires. L'homologie de ICOSL à B7.1 et B7.2 est de 20 et 19% respectivement, soit proche de l'homologie entre B7.7 et B7.2 qui est de 24%. L'interaction entre ICOS et ICOSL est spécifique et n'interfère pas avec la voie CD28/B7 chez la souris. Cependant, chez l'homme, ICOSL est capable de se lier à CD28 et CTLA-4 (Yao, Zhu et al. 2011).

Cette molécule est constitutivement exprimée sur les LB, les macrophages, les cellules dendritiques, mais n'est pas exprimée sur les LT (Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999) .

La stimulation de CD40 est un puissant inducteur d'ICOSL sur les APC (Liang, Porter et al. 2002). De même le TNF- α et le LPS via la voie MyD88 induisent l'expression l'ICOSL. En revanche, l'IL-4, l'engagement du récepteur des LB (BCR), l'interaction ICOS/ICOSL et TACI (TNFRSF13B) diminuent l'expression d'ICOSL (Liang, Porter et al. 2002; Zhou, Hoebe et al. 2005; Ou, Xu et al. 2012). Les souris surexprimant ICOS ont le même phénotype qu'une souris ICOS^{-/-}. On observe chez ces souris une nette diminution d'ICOSL à la surface des APC, l'engagement de la voie ICOS/ICOSL entraînant un feedback négatif sur la synthèse d'ICOSL (Watanabe, Takagi et al. 2008). Un autre mécanisme pourrait être qu'une stimulation prolongée de la voie ICOS/ICOSL produise l'effet inverse d'une stimulation classique, comme pour la voie CD40/CD40L où la stimulation prolongée de cette voie entraîne une diminution des centres germinatifs, et un défaut de commutation isotopique des immunoglobulines (Erickson, Durell et al. 2002).

Dans des conditions inflammatoires majeures, la molécule ICOSL peut être exprimée sur des tissus non hématopoïétiques tels que le cœur, le foie, les reins, les testicules (Swallow, Wallin et al. 1999; Brodie, Collins et al. 2000; Wahl, Schoop et al. 2002).

4.4.3.3 La transduction du signal ICOS/ICOSL

Les homodimères ICOS vont se lier à des monomères d'ICOSL grâce au motif FDPFFF (Greenwald, Freeman et al. 2005). Après cette liaison, le motif YXXM, situé en intra cellulaire, permet l'activation de la PI3K, comme pour CD28 et CTLA-4 (Tajima, Tezuka et al. 2008). A la différence de CD28, la molécule ICOS ne possède pas les motifs YxNx et PxxP permettant le recrutement de Grb2 Gads et des kinases SH3, indispensables à la prolifération et à la production majeure d'IL-2 induite par la voie CD28/B7 via NF-κB (Watanabe, Harada et al. 2006)

L'interaction de la PI3K avec le domaine intra cellulaire d'ICOS va permettre l'activation de la voie NF-κB par l'intermédiaire d'Akt (Alegre, Frauwirth et al. 2001; Fos, Salles et al. 2008).

4.4.3.4 Les fonctions de la voie ICOS/ICOSL

La régulation de la réponse lymphocytaire T

Anna Tafuri et Tak Mak ont développé la souris ICOS^{-/-}, par recombinaison homologe. Un vecteur comprenant un fragment tronqué du gène *Icos* ainsi qu'une cassette de néomycine a été introduit par électroporation dans des cellules souches embryonnaires E14 de fond génétique 129/ola. Les cellules souches comprenant la séquence d'intérêt ont été implantées dans des souris porteuses de souche C57BL/6. Ces souris ont été backcrossées sur fond C57BL/6. Elles présentent une altération de formation des centres germinatifs, un défaut de commutation isotypique des immunoglobulines, une diminution de production d'IL-4 après stimulation, mais conservent leur capacité de sécrétion d'IFN-γ. Chez ces souris, les populations cellulaires CD3⁺, TCRαβ, B220⁺ l'expression de CD28, CD44, des IgM et IgD sur les LB matures sont comparables à celle des souris sauvages (Tafuri, Shahinian et al. 2001).

L'équipe de Flavell a développé dans le même temps des souris ICOS^{-/-}, sur fond C57/BL6. Les LT-CD4⁺ présentent également un défaut d'activation et de prolifération, et un défaut de sécrétion d'IL4. De plus, ces souris sont plus sensibles à l'induction de l'EAE, indiquant

que la molécule ICOS a un rôle protecteur vis à vis des maladies inflammatoires (Dong, Juedes et al. 2001).

Ces modèles ainsi que l'utilisation d'anticorps bloquants ont permis de prouver que l'engagement de la voie ICOS/ICOSL participe à l'activation lymphocytaire et à la production de cytokines. L'engagement d'ICOS induit une production d'IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) de 50 à 70% supérieure à celle induite par la voie CD28/B7. En revanche, la sécrétion d'IL-2 est moins importante qu'après activation de la voie CD28/B7. La production de cytokines dépend du niveau d'expression d'ICOS. Les LT exprimant fortement ICOS produisent de grandes quantités d'IL10. Ceux exprimant de façon intermédiaire ICOS produisent des cytokines de type Th2: IL-4, IL-5, IL-13. La population exprimant faiblement ICOS sécrète des cytokines de type Th1: IL-2, IL-3, IL-6, IFN- γ (Lohning, Hutloff et al. 2003). Les LT-CD4⁺ ICOS^{-/-} issus de souris immunisées contre le KLH (keyhole limpet hemocyanin), restimulés *in vitro* ont une sécrétion accrue d'IFN- γ (McAdam, Greenwald et al. 2001).

La prolifération des LT-CD4⁺ICOS^{-/-} après stimulation par anticorps anti-CD3 est profondément réduite dans les 24 premières heures puis se rapproche de celles des LT-CD4⁺ICOS^{+/+}, faisant évoquer l'intervention de signaux compensateurs, ou que le signal ICOS est important pour la phase précoce d'activation des LT-CD4⁺. Les marqueurs d'activation CD40L, CD25, CD69 sont également diminués (Tafari, Shahinian et al. 2001). De plus, la prolifération des LT-CD4⁺ICOS^{-/-} en présence d'APC B7.1/2^{-/-} est diminuée par rapport à la prolifération des LT-CD4⁺ICOS^{+/+}, en effet, la présence des molécules B7.1 et B7.2 compense l'absence d'ICOS (McAdam, Greenwald et al. 2001).

La voie ICOS/ICOSL a également un rôle sur la population des LT régulateurs. Le rôle des LT régulateurs a été démontré dans le modèle de la souris BDC2.5. Ces souris expriment un récepteur transgénique pour un épitope de la chromogranine A, développent une insulite mais ne développent pas de diabète en raison de la sécrétion de grandes quantités d'IL-10 et de l'action prédominante des LT régulateurs. L'injection d'anticorps bloquant la molécule ICOS chez ces souris induit un diabète (Luhder, Hoglund et al. 1998). Après injection de l'anticorps on observe une augmentation des LT effecteurs (CD25^{lo}CD69⁺) et une diminution des T régulateurs (CD25⁺CD69⁻) dans l'infiltrat pancréatique uniquement, le ratio étant identique dans les ganglions pancréatiques et dans la rate (Herman, Freeman et al. 2004). Cette voie de costimulation semble donc jouer un rôle dans le maintien de l'équilibre entre les LT régulateurs et les LT effecteurs infiltrant le pancréas des souris BDC2.5. L'effet d'ICOS sur la fonction suppressive, la survie et la prolifération des LT

régulateurs a également été prouvé dans d'autres modèles. L'expression d'ICOSL sur les DC a un rôle important dans la sécrétion d'IL-10 par les LT régulateurs (Ito, Yang et al. 2007). De plus, les LT régulateurs ICOS^{+/+} sont plus sensibles à l'effet de l'IL-2 que les LT régulateurs ICOS^{-/-} (Chen, Shen et al. 2012; Kornete, Sgouroudis et al. 2012). Dans plusieurs modèles, il a été montré que les LT régulateurs ICOS^{+/+} ont des capacités immunosuppressives supérieures aux LT régulateurs ICOS^{-/-} (Prevot, Briet et al. 2010; Busse, Krech et al. 2012).

La population des LT folliculaires auxiliaires dépend également de la voie ICOS/ICOSL. Les LT folliculaires auxiliaires sont spécialisés dans l'interaction entre les LT et les LB dans les centres germinatifs, permettent également la différenciation en LB mémoire et participent à la maturation des LB et des plasmocytes. Ils expriment la voie de transcription Bcl6 (B-cell lymphoma 6), des marqueurs de surfaces tels que CXCR5, PD-1, ICOS et CD40L et sont caractérisés par la production de cytokines IL-21 et IL-6 (Rasheed, Rahn et al. 2006; Shekhar and Yang 2012). L'orientation des LT en LT folliculaires auxiliaires serait induite, entre autre, par l'engagement de la voie ICOS/ICOSL qui permet l'expression de Bcl6, induisant CXCR5, PD-1 (Choi, Kageyama et al. 2011; Hu, Wu et al. 2011; Kerfoot, Yaari et al. 2011).

Par ailleurs, la voie ICOS/ICOSL induit l'activation des NKT variant et invariant (Zietara, Lyszkiewicz et al. 2011; Kadri, Korpos et al. 2012).

La régulation de la réponse lymphocytaire B

Le signal ICOS/ICOSL joue un rôle dans la sécrétion d'IL-10, cytokine qui entraîne notamment la différenciation terminale des LB en LB mémoires et en cellules plasmacytoïdes sécrétant des anticorps (Ansari, Salama et al. 2003).

La voie ICOS/ICOSL est impliquée dans le dialogue entre les LB et les LT à différents niveaux. Comme l'engagement de la voie CD28, l'engagement de la voie ICOS/ICOSL entraîne l'expression de la molécule CD40L impliquée dans la coopération entre les LT et les LB. De plus, nous avons vu précédemment le rôle d'ICOS dans l'induction des LT folliculaires axillaires, population indispensable à la coopération entre les LB et les LT. Ces LT folliculaires produisent de l'IL-21, permettant également la commutation isotypique des immunoglobulines (Konforte, Simard et al. 2009).

Ces défauts de collaboration LT/LB en l'absence de la voie ICOS ont été démontrés chez les souris ICOS^{-/-}, qui présentent un défaut de commutation isotopique des immunoglobulines et un défaut de formation des centres germinatifs (Ansari, Salama et al. 2003). En l'absence du signal ICOS/ICOSL, il n'y a pas d'expression de CD40L, moins de LT folliculaires auxiliaires, moins d'IL-10 et d'IL-21. Les LB sont plus faiblement stimulés dans les régions riches en LT et forment moins de centres germinatifs. A 8 semaines les souris ICOS^{-/-} ont un taux réduit d'IgG1 qui est très dépendant des LT-CD4⁺ folliculaires auxiliaires. Les souris ICOS^{-/-} présentent également un défaut d'IgG2a et d'IgE, après immunisation au KLH. En revanche, lorsqu'on immunise les souris ICOS^{-/-} avec du trinitrophénol conjugué au ficoll, un antigène indépendant des LT, la production d'IgG3 est normale, indiquant qu'en l'absence d'ICOS, il existe un défaut de réponse des LB dépendante des LT, mais que la fonction intrinsèque des LB est normale (Tafari, Shahinian et al. 2001).

L'engagement de la voie ICOS/ICOSL oriente le plus souvent vers un phénotype Th2. Or, il a été démontré que la réponse Th1 oriente vers une commutation isotopique des immunoglobulines en faveur des IgG2a, alors que la réponse Th2 oriente vers la production d'IgG1 et IgE. Ceci pourrait également expliquer la diminution des IgG1 et IgE chez la souris ICOS^{-/-} (Tafari, Shahinian et al. 2001).

Les souris transgéniques exprimant la molécule ICOSL soluble présentent une hyperplasie lymphoïde dans la rate, les ganglions périphériques et les plaques de Peyer. Les IgG sont produites en excès, particulièrement les IgG2a confirmant le rôle de la voie ICOS/ICOSL dans la prolifération des LT et la coopération LT/LB (Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999).

Le rôle d'ICOSL exprimé sur les DC et sur les LB est différent. Si l'expression d'ICOSL sur les LB conduit à l'augmentation du nombre de cellules plasmacytoïdes et une augmentation des anticorps de type IgG de tous les isotypes, le signal ICOSL sur les DC contribue lui à la formation des centres germinatifs (Larimore, Liang et al. 2012).

4.4.3.5 Conséquences et applications d'une anomalie de la voie ICOS/ICOSL

Les maladies infectieuses

La voie ICOS/ICOSL a un rôle dans la réponse anti-bactérienne et anti-parasitaire. Le blocage de la voie ICOS/ICOSL entraîne une susceptibilité à l'infection par *Listeria monocytogenes* (bactérie intra-cellulaire induisant une réponse lymphocytaire impliquant les LT-CD4⁺ Th1 et les LT-CD8⁺) avec une moindre réponse des LT-CD8⁺ et une diminution de production d'IFN- γ par les LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺ (Mittrucker, Kursar et al. 2002). D'autres modèles infectieux reproduisent le même schéma (Wilson, Zaph et al. 2006).

Concernant les infections parasitaires, le blocage de la voie ICOS entraîne une diminution de la réponse lymphocytaire LT-CD4⁺ de type Th2 et de la production d'IL-4, IL-5, IL-10 dans le cadre d'une infection à *Leishmania major*. On observe également une diminution des IgE et IgG (Miyahira, Akiba et al. 2003). Inversement, dans le cadre d'une infection à *Schistosoma Mansoni*, responsable de la bilharziose intestinale, le blocage de la voie ICOS/ICOSL 4 semaines après l'infection entraîne un relargage majeur d'INF- γ pouvant conduire à une nécrose hépatique. Dans ce cas, on n'observe pas de modification de la réponse des LT-CD4⁺ de type Th2 (Rutitzky, Ozkaynak et al. 2003) .

Les réactions allergiques

La réponse immunitaire de type Th2 est indispensable au développement et au maintien de la réponse allergique. Or le blocage de la voie ICOS/ICOSL entraîne une diminution des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et une diminution de la réponse humorale (diminution des immunoglobulines de type IgG1 et IgE). La voie a donc été étudiée dans des modèles d'allergie. Ainsi, le blocage de la voie ICOS/ICOSL par anticorps bloquant ou par invalidation du gène entraîne une diminution de la sensibilité des souris aux réactions allergiques, de façon prolongée jusqu'à 21 jours après la sensibilisation. La voie CD28/B7 en revanche n'a aucun effet sur ces réactions allergiques (Gonzalo, Tian et al. 2001; Tesciuba, Subudhi et al. 2001; Kadkhoda, Wang et al. 2011).

Dans la dermatite atopique, le rôle d'ICOS/ICOSL a été démontré pour l'induction de tolérance via les DC (Gomez de Agüero, Vocanson et al. 2012). Dans l'asthme allergique, l'expression d'ICOS sur les LT régulateurs induit la production d'IL-35 permettant l'inhibition des TH17 et de l'inflammation pulmonaire (Whitehead, Wilson et al. 2012). De même, les souris ICOSL^{-/-} sont résistantes au développement d'un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine (Kadkhoda, Wang et al. 2011).

Les greffes

Lors de la greffe d'organe, les signaux de co-stimulation sont indispensables pour activer les lymphocytes dirigés contre le greffon, et dans la greffe de cellules hématopoïétiques, les voies de costimulation sont impliquées dans la réaction du greffon contre l'hôte (Cuzzola, Fiasche et al. 2012).

Si la voie CD28/B7 est importante pour le rejet aigu, son blocage n'empêche pas le rejet chronique (Rothstein and Sayegh 2003). C'est la voie ICOS/ICOSL qui est la plus impliquée dans le rejet chronique. Ainsi, un traitement séquentiel par anticorps bloquant anti-CTLA-4 suivi d'un traitement par anticorps bloquant anti-ICOSL permet d'éviter le développement de rejet aigu et chronique du greffon cardiaque. Pour obtenir cette tolérance, l'administration séquentielle de ces anticorps bloquant est nécessaire (Ozkaynak, Gao et al. 2001; Kosuge, Suzuki et al. 2003). En effet, en cas d'administration simultanée des deux anticorps bloquant, on observe un rejet aigu (Pan, Guo et al. 2008) .

Le blocage de la voie ICOS/ICOSL a été également étudié dans la greffe d'îlots pancréatiques, en association à la cyclosporine, mais ce traitement n'augmente pas la survie du greffon (Nanji, Hancock et al. 2004). En revanche, l'administration simultanée d'anticorps anti-COS et d'anticorps anti-CD40L, permet d'obtenir une tolérance du greffon, à long terme (Nanji, Hancock et al. 2006).

Les maladies auto-immunes

L'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) est provoquée par l'induction d'une réponse immune contre la myéline, la myelin basic protein (MBP), la protéine MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), ou la PLP (proteo-lipid protein) en présence d'adjuvant complet de Freund et de toxine pertussique, permettant la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Sospedra and Martin 2005; Kuerten, Lichtenegger et al. 2006). L'EAE reproduit une pathologie proche de la sclérose en plaque observée chez l'homme. La réaction auto-immune de l'EAE se caractérise par un infiltrat de LT dans le système nerveux central, composé notamment de lymphocytes Th17 et s'accompagne d'une démyélinisation du système nerveux central (Komiyama, Nakae et al. 2006). L'IL-10 joue un rôle essentiel dans le contrôle de sévérité de la maladie. Les souris IL-10^{-/-} développent

une EAE très sévère alors que les souris surexprimant l'IL10 sont résistantes à l'induction de la maladie (Bettelli, Das et al. 1998).

La voie ICOS a un rôle dans le contrôle de l'EAE. Les souris ICOS^{-/-} développent une forme plus sévère d'EAE que les souris ICOS^{+/+} (Dong and Nurieva 2003). Cependant, le rôle de la voie ICOS dans l'EAE est plus compliqué puisque le blocage de la voie après l'induction de la maladie (9-20 jours) entraîne une protection, alors que le blocage de la voie ICOS pendant l'immunisation (1-10 jours) aggrave la maladie (Rottman, Smith et al. 2001). Chez la souris ICOS^{-/-} où la maladie est sévère, on observe une production d'IL-17 importante, ainsi qu'une augmentation des cytokines favorisant une déviation Th17: IL-6 et TGF-β. De plus le blocage de l'IL-17 par des anticorps bloquant chez ces souris ICOS^{-/-} immunisées inhibe le développement de la maladie (Galicia, Kasran et al. 2009), suggérant que la voie ICOS est nécessaire à l'induction d'une tolérance dès l'initiation de la maladie via l'IL-17 notamment, mais également à l'activation et au maintien des LT effecteurs (Sporici, Beswick et al. 2001). Les voies de costimulation jouent un rôle important dans l'EAE, résumé figure 18.

L'arthrite au collagène est une autre maladie auto-immune expérimentale induite par une immunisation avec du collagène de type II en adjuvant complet de Freund. L'administration d'anticorps bloquant anti-ICOS entraîne une diminution de l'atteinte clinique liée à une diminution de l'IL-10, de l'IFN-γ et de l'IL-17 (Iwai, Kozono et al. 2002). De même, la souris ICOS^{-/-} est résistante à l'induction de cette maladie (Nurieva, Treuting et al. 2003).

Dans le Dt1, le rôle d'ICOS a été démontré par l'équipe de Christophe Benoist dans le modèle des souris NOD BDC2.5. Dans ce modèle, l'analyse des populations cellulaires présentes dans l'infiltrat met en évidence la coexistence de LT régulateurs et de LT effecteurs. L'injection d'anticorps bloquant la molécule ICOS ou la molécule CTLA-4 chez ces souris induit un diabète. Si l'anticorps anti-CTLA-4 doit être administré avant le début de l'infiltrat pancréatique, l'administration de l'anticorps anti-ICOS peut être administré avant ou pendant l'infiltration (figure 15) (Luhder, Hoglund et al. 1998; Herman, Freeman et al. 2004). Nous avons confirmé le rôle d'ICOS avec l'étude de la souris BDC2.5 ICOS^{-/-} qui présente un diabète accéléré, une diminution du nombre de LT régulateurs in vivo, et une diminution de la capacité suppressive des LT régulateurs BDC2.5 ICOS^{-/-} comparés aux LT régulateurs BDC2.5 ICOS^{+/+}, in vitro (Prevot, Briet et al. 2010).

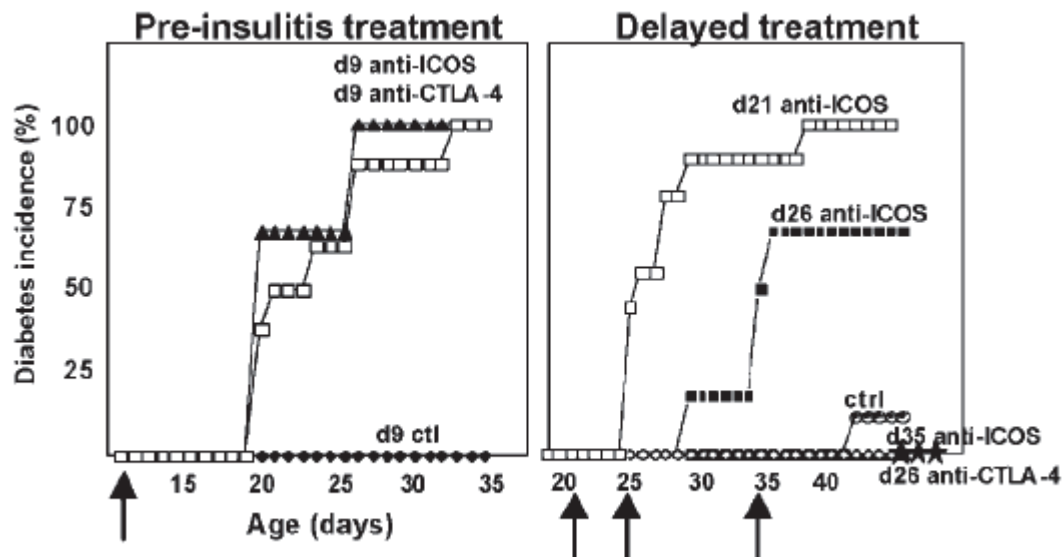


Figure 15: Rôle de la voie ICOS/ICOSL dans le modèle de la souris BDC2.5. L'injection d'anticorps anti-ICOS ou anti-CTLA-4 chez de jeunes souris NOD.BDC2.5 induit un diabète aigu si celui-ci est administré avant le 12ème jour de vie pour l'anticorps anti-CTLA-4, alors que l'anticorps bloquant ICOS peut être administré après le début de l'infiltrat (Herman, Freeman et al. 2004).

La même année, l'équipe de Shapiro démontrait l'effet bénéfique de l'anticorps bloquant anti-ICOS dans la greffe d'îlots (Nanji, Hancock et al. 2004).

Ce n'est qu'en 2006 que le rôle d'ICOS est étudié dans un modèle polyclonal de diabète : chez la souris NOD. L'administration d'anticorps bloquants anti-ICOS à 10 semaines d'âge chez la souris NOD (âge auquel l'insulite est présente) entraîne une diminution non significative de l'incidence du diabète. Lorsque cet anticorps est administré en association à l'anticorps anti-CD40L, la protection de la souris NOD vis à vis du diabète est significative (figure 16) (Nanji, Hancock et al. 2006).

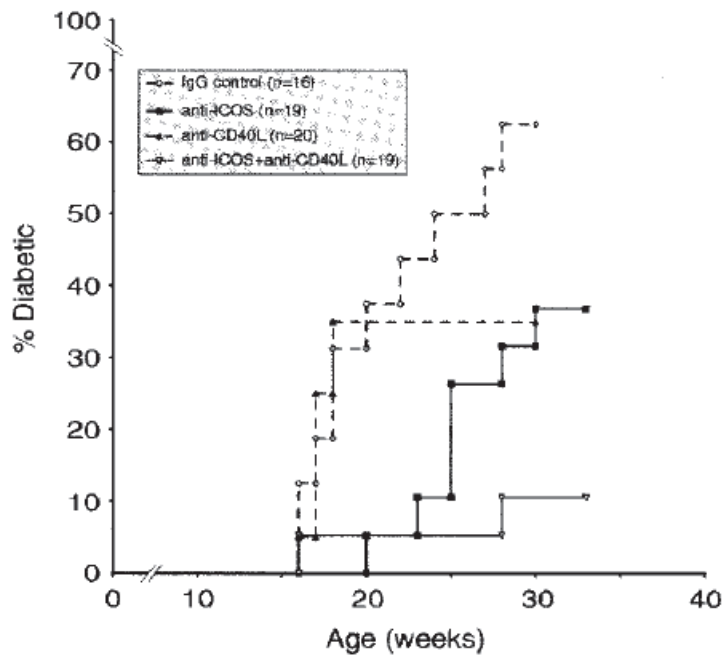


Figure 16: L'injection d'anticorps anti-ICOS chez la souris NOD diminue l'incidence spontanée du Dt1. Les souris traitées par l'anticorps anti-ICOS sont protégées du diabète. Cette protection est accrue en cas d'adjonction d'anticorps anti-CD40L (Nanji, Hancock et al. 2006).

La preuve formelle du rôle d'ICOS dans la physiopathologie du diabète a été publiée en 2008 par l'équipe de Flavell, avec l'étude de l'incidence du diabète chez des souris NOD invalidées pour le gène *Icos*. Ces souris sont totalement protégées du diabète et ne développent que peu d'insulite à l'âge de 25 semaines. Chez ces souris, on observe une diminution de la production d'IFN- γ par les LT effecteurs, et une diminution du nombre de LT régulateurs (Hawiger, Tran et al. 2008).

Les voies de costimulation ont donc des effets différents sur les maladies auto immunes. Dans le Dt1, le blocage de ces voies de costimulation peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'incidence de la maladie, de même que dans l'EAE (figure 17 et 18).

		Anticorps bloquant : effet sur l'incidence spontanée	Invalidation/surexpression du gène : effet sur l'incidence spontanée
TNF/TNFR	CD40/CD40L	Diminution ¹	
	OX40/OX40L	Diminution ²	OX40L ^{-/-} protection ³
	CD27/CD70	N'augmente pas la survie du greffon ⁴	
	4-1BB/4-1BBL		Surexpression de 4-1BB: accélération ⁵
	HVEM/LIGHT	Diminution ⁶	
	CD30/CD30L	Diminution ⁷	
	GITR/GITRL	Diminution ⁸	
	TRAIL	Diminution ⁹	
	BAFF	Diminution ¹⁰	
	TNF	Protection ¹¹	
TIM	TIM3	Augmentation ¹²	
CD28/B7	CD28/B7	B7.1 et B7.2: augmentation ¹³ B7.2 et CTLA4: diminution ¹³ B7.1 : augmentation ¹³	CD28 ^{-/-} augmente l'incidence et la pénétrance ¹⁴ B7.1 ^{-/-} B7.2 ^{-/-} accélération ¹⁴ B7.2 ^{-/-} protection ¹⁴ B7.1 ^{-/-} accélération ¹⁴
	PD1/PDL1	Augmentation ¹⁵	
	ICOS/ICOSL	Diminution ¹⁶ Augmente la survie du greffon ¹⁷	ICOS ^{-/-} protection ¹⁸ ICOSL ^{-/-} protection ¹⁹

1: Munroe 2009; 2: Pakala, Bansal-Pakala et al. 2004; 3: Martin-Orozco, Chen et al. 2003; 4: Wu, Hering et al. 2001; 5: Sytwu, Lin et al. 2003; 6: Wang, Lo et al. 2001; 7: Nandedkar. 1992; 8: You, Poulton et al. 2009; 9: MI 2003; 10: Zekavat 2008; 11: Lee 2005 ; 12: Sanchez-Fueyo, Tian et al. 2003; 13: Lenschow, Ho et al. 1995; 14: Salomon, Lenschow et al. 2000; 15: Ansari, Salama et al. 2003; 16: Nanji, Hancock et al. 2006; 17: Nanji, Hancock et al. 2004; 18: Hawiger, Tran et al. 2008; 19: Prevot, Briet et al. 2010.

Figure 17: Résumé du rôle des différentes voies de costimulation dans le Dt1 chez la souris NOD. Ces voies peuvent être bloquée par des anticorps ou par invalidation génétique du gène d'expression de la molécule de costimulation.

		Anticorps bloquant : effet sur le score clinique de l'EAE	Invalidation du gène: effet sur le score clinique de l'EAE
TNF/ TNFR	CD40/CD40L	Diminue ¹	
	OX40/OX40L	Diminue ² OX40 associé au CTLA-4: prévient l'EAE ²	OX40 ^{-/-} diminue ³ OX40L ^{-/-} diminue ⁴
	CD27/CD70	Prévient l'EAE ⁵	
	4-1BB/ 4-1BBL	Pas d'effet ⁶	4-1 BB ^{-/-} diminue ⁶
	HEVM/ LIGHT		HVEM ^{-/-} augmente, accélère l'initiation, augmente la durée ⁸
	GITR/GITRL	Diminue ⁹	
	TRAIL/ TRAILR	Augmente ^{10,11}	TRAIL/Apo2L ^{-/-} augmente ¹⁰
	BAFF/ BCMA	Diminue ¹²	BAFF-R ^{-/-} augmente ¹³
TIM	TIM3 TIM1	TIM3: augmente ¹⁴ TIM1: augmente ¹⁵	
CD28 /B7	CTLA-4 CD28/B7	CTLA-4: une dose unique: diminue ¹⁶ CTLA-4: administré à répétition au moment de l'induction: augmente ¹⁶ B7.1: diminue ¹⁶ B7.2: augmente modérément ¹⁶ B7.1 et B7.2: diminue ¹⁶	CTLA4 ^{-/-} prévient l'EAE ¹⁷ CD28 ^{-/-} prévient l'EAE ^{18 19} B7.2 ^{-/-} diminue, retarde les premiers symptômes ²⁰ B7.1 ^{-/-} diminue peu et retarde les premiers symptômes ²⁰
	PD1/PDL1		PDL1 ^{-/-} augmente, accélère l'initiation, augmente la durée ²¹
	ICOS/ICOSL	ICOS : administré pendant l'induction: augmente (>J10) ²² ICOS: administré après l'induction: prévient l'EAE ²²	ICOS ^{-/-} augmente ²³

1: Kim 2011; 2: Weinberg 1999; 3: Carboni 2003; 4: Ndhlovu 2001; 5: Nakajima 2000; 6: Sun 2002; 7: sytwu 2003; 8: Wang 2005; 9: Ray 2012 (modèle de transfert d'EAE); 10: Cretney 2005; 11: Hilliard 2001; 12: huntington 2006; 13: kim 2011; 14 : Money 2002; 15: Xiao 2011; 16: Racke 1995; 17: Hurwitz 1997; 18: Verhagen 2009; 19: Girvin 2000 (chez la souris NOD); 20: Chitnis 2001; 21:Ortler 2008; 22: Rottman 2001; 23: Dong 2003.

Figure 18: Résumé du rôle des différentes voies de costimulation dans l'EAE chez la souris C57BL6 ou SLJ. Ces voies peuvent être bloquée par des anticorps ou par invalidation génétique du gène d'expression de la molécule de costimulation. De plus, l'anticorps agoniste de la molécule 4-1 BB prévient l'EAE (Sun, Lin et al. 2002). L'anticorps anti-TIM-1 rend sensible à l'EAE des souches résistantes (Xiao, Zhu et al. 2011).

PROJET DE RECHERCHE EXPERIMENTALE

Le laboratoire s'intéresse depuis 2005 à la voie ICOS/ICOSL chez la souris NOD. Les premiers travaux du laboratoire ont montré que les souris invalidées pour le gène *Icos* situé sur le chromosome 1 ou pour le gène *Icosl* situé sur le chromosome 10 avaient le même phénotype: une protection vis-à-vis du diabète et une déviation de la réponse auto-immune avec le développement d'une neuromyopathie.

Concernant le diabète, nous avons mis en évidence un défaut d'activation des LT effecteurs diabéto-gènes, et un défaut des LT régulateurs.

Nous avons étudié le rôle de la voie ICOS/ICOSL dans le modèle de souris NOD BDC2.5. Chez ces souris, la plupart des LT-CD4⁺ expriment un TCR transgénique issu d'un lymphocyte infiltrant l'îlot. Ces souris BDC2.5 développent une péri-insulite dès 3 à 6 semaines d'âge, sans développer de diabète clinique. Lorsque le gène *Icos* est invalidé chez cette souris, un diabète apparaît dès 3 à 5 semaines d'âge. Nous avons démontré qu'il existait un défaut de régulation périphérique via les LT régulateurs chez ces souris NOD BDC2.5 ICOS^{-/-}.

L'observation du développement d'une atteinte musculaire et neurologique auto-immune nous a conduit à approfondir ce modèle, permettant d'obtenir des données nouvelles sur la neuromyopathie observée chez les souris ICOS^{-/-} et ICOSL^{-/-}, mais aussi sur le rôle d'ICOS/ICOSL dans le dialogue cellulaire.

RESULTATS

ARTICLES

ABROGATION OF ICOS/ICOSL COSTIMULATION IN NOD MICE RESULTS IN AUTOIMMUNE

DEVIATION TOWARDS THE NEUROMUSCULAR SYSTEM.

Nicolas Prevot, Claire Briet, Hans Lassmann, Isabelle Tardivel, Edwige Roy, Joëlle Morin, Tak W. Mak, Anna Tafuri, Christian Boitard.

DEVELOPMENT OF SPONTANEOUS AUTO-IMMUNE NEUROMYOPATHY IN ICOSL-/- NOD MICE.

Claire Briet, Isabelle Tardivel, Nicolas Prevot, Chantal Bécourt, Hans Lassmann, Tak W. Mak, Anna Tafuri, C. Massaad, O. Boyer, Christian Boitard.

Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system

Nicolas Prevot^{1,2}, Claire Briet^{1,2}, Hans Lassmann³, Isabelle Tardivel²,
Edwige Roy⁴, Joëlle Morin², Tak W. Mak⁵, Anna Tafuri⁴
and Christian Boitard^{1,2}

¹ INSERM U986, Hôpital Cochin/St Vincent de Paul, Paris, France

² Université Paris Descartes, Paris, France

³ Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche médicale, Paris, France

⁵ Departments of Medical Biophysics and Immunology, Ontario Cancer Institute, University of Toronto, Toronto, Canada

NOD mice spontaneously develop insulin-dependent diabetes around 10–40 wk of age. Numerous immune gene variants contribute to the autoimmune process. However, genes that direct the autoimmune response toward β cells remain ill defined. In this study, we provide evidence that the *Icos* and *Icosl* genes contribute to the diabetes process. Protection from diabetes in *ICOS*^{-/-} and *ICOSL*^{-/-} NOD mice was unexpectedly associated with the development of an autoimmune disorder of the neuro-muscular system, characterized by myositis, sensory ganglionitis and, to a reduced extent, inflammatory infiltrates in the CNS. This syndrome was reproduced upon adoptive transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from diseased donors to naïve NOD.scid recipients. Our data further show that protection from diabetes results from defective activation of autoimmune diabetogenic effector T cells in *ICOS*^{-/-} NOD mice, whereas acceleration of diabetes in BDC2.5 *ICOS*^{-/-} NOD mice is induced by a dominant defect in Treg. Taken together, our findings indicate that costimulation signals play a key role in regulating immune tolerance in peripheral tissues and that the ICOS/ICOSL costimulatory pathway influences the balance between Treg and diabetogenic effector T cells.

Key words: Autoimmunity · Costimulation · ICOS · ICOS ligand · Type 1 diabetes



Supporting Information available online

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the activation of autoreactive lymphocytes against pancreatic

β -cell antigens. Mechanisms that initiate the failure of immune tolerance to β cells remain elusive in common forms of T1D. The disease develops as a multifactorial process in which environmental factors concur with a highly multigenic susceptibility background [1]. However, genes that direct the autoimmune response toward β cells remain ill defined.

In animal models such as the NOD mouse, the predominant role of T lymphocytes is supported by experiments in which T1D

Correspondence: Professor Christian Boitard
e-mail: Christian.boitard@htd.aphp.fr

is transferred into naïve recipients by T lymphocytes from diabetic or prediabetic animals. Moreover, T1D is prevented by injection of Ab that interfere with T-lymphocyte activation and fails to develop in diabetes-prone mice in which key genes in T-lymphocyte differentiation or activation are nonfunctional [2]. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved [3–5].

The activation of autoreactive T lymphocytes in T1D requires the recognition of autoantigens expressed by β cells as well as costimulatory signals. Membrane proteins of the CD28 gene family mediate major costimulatory signals through their interaction with members of the B7 family expressed on APC and stromal cells. CD28 [6, 7], CTLA4 [8], and ICOS [9, 10] are related proteins of the CD28 family that are encoded by genes clustered within a 300 kb region located on chromosome 2. Gene variants within this region have been associated with susceptibility to T1D [11, 12]. *In vivo* deletion of the *Cd28* or *B7* genes, pharmacological blockade of the CD28 or B7 molecules using monoclonal Ab [13–15], and anti-CTLA4 treatment or the expression of a CTLA4-Ig transgene have all shown to profoundly affect the development of T1D in the NOD mouse [16, 17]. The role of the ICOS/ICOS ligand (ICOSL) costimulatory pathway in the pathogenesis of T1D is still controversial. On the one hand, blockade [18, 19] or *in vivo* deletion [20] of ICOS inhibits the development of T1D in NOD mice; on the other hand, treatment with an ICOS-blocking Ab induces acute T1D in transgenic BDC2.5 NOD mice [21].

To better understand the role of the ICOS/ICOSL costimulatory pathway in the development of T1D, we used a genetic approach, introgressing the *Icos* and *Icosl* null mutations [22] onto the NOD background. We confirm the key role of the ICOS/ICOSL costimulatory pathway in the activation of Treg and diabetogenic effector T cells (T_{eff} cells) in the NOD mouse. However, ICOS^{-/-} or ICOSL^{-/-} NOD mice, while protected from T1D, develop an autoimmune disease that affects neural and muscular cells, indicating that local T-cell interaction within the islet environment is a key factor in immune tolerance.

Results

Abrogation of the ICOS/ICOSL costimulatory pathway protects NOD mice from diabetes

To define the role of ICOS/ICOSL costimulation in T1D development, we studied ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice. The spontaneous incidence of T1D was significantly reduced in female ICOS^{-/-} NOD mice (Fig. 1A) since only 16.6% of them became diabetic by 40 wk of age, as compared with 63.6% for female ICOS^{+/+} NOD mice by 40 wk of age. Since the *Icos* locus (1C2) is located in proximity of other immuno-modulatory genes, including CD28 and CTLA-4, we analyzed mice deficient for *Icosl*, which lies in a completely different genetic region. Female ICOSL^{-/-} NOD mice were protected from T1D to a similar extent as female ICOS^{-/-} NOD mice (Fig. 1A). At 40 wk of age, none of them became diabetic, whereas 57.5% female ICOSL^{+/+} NOD

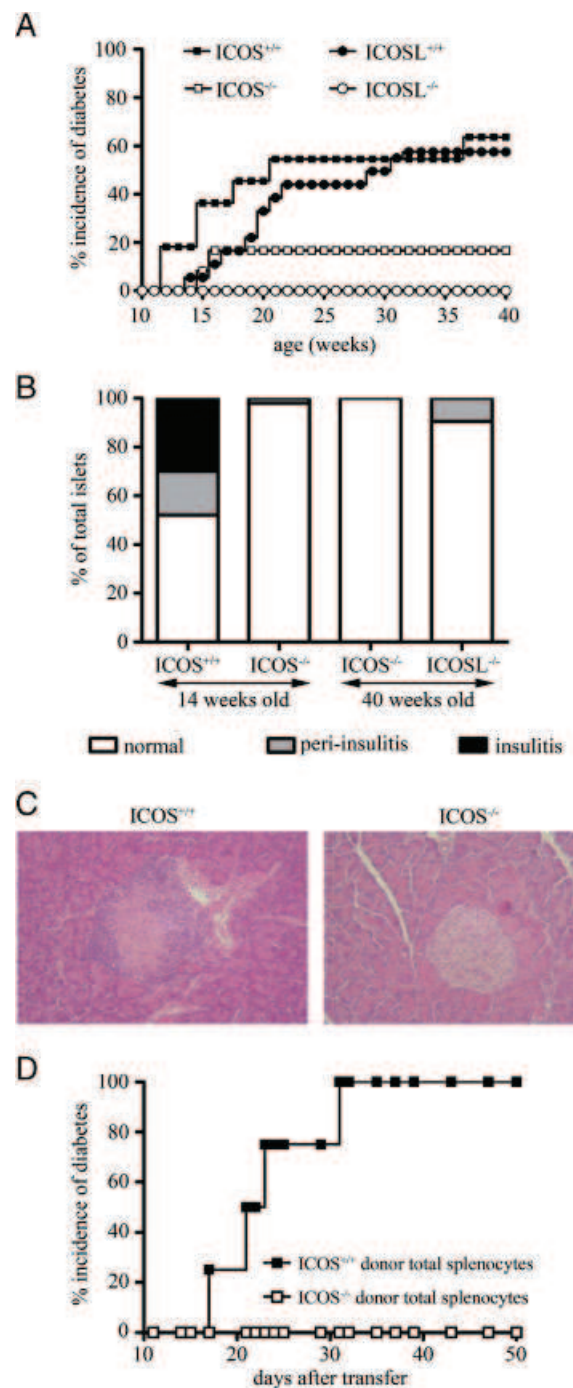


Figure 1. ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice are protected from T1D. (A) Spontaneous incidence of T1D in female ICOS^{+/+} (■, n = 11), ICOS^{-/-} (□, n = 12), ICOSL^{+/+} (●, n = 18), ICOSL^{-/-} (○, n = 15) NOD mice. **p* < 0.05 (Logrank Test). (B) ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice are almost free from insulinitis. Percentage of normal islets, peri-insulinitis, and insulinitis in 14-wk-old female ICOS^{+/+} (n = 10 mice) or ICOS^{-/-} (n = 9) NOD mice, and in 40-wk-old female ICOS^{-/-} (n = 6) or ICOSL^{-/-} (n = 6) NOD mice. (C) Representative sections of pancreases from 14-wk-old female ICOS^{+/+} or ICOS^{-/-} NOD mice. (D) Splenocytes from 40-wk-old ICOS^{-/-} NOD mice do not transfer T1D. Briefly, 8-wk-old NOD.scid mice were transferred with 10 × 10⁶ stimulated splenocytes from 40-wk-old ICOS^{-/-} (□ ICOS^{-/-} donor total splenocytes, n = 4) or ICOS^{+/+} (■ ICOS^{+/+} donor total splenocytes, n = 4) NOD mice. ***p* < 0.01 (Logrank Test). Data are representative of three independent experiments.

mice developed T1D. Interestingly, both female $ICOS^{-/-}$ and $ICOSL^{-/-}$ NOD mice were also protected from insulinitis. At 14 wk of age, 48% of islets from $ICOS^{+/+}$ mice were infiltrated, with 30% of the islets showing invasive insulinitis, whereas only 2% islets were infiltrated in $ICOS^{-/-}$ mice (Fig. 1B and C). At 40 wk of age, $ICOS^{-/-}$ NOD mice were free from insulinitis, whereas 9.5% of the islets from $ICOSL^{-/-}$ NOD mice showed peri-insulinitis (Fig. 1B). In the light of these findings, we next investigated whether the inability to induce T1D was intrinsic to spleen cells from $ICOS^{-/-}$ NOD mice. To this end, splenocytes from 40-wk-old $ICOS^{-/-}$ or $ICOS^{+/+}$ mice were activated *in vitro* by anti-CD3 and anti-CD28 Ab and then adoptively transferred to NOD.scid recipients (Fig. 1D). None of the recipient mice transferred with splenocytes from $ICOS^{-/-}$ NOD mice developed T1D upon transfer within a 90-day time frame. By contrast, all recipient mice transferred with splenocytes from control $ICOS^{+/+}$ NOD mice became diabetic within 30 days following transfer (Fig. 1D). Interestingly, both $ICOS^{-/-}$ and $ICOSL^{-/-}$ NOD mice were resistant to the induction of T1D by cyclophosphamide at 8 wk of age (data not shown). Taken together, these observations demonstrate that the ICOS/ICOSL pathway is critical in the early steps leading to failure of immune tolerance to β cells.

ICOS expression during the T1D development

To better understand how the ICOS/ICOSL costimulatory pathway may interfere with the diabetogenic process, we studied ICOS expression during T1D development. We found that ICOS expression was the highest in the islet cell infiltrate (Fig. 2A). In total, 29.2% of $CD4^+$ islet-infiltrating T cells expressed ICOS at 8 wk of age, as compared with 7% in pancreatic LN (PLN), 7.5% in axillary LN (ALN), and 9.2% in the spleen. No significant peak of ICOS expression was seen on $CD4^+$ T cells at earlier stages of the NOD autoimmune process, especially in PLN, although ICOS expression was slightly increasing with age (*i.e.* at 3, 5, and 8 wk of age; Fig. 2B). Since ICOSL can be expressed by various tissues under inflammatory conditions, we studied ICOSL expression in the pancreas. Although ICOSL was expressed, as expected, on infiltrating B cells and APC (data not shown), we observed no ICOSL expression on β cells using flow cytometric analysis (Fig. 2C).

Abrogation of ICOS/ICOSL costimulatory pathway induces acute diabetes in BDC2.5 NOD mice

Several lines of evidence point toward an important role of the ICOS/ICOSL pathway in the differentiation of Treg, including the observation that anti-ICOS monoclonal Ab treatment accelerates the development of T1D in BDC2.5 NOD mice [21]. Since it is difficult to evaluate the level of saturation and accessibility of target cells in studies using blocking Ab, we sought to evaluate the role of ICOS in the development of T1D of BDC2.5 $ICOS^{-/-}$ NOD mice. We observed an increased prevalence of spontaneous

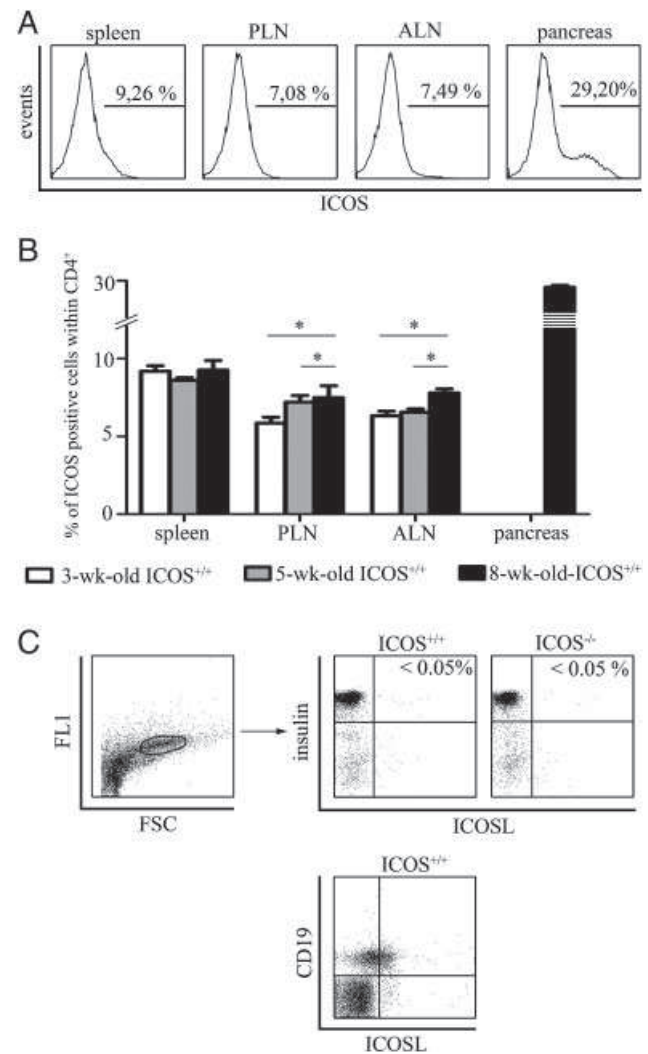


Figure 2. ICOS is strongly expressed on islet-infiltrating $CD4^+$ T cells. (A) ICOS expression on islet-infiltrating T cells. Flow cytometric analysis of ICOS expression on unmanipulated T cells from spleen, PLN, ALN, pancreas of 8-wk-old $ICOS^{+/+}$ NOD mice ($n = 6$). Plots show representative staining of ICOS intensity gated on $CD4^+$ living cells. Numbers represent the percentage of $ICOS^+$ cells within $CD4^+$. Data are representative of three independent experiments. (B) ICOS expression during T1D development. Expression of ICOS on unmanipulated T cells from spleen, PLN, ALN, pancreas of 3, 5, and 8-wk-old $ICOS^{+/+}$ NOD mice ($n = 6$ per group). Each bar corresponds to the mean \pm SD of values obtained. $*p < 0.05$ (Student's *t*-test). Data are representative of three independent experiments. (C) β cells do not express ICOSL. The first dot plot on the left shows how β cells were distinguished from non- β cells based on their autofluorescence (FAD content) and cell size, resulting in a population with 90% (insulin-positive) β cells. Second and third dot plots on the right show representative staining of ICOSL intensity gated on unmanipulated β cells pooled from three pancreas of 8-wk-old $ICOS^{+/+}$ or $ICOS^{-/-}$ NOD mice. Numbers are percentage of $ICOSL^+$ cells within insulin-positive β cells. As positive control, the lower dot plot shows representative staining of ICOSL intensity gated on unmanipulated $CD19^+$ cells pooled from ALN from 8-wk-old $ICOS^{+/+}$ NOD mice, treated as β cells with collagenase and dissociation buffer. Data representative of five independent experiments.

T1D in BDC2.5 $ICOS^{-/-}$ NOD mice as compared with BDC2.5 $ICOS^{+/+}$ NOD mice (Fig. 3A). At 20 wk of age, 66% of female BDC2.5 $ICOS^{-/-}$ became diabetic, as compared with 8.33% of

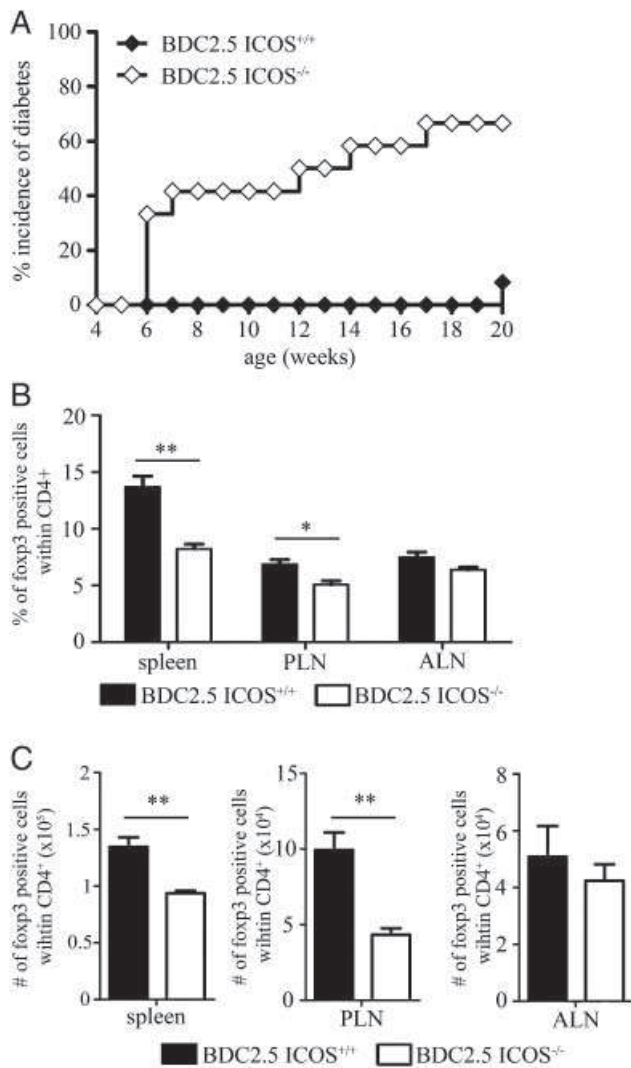


Figure 3. Acute T1D and decreased Treg in spleen and PLN of BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice. (A) BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice develop acute T1D. Spontaneous incidence of T1D in BDC2.5 ICOS^{+/+} (◆, *n* = 10 mice) and BDC2.5 ICOS^{-/-} (◇, *n* = 10 mice) NOD females. **p* < 0.05 (Logrank Test). (B, C) Decreased Treg in BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice. Percentage (B) and absolute number (C) of Foxp3⁺ cells within CD4⁺ T cells in spleen, PLN, ALN of 8-wk-old, unmanipulated, BDC2.5 ICOS^{+/+} (*n* = 7) or BDC2.5 ICOS^{-/-} (*n* = 8) NOD mice. Each bar represents the mean ± SD of values obtained. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 (Student's *t*-test). Data representative of three independent experiments.

control mice. This observation raises the possibility that the ICOS pathway may control both the activation of autoimmune T_{eff} cells and of Treg, but that T-cell dependence on ICOS may vary depending on the T-cell clone considered.

A significant decrease in the absolute number and the percentage of CD4⁺Foxp3⁺ T cells was observed in spleen and PLN obtained from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice as compared with WT littermates (Fig. 3B and C). A 26.3–40.0% decrease of percentages of CD4⁺Foxp3⁺ T cells was observed in BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice, respectively, in PLN and spleen. Considering absolute numbers of CD4⁺Foxp3⁺ T cells, a comparable decrease was observed, with a 31–48% decreased in spleen and PLN.

Similar results were obtained in ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice as compared with their respective littermates (Supporting Information Fig. 1). Whatever the strains considered, no decrease was seen in ALN.

We next evaluated the ability of Treg from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice, as compared with control cells, to inhibit the proliferative response of T_{eff} cells to anti-CD3 Ab or RVRPLWVRME mimotope peptide. As shown in Fig. 4A, no defective inhibitory capacity of CD4⁺CD25⁺ Treg from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice was observed when cells were stimulated with anti-CD3 Ab. In contrast, CD4⁺CD25⁺ Treg from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were less efficient in suppressing the proliferative response of CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from BDC2.5 ICOS^{+/+} NOD mice to stimulation by the RVRPLWVRME peptide than BDC2.5 CD4⁺CD25⁺ Treg from BDC2.5 ICOS^{+/+} NOD mice (Fig. 4B). These results were confirmed at various CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ T-cell ratios. Taken together, our data suggest that qualitative and quantitative defects in ICOS-dependent Treg drive the increased incidence of T1D in transgenic BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice.

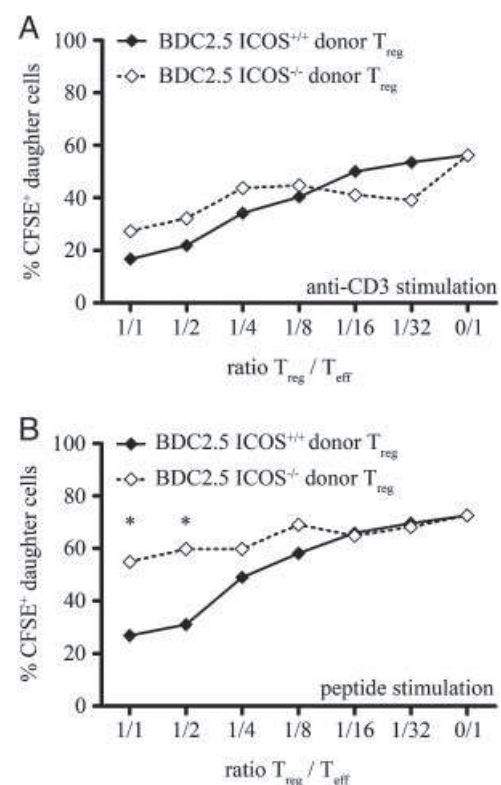


Figure 4. Treg from BDC2.5 ICOS^{-/-} are less efficient in suppressing T-cell proliferation in response to peptide stimulation. (A, B) In total, 5×10^4 CD4⁺CD25⁻CFSE⁺ T_{eff} cells (T_{eff} cells) from 8-wk-old BDC2.5 ICOS^{+/+} NOD mice (*n* = 3) were cultured in the presence of CD4⁺CD25⁺ Treg from 8-wk-old BDC2.5 ICOS^{+/+} (◆ BDC2.5 ICOS^{+/+} donor Treg, *n* = 3) or BDC2.5 ICOS^{-/-} (◇ BDC2.5 ICOS^{-/-} donor Treg, *n* = 3) NOD mice at indicated ratio (T_{reg}/T_{eff}). Cells were stimulated by anti-CD3 Ab (1 μg/mL, (A)) or by RVRPLWVRME peptide (60 μg/mL, (B)). Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells was assessed after 72h by CFSE dilution. **p* < 0.05 (Student's *t*-test). Data are representative of three independent experiments.

A low frequency of ICOS-independent diabetogenic precursors contributes to diabetes protection in ICOS^{-/-} NOD mice

The development of accelerated T1D in BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice points to diabetogenic BDC2.5 T_{eff} cells as ICOS-independent. The difference between polyclonal T cells in conventional NOD mice and BDC2.5 T cells in BDC2.5 transgenics is likely in the frequency of corresponding precursors. To test this hypothesis, we performed transfer experiments in which an increasing ratio of BDC2.5 monoclonal T_{eff} cells/polyclonal T_{eff} cells was transferred into ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients. As shown in Fig. 5, 2×10^5 CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from ICOS^{-/-} NOD mice failed to transfer T1D, as it was the case when 1×10^3 CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from BDC2.5 ICOS^{-/-} mice and 1.99×10^5 CD4⁺CD25⁻ polyclonal T_{eff} cells from conventional ICOS^{-/-} NOD mice were cotransferred into ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients (ratio 1:100). In contrast, co-injection of 5×10^3 CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice with 1.95×10^5 CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from ICOS^{-/-} NOD mice (ratio 1:40) was sufficient to efficiently transfer T1D in ICOSL^{-/-} NOD.scid recipients. The frequency of potent diabetogenic T_{eff} cells thus explains the opposite T1D phenotype observed in conventional ICOS^{-/-} NOD mice and BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice.

Development of neuromuscular autoimmunity in ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice

Beginning at 20 wk of age, ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice exhibited a symmetrical, rapidly progressing hind leg paralysis with a higher prevalence in female (100 and 72.9%, respectively at 40 wk of age) than in males (20 and 26.9%, respectively, at 40 wk of age) (Fig. 6A). The disease was not observed in

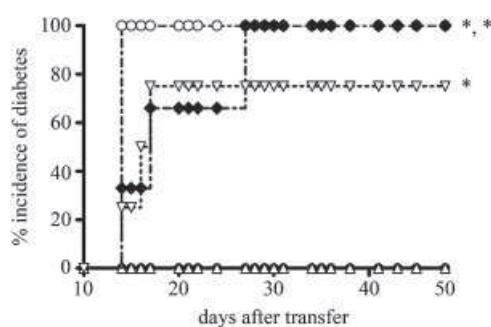


Figure 5. Dependence of NOD diabetogenic T cells on the ICOS pathway is determined by frequency of precursors. About 8-wk-old ICOSL^{-/-} NOD.scid mice were injected with CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from 14-wk-old ICOS^{-/-} NOD mice (ICOS^{-/-} donor T_{eff}) and/or from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice (BDC2.5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}) at indicated ratio (● 2×10^5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}, n = 3; △ 1.99×10^5 ICOS^{-/-} donor T_{eff} and 1×10^3 BDC2.5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}, n = 4; ▽ 1.95×10^5 ICOS^{-/-} donor T_{eff} and 5×10^3 BDC2.5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}, n = 4; ◆ 1.90×10^5 ICOS^{-/-} donor T_{eff} and 1×10^4 BDC2.5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}, n = 4; ○ 2×10^5 BDC2.5 ICOS^{-/-} donor T_{eff}, n = 3). **p* < 0.05 as compared with mice injected with 2×10^5 ICOS^{-/-} donor T_{eff} (Logrank Test). Data are representative of three independent experiments.

corresponding control NOD mice. ICOS^{-/-} NOD mice showing evidence for paralysis were analyzed for pathological alterations in the nervous system and muscle (Fig. 6B). Inflammatory infiltrates seen in muscles, peripheral nerves, sensory ganglia, brain, and spinal cord were composed of T cell, macrophages, and a variable number of granulocytes. Overall, the picture was that of a T-cell-mediated inflammatory reaction, potentially of autoimmune origin. By contrast, no histological lesions were seen in control ICOS^{+/+} NOD mice in the corresponding organs (Fig. 6B).

To assess whether muscular and neurological lesions were immune-mediated, purified T cells including CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells or total splenocytes from 40-wk-old ICOS^{-/-} or ICOS^{+/+} NOD mice were first activated *in vitro*, then adoptively transferred into conventional NOD.scid recipients (Fig. 6C). Muscular and neurological symptoms, consisting in hind leg weakness and ataxia, were observed only in recipients of total splenocytes or purified T cells including CD4⁺ and CD8⁺ T cells from ICOS^{-/-} NOD mice. Clinical paralysis started 4–6 wk post-transfer. In contrast, none of the NOD.scid recipients that received total splenocytes or purified T cells including CD4⁺ and CD8⁺ T cells from ICOS^{+/+} NOD mice developed T1D. Clinical T1D was observed only in recipient mice transferred with corresponding T cells from ICOS^{+/+} NOD mice (data not shown). Neither T1D nor neuromuscular disease was observed in mice transferred by splenocytes depleted of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from ICOS^{+/+} or ICOS^{-/-} NOD mice. Histological analyses of recipient mice were performed 30 days after transfer. Although no infiltrates were found in CNS, the same pathological alterations as those seen in ICOS^{-/-} mice developing a spontaneous neuromuscular disease were observed in the peripheral nervous system (PNS) and in muscles (data not shown).

Since a similar neuropathy phenotype was previously reported in the B7.2^{-/-} NOD mice, and since the ICOS/ICOSL costimulation pathway belongs to the same costimulation superfamily as CD28/B7, we checked the expression of CD28, B7, and CTLA-4. No significant difference in the expression of CD28 and CTLA-4 on T cells was seen in ICOS^{-/-} NOD mice as compared with ICOS^{+/+} NOD mice (data not shown). As shown in Fig. 6D, expression of B7.1 and B7.2 on B cells remains unchanged in both strains before and after 24 h stimulation by LPS. These data demonstrate that the neuropathy observed in ICOS^{-/-} NOD mice does not depend on secondary modifications of the CD28/B7 pathway.

Discussion

Given the role of costimulation in T-cell responses to antigens, attempts to modulate signaling through costimulatory pathways are expected to modify the development of autoimmunity in models in which T cells are central in the autoimmune process [13, 14, 23]. Understanding the role of the ICOS/ICOSL costimulatory pathway in processes that lead to autoimmune destruction of pancreatic β cells in T1D is thus a key issue and the

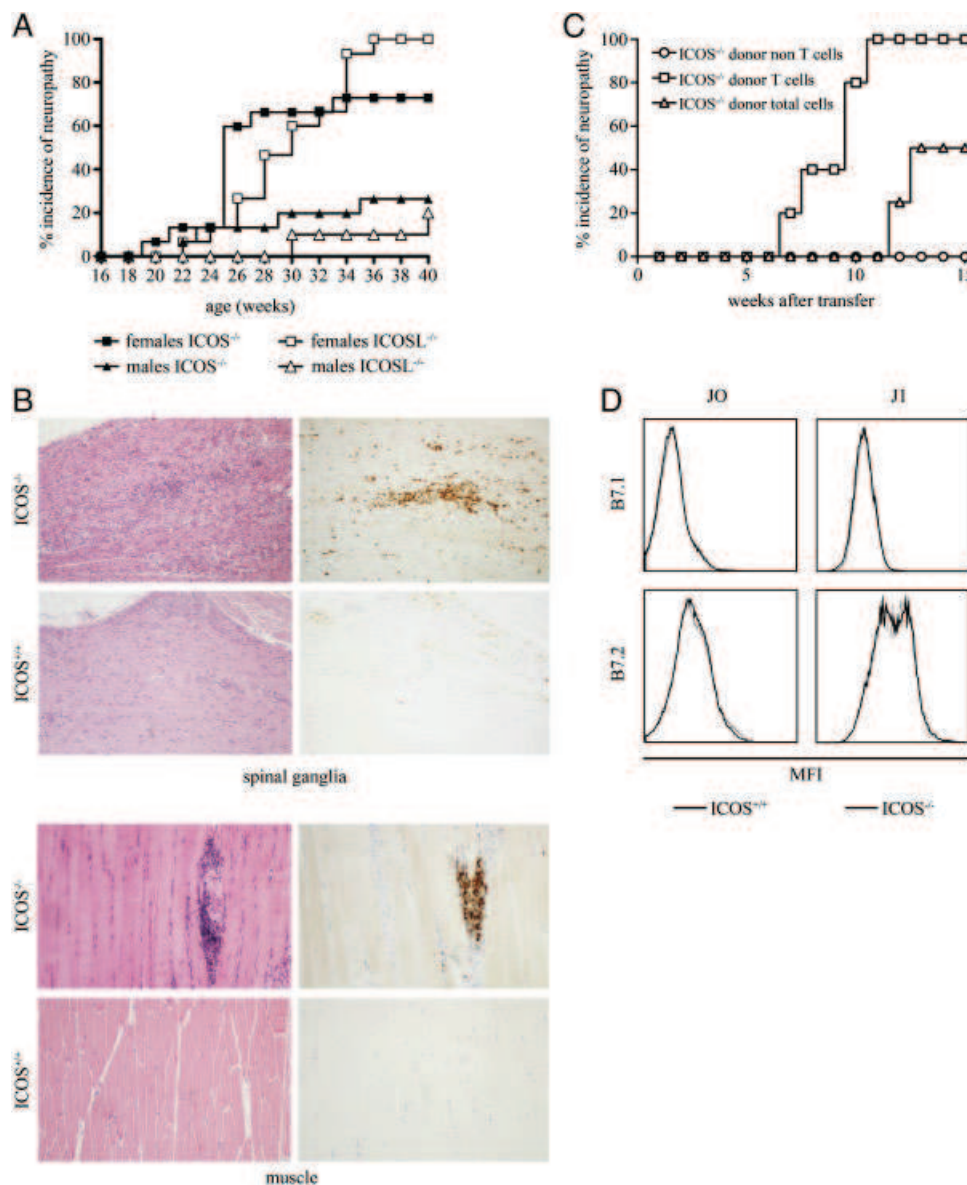


Figure 6. Muscle and neural autoimmunity in ICOS^{-/-} NOD mice. (A) Spontaneous incidence of neuropathy in male (▲, *n* = 10) and female (■, *n* = 10) ICOS^{-/-} NOD mice and in male (△, *n* = 15) and female (□, *n* = 15) ICOSL^{-/-} NOD mice. Mice were checked weekly for clinical signs of neuropathy, consisting chronologically in hind legs weakness, ataxia, and sensitive troubles. Data are representative of two independent experiments. (B) Histology of spinal ganglia and muscles from 40-wk-old ICOS^{+/+} or ICOS^{-/-} NOD females. As compared with age-matched female ICOS^{+/+} NOD mice, female ICOS^{-/-} NOD mice show inflammation and infiltrating T cells (left column for hematoxylin and eosin staining, 90 × magnification; right column for anti-CD3 immunocytochemistry staining, 90 × magnification) in spinal ganglia (upper panel) and in muscle (lower panel). (C) Briefly, 8-wk-old NOD.scid mice (*n* = 5 per group) were injected with 10 × 10⁶ stimulated total spleen cells (△, ICOS^{-/-} donor total cells), 5 × 10⁶ purified stimulated T cells including CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells (□, ICOS^{-/-} donor T cells), 5 × 10⁶ stimulated splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (○, ICOS^{-/-} donor non-T cells) from 40-wk-old ICOS^{-/-} NOD mice. Data are representative of three independent experiments. (D) The CD28/B7 pathway is not altered in the ICOS^{-/-} NOD mice. Flow cytometric analysis of B7.1 and B7.2 expression on B cells from spleen of 8-wk-old ICOS^{+/+} or ICOS^{-/-} NOD mice before and after *in vitro* stimulation by LPS. Plots show representative staining of B7.1 or B7.2 intensity gated on CD19⁺ living cells. Data are representative of three independent experiments.

first step toward potential therapeutic applications. In this study, using a genetic deletion approach, we have demonstrated that the ICOS/ICOSL costimulation pathway is required for the development of T1D in the NOD mouse. We observed that ICOS^{-/-} and, for the first time, ICOSL^{-/-} NOD mice are both protected from developing T1D. Since the *Icos* gene and the *Icosl* gene locate on different chromosomes, our data indicate that

protection against T1D directly relates with deficient ICOS/ICOSL pathway and is not due to the effect of a distinct *Idd* gene located in the vicinity of *Icos*, such as *Cd28* [6, 7] or *Ctla4* [8]. Moreover, the inefficiency of cyclophosphamide injections to induce acute T1D, the striking protection from insulinitis in 40-wk-old ICOS^{-/-}, and ICOSL^{-/-} NOD mice, the failure to transfer T1D into NOD.scid mice after adoptive transfer of splenocytes from

ICOS^{-/-} NOD mice suggests that the ICOS/ICOSL pathway is necessary in the early steps that lead to the failure of immune tolerance to β cells.

Interestingly, as compared with the levels of expression within spleen, PLN, and ALN, a high percentage of islet-infiltrating CD4⁺ T cells express ICOS in conventional 8-wk-old NOD mice. More surprisingly, no peak of ICOS expression was ever observed in PLN along T1D development. However, it is possible that we failed to capture an ICOS expression peak since activated T cells rapidly migrate into the islets where further increase in ICOS expression is likely to take place. We studied ICOSL expression in pancreas in order to further precise the role of the ICOS/ICOSL pathway in the islets. *In situ*, ICOSL expression was restricted to conventional APC. No ICOSL expression was observed on β cells. High ICOS expression by islet T cells is thus possibly secondary to the local expansion of diabetogenic T cells within the islets independently of ICOSL expression by β cells.

Although we cannot exclude that the ICOS/ICOSL pathway is necessary for activation and homeostasis of diabetogenic T cells, we have to take into account the role of ICOS and ICOSL in T-cell-dependent B-cell responses [22, 24–26]. The ICOS/ICOSL pathway is indeed critical for isotypic commutation and somatic mutation in B cells. Defective *Icos* or *Icosl* expression in NOD mice is expected to disrupt interactions between T and B cells and prevent the failure of immune tolerance to β cells initiated by B lymphocytes. B cells are essential APC during T1D development [27–29]. This is consistent with the diminished production of auto-Ab that has been previously reported in ICOS^{-/-} NOD mice [20].

The increased incidence of T1D seen in BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice suggests that the ICOS/ICOSL pathway is critical for Treg. In ICOS^{-/-} and BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice, a significant decrease in percent and absolute number of CD4⁺Foxp3⁺ T cells is seen in spleen and PLN although not in ALN. This difference may reflect the local immune activation process that leads to T1D. Interestingly, *in vitro*, CD4⁺CD25⁺ Treg from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were significantly less efficient than control Treg in suppressing the T-cell response to a mimotope peptide but not to anti-CD3 Ab. These observations suggest that the ICOS/ICOSL pathway is critical for the function of both T_{eff} cells and Treg, but that the dependence of T cells on ICOS varies depending on the T-cell clone considered and the strength of signals involved in T-cell activation.

Accelerated T1D in ICOS^{-/-} BDC2.5 NOD mice indicates that all diabetogenic T_{eff} cells do not depend on the ICOS/ICOSL costimulation pathway. Affinity of the TCR for peptide–major histocompatibility complexes is expected to inversely correlate with dependence of T-cell activation on ICOS costimulation. Addressing the affinity issue would require studying transgenic mice carrying different TCR specific for the same peptide–major histocompatibility complexes. However, transfer experiments using decreasing dilution of BDC2.5 diabetogenic T_{eff} cells in a polyclonal NOD T_{eff} cells pool allowed showing that the frequency of ICOS-independent diabetogenic T_{eff} explains the opposite T1D phenotype observed in conventional ICOS^{-/-} NOD mice and BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice.

For the first time, we report, in both ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice, a deviation of autoimmunity from the islets toward muscles, peripheral nerves, sensory ganglia, and, to a lesser extent, the CNS. Diffuse inflammatory infiltrates composed of T cells, macrophages, and variable numbers of granulocytes are observed, similar to those seen in autoimmune encephalitis, neuritis, and myositis. The observation of muscle and peripheral nerve autoimmunity is not unexpected if one considers that, beyond spontaneously developing T1D, NOD mice are susceptible to many other autoimmune diseases. These include autoimmune sialadenitis [30], autoimmune thyroiditis [31], hemolytic anemia [32], and prostatitis in male mice [33]. Accordingly, the NOD-derived mouse has been considered as a model of primary Sjogren syndrome, Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis [34–36].

A shift from T1D to other autoimmune diseases has been evidenced in NOD mice in which a costimulatory molecule that is distinct from ICOSL, B7.2, was disrupted [34]. Autoimmunity in B7.2^{-/-} NOD mice is directed against myelin protein zero and is mainly directed against the PNS [37]. A critical point is that the CD28/B7 pathway remains unaltered in ICOS^{-/-} NOD mice as compared with control mice. Moreover, autoimmune deviation in ICOS^{-/-} NOD mice extends to muscles, sensory ganglia and to a lower extent the CNS while it is only restricted to PNS in B7.2^{-/-} NOD mice. Our observation, along with the previous report in the B7.2^{-/-} NOD model, points to local interactions of T cells with other cell partners as a key factor in maintenance or disruption of organ-specific immune tolerance. Further experiments will be required to address whether T_{eff} cells that drive muscle and/or neurological autoimmunity in ICOS^{-/-} NOD mice can be down-regulated by Treg from ICOS^{+/+} NOD mice that are likely to be ICOS-independent.

In conclusion, we bring evidence that ICOS/ICOSL interaction controls in part the activation of diabetogenic T_{eff} cells and influences the balance between Treg and diabetogenic T_{eff} cells. This likely explains the discordant observations made in conventional and transgenic BDC2.5 NOD mice. Furthermore, although ICOS^{-/-} or ICOSL^{-/-} NOD mice are protected from T1D, they develop autoimmunity against neural and muscular tissues, indicating that ICOS–ICOSL interactions are important in polarizing the NOD autoimmune response.

Materials and methods

Mice

NOD, ICOS^{-/-} NOD, ICOSL^{-/-} NOD, NOD.*scid*, ICOSL^{-/-} NOD.*scid*, BDC2.5 NOD and BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were bred and housed in our facilities under specific pathogen-free conditions. ICOS^{-/-} NOD mice were generated by crossing NOD mice with ICOS^{-/-} [22] and backcrossing for nine generations to NOD mice. ICOSL^{-/-} NOD mice were generated by backcrossing ICOSL^{-/-} [38] to NOD mice for 16 generations. The prevalence

of T1D in our NOD colony reaches 10% in males and 75% in females by 6 month of age. Animal studies were approved by institutional review.

Diabetes assessments

T1D was assessed by monitoring mice for glycosuria using test strips from 4 wk on twice a week for spontaneous incidence or three times a week, 10 days after the beginning of adoptive transfer experiments. Blood glucose was measured (Euroflash, Lifescan, Milpitas, CA) when glycosuria was detected. Mice were diagnosed as diabetic after two consecutive glycemia over 200 mg/dL. The onset of T1D was dated from the first of the sequential glycemia measurements.

Histological analysis

To evaluate inflammation in nervous tissue and muscle, animals were perfused, fixed by 4% formaldehyde solution (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA), then spinal ganglia and pieces of different skeletal muscles were dissected and embedded into paraffin. Briefly, 3 m sections were stained with hematoxylin and eosin. Immunocytochemistry was performed with primary Ab against T cells (CD3; MCA 1477; Serotec, GB) using a biotin/avidin/peroxidase technique.

Flow cytometric analysis

Ab

The following mAb were used (hybridoma clone indicated in parentheses): PerCP-anti-CD4 (RM4-5), PE-anti-ICOSL (HK5.3) from BD Bioscience (San Jose, CA); FITC-anti-B7.1 (16–10A1), PE-anti-B7.2 (GL1), APC-anti-CD19 (MB19-1), Biotin-anti-CD278/ICOS (15F9), PE-anti-Foxp3 (FJK-16s) from eBioscience (San Diego, CA). β cells were stained with bovin anti-insulin Ab (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) then with Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG (Jakson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Appropriate isotype control mAb were included.

Immunofluorescence staining

Single-cell suspensions were pelleted in 96-well plates, preincubated with 10 μ g/mL 2.4G2 for 15 min at 4°C and washed twice in order to minimize unspecific binding. Cells were then stained for 30 min at 4°C with optimal concentrations of reagents in 20 μ L of PBS supplemented with 2% FBS and 5 mM sodium azide. Cells were washed twice, stained again if necessary, or resuspended in PBS containing 1% formaldehyde. Intracellular Foxp3 staining was performed according to the manufacturer's instructions (Foxp3 anti-mouse/rat Foxp3 staining set; eBioscience). Flow

cytometric analysis was performed using a FACSCalibur, FlowJo softwares (Tree Star, Ashland, OR).

Cell purifications

CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells were purified through a first step of CD4⁺ T-cell enrichment using mouse CD4⁺ Selection Kit (Invitrogen Dynal AS, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were then separated by MACS sorting, using LS columns, biotin-anti-CD25 (7D4, BD Bioscience) Ab, and streptavidin beads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany): CD4⁺CD25⁺ T cells were recovered from the "positive" fraction, whereas CD4⁺CD25⁻ T cells were in the flow through. Purified T cells including CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were directly separated by MACS sorting as described above using biotin-anti-CD8 and biotin-anti-CD4 Ab prepared in the laboratory. β cells were prepared using collagenase as described previously [39] with slight modifications and further digestion in enzyme-free cell-dissociation buffer (Invitrogen).

In vitro suppression assay

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were sorted as described above from pooled spleen cells of three 8-wk-old BDC2.5 ICOS^{+/+} or BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice. CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells from BDC2.5 ICOS^{+/+} NOD mice were labeled by incubation with 5 μ M CFSE (Molecular Probes, Invitrogen) for 15 min at 37°C. Cells were then incubated in triplicate wells in 96-plates at 5×10^4 /well with different ratios of unlabeled CD4⁺CD25⁺ Treg from BDC2.5 ICOS^{+/+} or BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice. Cells were stimulated in the presence of anti-CD3 (1 μ g/mL, eBioscience) or RVRPLWVRME peptide (60 μ g/mL) and 1×10^5 irradiated CD4⁺ and CD8⁺-depleted splenocytes from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice. Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells was assessed after 72h by flow cytometry.

Adoptive cell transfers

CD4⁺CD25⁻ T_{eff} cells, purified T cells including CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, splenocytes depleted of CD4⁺, and CD8⁺ T cells from 8, 14, or 40-wk-old either ICOS^{+/+}, ICOS^{-/-}, BDC2.5 ICOS^{+/+}, BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were sorted as described above. When indicated, cells were stimulated with 1 μ g/mL anti-CD3 (BD Bioscience) and anti-CD28 (BD Bioscience) for 48 h. IL2 (20 U/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) was added to the culture of the splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Total spleen cells or purified T cells, stimulated or not, were then adoptively transferred as indicated in figure legends i.v. into 8-wk-old ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD.scid mice as described previously [40].

Ten days after the transfer, mice were evaluated three times a week, for clinical T1D or neuropathy (consisting in hind legs weakness, ataxia) during 15 wk or sacrificed 30 days after transfer, perfused, and fixed by 4% formaldehyde solution (Electron Microscopy Science) in order to perform histological analysis.

Statistical analysis

Appropriate statistical tests were performed on all data as indicated in figure legends using GraphPad Prism Version 4.0b software (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Acknowledgements: A. T. was supported by an “Avenir” INSERM contract. E. R. was supported by an FRM contract. C. B. was supported by INSERM contract.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Faideau, B., Larger, E., Lepault, F., Carel, J. C. and Boitard, C., Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* 2005. **54**: S87–S96.
- 2 Anderson, M. S. and Bluestone, J. A., The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. **23**: 447–485.
- 3 Jones, E. Y., Fugger, L., Strominger, J. L. and Siebold, C., MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. **6**: 271–282.
- 4 Toma, A., Haddouk, S., Briand, J. P., Camoin, L., Gahery, H., Connan, F., Dubois-Laforgue, D. et al., Recognition of a subregion of human proinsulin by class I-restricted T cells in type 1 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. **102**: 10581–10586.
- 5 Wong, F. S., Visintin, I., Wen, L., Flavell, R. A. and Janeway, C. A., Jr., CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J. Exp. Med.* 1996. **183**: 67–76.
- 6 Hara, T., Fu, S. M. and Hansen, J. A., Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.* 1985. **161**: 1513–1524.
- 7 Gross, J. A., St John, T. and Allison, J. P., The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J. Immunol.* 1990. **144**: 3201–3210.
- 8 Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G. and Golstein, P., A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature* 1987. **328**: 267–270.
- 9 Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G. et al., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999. **402**: 827–832.
- 10 Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. and Kroczeck, R. A., ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999. **397**: 263–266.
- 11 Todd, J. A. and Wicker, L. S., Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity* 2001. **15**: 387–395.
- 12 Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B. et al., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. **423**: 506–511.
- 13 Lenschow, D. J., Ho, S. C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K. C. et al., Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 1145–1155.
- 14 Lenschow, D. J., Herold, K. C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H. Y., Fuchs, E. et al., CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 1996. **5**: 285–293.
- 15 Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. and Bluestone, J. A., B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000. **12**: 431–440.
- 16 Luhder, F., Högglund, P., Allison, J. P., Benoist, C. and Mathis, D., Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 1998. **187**: 427–432.
- 17 Ansari, M. J., Salama, A. D., Chitnis, T., Smith, R. N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T. et al., The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 2003. **198**: 63–69.
- 18 Ansari, M. J., Fiorina, P., Dada, S., Guleria, I., Ueno, T., Yuan, X., Trikudanathan, S. et al., Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice. *Clin. Immunol.* 2008. **126**: 140–147.
- 19 Nanji, S. A., Hancock, W. W., Luo, B., Schur, C. D., Pawlick, R. L., Zhu, L. F., Anderson, C. C. et al., Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 2006. **55**: 27–33.
- 20 Hawiger, D., Tran, E., Du, W., Booth, C. J., Wen, L., Dong, C. and Flavell, R. A., ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2008. **180**: 3140–3147.
- 21 Herman, A. E., Freeman, G. J., Mathis, D. and Benoist, C., CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* 2004. **199**: 1479–1489.
- 22 Tafuri, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S. K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L. M. et al., ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001. **409**: 105–109.
- 23 Rottman, J. B., Smith, T., Tonra, J. R., Ganley, K., Bloom, T., Silva, R., Pierce, B. et al., The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 605–611.
- 24 Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H. and Flavell, R. A., ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001. **409**: 97–101.
- 25 McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J. et al., ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001. **409**: 102–105.
- 26 Gigoux, M., Shang, J., Pak, Y., Xu, M., Choe, J., Mak, T. W. and Suh, W. K., Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009. **106**: 20371–20376.
- 27 Serreze, D. V., Fleming, S. A., Chapman, H. D., Richard, S. D., Leiter, E. H. and Tisch, R. M., B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for

- the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 1998. **161**: 3912–3918.
- 28 Noorchashm, H., Noorchashm, N., Kern, J., Rostami, S. Y., Barker, C. F. and Naji, A., B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1997. **46**: 941–946.
- 29 Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A. et al., B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig mu null mice. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 2049–2053.
- 30 Hu, Y., Nakagawa, Y., Purushotham, K. R. and Humphreys-Beher, M. G., Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol.* 1992. **263**: E607–E614.
- 31 Many, M. C., Maniratunga, S. and Deneff, J. F., The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1996. **104**: 17–20.
- 32 Oldenborg, P. A., Gresham, H. D., Chen, Y., Izui, S. and Lindberg, F. P., Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 2002. **99**: 3500–3504.
- 33 Rivero, V. E., Cailleau, C., Depiante-Depaoli, M., Riera, C. M. and Carnaud, C., Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP). *J. Autoimmun.* 1998. **11**: 603–610.
- 34 Salomon, B., Rhee, L., Bour-Jordan, H., Hsin, H., Montag, A., Soliven, B., Arcella, J. et al., Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* 2001. **194**: 677–684.
- 35 Robinson, C. P., Yamachika, S., Bounous, D. I., Brayer, J., Jonsson, R., Holmdahl, R., Peck, A. B. et al., A novel NOD-derived murine model of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1998. **41**: 150–156.
- 36 Girvin, A. M., Dal Canto, M. C., Rhee, L., Salomon, B., Sharpe, A., Bluestone, J. A. and Miller, S. D., A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J. Immunol.* 2000. **164**: 136–143.
- 37 Louvet, C., Kabre, B. G., Davini, D. W., Martinier, N., Su, M. A., DeVoss, J. J., Rosenthal, W. L. et al., A novel myelin P0-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy. *J. Exp. Med.* 2009. **206**: 507–514.
- 38 Mak, T. W., Shahinian, A., Yoshinaga, S. K., Wakeham, A., Boucher, L. M., Pintilie, M., Duncan, G. et al., Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 765–772.
- 39 Halbout, P., Briand, J. P., Becourt, C., Muller, S. and Boitard, C., T cell response to preproinsulin I and II in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* 2002. **169**: 2436–2443.
- 40 Boitard, C., Yasunami, R., Dardenne, M. and Bach, J. F., T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 1989. **169**: 1669–1680.

Abbreviations: ALN: axillary LN · ICOSL: ICOS ligand · PLN: pancreatic LN · PNS: peripheral nervous system · T_{eff} cells: effector T cells · T1D: type 1 diabetes

Full correspondence: Professor Christian Boitard, INSERM U561, Hôpital Saint Vincent de Paul, 82 Avenue Denfert Rochereau, 75014 Paris, France
 Fax: +33-0-1-40-48-83-52
 e-mail: Christian.boitard@htd.aphp.fr

Received: 18/2/2010

Revised: 28/4/2010

Accepted: 4/6/2010

Accepted article online: 11/6/2010

DEVELOPMENT OF SPONTANEOUS AUTOIMMUNE NEUROMYOPATHY IN ICOSL^{-/-} NOD MICE.

Briet C^{1,2,3}, Tardivel I¹, Bécourt C¹, Drouot L⁴, Prevot N¹, Lassmann H⁵, Massaad C^{2,6}, Boyer O⁷, Boitard C^{1,2}

¹ INSERM U986, Hôpital Cochin/S^t Vincent de Paul, Paris, France

² Université René Descartes, Paris, France

³ Université Paris Sud, Paris, France

⁴INSERM U905, faculté de médecine et pharmacie, Rouen, France

⁵Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁶ Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM), France

⁷Unité Mixte de Recherche 8194, Paris, France

Address correspondence to Christian Boitard, INSERM U561, Hôpital Saint Vincent de Paul, 82 Avenue Denfert Rochereau, 75014 Paris, France. Phone: 33 (0)1 40 48 82 49 Fax: 33 (0)1 40 48 83 52. E-mail: Christian.boitard@htd.aphp.fr

Key words: autoimmunity, type 1 diabetes, neuropathy, myopathy, costimulation, ICOS, ICOSL.

Abbreviations: Abs: antibodies; ALN: axillary lymph nodes; APC: antigen presenting cells; β 2-m: beta-2-microglobuline; T1D: diabetes type 1; ICOSL: ICOS ligand; Ig immunoglobulin; MPO: myelin protein zero; PLN: pancreatic lymph nodes; PNS: peripheral nervous system. SPL: spleen.

ABSTRACT

Costimulation pathways are described as central in T cell activation and the control of autoimmune responses. We previously reported that NOD mice that are deficient for the *icosl* gene are protected from diabetes, but instead develop a spontaneous autoimmune neuromyopathy. The general phenotype of the neuromyopathy observed in *ICOSL*^{-/-} NOD mice is globally similar to that observed in *ICOS*^{-/-} and *ICOS*^{-/-}*ICOSL*^{-/-} double knockout NOD mice. The neuromyopathy is observed in 100% of female mice by the age of 35 weeks. The neuropathy remains limited to the peripheral nerve tissue. The disease is characterized by an infiltration of immune cells: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, dendritic cells and B lymphocytes, but does not extend to the central nervous system. A similar infiltrate is seen in muscles.

Autoimmune neuromyopathy can be transferred to naive recipients by T lymphocytes. Transfer is achieved in *NOD.scid* recipient mice by CD4⁺ T-cells, although not by CD8⁺ T-cells, isolated from 35 week old *ICOSL*^{-/-} NOD. The predominant role of CD4⁺T-cells is further demonstrated in this model by the observation that *CIITA*^{-/-}*ICOSL*^{-/-} NOD mice do not developed the neuromyopathy. By contrast, β 2m^{-/-}*ICOSL*^{-/-} NOD mice develop a neuromyopathy.

We obtained evidence (in chimeric mice) that the interaction between antigen-presenting cells (APC) and T lymphocytes via ICOS/ICOSL is a prerequisite to the development of diabetes, while the loss of the interaction between T lymphocytes and APC play a key role in the development of nervous and muscular autoimmunity.

Altogether, our data indicate that the deviation of autoimmunity in NOD mice from the pancreas to muscles and the peripheral nervous system in the absence of ICOS/ICOSL signal is dependent on the loss of the physiological interaction between T cells and APC.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the activation of autoreactive lymphocytes against pancreatic β -cell antigens. Mechanisms that initiate the failure of immune tolerance to β -cells remain elusive in common forms of T1D (Faideau, Larger et al. 2005).

In animal models such as the non-obese diabetic (NOD) mouse, the predominant role of T lymphocytes is supported by experiments in which diabetes is transferred into naive recipients by T lymphocytes from diabetic or prediabetic animals (Yagi, Matsumoto et al. 1992). Moreover, T1D is prevented by injection of antibodies that interfere with T lymphocyte activation and fails to develop in diabetes-prone mice in which key genes in T lymphocyte differentiation or activation are non-functional (Kikutani and Makino 1992; Anderson and Bluestone 2005). Both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells are involved in diabetes development and both class I and class II knockout NOD mice fail to develop diabetes (Kay, Parker et al. 1996; Wong, Visintin et al. 1996). The activation of autoreactive T lymphocytes in diabetes requires the recognition of auto-antigens expressed by β -cells as well as costimulatory signals (Bour-Jordan and Bluestone 2009). Membrane proteins of the *cd28* gene family mediate costimulatory signals through their interaction with members of the B7 family expressed on antigen-presenting cells and stromal cells (Sharpe and Freeman 2002). *In vivo* deletion of the *cd28* or *b7* genes and *Icos* or *Icosl* genes profoundly affect the development of diabetes in the NOD mouse (Lenschow, Herold et al. 1996; Salomon, Lenschow et al. 2000; Sharpe and Freeman 2002; Hawiger, Tran et al. 2008; Prevot, Briet et al. 2010).

NOD mice are highly susceptible to develop T1D and are the animal model that shows the most striking similarities with the human disease (Aoki, Borchers et al. 2005). But, as humans, NOD mice are susceptible to the development of other forms of autoimmunity, and occasionally develop infiltrates in the thyroid, the parathyroid and the adrenal glands (Krug, Williams et al. 1991; Kikutani and Makino 1992). Conventional NOD mice develop autoimmune sialitis with a high prevalence (Hu, Nakagawa et al. 1992; Many, Maniratunga et al. 1996). This predisposition to autoimmunity also set up NOD mice as a good model for experimental induction of autoimmune diseases such as autoimmune prostatitis or autoimmune thyroiditis (Rivero, Cailleau et al. 1998; Hutchings, Hedlund et al. 1999). The NOD mouse disease is highly multigenic and most gene variants characterized are directly involved in controlling immune responses at one or another level. But different NOD genes are also involved in orienting the autoimmune response towards β -cells. Congenic NOD mice expressing non-NOD genes such as class II major histocompatibility complex (MHC) genes I-A^k or I-A^q fail to develop diabetes. They instead develop autoimmunity to the thyroid and the

salivary glands, respectively (Slattery, Kjer-Nielsen et al. 1990; Lindqvist, Nakken et al. 2005). Non MHC genes are also involved in directing the autoimmune response towards an organ or another, as observed in a series of double congenic NOD mice (Lyons, Hancock et al. 2000; Cha, Nagashima et al. 2002; Koarada, Wu et al. 2004). Finally, genes controlling costimulatory T cell molecule have been shown to play a key role, as observed in B7.2 knockout NOD mice which fail to develop diabetes, but develop autoimmune peripheral neuropathy (Salomon, Rhee et al. 2001). This observation raises the possibility that the avidity of interactions between T cells and other cell partners is a local key factor in maintenance or disruption of organ-specific immune tolerance.

We previously reported that protection from diabetes in ICOS^{-/-} NOD mice was unexpectedly associated with the development of an autoimmune disorder of the neuromuscular system, characterized by myositis, sensory ganglionitis and, to a lower extent, inflammatory infiltrates in the central nervous system. This autoimmune neuromyopathy was transferable into naive NOD.*scid* recipients by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from diseased donors (Prevot, Briet et al. 2010). Here, we report that autoimmune neuromyopathy is exclusively dependent on the activation of CD4⁺ T lymphocytes and that the loss of the interaction between T lymphocytes and antigen presenting cells (APC) play a key role in the development of nervous and muscular autoimmunity.

MATERIALS AND METHODS

MICE

NOD mice were bred and housed in our facilities under specific pathogen-free conditions. ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice were generated as described previously (Prevot, Briet et al. 2010). ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were obtained by crossing ICOS^{-/-} with ICOSL^{-/-} NOD mice. CIITA^{-/-}ICOSL^{-/-} and β2-m^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were obtained by crossing ICOSL^{-/-} NOD mice with CIITA^{-/-} NOD mice and β2-m^{+/-} NOD mice (Jackson laboratory, Bar harbour) respectively. ICOSL^{-/-} NOD.*scid* mice were obtained by crossing NOD.*scid* mice with ICOSL^{-/-} NOD mice. The prevalence of diabetes in our NOD colony reaches 10% in males and 60% in females by 6 month of age. Animal studies were approved by institutional review.

DIABETES AND NEUROMYOPATHY ASSESSMENTS

Diabetes was assessed by monitoring mice as describe previously (Prevot, Briet et al. 2010). A clinical score was used to quantify neuromyopathy. Stage 1 is defined by asymmetric extension of back legs after suspension of the mice by the tail. Stage 2 is defined by retraction of back legs after suspension of the mice by the tail. Stage 3 is defined by flexion of front and back legs without snatching to the grid after suspension of the mice by the tail.

HISTOLOGICAL ANALYSIS

To evaluate inflammation in nervous tissue and muscle, animals were perfused 4% formaldehyde solution (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) then brain, spinal cord, spinal roots, spinal and trigeminal ganglia and pieces of different skeletal muscles were dissected and embedded into paraffin. Three sections were stained with hematoxylin and eosin.

Immunocytochemistry was performed on frozen muscle preparations. Sections were stained with primary antibody specific to (hybridoma clone indicated in parentheses): CD8 (53-6.7), CD4 (RM4-5), I-A^d (AMS-32.1), H-2K^d (SF1-1.1), CD11b (M1/70), CD45R/B220 (RA3-6B2) from BD Bioscience. Histologic layer were labeled with a secondary antibody (Anti-rat Biotin from eBioscience or Streptavidine-594 from Invitrogen) and DNA were labeled using Hoechst staining.

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS

Antibodies

The following antibodies (Abs) were used purified or conjugated to biotin (hybridoma clone indicated in parentheses): CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), B220 (RA3-6B2), CD11b (ICRF44) from BD Bioscience and IFN- γ (4S.B3), IL-4(B-S4), IL-17 (17B7) from eBioscience. Appropriate isotype control mAbs were included.

Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining was performed as described previously (Prevot, Briet et al. 2010). Intracellular cytokine staining was performed according to manufacturer's instructions (staining intracellular antigens; eBioscience). Flow cytometric analysis was performed using a FACS FORTESSA, FlowJo softwares (Tree Star, Ashland, OR).

Cytokine production

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

CELL PURIFICATIONS

CD4⁺ T cells were purified using mouse CD4-Negative Selection Kit (Invitrogen Dynal AS, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. CD8⁺ T cells /CD4⁺CD8⁺ T cells /CD4⁺CD25⁺ T cells or CD4⁺CD25⁻ T cells were purified through a MACS sorting, using LS or LD columns, with biotin-anti-CD8 and biotin-anti-CD4 Abs prepared in the laboratory, biotin-anti-CD25 (BD Bioscience) Abs and streptavidin beads according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

ADOPTIVE CELL TRANSFERS:

Purified CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD19⁺ cells, T cells including CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, splenocytes depleted with CD4⁺ and CD8⁺T cells from 8-wk-old or 40-wk-old either ICOSL^{+/+}, ICOSL^{-/-} NOD mice were sorted as described above. When indicated, cells were

then stimulated with 1µg/ml anti-CD3 (BD Bioscience) and anti-CD28 (BD Bioscience) for 48 h. IL2 (20U/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) was added to the culture of the splenocytes depleted of CD4⁺ and CD8⁺T cells. Total spleen cells or purified T cells, stimulated or not, were then adoptively transferred i.v. into 6 to 8-wk-old ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* mice as previously described and as indicated in figure legends.

Ten days after the transfer, mice were evaluated twice a week for clinical diabetes and neuromyopathy for 15 weeks post-transfer, sacrificed, perfused and fixed by 4% formaldehyde solution (Electron Microscopy Science) in order to perform histological analysis.

BONE MARROW CHIMERA

Recipient mice were gamma-irradiated (10 Gy from a ¹³⁷Cs source) 24 hours pre-transplant. Bone marrow transplants were depleted of CD4⁺ and CD8⁺T cells as described above and injected (5.10⁶ cells i.v.) in recipient mice. Neomycin sulfate (4 mg/ml) was given in drinking water during 2 weeks following transplantation. Mice were tested for diabetes and neuromyopathy once a week during 30 weeks.

STATISTICAL ANALYSIS:

Appropriate statistical tests were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism Version 4.0b software (GraphPad Software, La Jola, CA).

RESULTS

ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double knockout NOD mice are protected from T1D and develop neuromuscular autoimmunity.

As we previously reported, both ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice were protected from diabetes, but developed a severe neuromyopathy. As shown in figure 1A, diabetes developed from 12 weeks in wild type ICOSL^{+/+} NOD mice and reached a plateau around 32 weeks of age with a final prevalence of diabetes of 65% at 50 weeks. A slight delay in the onset of neuromyopathy was observed, ICOSL^{-/-} NOD mice developing clinical neuromuscular disease from 19 weeks on to a plateau around 34 weeks of age. Overall, the timing of neuromyopathy onset paralleled that of diabetes with a 6 to 8 weeks delay ($P=0.3$; Log-Rank Test). If diabetes prevalence reached 65% by 50 weeks of age in female mice, the penetrance of neuromyopathy was 100% in female ICOSL^{-/-} NOD mice (figure 1A) and 60% in male ICOSL^{-/-} (not shown) by 50 weeks of age. We then compared female ICOS^{-/-} and ICOSL^{-/-} NOD mice and address whether the incidence was comparable in ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double knockout mice. ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice were all protected from diabetes and developed neuromyopathy following the same kinetics (figure 1 B). The infiltrate was already present in 25 week old female mice, but was not detected in 16 week old female mice (data not shown). The severity of the neuromuscular histological infiltrate was identical in female ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice (figure 1C). High grade immune infiltration was detected in muscles and peripheral nerves of 40 week old female ICOSL^{-/-} NOD mice (figure 1D), but also in male ICOSL^{-/-} NOD mice despite the lower prevalence of clinical neuromuscular disease. This neuromuscular infiltration was composed of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, B220⁺ cells, and CD11c⁺ cells (figure 1E). The similar kinetic and severity profiles of neuromuscular disease in single and double knockout mice is in keeping with data indicating that single molecules signals through the ICOS pathway.

Immune phenotype of ICOSL^{-/-} NOD mice.

We previously reported that ICOS^{-/-} mice showed no gross modification in major T lymphocyte subset as compared with control mice. However, we observed a 26% reduction of Foxp3⁺CD25⁺ T cells in ICOS^{-/-} mice as compared to wild type mice (Prevot, Briet et al. 2010). We further studied the CD11b⁺ cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B220⁺ cells in axillary lymph node (ALN), pancreatic lymph node (PLN) and spleen (SPL) in ICOSL^{-/-} NOD mice as compared to wild type mice. These populations were comparable in ICOSL^{-/-} NOD mice and in wild type NOD mice (figure 2A). A reduction of 30% Foxp3⁺CD25⁺ T cells was

also seen in ICOSL^{-/-} mice as compared to wild type mice (figure 2A). Cytokine production by CD4⁺T cells was analyzed by flow cytometer analysis following PMA-ionomycin activation. The IFN- γ , IL-4 and IL-17 production were not different in ICOSL^{-/-} NOD mice and ICOSL^{+/+} NOD mice (figure 2B). Infiltrating T cells were able to produce INF- γ but not IL-4 nor IL-17 after PMA ionomycin stimulation (figure 2B).

The neuromyopathy is an auto immune disease CD4⁺ T cells dependant.

In order to address whether the neuromuscular syndrome observed in ICOSL^{-/-} NOD mice, was dependent on both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, as seen for diabetes, or was dependent on either one of these two subsets, we performed transfer experiments. When CD4⁺ T cells were transferred in association with CD8⁺ T cells from old ICOSL^{-/-} NOD mice or as a single subset into NOD.*scid* recipient mice, both recipient groups developed neuromyopathy but not diabetes. Development of clinical neuromyopathy was observed as early as by 25 days post-transfer and in 80% to 100% recipients within 50 days post-transfer. By contrast, ICOSL^{-/-} CD8⁺ T cells alone or spleen depleted in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells (CD4⁻CD8⁻ T cells) did transfer neither neuromyopathy nor diabetes (figure 3A). Histological analyses of recipient mice confirmed that either CD4⁺ T cells or CD4⁺ T cells in association with CD8⁺ T cells transfer a neuromuscular infiltrate in NOD.*scid* recipients (figure 3B). The composition of the infiltrate observed in muscles and nerves was identical to that observed in the spontaneously sick mice.

To confirm that autoimmune neuromyopathy development in ICOSL^{-/-} mice was CD4⁺ T cell-dependent, we studied ICOSL^{-/-} NOD mice that were further deficient in either the *c2ta* or the *β 2-microglobulin (β 2-m)* genes. These mice were deprived of either class II-restricted CD4⁺ T cells or class I-restricted CD8⁺ T cells. ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} NOD mice neither developed autoimmune neuromyopathy, as opposed to control ICOSL^{-/-}CIITA^{+/+} NOD mice, nor developed diabetes over 40 weeks of survey (figure 3C). By contrast ICOSL^{-/-} β 2-m^{-/-} NOD mice developed a neuromyopathy, along with a neuromuscular infiltrate that was comparable to that developed by ICOSL^{-/-} β 2m^{+/+} control NOD mice (figure 3D). Thus, both ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} and ICOSL^{-/-} β 2-m^{-/-} NOD mice were protected from diabetes, but only ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} NOD mice were protected from neuromuscular autoimmunity.

In order to further demonstrate that transfer related directly with the neuromuscular disease observed in ICOSL^{-/-} mice and to address whether lymphocytes that cross infiltrated muscle and nerves were responsible for the phenotype observed, we asked whether muscle and nerve infiltrating cells were able to directly transfer nerve and/or muscle autoimmunity. We

isolated muscle and nerve infiltrates and transferred them into NOD.*scid* recipient mice. Recipient mice developed clinical neuromyopathy following the transfer of either nerve (2 out of 3) or muscle (6 out of 7) infiltrating T cells. Nerve-infiltrating T cells induced nerve and muscular infiltrates in NOD.*scid* recipients, but infiltrates observed in these recipients were milder than infiltrates observed in NOD.*scid* recipients of muscle-infiltrating cells. However, the number of infiltrating cells recovered from nerve, and transferred ($0.2 \cdot 10^6$), was 5 fold lower as compared to cells recovered from infiltrated muscle and transferred into NOD.*scid* recipients (10^6) (figure 3E).

ICOS/ICOSL signal is key signal for efficient transfer of neuromyopathy.

The ICOS/ICOSL pathway has been shown central in the primary activation of naive T cells (Swallow, Wallin et al. 1999; Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999). Whether it is also required for activation of memory cells remains an open issue (Moore, Clay et al. 2011). $CD8^+$ T cells and $CD4^+$ T cells from aging conventional or ICOSL^{+/+} NOD mice directly transfer diabetes into NOD.*scid* recipients without the need of prior in vitro activation. However, it has been observed that the transfer of diabetes is delayed by treatment of recipients mice by anti-class II monoclonal antibodies (Boitard, Bendelac et al. 1988), indicating that interactions between $CD4^+$ effector T cells and APCs through class II-mediated antigen presentation is still required for efficient transfer. In case of neuropathy or neuromyopathy, the need for pre-activation of effector T cells in vitro by anti-CD3 and anti-CD28-coated microplates prior to transfer has been observed both when transferring autoimmune peripheral neuropathy by T lymphocytes from B7.2^{-/-} NOD donors (Salomon, Rhee et al. 2001) and autoimmune neuromyopathy from ICOS^{-/-} NOD donors into naive NOD.*scid* recipients (Prevot, Briet et al. 2010). In order to address these issues, we performed transfers of either diabetes or neuromyopathy by T cells from ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD donors into conventional NOD.*scid* recipients or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* recipients. As shown in figure 4A, a significant delay was indeed observed in transferring diabetes into ICOSL^{-/-} as compared to ICOSL^{+/+} NOD.*scid* recipients by $CD4^+CD8^+$ effector T cells from 35 week old control ICOSL^{+/+}. This was the case whatever $CD4^+CD8^+$ T cells were pre-activated in vitro by anti-CD3/anti-CD28-coated microplates (figure 4A) or not (figure 4B) and whatever effectors were total $CD4^+CD8^+$ T cells or $CD4^+CD25^-$ T cells (figure 4C). A delay was also observed in the transfer of autoimmune neuromyopathy by pre-activated $CD4^+$ effector T cells from ICOSL^{-/-} NOD mice in ICOSL^{-/-} NOD.*scid* recipients as compared to ICOSL^{+/+} NOD.*scid* recipients (figure 4D). Altogether, these results indicate that ICOS/ICOSL is necessary not only for activation of naive T cells but also for activation of memory T cells.

Role of APC expression of ICOSL in development of autoimmunity in NOD mice.

We have obtained evidence that ICOS/ICOSL drives key signals in the activation of T cells that are involved in the autoimmune response to β -cells. The APC that interacts with T lymphocytes through ICOS/ICOSL to drive diabetes development or that is deficient and drives the development of autoimmune neuromyopathy in knockout mice is unknown. To address this issue, we reconstituted 3 week old NOD*scid* recipients with B and T cells from either ICOSL^{-/-} or ICOSL^{+/+} 3 week old NOD mice. Upon transfer of T cells from ICOSL^{+/+}NOD mice and B cells from 3 week old ICOSL^{-/-}NOD mice in NOD.*scid* recipients, muscle and nerve infiltrates developed with time. By contrast, reconstitution with T cells from ICOSL^{+/+}NOD mice and B cells from 3 week old ICOSL^{+/+}NOD mice led to insulinitis but no muscle and nerve infiltrate in recipient mice (figure 5A). We further obtained chimeric mice in which 3 week old irradiated (Rx) ICOSL^{-/-} NOD mice were reconstituted with bone marrow (BM) cells from ICOSL^{+/+} or ICOSL^{-/-} NOD mice. In (ICOSL^{+/+}BM \rightarrow RxICOSL^{-/-}) NOD mice, we observed the development of a neuromyopathy, as in (ICOSL^{-/-}BM \rightarrow RxICOSL^{+/+}) NOD mice. These results indicate that autoimmune neuromyopathy can develop when only B lymphocytes or conventional APCs are deficient for ICOSL, while diabetes is only seen in chimeras expressing ICOSL in both B lymphocytes and conventional APCs (figure 5B).

DISCUSSION

The development of diabetes onto the NOD mouse background is associated with many gene variants that are scattered along the genome. Most genes involved affect many different pathways involved in controlling immune responses (Ridgway, Peterson et al. 2008). Among regions harboring these genes, one has for instance been identified as carrying genes encoding for costimulatory molecules. Variants encoding CD28, CTLA4 and ICOS within a 300 kb cluster located on human chromosome 2 are associated with T1D (Wicker, Chamberlain et al. 2004). A syntenic region on mouse chromosome 1 (*Idd5*) that carries the same costimulatory genes has been associated to diabetes in the NOD mouse (Colucci, Bergman et al. 1997). However, the *ICOSL* gene is not located in a region in which markers have been identified as associating with T1D. The diabetes protective phenotype observed in ICOS and ICOSL knockout NOD mice thus indicates that the ICOS/ICOSL pathway is directly involved in the T cell activation observed in autoimmune diabetes. A striking observation in *ICOSL*^{-/-}, as well as in *ICOS*^{-/-}, NOD mice, is the deviation of autoimmunity from the islets towards muscles and peripheral nerves. Diffuse inflammatory infiltrates with macrophage/microglia activation are observed in these mice. T cells are observed within infiltrates. The infiltrate of comparable extent is observed in *ICOS*^{-/-}*ICOSL*^{-/-} double knockout NOD mice, which excludes the possibility of another ligand for ICOS. Finally, neuromuscular autoimmunity develops in *ICOSL*^{-/-} NOD mice within a time frame that is comparable to that of diabetes in conventional *ICOSL*^{+/+} NOD mice. However, the prevalence of neuromyopathy reaches 100% in female mice, which we never observe in conventional female NOD mice and was much higher than that of diabetes in male NOD mice.

Beyond inheritance of genes that predispose to general failure of immune-tolerance in the NOD mouse, some susceptibility regions identified by analysis of crosses between the NOD and conventional mouse strains harbour genes that control the targeting or deviation of autoimmunity towards or from β -cells, respectively (Johansson, Lindqvist et al. 2003). The class II I-A^{g7} allele that is associated with diabetes is a major gene that focuses autoimmunity towards the islet (Chosich and Harrison 1993). Congenic NOD mice expressing class II molecules that are not associated to diabetes in the mouse, such as I-A^k or I-A^q, fail to develop diabetes. They instead develop extensive thyroiditis, especially in the presence of increase dietary iodine, and destructive sialitis, respectively (Slattery, Kjer-Nielsen et al. 1990; Lindqvist, Nakken et al. 2005). Beyond class II genes, other genes and environmental factors also contribute to direct the autoimmune response towards a given target tissue on the autoimmune-prone NOD background. Infection of NOD mice by mycobacteria has been

shown to favor the development of a lupus phenotype (Baxter and Hodgkin 2002). Seemingly, a low frequency of diabetes is observed in congenic NOD mice carrying B6 or B10 gene fragments defined within diabetes susceptibility regions such as *Idd3* (chromosome 3), *Idd9* (chromosome 4) or *Idd5* (chromosome 1). Double NOD congenics carrying non-NOD gene fragments within the *Idd9*, *Idd3* or *Idd5* develop autoimmunity against the liver, exocrines glands and/or serological autoantibodies that reminiscent of systemic lupus erythematosus (Lyons, Hancock et al. 2000; Koarada, Wu et al. 2004).

Also striking is the shift from diabetes to peripheral nerve autoimmunity that has been evidenced in B7.2^{-/-} NOD mice in which myelin protein zero (MP0) has been identified as an auto-antigen (Louvet, Kabre et al. 2009). Autoimmune deviation in ICOSL^{-/-} NOD mice targets muscles and peripheral nerves while it is restricted to peripheral neurons in B7.2^{-/-} NOD mice (Salomon, Rhee et al. 2001; Prevot, Briet et al. 2010). ICOS is expressed on T cells after CD28/B7 engagement. We can suppose that, in absence of CD28/B7 signal, ICOS is weakly expressed in B7.2^{-/-} NOD mice, and that the phenotype is partial, as compared to ICOSL^{-/-} NOD mice or ICOS^{-/-} NOD mice. A critical point is that the CD28/B7 pathway indeed remained unaltered in ICOS^{-/-} NOD mice. Autoimmune dilated cardiomyopathy has been reported following disruption of the negative immunoregulatory receptor *PD-1* in BALB/c mice along with diffuse deposition of immunoglobulin (Ig) G on the cardiomyocyte surface. Anti-troponin I autoantibodies have been identified as key effectors in this model (Nishimura, Okazaki et al. 2001; Okazaki, Tanaka et al. 2003). Altogether, these observations point to local interactions of T cells with resident cells as central in regulating organ-specific immune tolerance.

Finally, many diabetes auto-antigens that have been characterized so far are not strictly β -cell-specific and are expressed more generally in neuro-endocrine tissues. It has been reported that the glial sheath composed of peri-islet Schwann cells is destroyed in the pre-diabetic phase in the NOD mouse in which autoantibodies are detected and T cells are activated against glial fibrillary acidic protein, which is predominantly expressed in Schwann cells and astrocytes (Winer, Tsui et al. 2003). However, NOD mice do not spontaneously develop autoimmunity to nervous neuronal tissues.

Different mechanisms involved in diabetes in control NOD mice and in neuromuscular autoimmunity observed in ICOSL^{-/-} NOD mice. In the autoimmune neuromyopathy observed in ICOSL^{-/-} NOD mice, CD4⁺ T lymphocytes were exclusive effectors and autoimmunity was not prevented by the absence of class I MHC molecules and CD8⁺ effector T cell. These data mean that class I MHC molecules are not necessary for the neuromyopathy development, which is different to previous data about myositis (Emslie-Smith, Arahata et al. 1989). By

contrast, the efficiency of diabetes transfer by T cells from a diabetic donor is the highest when both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are co-injected into naive NOD recipients (Yagi, Matsumoto et al. 1992). CMH class II^{-/-} NOD mice and CMH class I^{-/-} NOD mice are protected from diabetes (Katz, Benoist et al. 1993; Mora, Wong et al. 1999). It has further been shown that diabetes is induced in β 2-m^{-/-} NOD mice unless class I expression is restored on β -cells (Faustman 1993). We previously showed in ICOS^{-/-} NOD mice that diabetes protection related with defective activation of effector T cells. However, an accelerated form of diabetes was observed in BDC2.5 ICOS^{-/-} transgenic NOD mice, indicating both that diabetogenic BDC2.5 effectors were ICOS-independent and that the ICOS/ICOSL interaction was central in the activation of regulatory T cells. Indeed, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from BDC2.5 ICOS^{-/-} NOD mice were significantly less efficient in suppressing the T cell response to a mimitope peptide than control regulatory T cells *in vitro* (Prevot, Briet et al. 2010). A slight decrease in percent and absolute number of CD4⁺Foxp3⁺ T cells was observed in spleen and pancreatic lymph nodes, as it was observed in ICOSL^{-/-} NOD mice. Cytokine profile of CD4⁺T cells present in muscle and nerve infiltrate of ICOSL^{-/-} NOD mice is Th1 profile with high IFN- γ secretion.

Whether the lack of expression of ICOSL in conventional antigen presenting cells or in B lymphocytes is predominantly involved in the escape of immune tolerance seen against peripheral neurons and muscle cells remain an open issue in our model. Our experiments in chimeric mice allow us to conclude that absence of ICOS/ICOSL signal between B and T cells or between conventional CPA and T cells lead to neuromyopathy.

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

In conclusion, while ICOS^{-/-} or ICOSL^{-/-} NOD mice are protected from T1D, they develop autoimmunity against neural and muscular tissues, indicating that ICOS–ICOSL interactions are important in polarizing the NOD autoimmunity of identifying new biomarkers in idiopathic forms of peripheral nerve and muscular autoimmunity.

REFERENCES

- Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." Annu Rev Immunol **23**: 447-485.
- Aoki, C. A., A. T. Borchers, et al. (2005). "NOD mice and autoimmunity." Autoimmun Rev **4**(6): 373-379.
- Baxter, A. G. and P. D. Hodgkin (2002). "Activation rules: the two-signal theories of immune activation." Nat Rev Immunol **2**(6): 439-446.
- Boitard, C., A. Bendelac, et al. (1988). "Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by anti-I-A monoclonal antibodies: transfer of protection by splenic T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9719-9723.
- Bour-Jordan, H. and J. A. Bluestone (2009). "Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells." Immunol Rev **229**(1): 41-66.
- Cha, S., H. Nagashima, et al. (2002). "Two NOD Idd-associated intervals contribute synergistically to the development of autoimmune exocrinopathy (Sjogren's syndrome) on a healthy murine background." Arthritis Rheum **46**(5): 1390-1398.
- Chosich, N. and L. C. Harrison (1993). "Suppression of diabetes mellitus in the non-obese diabetic (NOD) mouse by an autoreactive (anti-I-Ag7) islet-derived CD4+ T-cell line." Diabetologia **36**(8): 716-721.
- Colucci, F., M. L. Bergman, et al. (1997). "Apoptosis resistance of nonobese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8670-8674.
- Emslie-Smith, A. M., K. Arahata, et al. (1989). "Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies." Hum Pathol **20**(3): 224-231.
- Faideau, B., E. Larger, et al. (2005). "Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis." Diabetes **54 Suppl 2**: S87-96.
- Faustman, D. L. (1993). "MHC class I and autoimmune diabetes." Biomed Pharmacother **47**(1): 3-10.
- Hawiger, D., E. Tran, et al. (2008). "ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice." J Immunol **180**(5): 3140-3147.
- Hu, Y., Y. Nakagawa, et al. (1992). "Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): E607-614.
- Hutchings, P., G. Hedlund, et al. (1999). "Effect of the synthetic immunomodulator, linomide, on experimental models of thyroiditis." Immunology **96**(3): 340-347.
- Johansson, A. C., A. K. Lindqvist, et al. (2003). "Genetic heterogeneity of autoimmune disorders in the nonobese diabetic mouse." Scand J Immunol **57**(3): 203-213.
- Katz, J., C. Benoist, et al. (1993). "Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice." Eur J Immunol **23**(12): 3358-3360.
- Kay, T. W., J. L. Parker, et al. (1996). "RIP-beta 2-microglobulin transgene expression restores insulinitis, but not diabetes, in beta 2-microglobulin null nonobese diabetic mice." J Immunol **157**(8): 3688-3693.
- Kikutani, H. and S. Makino (1992). "The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains." Adv Immunol **51**: 285-322.
- Koarada, S., Y. Wu, et al. (2004). "Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain." J Immunol **173**(4): 2315-2323.
- Krug, J., A. J. Williams, et al. (1991). "Parathyroiditis in the non-obese diabetic mouse--a new finding." J Endocrinol **131**(2): 193-196.

- Lenschow, D. J., K. C. Herold, et al. (1996). "CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes." *Immunity* **5**(3): 285-293.
- Lindqvist, A. K., B. Nakken, et al. (2005). "Influence on spontaneous tissue inflammation by the major histocompatibility complex region in the nonobese diabetic mouse." *Scand J Immunol* **61**(2): 119-127.
- Louvet, C., B. G. Kabre, et al. (2009). "A novel myelin P0-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy." *J Exp Med* **206**(3): 507-514.
- Lyons, P. A., W. W. Hancock, et al. (2000). "The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137." *Immunity* **13**(1): 107-115.
- Many, M. C., S. Maniratunga, et al. (1996). "The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104 Suppl 3**: 17-20.
- Moore, T. V., B. S. Clay, et al. (2011). "Protective effector memory CD4 T cells depend on ICOS for survival." *PLoS One* **6**(2): e16529.
- Mora, C., F. S. Wong, et al. (1999). "Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice." *J Immunol* **162**(8): 4576-4588.
- Nishimura, H., T. Okazaki, et al. (2001). "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice." *Science* **291**(5502): 319-322.
- Okazaki, T., Y. Tanaka, et al. (2003). "Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice." *Nat Med* **9**(12): 1477-1483.
- Prevot, N., C. Briet, et al. (2010). "Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system." *Eur J Immunol* **40**(8): 2267-2276.
- Ridgway, W. M., L. B. Peterson, et al. (2008). "Gene-gene interactions in the NOD mouse model of type 1 diabetes." *Adv Immunol* **100**: 151-175.
- Rivero, V. E., C. Cailleau, et al. (1998). "Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP)." *J Autoimmun* **11**(6): 603-610.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-440.
- Salomon, B., L. Rhee, et al. (2001). "Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice." *J Exp Med* **194**(5): 677-684.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* **2**(2): 116-126.
- Slattery, R. M., L. Kjer-Nielsen, et al. (1990). "Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-Ak transgenic mice." *Nature* **345**(6277): 724-726.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, et al. (1999). "B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha." *Immunity* **11**(4): 423-432.
- Wicker, L. S., G. Chamberlain, et al. (2004). "Fine mapping, gene content, comparative sequencing, and expression analyses support Ctla4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse." *J Immunol* **173**(1): 164-173.
- Winer, S., H. Tsui, et al. (2003). "Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive." *Nat Med* **9**(2): 198-205.
- Wong, F. S., I. Visintin, et al. (1996). "CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells." *J Exp Med* **183**(1): 67-76.
- Yagi, H., M. Matsumoto, et al. (1992). "Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice." *Eur J Immunol* **22**(9): 2387-2393.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." *Nature* **402**(6763): 827-832.

Figure 1: ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} double knockout NOD mice are protected from T1D and develop neuromuscular autoimmunity.

A. Incidence of clinical neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD mice (■, n=18 mice) and incidence of diabetes in ICOSL^{+/+} NOD mice (□, n=20 mice) ($p=1$; Log-Rank Test). B. Spontaneous Incidence of clinical neuromyopathy and diabetes in female ICOS^{-/-} (■, n= 11), ICOSL^{-/-} (▲, n=10) and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice (●, n=13) ($p=1$; Log-Rank Test). C. Histologic score of the cells infiltrate in peripheral nerve system (PNS), muscle and brain in ICOS^{-/-}, ICOSL^{-/-} and ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice. D. Representative sections of muscle and nerves from 40-wk-old female ICOS^{-/-}ICOSL^{-/-} NOD mice. E. Immunostaining for CD4⁺Tcells, CD8⁺Tcells, CD11c⁺ cells and B220⁺ cells in muscle section of ICOSL^{-/-} mice (x200 magnification).

Figure 2: Immune phenotype of ICOSL^{-/-} NOD mice.

A. Percentage of CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, CD11b⁺ cells in spleen, axillary lymph node (ALN), pancreatic lymph node (PLN), and spleen (SPL) of unmanipulated ICOSL^{+/+} and ICOSL^{-/-} NOD mice (n=6, NS: $p>0.05$, Student's *t* test). B. IFN- γ , IL-4 and IL-17 cytokine production by CD4⁺ T cells from lymph node, spleen, muscle and nerve. Data are representative of three independent experiments.

Figure 3: The neuromyopathy is an auto-immune disease CD4⁺T cells dependant.

A. Transfert experiment of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺T cells and spleen cells depleted in CD4⁺ and CD8⁺T cells (CD4⁻CD8⁻) from ICOSL^{-/-} old mice in NOD.*scid* mice. Briefly, 8 weeks old NOD.*scid* mice were transferred with 0.8 million (M) of stimulated CD4⁺ T cells, 0.4M of CD8⁺ T cells or 0.8M CD4⁺T cells with 0.4M CD8⁺T cells from 40 weeks old ICOSL^{-/-} mice (n=6, data are representative of three independent experiments). B. Histological scores of infiltrating cells in muscle and peripheral nervous system of transferred recipients. C. Incidence of neuromyopathy in ICOSL^{-/-}CIITA^{-/-} NOD mice. D. Neuromyopathy in ICOSL^{-/-} beta2m^{-/-} NOD mice. E. Histological scores of infiltrating cells in muscle and peripheral nervous system of recipient mice after transfer experiment of T cells isolated from the muscle (10^6 /recipient mice) and the nerve ($0.2 \cdot 10^6$ /recipient mice) of ICOSL^{-/-} old mice.

Figure 4: ICOS/ICOSL signal is key signal for efficient transfer of neuromyopathy

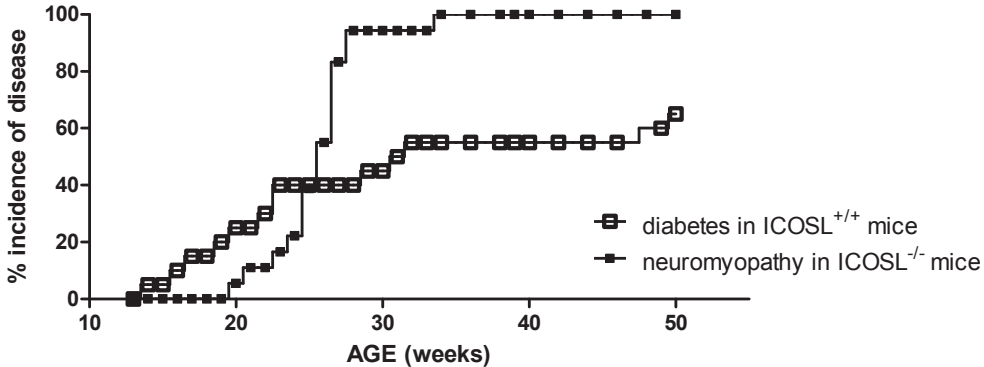
A. 8-wk-old NOD.*scid* mice (●, n=8) or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* (■, n=8) were transferred with 6x10⁶ CD4⁺CD8⁺T cells from 40-wk-old ICOSL^{+/+} NOD mice after in vitro activation (Log-Rank Test). B. 8-wk-old NOD.*scid* mice (●, n=12) or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* (■, n=12) were transferred with 6x10⁶ CD4⁺CD8⁺T cells from 40-wk-old ICOSL^{+/+} NOD mice without activation (Log-Rank Test). C. 8-wk-old NOD.*scid* mice (●, n=12) or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* (■, n=11) were transferred with 6x10⁶ CD4⁺CD25⁻ T cells from 40-wk-old ICOSL^{+/+} NOD mice after in vitro activation (Log-Rank Test). D. 8-wk-old NOD.*scid* mice (●, n=10) or ICOSL^{-/-} NOD.*scid* (■, n=10) were transferred with 1x10⁶ stimulated CD4⁺T cells from 40-wk-old ICOSL^{-/-} NOD mice (Log-Rank Test).

Figure 5: Role of APC expression of ICOSL in development of autoimmunity in NOD mice.

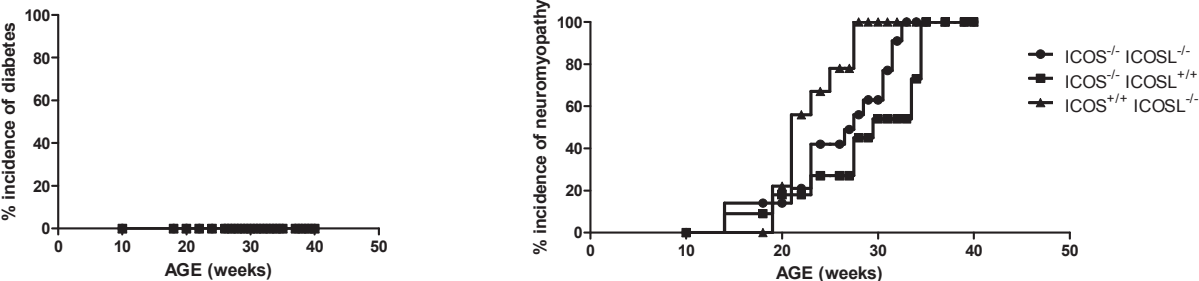
A. Transfer experiment of ICOSL^{+/+} T cells and ICOSL^{-/-} B cells in NOD.*scid* mice. Histologic score of muscle and nerve (a), and pancreas (b) infiltrate. Briefly, 4x10⁶ T cells from ICOSL^{+/+} NOD mice were co injected with 4x10⁶ B cells from 3 week old ICOSL^{-/-} or ICOSL^{+/+} NOD mice. B. Incidence of neuromyopathy and diabetes in bone marrow chimera mice. Irradiated ICOSL^{-/-} or ICOSL^{+/+} NOD mice were reconstituted with 10 x 10⁶ ICOSL^{-/-} or ICOSL^{+/+} bone marrow cells depleted with CD4⁺ and CD8⁺ mature T cells.

Figure 1

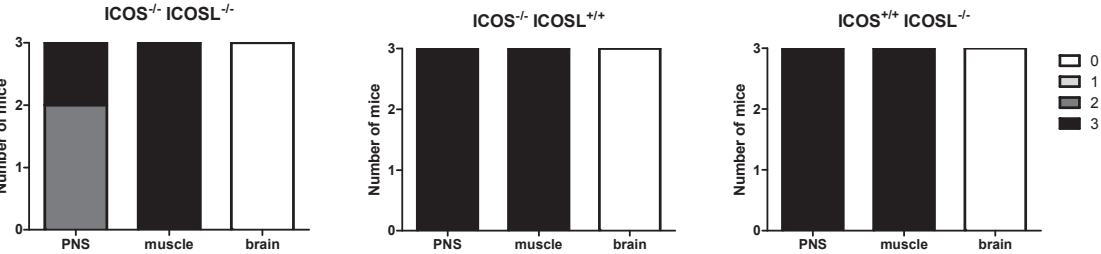
A.



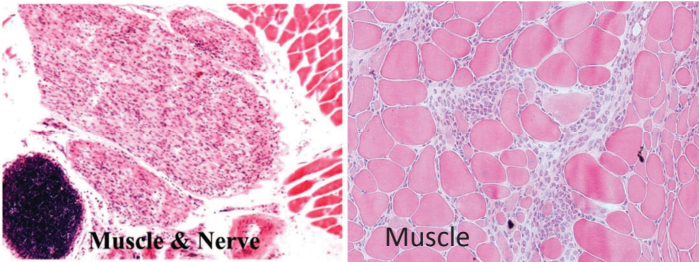
B.



C.



D.



E.

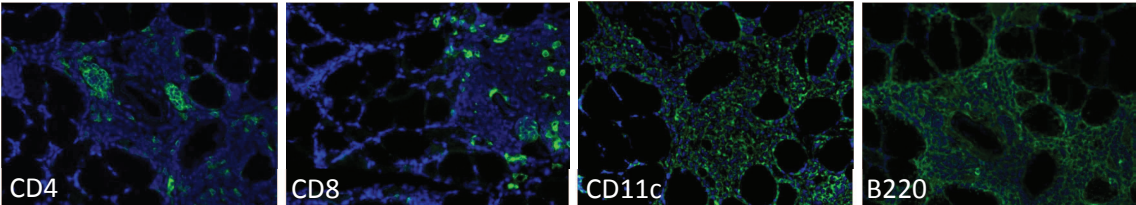
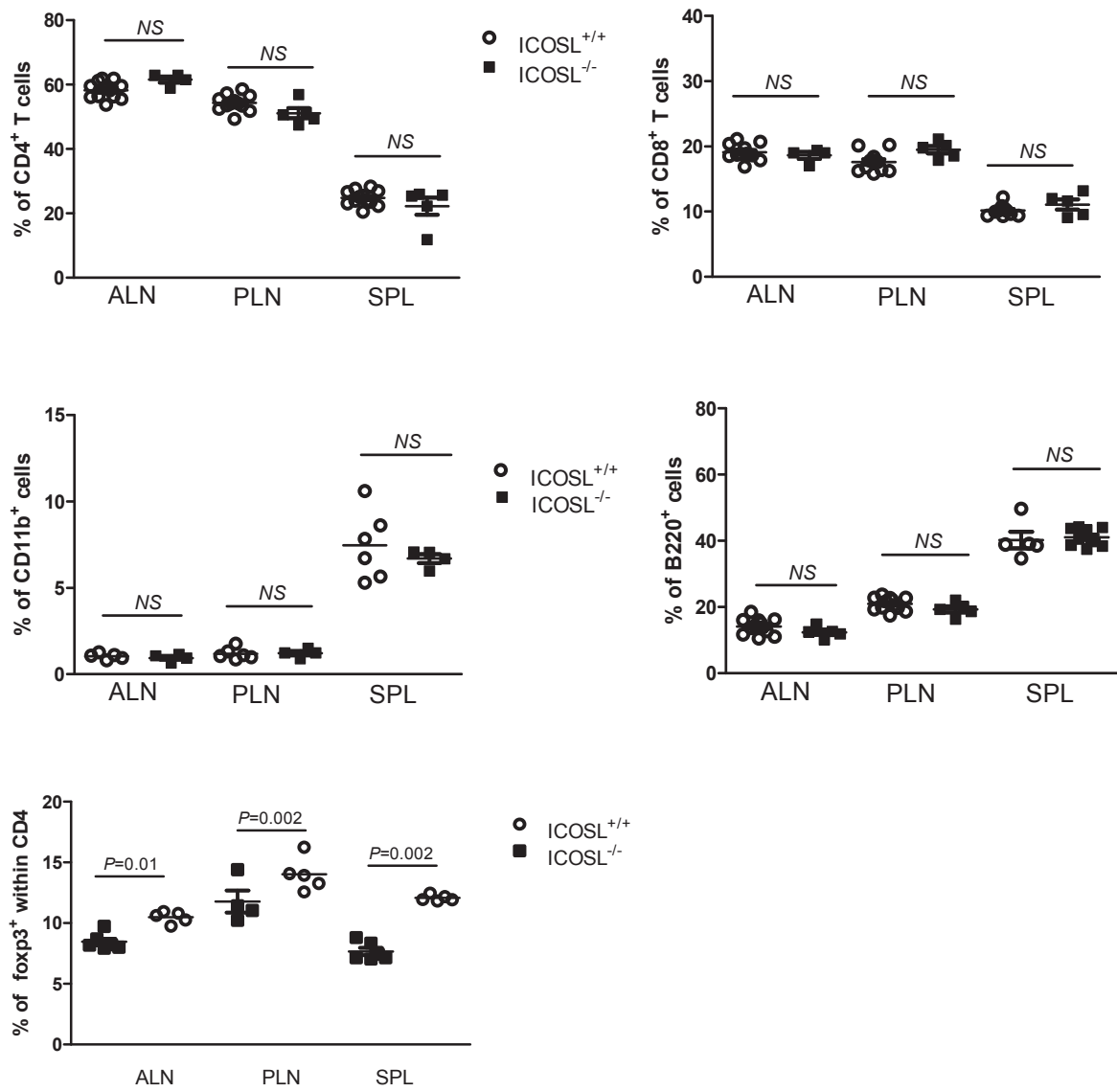


Figure 2

A.



B.

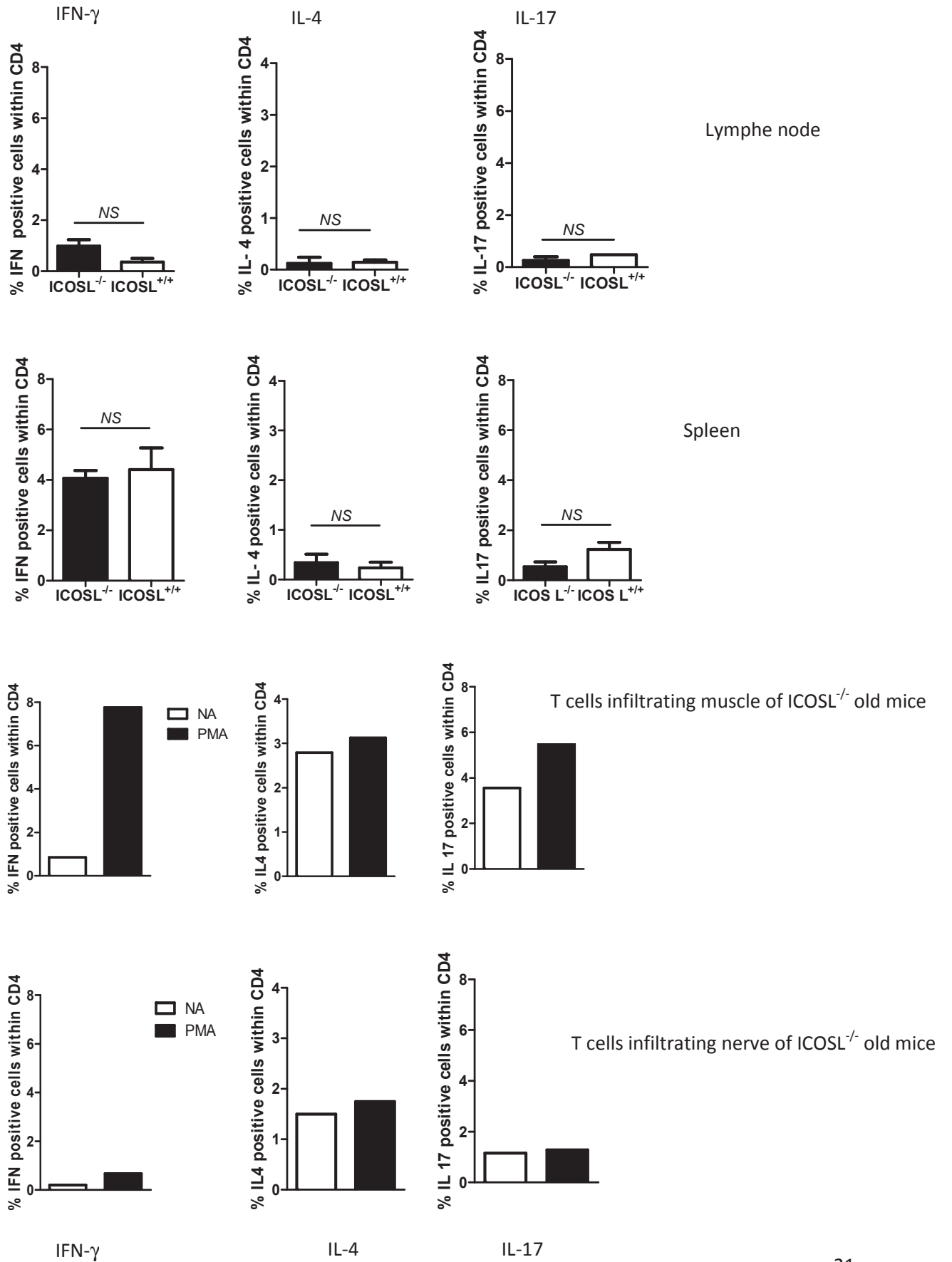
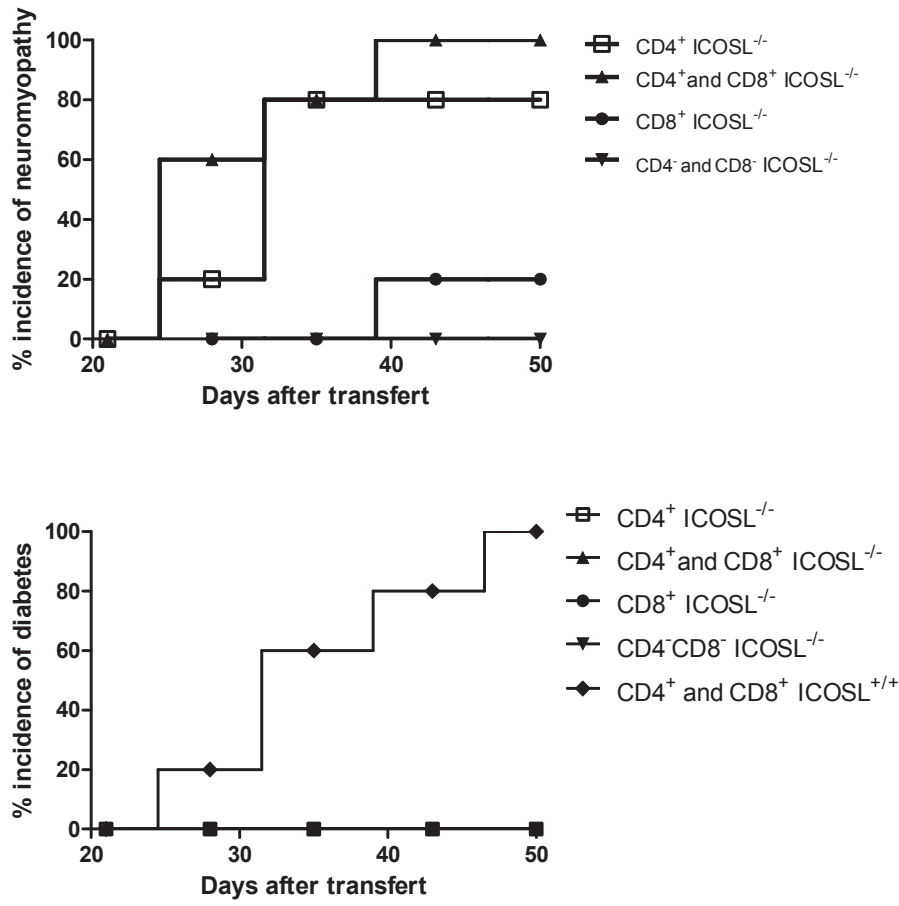
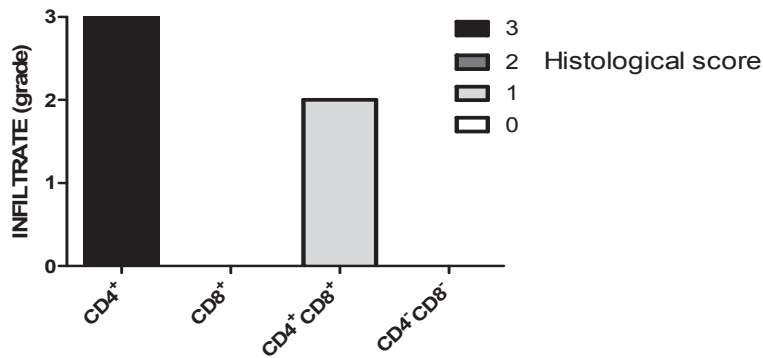


Figure 3

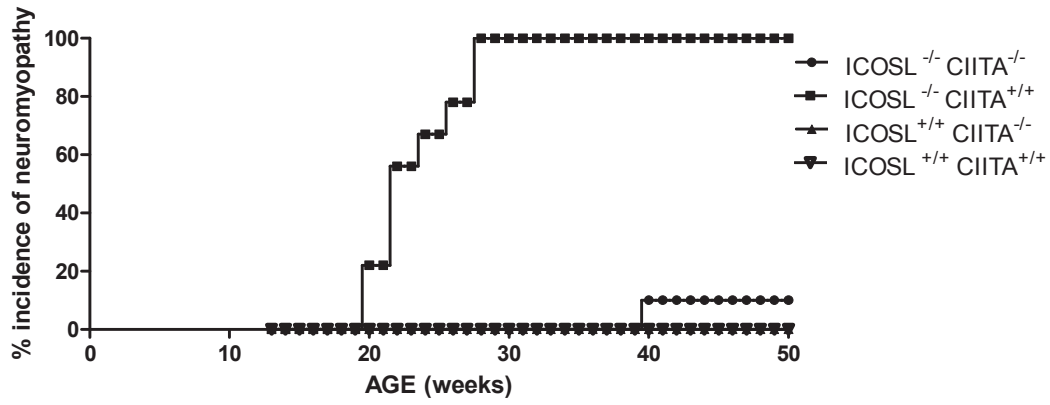
A.



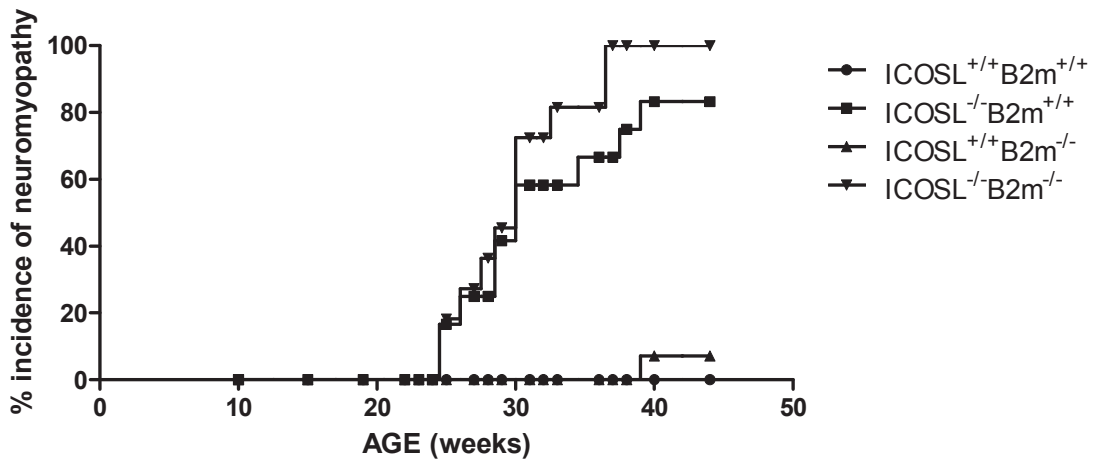
B.



C.



D.



E.

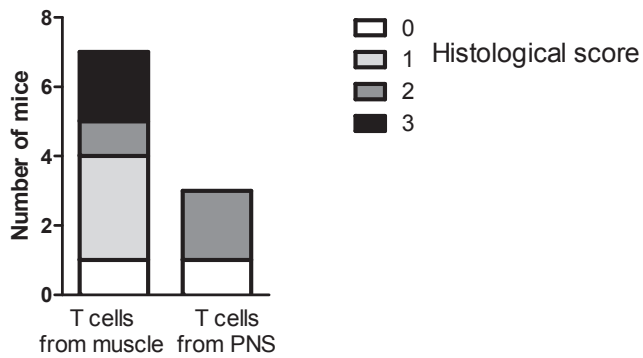
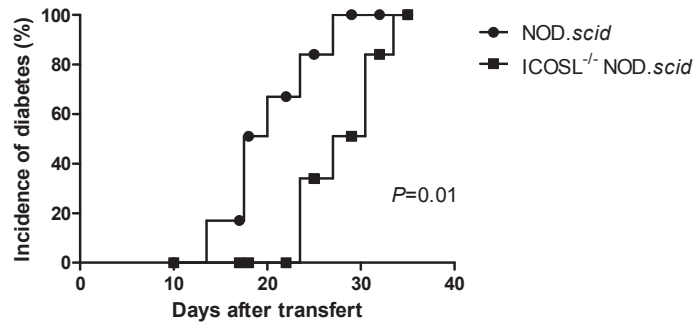


Figure 4

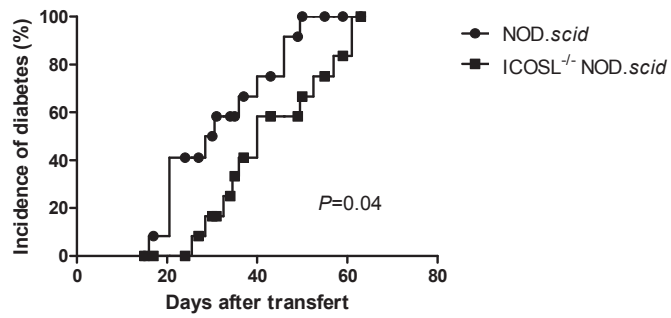
A.

Activated CD4⁺CD8⁺ T cells



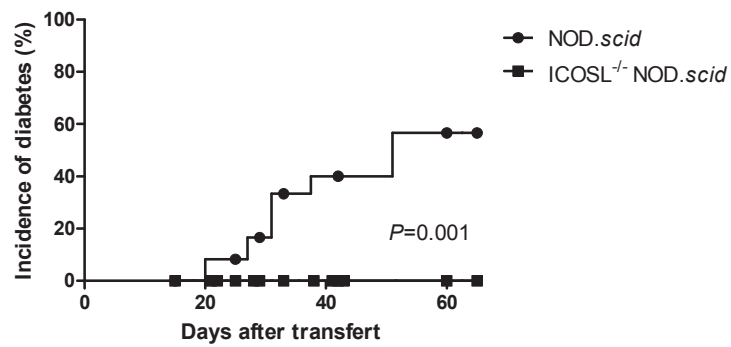
B.

Non activated CD4⁺CD8⁺ T cells



C.

Non activated CD4⁺CD25⁻ T cells



D.

Activated CD4⁺ T cells

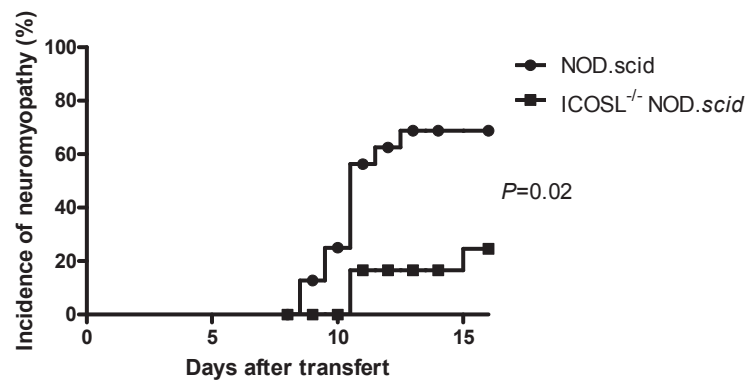
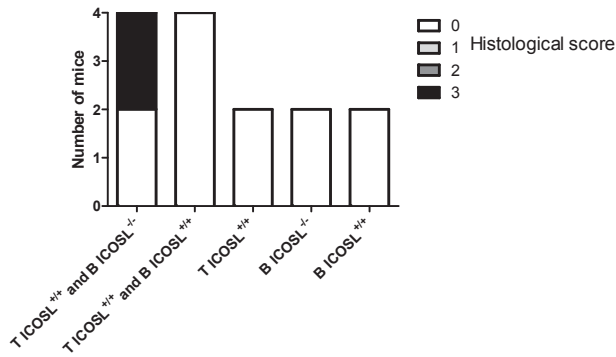
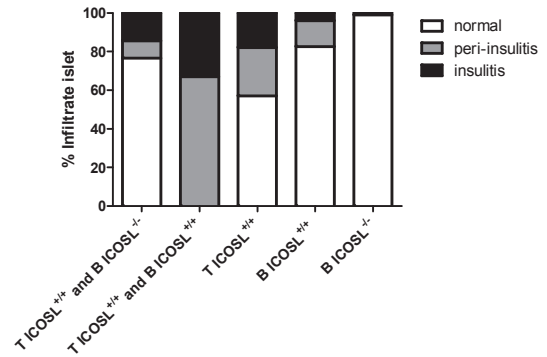


Figure 5

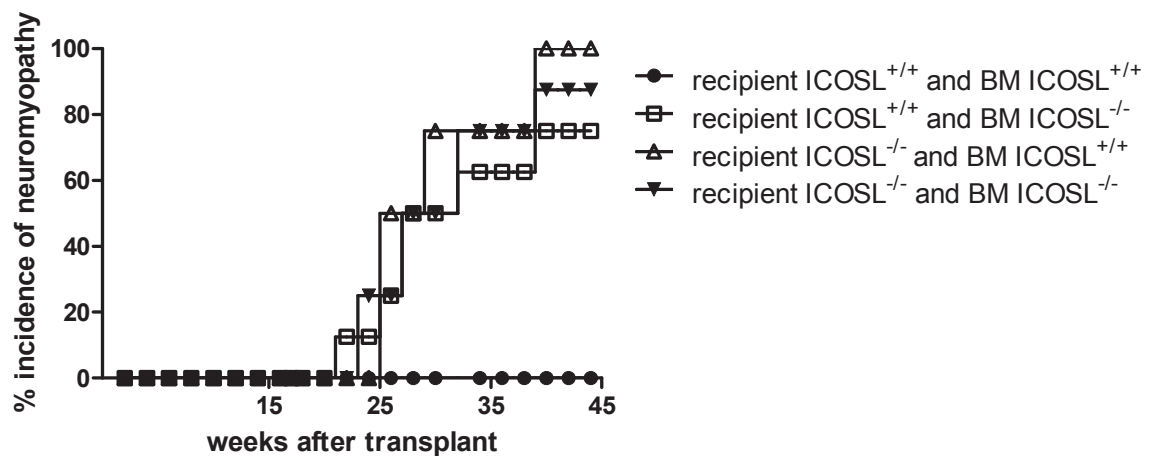
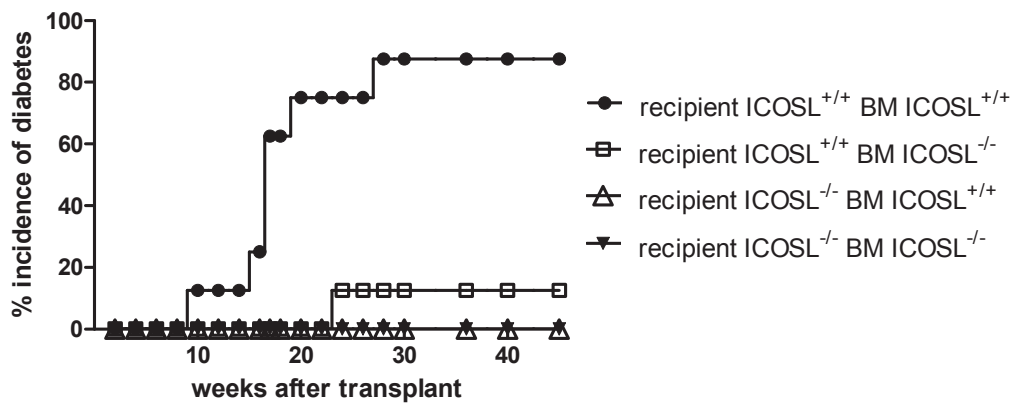
A.a



b



B.



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Les résultats complémentaires présentés dans les figures 18 et 19 de ce chapitre ont été obtenus grâce aux collaborations que nous avons développées avec Olivier Boyer et Laurent Drouot (INSERM U905, Rouen) et Charbel Massaad (UMR 8194).

Nous avons identifié les antigènes issus du muscle reconnus par les anticorps présents dans le sérum des souris ICOSL^{-/-} et ICOS^{-/-}. Dix antigènes ont été mis en évidence dont 3 communs aux deux lignées de souris. Parmi ces trois auto-antigènes communs, le plus spécifique du muscle squelettique est la troponine I squelettique. Des souris ICOSL^{-/-} de 12 semaines ont donc été immunisées avec la troponine I ou de l'ovalbumine. Nous n'avons pas observé de différence d'incidence de la neuromyopathie. L'immunisation contre cet antigène ne protège ni n'accélère la maladie (figure 18).

Nous avons également recherché des anomalies histologiques précoces des muscles et des nerfs périphériques de souris ICOSL^{-/-}. L'analyse en microscopie électronique mets en évidence des anomalies de démyélinisation, une souffrance axonale et des anomalies de l'architecture du muscle dès 12 semaines (figure 19).

Matériel et méthode

Western blot

La préparation musculaire est congelée dans l'azote liquide puis broyée, dissoute dans un tampon de lyse (150mM NaCl, 20mM Tris pH 7,5, NP40 1%, inhibiteur de protéases). Après mesure de la concentration protéique, la préparation protéique totale est ajustée à 1mg/ml dans un tampon Tris HCl 1M pH 6,8, 20% glycérol, 6% SDS et 70 mM β-mercaptoéthanol puis dénaturée 5 min à 95°C.

Western 1 dimension

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 12% (30µg/puits). Le gel est ensuite électrotransféré sur membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Healthcare). La membrane est saturée par une solution de PBS, 0,05% Tween 5% BSA pendant 1 nuit à +4°C sous agitation.

Après lavages, la membrane est incubée en présence des sérums (1/50^{ème}) pendant 1 puis avec l'anticorps secondaire anti-mouse IgG peroxydase (Promega).

L'anticorps secondaire est révélé par chémiluminescence (Kit Pico West Thermo scientific) et les bandelettes sont exposées à un film (Amersham).

Western blot en deux dimensions

La préparation est déposée sur une bandelette d'isoélectrofocalisation, pendant 12 à 16h, puis placée dans l'appareil Protean IEF cell system Biorad. Une focalisation isoélectrique est réalisée avec un champ électrique à 35000 V/h et un voltage maximal de 8000 volts. L'électrophorèse est réalisée dans un second temps, selon le protocole décrit ci-dessus. Le sérum des souris (1/200^{ème}) est alors incubé avec les bandelettes pendant 2 heures à température ambiante. La membrane est ensuite lavée puis révélée par un anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 680 (1/5000^{ème}). La lecture se fait par scanner sur ODYSSEE Li COR.

Immunisation

Les souris NOD ICOSL^{-/-} sont immunisées à 12 semaines d'âge à la base de la queue avec 100µg de la protéine d'intérêt en CFA. Un rappel est effectué 9 jours après en présence IFA. Les souris sont suivies chaque semaine afin de tester l'apparition d'une neuromyopathie.

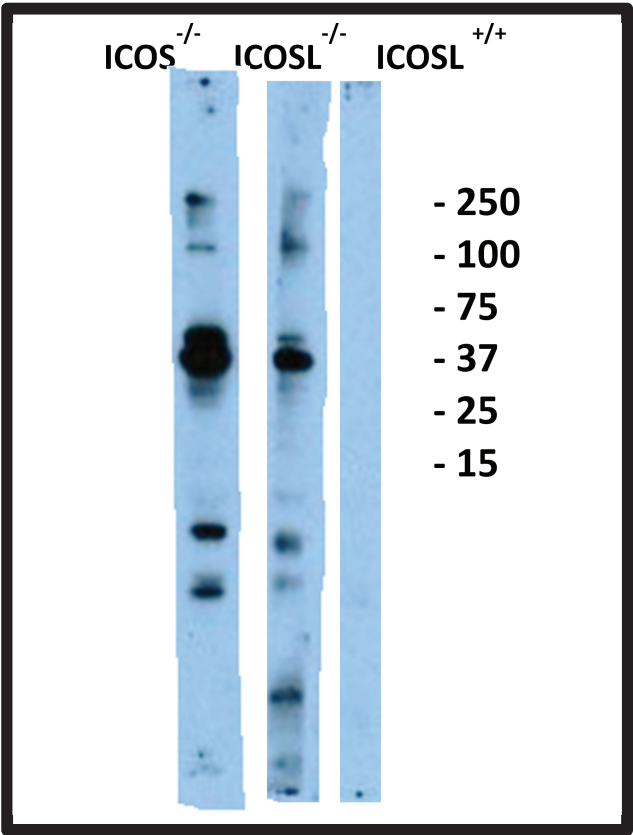
Microscopie électronique

Les organes sont prélevés dans de la glutaraldéhyde 3%, imprégnés dans du PBS 0.1M contenant 2% de tétr oxyde d'osmium, puis inclus dans l'epon et polymérisés à 60°C. Le bloc est coupé au microtome (0.5µm) et analysé en microscopie électronique.

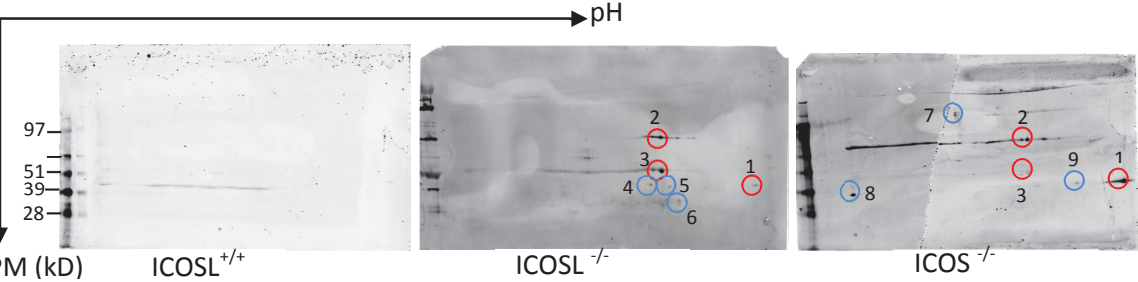
Figure 19: Identification d'auto-antigènes du muscle périphérique spécifiques des anticorps présents dans le sérum des souris NOD ICOSL^{-/-} A. Analyse de la spécificité

des anticorps issus du sérum de souris NOD ICOSL^{-/-}, ICOS^{-/-} et ICOS^{+/+} vis-à-vis du muscle par western blot. B. Analyse de la spécificité des anticorps issus du sérum de souris NOD ICOSL^{-/-}, ICOS^{-/-} et ICOS^{+/+} vis-à-vis du muscle par western blot en deux dimensions. En rouge sont représentés les antigènes communs entre les deux souris, en bleu les antigènes distincts. C. Analyse en spectrométrie de masse des antigènes cibles. D. Courbe d'incidence de la neuromyopathie des souris ICOSL^{-/-} immunisées avec de la troponine ou de l'ovalbumine.

A



B



C.

Numéros	Protéines
1	A
2	B
3	C
4	In process
5 et 6	D
7	E
8	F
9 et 10	G

D.

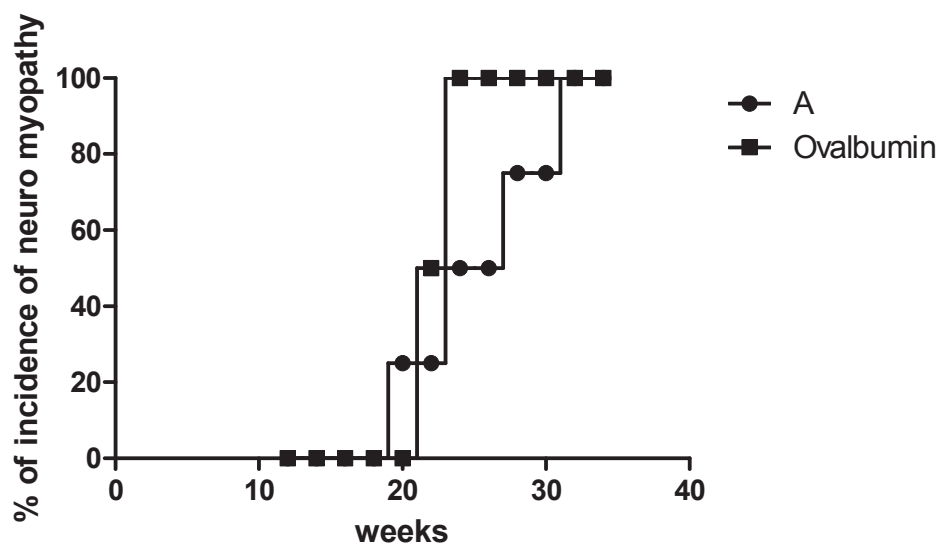
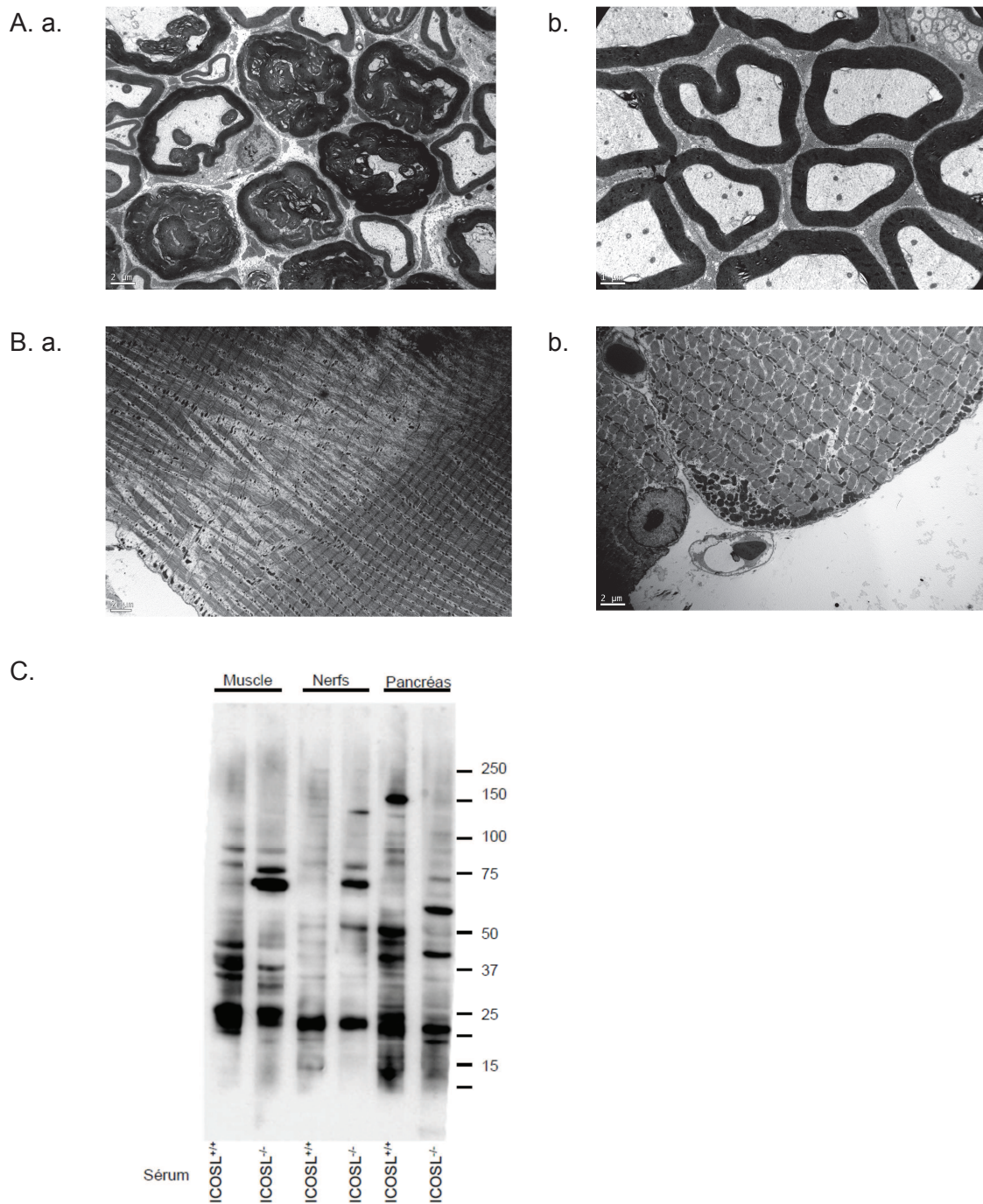


Figure 20: Anomalies histologiques précoces des nerfs et des muscles de souris NOD ICOSL^{-/-} de 12 semaines. A. Analyse en microscopie électronique des nerfs des souris NOD ICOSL^{-/-} (a) et NOD ICOSL^{+/+} (b). B. Analyse en microscopie électronique des muscles des souris NOD ICOSL^{-/-} (a) et NOD ICOSL^{+/+} (b). C. Identification des antigènes issus du nerf périphérique reconnus par les anticorps de souris ICOSL^{-/-} par western blot en une dimension, et comparaison aux antigènes issus du muscle périphérique et du pancréas.



DISCUSSION

1. Voie ICOS/ICOSL et diabète

Les voies de costimulation permettent, par leurs signaux activateurs ou inhibiteurs, une régulation fine de la réponse immunitaire. Cette régulation est essentielle à la fonction principale du système immunitaire qui est de vérifier en permanence et d'assurer l'intégrité du soi en respectant l'équilibre entre activation de réponses effectrices et régulatrices et en assurant la tolérance immunitaire vis-à-vis du soi.

Le diabète est une maladie auto-immune multigénique et multifactorielle liée à un défaut de tolérance centrale et périphérique. Dans le modèle de la souris NOD, les LT ont un rôle effecteur majeur, et les LB sont indispensables en tant que CPA. Or la voie ICOS/ICOSL est impliquée à la fois dans l'activation lymphocytaire T, dans la maturation des LB et dans la coopération entre les LT et les LB. On pouvait donc suspecter un rôle de cette voie dans la physiopathologie du diabète chez la souris NOD. L'étude de l'effet de l'anticorps anti-ICOS a confirmé cette hypothèse. Pour cette étude, nous avons choisi dans le laboratoire d'étudier un modèle de souris invalidées pour les gènes *Icos* et *Icosl* afin de s'affranchir d'un blocage partiel de la voie par des anticorps bloquants.

L'étude des souris NOD ICOS^{-/-} et ICOSL^{-/-} a confirmé le rôle majeur de cette voie de costimulation dans la physiopathogénie du diabète. En effet, les souris femelles sont protégées du diabète contre une incidence de diabète de 65% pour les souris NOD ICOSL^{+/+} femelles, à 50 semaines d'âge dans notre animalerie. Sur le plan histologique, une péri-insulite minime est observée dans certains îlots de souris NOD ICOSL^{-/-} de 40 semaines qui est absente à 14 semaines. Il y a donc un retard d'initiation de la maladie qui reste infraclinique. Or, il a été démontré que les LB étaient des cellules présentatrices d'antigènes importantes au développement du diabète chez la souris NOD (Serreze, Chapman et al. 1996). On peut émettre l'hypothèse que chez les souris NOD ICOSL^{-/-} ou NOD ICOS^{-/-}, l'absence de coopération entre les LT et les LB via le signal ICOS/ICOSL est responsable de cette protection. Pour le prouver, une expérience de cotransfert de LT issus de souris NOD ICOSL^{-/-} de trois semaines avec des LB issus de souris NOD ICOSL^{+/+} dans un receveur NOD ICOSL^{-/-} *scid* a été réalisée et est en cours, ainsi que l'étude des populations folliculaires auxiliaires chez les souris ICOSL^{-/-}.

Une autre hypothèse est que l'absence de signal ICOS/ICOSL entraîne une activation non suffisante des LT autoréactifs vis-à-vis des antigènes pancréatiques. Les LT autoréactifs ont une affinité/avidité faible vis-à-vis des auto-antigènes qu'ils reconnaissent. De fait, les voies de costimulation activatrices, en participant à l'établissement des synapses immunologiques et à la production du deuxième signal, peuvent favoriser l'apparition de l'auto-immunité. L'expression d'ICOS sur les LT infiltrant le pancréas suggère le rôle de cette voie dans l'activation des LT diabétogènes.

Cependant, nous avons également montré que dans le modèle de la souris BDC2.5, l'absence de la molécule ICOS entraîne l'apparition d'un diabète. Ces souris sont transgéniques pour un TCR issu d'un clone T infiltrant l'îlot. L'hypothèse retenue est que ce TCR a une affinité suffisante pour son peptide pour s'affranchir d'un signal de costimulation tel que le signal ICOS/ICOSL. Ce clone est donc capable d'infiltrer l'îlot sans le signal ICOS/ICOSL. Il a été démontré que les voies de costimulation ne sont pas toujours indispensables, notamment dans certaines conditions inflammatoires (Swallow, Wallin et al. 1999; Brodie, Collins et al. 2000). Dans cette hypothèse, dans le modèle polyclonal de la souris NOD ICOSL^{-/-}, l'absence de diabète s'explique par une fréquence insuffisante de LT diabétogènes ICOS indépendants. De plus dans le modèle de souris BDC2.5, nous avons montré que les LT régulateurs sont moins efficaces in vitro. Cette population cellulaire n'arrive donc plus à contrôler l'infiltrat présent dans le pancréas de ces souris, et c'est ce défaut de tolérance périphérique qui conduit au diabète. De plus, dans le modèle ICOSL^{-/-} BDC2.5 et dans le modèle ICOSL^{-/-}, une diminution de 30 % du nombre de lymphocytes T régulateurs a été mise en évidence. Ceci est concordant avec l'hypothèse qu'ICOS est nécessaire à l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs (Kornete, Sgouroudis et al. 2012)

Au total, la protection du diabète observée chez la souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} pourrait être liée à un défaut d'activation des lymphocytes T diabétogènes, un défaut de coopération entre les LT et les LB, ou être secondaire à une fréquence trop faible de LT diabétogènes pouvant être activés de façon ICOS indépendante.

2. Voie ICOS/ICOSL et neuromyopathie

L'invalidation de la voie ICOS/ICOSL sur d'autres fonds génétiques tels que le fond C57BL/6 n'a pas provoqué l'émergence de maladies auto-immunes. C'est sur le fond NOD, prédisposant aux atteintes auto-immunes, que la neuromyopathie a été observée.

La neuromyopathie observée chez les souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} est une maladie auto-immune dont la physiopathologie semble être proche de celle du diabète.

En effet, si le transfert de LT-CD8⁺ issus de souris NOD ne transfère pas le diabète, les souris NOD *béta2m*^{-/-}, dépourvue de LT-CD8⁺ ne développent pas de diabète. Inversement, les LT-CD4⁺ sont capables de transférer la maladie, et les souris NOD *CIITA*^{-/-}, dépourvues de LT-CD4⁺ ne développent pas de diabète mais une insulite. Les deux populations LT-CD4⁺ et LT-CD8⁺ sont donc indispensables au développement de la maladie.

Dans le cadre de la neuromyopathie, nous avons vu qu'il s'agit d'une maladie transmise par les LT-CD4⁺. En effet, le transfert de LT-CD4⁺ dans une souris NOD.*scid* transfère la maladie et les souris NOD *CIITA*^{-/-} ICOSL^{-/-}, dépourvues de LT-CD4⁺ ne développent pas de neuromyopathie. Les LT-CD8⁺ ne transfèrent pas la maladie dans un receveur NOD.*scid*. Les LT-CD8⁺ ne sont donc pas indispensables au développement de la neuromyopathie. Ceci est confirmé par les souris NOD *béta2m*^{-/-} ICOSL^{-/-}, dépourvues de LT-CD8⁺, qui développent la neuromyopathie. Les LT-CD8⁺ n'ont donc pas de rôle crucial dans la neuromyopathie.

Sur le plan histologique, les différents types cellulaires infiltrant le muscle et le nerf périphérique sont comparables à ceux trouvés dans l'îlot. De même que dans l'îlot, on retrouve des zones de tissus nerveux et musculaire atteintes à proximité de zones de tissus non atteintes (Egeberg, Junker et al. 1976).

Par ailleurs l'étude des cytokines montre que la neuromyopathie est une maladie auto-immune avec un profil cytokinique de type Th1. On peut émettre plusieurs hypothèses concernant la déviation de l'auto-immunité chez la souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} vers le nerf périphérique et le muscle. Nous avons vu précédemment que l'absence de la voie ICOS/ICOSL oriente les LT-CD4⁺ vers un phénotype Th1. Dans notre modèle, sont présents des LT autoréactifs vis-à-vis de déterminants antigéniques exposés dans le pancréas, il existe également des LT autoréactifs spécifiques du nerf et du muscle. On peut supposer que de ces derniers n'ont pas besoin du signal ICOS/ICOSL pour s'activer, mais que l'absence de cette voie les fait s'engager dans la voie Th1. En présence d'ICOS/ICOSL, ces

mêmes lymphocytes autoréactifs s'orientent vers un phénotype Th2 et ne sont plus pathogènes.

Une autre hypothèse plus plausible peut être évoquée en prenant en compte les résultats obtenus en microscopie électronique. En effet, des anomalies de la gaine de myéline sont présentes dès 12 semaines d'âge chez la souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} alors que l'on n'observe pas d'infiltrat de cellules immunitaires. Ces lésions peuvent faire suite à une anomalie de myélinisation liée à l'absence du gène *Icos* ou *Icosl*. Une inflammation du nerf périphérique fait suite à ces lésions, entraînant une surexpression du CMH, une production de cytokines inflammatoires et de chémokines. Ainsi, on observe un infiltrat de cellules inflammatoires débutant dans le système périphérique, puis après diffusion via les jonctions neuromusculaires, vers les muscles. L'étude des gènes de myélinisation chez les souris NOD ICOSL^{-/-} sont en cours, de même l'analyse des souris NOD ICOSL^{-/-}.*scid*.

Cette hypothèse d'anomalies d'innervation des souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} peut également expliquer la protection vis-à-vis du diabète. En effet, il y a quelques années, l'équipe de Dosh a émis l'hypothèse qu'un défaut d'innervation du pancréas entraîne une protection vis-à-vis de l'infiltrat pancréatique (Tsui, Winer et al. 2003). Notre modèle présentant des lésions de la gaine de myéline et une protection vis-à-vis du diabète est compatible avec une telle hypothèse qui mériterait d'être explorée par l'étude de l'innervation de l'îlot si les défauts de myélinisation sont confirmés.

Par ailleurs, en terme de développement embryonnaire, des éléments concordants suggèrent que le développement et la migration des cellules souches de la crête neurale sont liées au développement des cellules bêta (Kozlova and Jansson 2009). De plus, sur le plan histologique, il existe des cellules nerveuses (cellules de Schwann notamment) dans le pancréas. Dans l'infiltrat lymphocytaire des îlots, sont présents des lymphocytes spécifiques de ces cellules de Schwann (Winer, Tsui et al. 2003). Tout ceci rapproche le système nerveux périphérique de l'îlot, en termes d'auto-antigènes. On ne peut pas exclure que la spécificité antigénique de la neuromyopathie observée chez les souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} soit la même que celle observée dans le diabète de la souris NOD, et que l'atteinte d'un tissu puisse conduire à l'atteinte secondaire d'un autre tissu par un phénomène d'*epitope spreading*. Néanmoins, les antigènes spécifiques du muscle retrouvés par western blot sont différents de ceux vis à vis desquels des auto-anticorps anti-cellules d'îlots sont retrouvés chez la souris NOD. Un tel phénomène d'*epitope spreading* peut d'ailleurs également être avancé comme une hypothèse reliant l'atteinte musculaire et neurologique chez les souris NOD ICOS^{-/-} et NOD ICOSL^{-/-}.

3. Comparaison de la souris NOD ICOSL^{-/-} à la souris NOD B7.2^{-/-}

La souris NOD B7.2^{-/-} a été étudiée par l'équipe de Bluestone. Le phénotype est proche de celui de la souris NOD ICOSL^{-/-} et de la souris NOD ICOS^{-/-}. En effet, la souris B7.2^{-/-} présente une neuropathie auto-immune spontanée à partir de 20 semaines d'âge avec une incidence de 100% à 35 semaines chez les femelles. Sur le plan histologique, l'atteinte est localisée aux nerfs périphériques et aux ganglions spinaux. Contrairement à la souris NOD ICOSL^{-/-}, le muscle n'est pas atteint. Une des cibles antigéniques retrouvées chez la B7.2^{-/-} est la myéline protéine zero (MPO). Dans la souris NOD ICOSL^{-/-} on ne retrouve ni anticorps ni LT dirigés contre des épitopes issus de cette protéine (résultats non montrés).

Sur le plan des interactions moléculaires, l'absence de la séquence MYPPPY sur la molécule ICOS permet d'exclure l'hypothèse d'une interaction directe entre la voie CD28/B7 et la voie ICOS/ICOSL.

Cependant, l'expression d'ICOS dépend de l'engagement de la voie CD28/B7. On peut donc supposer que l'absence de signal CD28/B7.2 conduit à l'absence d'expression d'ICOS à la surface cellulaire, et donc à l'absence de signal ICOS/ICOSL. Le phénotype de la souris B7.2 Ko ne serait donc que secondaire à l'absence de l'interaction ICOS/ICOSL. Cette hypothèse est concordante avec un phénotype d'expression plus partiel de la souris B7.2^{-/-} comparée à la souris NOD ICOSL^{-/-}.

4. Approfondissement des connaissances sur le signal ICOS/ICOSL

Nous avons croisé la souris NOD ICOSL^{-/-} avec la souris NOD ICOS^{-/-}. L'incidence de la neuromyopathie de la souris NOD ICOSL^{-/-}ICOS^{-/-} est identique aux souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-}. Il n'y a donc pas d'argument pour un autre ligand d'ICOS.

La voie ICOS/ICOSL est une voie de costimulation nécessaire à la primo-activation des LT. Cependant, les expériences de transfert de diabète dans un receveur NOD.scid et un receveur NOD ICOSL^{-/-}.scid, indiquent que cette voie permet une activation secondaire plus efficace d'un lymphocyte activé une première fois in vivo dans une souris ICOSL^{+/+} âgée, puis in vitro par l'anticorps anti-CD3/anti-CD28. En effet, on observe un transfert plus

précoce du diabète lorsque les lymphocytes sont transférés dans un receveur NOD.*scid*. Cette accélération est indépendante des LT régulateurs puisqu'on observe le même phénomène (voir accentué) lorsque l'on transfère une population déplétée en LT-CD25⁺ (figure 4a ; 2ème article). En déplétant les LT-CD25⁺ de la population transférée, on s'affranchi du rôle des LT-régulateurs, mais on diminue également la fréquence des LT effecteurs activés. De plus, lorsque sont transférés des lymphocytes issus de souris NOD ICOSL^{-/-} âgées, après activation in vitro par l'anticorps anti-CD3/anti-CD28 dans un receveur NOD.*scid* et un receveur NOD ICOSL^{-/-}*scid*, une diminution de l'incidence de la neuromyopathie dans le receveur NOD.*scid* est observée.

La voie ICOS/ICOSL permet donc une meilleure activation des lymphocytes pré-activés ou mémoires que ce soit dans le modèle du diabète ou de la neuromyopathie.

La voie ICOS/ICOSL, nécessaire à la primo-activation a donc également un rôle dans la réactivation lymphocytaire.

5. La souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-}, un nouveau modèle animal d'une maladie humaine?

Les souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} développent une maladie auto-immune spontanée vis-à-vis du nerf périphérique et du muscle strié squelettique. Il existe à l'heure actuelle peu de modèles animaux de myosites auto-immunes spontanées. A la différence des myosites auto-immunes observées chez l'homme, on n'observe que peu de myoblastes en régénération, l'infiltrat respecte l'architecture du muscle, il n'y a pas de plage de nécrose ni d'inclusion. De plus, il ne semble pas y avoir d'atteinte cutanée qui pourrait faire évoquer une forme de dermatomyosite.

La surexpression des molécules du CMH de classe I est considérée comme un événement précoce, indispensable et suffisante au développement de la myosite auto-immune (Nagaraju, Raben et al. 2000). Cependant, dans notre modèle, on observe une myopathie auto-immune chez la souris NOD ICOSL^{-/-}β2m^{-/-}, n'exprimant donc pas le CMH de classe I, avec une incidence comparable à la souris NOD ICOSL^{-/-}. Il s'agit d'un modèle de myopathie auto-immune purement dépendant des LT-CD4⁺, où le CMH I n'a pas d'influence.

Concernant le rapprochement de la neuropathie auto-immune à une pathologie humaine, la physiopathologie des atteintes auto-immunes du système nerveux périphérique est mal connue. Les souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} présentent une faiblesse musculaire

progressive ainsi qu'une rigidité musculaire. Une fois les pattes rétractées, en flexion, elles ne se décontractent plus. Cette observation rappelle le syndrome de stiff-person où des défauts de décontraction ainsi qu'une contraction conjointe des muscles agonistes et antagonistes sont observés.

A la différence du syndrome de Guillain Barré, la maladie chez la souris NOD ICOSL^{-/-} et NOD ICOS^{-/-} évolue de façon linéaire sans régression, l'infiltrat est présent dans le nerf, mais aussi dans le muscle, et ces souris ne sont pas infectées par le *Campylobacter jejuni*. L'atteinte chez ces souris n'est pas axonale, mais touche principalement la myéline, ce qui élimine un parallèle avec les neuropathies axonales auto-immunes de l'homme.

Il est donc difficile de rapprocher notre modèle de neuromyopathie auto-immune spontanée à une maladie auto-immune nerveuse ou musculaire humaine, à ce stade des connaissances.

6. Conclusions et perspectives

La voie ICOS/ICOSL est responsable d'une régulation très fine de l'activation lymphocytaire, importante dans le contrôle des réactions immunitaires vis-à-vis du soi, dans les phases d'activation primaire et secondaire. Nous avons montré que l'invalidation de la voie ICOS/ICOSL chez la souris NOD conduit à une déviation de l'auto-immunité du pancréas vers le muscle et le système nerveux périphérique. Les nerfs périphériques et les muscles sont infiltrés de cellules immunitaires (LT, LB, cellules dendritiques et macrophages). Nous avons montré un défaut en nombre et en fonction des LT régulateurs chez les souris ICOS^{-/-} et ICOSL^{-/-}, tandis que les autres populations lymphocytaires ne sont pas altérées. Les LT effecteurs ont une production cytokinique normale. Nous avons également montré par des expériences de transfert et par invalidation des gènes codant pour les molécules du CMH que la neuromyopathie est une maladie LT-CD4⁺ dépendante. Nos travaux ont fait progresser la connaissance sur cette voie de costimulation, nécessaire non seulement à la primo activation mais aussi à la réactivation in vivo de lymphocytes préalablement activés. Enfin, les expériences de chimère ont montré que l'absence d'expression d'ICOSL par les LB ou les APC conventionnelles induit la déviation de l'auto-immunité vers les nerfs et les muscles.

Pour poursuivre le projet, l'établissement de clones de LT-CD4⁺ spécifiques des cibles antigéniques mises en évidence par l'étude des sérums des souris malades est une étape

indispensable pour valider les résultats qui ont été obtenus. En effet si le transfert de ces clones dans une souris NOD.*scid* reproduit la neuromyopathie, le rôle des auto-antigènes identifiés sera validé.

Concernant les anomalies morphologiques de la myéline mises en évidence par microscopie électronique, l'étude des gènes responsables des étapes précoces de la myélinisation est en cours.

Enfin, concernant l'évolution naturelle de la maladie, nous devons chercher à savoir si la maladie débute dans les nerfs avant de s'étendre dans les muscles striés squelettiques.

ANNEXES

Changes in MicroRNA Expression Contribute to Pancreatic β -Cell Dysfunction in Prediabetic NOD Mice. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, Regazzi R. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1742-51.

CD4(+) type II NKT cells mediate ICOS and programmed death-1-dependent regulation of type 1 diabetes. Kadri N, Korpos E, Gupta S, Briet C, Löfbom L, Yagita H, Lehuen A, Boitard C, Holmberg D, Sorokin L, Cardell SL. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3138-49.

New ImageStream^X Mark II

Cytometry without compromise



amnis[®]
part of EMD Millipore



CD4⁺ Type II NKT Cells Mediate ICOS and Programmed Death-1 –Dependent Regulation of Type 1 Diabetes

This information is current as of July 17, 2012.

Nadir Kadri, Eva Korpos, Shashank Gupta, Claire Briet, Linda Löfbom, Hideo Yagita, Agnes Lehuen, Christian Boitard, Dan Holmberg, Lydia Sorokin and Susanna L. Cardell

J Immunol 2012; 188:3138-3149; Prepublished online 27 February 2012;
doi: 10.4049/jimmunol.1101390
<http://www.jimmunol.org/content/188/7/3138>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/02/27/jimmunol.1101390.DC1.html>

References This article **cites 53 articles**, 26 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/188/7/3138.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2012 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



CD4⁺ Type II NKT Cells Mediate ICOS and Programmed Death-1–Dependent Regulation of Type 1 Diabetes

Nadir Kadri,^{*,1} Eva Korpos,[†] Shashank Gupta,[‡] Claire Briet,[§] Linda Löfbom,^{*} Hideo Yagita,[¶] Agnes Lehuen,[§] Christian Boitard,[§] Dan Holmberg,[‡] Lydia Sorokin,[†] and Susanna L. Cardell^{*}

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease that results from T cell-mediated destruction of pancreatic β cells. CD1d-restricted NKT lymphocytes have the ability to regulate immunity, including autoimmunity. We previously demonstrated that CD1d-restricted type II NKT cells, which carry diverse TCRs, prevented T1D in the NOD mouse model for the human disease. In this study, we show that CD4⁺ 24 α β type II NKT cells, but not CD4/CD8 double-negative NKT cells, were sufficient to down-regulate diabetogenic CD4⁺ BDC2.5 NOD T cells in adoptive transfer experiments. CD4⁺ 24 α β NKT cells exhibited a memory phenotype including high ICOS expression, increased cytokine production, and limited display of NK cell markers, compared with double-negative 24 α β NKT cells. Blocking of ICOS or the programmed death-1/programmed death ligand 1 pathway was shown to abolish the regulation that occurred in the pancreas draining lymph nodes. To our knowledge, these results provide for the first time cellular and molecular information on how type II CD1d-restricted NKT cells regulate T1D. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 3138–3149.

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease that results from destruction of pancreatic β cells mediated by T lymphocytes and other immune cells. Although much of the emphasis in the field has been on the role of effector T cells in the development and progression of the disease, deficiencies in multiple immune pathways have been reported to be associated with T1D, including a decreased regulation by CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells (Tregs) and defects in the NKT cell population (1, 2). NKT cells are an evolutionarily conserved lineage of T lymphocytes that are activated by endogenous and exogenous lipid Ags presented by the MHC class I-like molecule, CD1d. When activated, these cells can rapidly produce an array of cytokines and modulate innate and adaptive immune responses in

settings of autoimmune disease, allergy, tumor immunity, and infectious disease. There are two subsets of NKT cells: type I NKT cells (also called invariant NKT cells), bearing the V α 24-J α 18 (human) or V α 14-J α 18 (mouse) TCR α -chain, and type II NKT cells, which carry diverse TCRs (reviewed in Refs. 3–5). Although type I NKT cells appear more frequent than type II NKT cells in the murine system, studies of human NKT cells suggest that type II NKT cells may be more common than type I NKT cells in humans (5). Because of the limited availability of specific tools to identify type II NKT cells, the understanding of their function remains limited; however, studies in mice have demonstrated that type II NKT cells have a unique role in immunity different from that of type I NKT cells (reviewed in Ref. 5). In particular, an immunoregulatory function of type II NKT cells is revealed by the findings that type II NKT cells downmodulate tumor immunity (6, 7) and prevent T1D (8). Activation of a subset of type II NKT cells with the endogenous ligand sulfatide (9, 10) enhances the regulation of tumor immunity (11) and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis (9) and experimental hepatitis (12).

The NOD mouse develops a disease with many similarities to human T1D and is used extensively as a model to study the pathogenesis of T1D. NOD mice have lower numbers of NKT cells in the thymus and, to a lesser extent, in the periphery than do other strains of mice, leading to the proposal that NKT cell defects contribute to diabetes development in the NOD mouse (13–15). In agreement with a protective role for NKT cells, several studies have established that activated or overexpressed type I NKT cells can prevent T1D (16), while our studies have demonstrated a protective role for type II NKT cells (8). We showed that overexpression of a CD1d-restricted type II NKT cell TCR (V α 3.2⁺V β 9⁺) in NOD mice (24 α β NOD mice) resulted in an increased NKT cell population producing high levels of IFN- γ but low amounts of IL-4 (8, 17). Transgenic mice had reduced pancreatic infiltration correlating with almost complete prevention of disease, and transfer experiments demonstrated that type II NKT cells could regulate diabetogenic splenocytes from NOD mice.

^{*}Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, S-405 30 Gothenburg, Sweden; [†]Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, 48149 Münster, Germany; [‡]Department of Disease Biology, Faculty of Life Science, University of Copenhagen, DK-1165 Copenhagen K, Denmark; [§]INSERM Unité 986, Hôpital Cochin/St. Vincent de Paul, L'Université Paris-Descartes, 75279 Paris, France; and [¶]Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

¹Current address: Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Received for publication May 13, 2011. Accepted for publication January 21, 2012.

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation (Grant 1-2005-903), the Swedish Research Council (Grant 521-2009-5302), the Swedish Diabetes Society, the Novo Nordisk Foundation, the Children's Diabetes Society in Sweden, the Wilhelm and Martina Lundgren Foundation, and the Adlerbert Foundation. This work was carried out with support from the Swedish Foundation for Strategic Research to the Mucosal Immunology and Vaccine Center at Gothenburg University.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Susanna L. Cardell, Department of Microbiology and Immunology, University of Gothenburg, Box 435, 405 30 Gothenburg, Sweden. E-mail address: susanna.cardell@microbio.gu.se

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BDC cells, CD4⁺ BDC2.5 NOD cells; DN, double-negative; ICOS-L, ICOS ligand; iNOS, inducible NO synthase; OPT, optical projection tomography; PD-1, programmed death 1; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PD-L, programmed death ligand; PLN, pancreatic lymph node; T1D, type 1 diabetes; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/\$16.00

BDC2.5 NOD mice express a transgenic TCR isolated from the natural diabetogenic CD4⁺ T cell repertoire of NOD mice (18, 19), and CD4⁺ BDC transgenic T cells transfer acute diabetes to immunodeficient recipient mice. When the transgenic BDC2.5 TCR is expressed on a wild-type NOD genetic background, the mice accumulate a massive lymphocyte infiltrate in the pancreas that remains innocuous in most animals, with only a 10–20% incidence of diabetes. Regulatory cells expressing endogenous TCRs are necessary to prevent the disease in these mice, as an early aggressive disease develops in a high proportion of BDC2.5 NOD mice lacking rearrangement of TCR chains (20). It has been shown that both regulatory CD4⁺ T cells expressing Foxp3 (Tregs) and CD1d-restricted NKT cells are major players in the regulation of BDC cells in BDC2.5 NOD mice (20–23).

To investigate cellular requirements and molecular mechanisms underlying type II NKT cell regulation of T1D, we have explored the BDC2.5 NOD model using adoptive transfer experiments. Our results show that CD4⁺ type II NKT cells, but not CD4/CD8 double-negative (DN) NKT cells, were sufficient to regulate diabetogenic T cells. We found a unique phenotype displayed by CD4⁺ type II NKT cells, including low expression of NK markers, a phenotype of activated cells, high expression of ICOS, and increased cytokine production upon activation, different from DN type II NKT cells or conventional NOD CD4⁺ T cells. Most importantly, we demonstrate that the ICOS/ICOS ligand (ICOS-L) and the programmed death-1 (PD-1)/PD ligand (PD-L)1 pathways were required for the regulation to occur. To our knowledge, these results provide, for the first time, cellular and molecular information on the regulation of diabetogenic CD4⁺ T cells by a defined population of type II CD1d-restricted NKT cells.

Materials and Methods

Mice

Mice were housed under specific pathogen-free conditions. The 24 α B/NOD mice (8), BDC2.5 TCR transgenic NOD mice (BDC2.5 NOD mice) (18), and NOD.*scid* mice were bred at the Experimental Biomedicine Animal Facility at the University of Gothenburg. BDC2.5 NOD mice deficient for ICOS and their littermate controls (24) and C α ^{-/-} BDC2.5NOD (25) were bred at Hôpital Cochin/St. Vincent de Paul (Paris, France). Donor 24 α B/NOD mice were 8–12 wk of age, donor BDC2.5 NOD mice were 4–6 wk of age, and recipient NOD.*scid* mice were 5–8 wk of age at time of transfer. All experiments involving mice were approved by the Animal Ethics Committee of Gothenburg and performed according to the relevant regulatory standards.

Flow cytometry

Cells were stained at 4°C in PBS containing 5% FCS and 0.1% sodium azide after FcR blockade with 2.4G2 Ab. For surface staining, mAbs (clone indicated in parentheses) to V α 3.2 (RR3-16), V β 9 (MR 10-2), V β 4 (KT4), TCR β (H57-597), CD45R (B220; RA3-6B2), CD4 (GK1.5 and RM4-5), CD8 (53-6.7), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), CD25 (PC61 and 7D7), CD49b (DX5), ICOS (7E.17G9), CD134 (OX-40), LY49G2 (4D11), CD45RB (16A), CD95 (Jo2), CXCR3 (clone 220803), as well as streptavidin-allophycocyanin and streptavidin-Qdot605 were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA) or eBioscience (San Diego, CA). The anti-BDC2.5 Ab α BDC2.5 (22) was provided by Dr. A. Cooke after permission from Dr. O. Kanagawa. Cells were stimulated *in vitro* for 4 h with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of brefeldin A (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich). After surface staining, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences), followed by intracytoplasmic staining using Abs against IL-2 (JES6-5H4), IFN- γ (XMG1.2), TNF- α (MP6-XT22), IL-10 (JES5-16E3), IL-4 (11B11), IL-13 (eBio13A), or IL-17 (eBio17B7). All reagents were from BD Biosciences, except anti-IL-13 and anti-IL-17, which were from eBioscience. Samples were collected on an LSRII (BD Biosciences) and analyzed by FlowJo (Tree Star).

Preparation of pancreas-infiltrating cells, spleen, and lymph node cells

Spleen, mesenteric lymph nodes, and pancreatic lymph nodes (PLNs) were isolated and single-cell suspensions prepared. Infiltrating immune cells were obtained from lymph node-free pancreas tissue by cell sieving using 40- μ m strainers (BD Biosciences). Lymphocytes were subsequently isolated by Percoll (Sigma-Aldrich) gradient centrifugation. For flow cytometry analyses of islet infiltrates, cells from at least three mice were pooled.

Adoptive cell transfer and *in vivo* blocking

Splenocytes from 24 α B/NOD mice were processed to single-cell suspensions. V α 3.2⁺, B220⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, CD8⁺, and CD25⁺ cells were depleted as indicated using biotinylated Abs (BD Biosciences) and streptavidin-conjugated microbeads, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Depleted regulatory populations were transferred at the same numbers as control (nondepleted) populations after correction for depleted cells. CD4⁺ cells from 24 α B/NOD mice were positively selected to >93% purity using CD4 microbeads (Miltenyi Biotec), and CD4⁺ cells containing 7 \times 10⁵ V α 3.2⁺ cells were transferred to NOD.*scid* mice unless other numbers are stated. 24 α B/NOD splenocytes were enriched for V α 3.2⁺ cells or CD4⁺ cells using microbeads, followed by sorting to isolate V α 3.2⁺V β 9⁺CD4⁺ cells (>95% purity) using a FACSaria (BD Biosciences). Regulatory cells were injected *i.p.* simultaneously or 2 d before diabetogenic cells. Diabetogenic CD4⁺ cells were obtained from the spleens of 4- to 6-wk-old nondiabetic BDC2.5 NOD mice (or when indicated from C α ^{-/-} BDC2.5 NOD mice) (25) mice using CD4 microbeads (Miltenyi Biotec) (>90% CD4⁺, of which 80–90% expressed high levels of the BDC clonotype). CD4⁺ BDC2.5 NOD cells (referred to as BDC cells) (5 \times 10⁵) were injected *i.p.* into NOD.*scid* mice (referred to as day 0). Abs were injected *i.p.* into recipient mice (0.5 mg/mouse) on days -1, 2, 4, 7, and 10 relative to transfer of 24 α B/NOD cells. Blocking Abs to PD-L1 (10F.9G2), TGF- β 1 (1D11), and ICOS (17G9) were from BioXCell. Abs to PD-1 (RMP1-14) and PD-L2 (TY25) were prepared as in Yamazaki et al. (26, 27), and rat IgG (Sigma-Aldrich) served as control. Blocking mAbs to IL-4 and IL-10 were injected *i.p.* into recipient mice (1 mg/injection) on days -2 and 1 relative to transfer of CD4⁺ 24 α B/NOD cells. Anti-IL-4 (11B11) and anti-IL-10 (JES5-16E3) Abs were purified in our laboratory. The anti-plasmacytoid dendritic cell (pDC) 927 cell line was provided by Dr. M. Colonna. Anti-pDC 927 Ab was purified in our laboratory, and for pDC depletion was injected (1 mg) 2 d before and 1 d after transfer of CD4⁺ 24 α B/NOD cells. Depletion efficiency was confirmed with flow cytometry using anti-CD11c, anti-B220, anti-MHC class II (Ia^k) (BD Pharmingen), and PDCA-1 (Invitrogen) Abs. For inhibition of IDO activity *in vivo*, 1-methyl-D-tryptophan (>99% pure; Sigma-Aldrich) was supplied in the drinking water, 5 mg/ml, starting 1 d before transfer of CD4⁺ 24 α B/NOD cells until day 10 after BDC cell transfer. Water was exchanged every second day. Control mice received normal water.

Immunohistology

Pancreas cryostat sections (5 μ m) were air dried and fixed in methanol. Nonspecific staining was blocked by incubation in 1% BSA in PBS. Abs used were rat Abs to CD45 (30G12), V β 4 (KT4), F4/80 (A3-1), NIMP-R14 (anti-Ly6b; Abcam), and hamster anti-CD11c (N418), rabbit anti-inducible NO synthase (iNOS)/NOS II (Upstate Cell Signaling Solution), rabbit anti-pan-laminin (455) (28), and guinea pig anti-insulin (Dako). Secondary reagents were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat, Cy5-conjugated anti-rabbit, Cy3-conjugated donkey anti-guinea pig, and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-hamster Abs (The Jackson Laboratory and Molecular Probes). Negative controls involved incubation of sections with secondary Abs alone. Sections were examined using a Zeiss AxioImager microscope equipped with epifluorescent optics and documented using a Hamamatsu ORCA ER camera and Volocity 5.4 software (Improvision).

Optical projection tomography

Pancreas tissue from NOD.*scid* mice was isolated, fixed and prepared (29), and stained with rabbit anti-CD3 (C7930; Sigma-Aldrich) followed by anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen). Optical projection tomography (OPT) scanings were carried out using the Bioptronics 3001 OPT M scanner with exciter D560/40 \times and emitter E610lpv2 filter (Chroma Technology) (29, 30). Tomographic reconstructions were generated using the NRecon V1.6.1.0 (SkyScan, Kontich, Belgium) software, and reconstructed images were further assessed using a Bioptronics viewer v2.0 (29). The movies and images were constructed using ImageJ 1.43u software.

Diabetes diagnosis

Starting 4 d after transfer of diabetogenic cells, recipient mice were tested every day for glucose in the urine using glucotest strips (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Overt diabetes was defined as two consecutive positive tests.

Statistical analysis

GraphPad Prism software was used for statistical comparisons of two groups; *p* values were calculated by the unpaired Student *t* test. For comparisons of multiple groups, *p* values were calculated by one-way ANOVA with GraphPad Prism. A *p* value of 0.05 or less was considered significant.

Results

A minor CD4⁺ subset of TCR transgenic type II NKT cells prevented T1D in a transfer model

A first set of experiments was performed to evaluate the capacity of 24αβ type II NKT cells to inhibit the induction of diabetes following transfer of BDC cells to NOD.*scid* mice. Transfer of 5×10^5 BDC cells (day of transfer of BDC cells is regarded as day 0) induced diabetes in 80–100% of recipients (Fig. 1). In contrast, when total spleen cells from 24αβNOD mice were injected at the same time (not shown), or 2 d before BDC cells (Fig. 1A), all mice were protected from disease for several months after transfer (Supplemental Fig. 1A). In all subsequent experiments 24αβNOD cells were transferred 2 d before (or at the same time where indicated) diabetogenic cells, hereafter referred to as cotransfer. Titration of cell numbers showed that 40×10^6 total 24αβNOD spleen cells, containing $\sim 5 \times 10^6$ Vα3.2⁺Vβ9⁺ (TCR transgene-positive) (8, 17, 31) 24αβ NKT cells, were required to prevent disease.

Although most T lymphocytes in 24αβ NOD mice express the transgenic TCR Vβ9 chain, only 10–15% of T cells also express the transgenic TCR Vα3.2 chain (8). Expression of the full transgenic Vα3.2/Vβ9 TCR is required for CD1d-dependent development of T cells with the typical NKT cell phenotype (8, 17). Depletion of Vα3.2⁺ cells from 24αβNOD splenocytes completely abrogated the protection conferred by these splenocytes (Fig. 1A), demonstrating that type II NKT cells were required for regulation of diabetogenic effector T cells. However, depletion of CD11c⁺, CD11b⁺, CD8⁺, and B220⁺ cells did not affect disease incidence (Fig. 1B). Approximately 10–15% of TCR transgene-positive (Vα3.2⁺Vβ9⁺) 24αβ type II NKT cells were CD4⁺ (Fig. 1C), and most were CD4⁻CD8⁻ (DN). Despite the low proportion of CD4⁺ cells, their depletion from 24αβNOD splenocytes restored disease induction by BDC cells, demonstrating a pivotal regulatory role for CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells (Fig. 1D). This was confirmed by cotransfer experiments where total CD4⁺ spleen cells, containing $5\text{--}7 \times 10^5$ Vα3.2⁺Vβ9⁺ cells, were as effective as total 24αβNOD splenocytes in providing long-term protection from BDC cell-mediated disease (Fig. 1D, Supplemental Fig. 1A, 1B). Again, the protection by 24αβNOD CD4⁺ cells was found to require Vα3.2⁺ type II NKT cells (Fig. 1E), demonstrating that the CD4⁺ but not the DN subset of Vα3.2⁺ 24αβ type II NKT cells was able to regulate T1D induced by BDC cells. Conventional Tregs expressing Foxp3 and CD25 were present among both CD4⁺ cells from BDC2.5 NOD mice and total CD4⁺ cells from 24αβNOD mice; however, TCR transgenic Vα3.2⁺Vβ9⁺CD4⁺ cells did not include cells expressing Foxp3 (Fig. 1C). The regulation of disease in recipient mice was not dependent on transferred CD25⁺ cells, as depletion of CD25⁺ cells from one or both populations of CD4⁺ 24αβNOD and CD4⁺ BDC cells before transfer did not affect the ability of CD4⁺ 24αβNOD cells to confer resistance to T1D (Fig. 1F). Cα^{-/-} BDC cells, lacking rearrangement of endogenous TCR α-chains (25), were similarly controlled by CD4⁺ 24αβNOD cells (Supplemental Fig.

1C). Finally, transfer of 7×10^5 sorted CD4⁺Vα3.2⁺Vβ9⁺ type II NKT cells was sufficient to prevent disease (Fig. 1G), and titration showed that this cell number was necessary to regulate 5×10^5 CD4⁺ BDC cells (Fig. 1H). Therefore, a minor CD4⁺ subset of type II NKT cells was sufficient for the regulation of T1D induced by CD4⁺ BDC cells (Fig. 1G), whereas DN type II NKT cells were not able to regulate disease even when transferred at 8- to 9-fold higher numbers (Fig. 1D).

Prevention of diabetes was associated with reduced inflammation in the pancreas

We next investigated whether the clinical observation of disease protection correlated with the extent of infiltration and destruction of islets in the pancreas on days 7–9 after transfer of BDC cells. Three-dimensional imaging using OPT analysis of major portions of pancreases from nondiabetic recipients of BDC cells demonstrated extensive T lymphocyte infiltration of the islets (Fig. 2A, Supplemental Video 1) and markedly reduced T cell infiltration in the case of cotransfer of CD4⁺ 24αβ spleen cells (Fig. 2A, Supplemental Video 2). Corresponding FACS analysis revealed a >8-fold reduction in infiltrating BDC cell numbers (Fig. 2B) and showed that the numbers of BDC cells and 24αβ Vα3.2⁺Vβ9⁺ type II NKT cells were similar in the pancreas after cotransfer (Fig. 2B). Immunofluorescence analyses of organ sections confirmed an abundance of infiltrating cells positive for the BDC TCR after transfer of these cells, whereas minor, mostly peri-insular, infiltrates containing BDC cells were detected after cotransfer with CD4⁺ 24αβ spleen cells (Fig. 2C). Further examination revealed an association of F4/80⁺ macrophages and CD11c⁺ dendritic cells with pancreatic infiltrates in both recipients of BDC cells alone and after cotransfer of CD4⁺ 24αβNOD spleen cells (Fig. 2D, 2E). In contrast, only after transfer of BDC cells alone were the infiltrates associated with high numbers of NIMP-R14⁺ neutrophils and iNOS production (Fig. 2D, 2E). Pancreatic infiltrates were still present 8–10 wk after cotransfer of CD4⁺ 24αβNOD cells together with BDC cells. BDC cells were present in the infiltrates but were apparently innocuous and under regulation, as suggested by the absence of neutrophils in the infiltrates, positive insulin staining, and the lack of clinical diabetes (Supplemental Fig. 1). Taken together, the data show that cotransfer with CD4⁺ 24αβNOD spleen cells reduced the extent and composition of inflammatory infiltrates induced by BDC cells in NOD.*scid* mice.

Cotransferred CD4⁺ 24αβ type II NKT cells accumulated in the PLNs and suppressed activation of CD4⁺ BDC2.5 cells

The data suggest that CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells recruited to the pancreas may exert their immunosuppressive function at this site, although the strongly reduced size of infiltrates may also result from regulation of BDC cell activation in the draining PLNs. Before transfer, most BDC cells had a naive phenotype (Supplemental Fig. 2A). Transfer of BDC cells alone resulted in accumulation of a high proportion of activated and cycling BDC cells in the PLN (Fig. 3A–C). In the presence of CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells, BDC cell numbers in the PLN were unaffected by day 3, but by days 6 and 9 the total cell numbers were 2-fold lower and BDC cell numbers were 5-fold lower in PLN (Fig. 3A, 3B). Analysis of BDC cells showed decreased CD69 levels and reduced cycling days 6–7 after cotransfer with CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells, and the capacity of BDC cells to produce inflammatory cytokines upon stimulation was significantly decreased (Fig. 3C). At this time, whether transferred alone or in the cotransfer situation, BDC cells preferentially localized to the PLN (Supplemental Fig. 2B).

In contrast, after cotransfer of CD4⁺ 24αβNOD spleen cells, CD4⁺Vα3.2⁺Vβ9⁺ cells were detected in different lymphoid

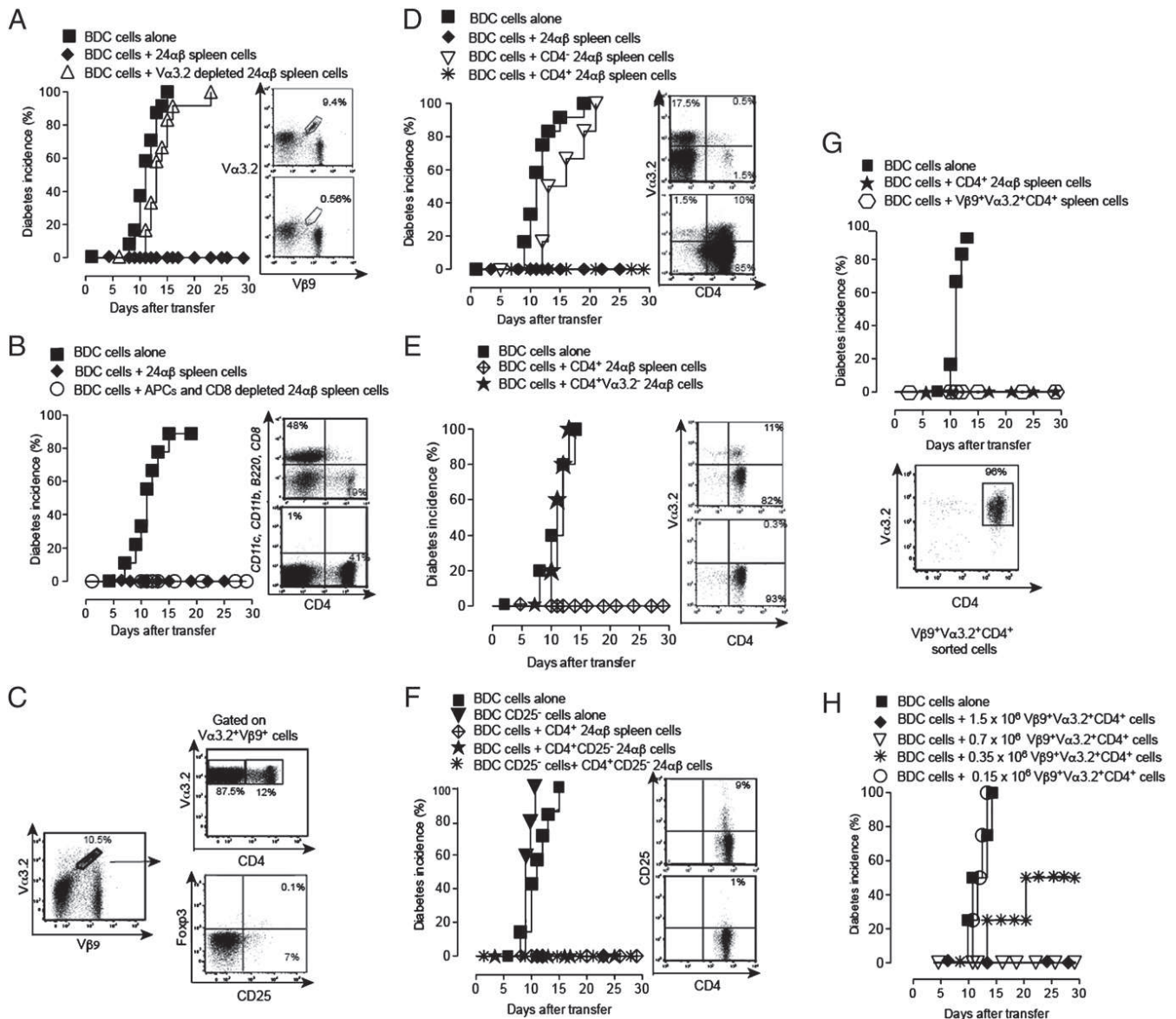


FIGURE 1. CD4⁺ but not DN type II NKT cells regulated diabetogenic CD4⁺ T cells. BDC cells (5×10^5) were transferred to NOD.scid mice alone or together with 24αβNOD spleen cells containing 10^7 CD4⁺ cells or with depleted or positively selected populations as described. (A) BDC cells were injected alone (■, $n = 24$) or cotransferred with total 24αβNOD splenocytes (◆, $n = 18$, depicted in the upper dot plot) or with 24αβNOD splenocytes depleted of Vα3.2⁺ type II NKT cells (△, $n = 12$, lower dot plot). (B) BDC cells were injected alone (■, $n = 9$) or cotransferred with 24αβNOD splenocytes (◆, $n = 10$, upper dot plot) or with 24αβNOD splenocytes depleted of CD8⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, and B220⁺ cells (APC and CD8 depleted; ○, $n = 11$, lower dot plot). (C) 24αβNOD spleen cells were gated for Vα3.2⁺Vβ9⁺ cells (left dot plot) and displayed for Vα3.2 versus CD4 expression (upper right dot plot) or for Foxp3 versus CD25 staining (lower right dot plot). (D) BDC cells were injected alone (■, $n = 12$) or cotransferred with 24αβNOD splenocytes (◆, $n = 8$), or with 24αβNOD splenocytes depleted of CD4⁺ cells (▽, $n = 6$, upper dot plot), or with positively selected CD4⁺ 24αβNOD cells (*, $n = 8$, lower dot plot). (E) BDC cells were injected alone (■, $n = 5$) or cotransferred with CD4⁺ 24αβ cells (◆, $n = 11$, upper dot plot) or with CD4⁺ 24αβ cells depleted of Vα3.2⁺ cells (★, $n = 5$, lower dot plot). (F) BDC cells (■, $n = 7$, upper dot plot), or BDC cells depleted of CD25⁺ cells (▼, $n = 5$, lower dot plot) were injected alone, or BDC cells were cotransferred with CD4⁺ 24αβ cells (◆, $n = 12$), or BDC cells were cotransferred with CD4⁺ 24αβ cells depleted of CD25⁺ cells (★, $n = 10$), or BDC cells depleted of CD25⁺ cells were cotransferred with CD4⁺ 24αβ cells depleted of CD25⁺ cells (*, $n = 10$). (G) NOD.scid mice received CD4⁺ BDC2.5 cells alone (■, $n = 6$), or cotransferred with CD4⁺ 24αβ spleen cells (★, $n = 6$), or cotransferred with sorted CD4⁺Vα3.2⁺Vβ9⁺ type II NKT cells (>95% pure, dot plot) (○, $n = 6$). (H) BDC cells were injected alone (■, $n = 8$) or cotransferred with CD4⁺ 24αβ cells containing 1.5×10^6 (◆, $n = 8$), 0.7×10^6 (▽, $n = 8$), 0.35×10^6 (*, $n = 8$), or 0.15×10^6 (○, $n = 8$) Vα3.2⁺ cells. Data show pooled results from two to three (B–H) or more (A) experiments.

organs of recipient mice (Supplemental Fig. 2C), including the PLNs where they were present in similar numbers to BDC cells (Fig. 3B). The CD4⁺Vα3.2⁺Vβ9⁺ type II NKT cells proliferated in the PLN of recipient mice as shown by the expression of Ki67, and they displayed higher levels of CD44 and CD69 compared with CD4⁺Vα3.2⁺Vβ9⁺ type II NKT cells in the spleen (Fig. 3D). This indicates that CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells accumulated and were activated in the PLN and prevented full activation, differentiation, and cell division of BDC cells at this site.

Transgenic CD4⁺ type II NKT cells were ICOS⁺ and displayed characteristics of increased activation, high cytokine production, and limited NK cell features

Because CD4⁺ but not DN 24αβNOD type II NKT cells could prevent disease in the transfer model, we first analyzed whether both cell types homed to pancreatic lymph nodes after transfer. Transfer of total spleen cells from 24αβNOD mice together with BDC cells resulted in a similar extent of CD4⁺ and DN type II NKT cell localization to the PLN, as well as an upregulation of the activation

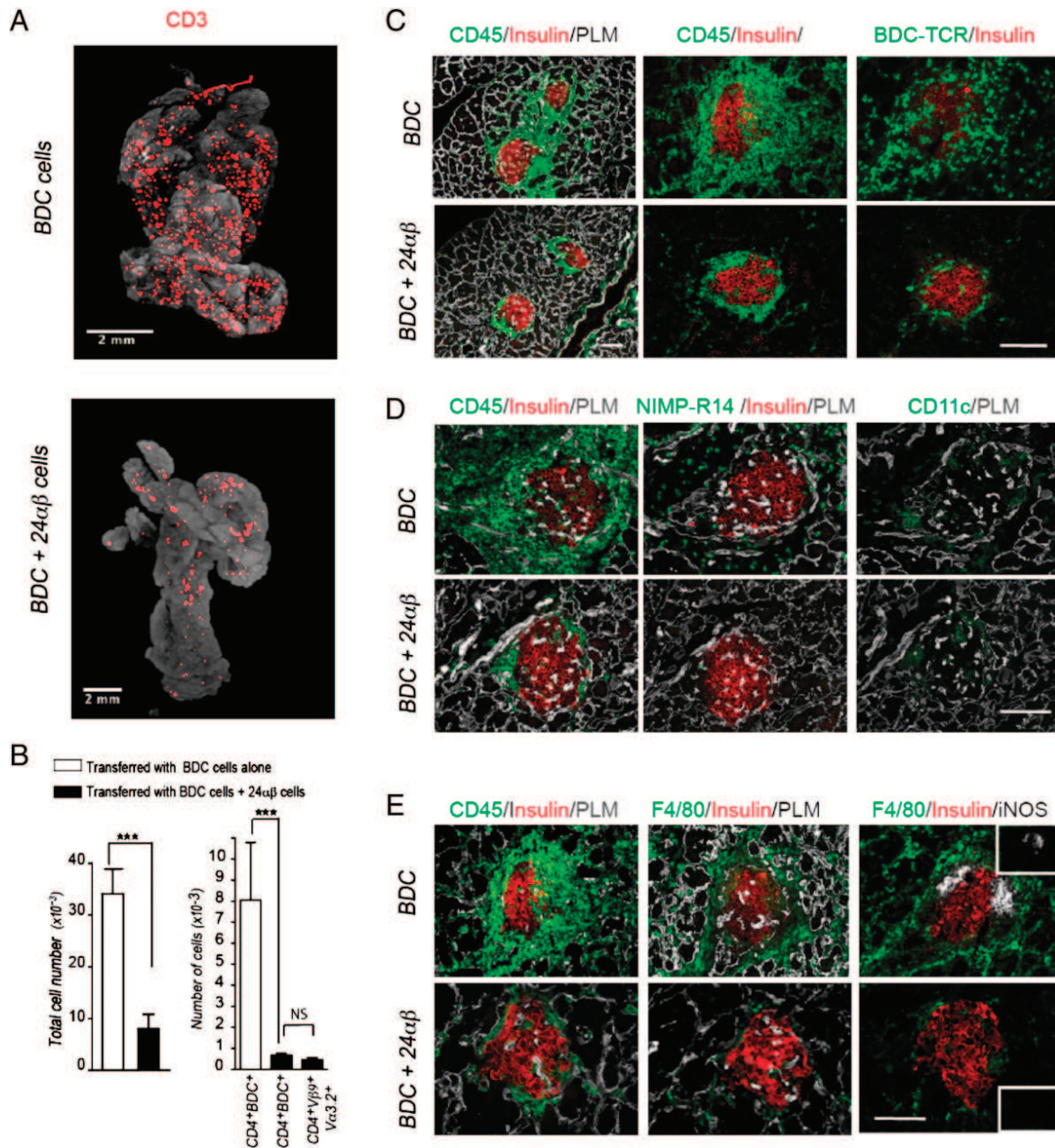


FIGURE 2. Cotransfer of type II NKT cells reduced the infiltration of diabetogenic T cells and inflammation in the pancreas. NOD.*scid* mice were transferred with BDC cells alone (BDC) or cotransferred with $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD spleen cells (BDC + $24\alpha\beta$), and pancreases were obtained on day 7. **(A)** Isosurface rendered OPT images of representative pancreases labeled for CD3 (red). The pancreas outline (gray) is based on the signal from tissue autofluorescence. **(B)** Total cell numbers (*left panel*) and absolute cell numbers (*right panel*) of BDC cells and $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD cells in the pancreas after injection with BDC cells alone ($n = 12$) or together with $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD cells ($n = 11$) are shown. **(C–E)** Immunofluorescence staining of the indicated markers was performed on pancreas sections. Pan-laminin (PLM) stain was used to visualize the structure of the pancreas tissue. Insets represent the single stained images for iNOS. Scale bars, 100 μ m (or as indicated). *** $p \leq 0.001$.

marker CD69 on both subsets in this organ (Supplemental Fig. 2D, 2E). To provide insight on the mechanism of action of the $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells, we compared the two subsets for previously described characteristics of transgenic type II NKT cells (8, 17, 32): the expression of a panel of surface receptors and their ability to secrete cytokines after stimulation. Conventional $CD4^+$ NOD cells are shown as reference. Several differences were found between the $CD4^+$ and DN $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cell subsets: $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells had lower expression of D α 5/CD49b, Ly49G2, and CD122 (Fig. 4A), demonstrating that DN cells but not $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells had several characteristics of NK cells. $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells had an expression profile typical of activated cells (CD62L^{lo} and CD45RB^{lo},

and CD44^{hi} and CD69⁺), whereas in this respect DN $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells resembled conventional resting $CD4^+$ NOD T cells (Fig. 4A). DN $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells had somewhat higher expression of CXCR3 (Fig. 4A), whereas other chemokine receptors and integrins tested were similarly expressed in both subsets (data not shown). Both type II NKT cell populations expressed a low level of PD-1, with a subset of cells having high levels, whereas PD-L1 but not PD-L2 was found at similar levels on type II NKT cells and NOD $CD4^+$ cells. $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells, in contrast, displayed increased amounts of CD95 and ICOS. We also found a difference in the production of cytokines upon ex vivo stimulation with PMA and ionomycin (Fig. 4B). The fraction of $CD4^+$ $24\alpha\beta$ NOD type II NKT cells producing the Th1 cytokines TNF- α ,

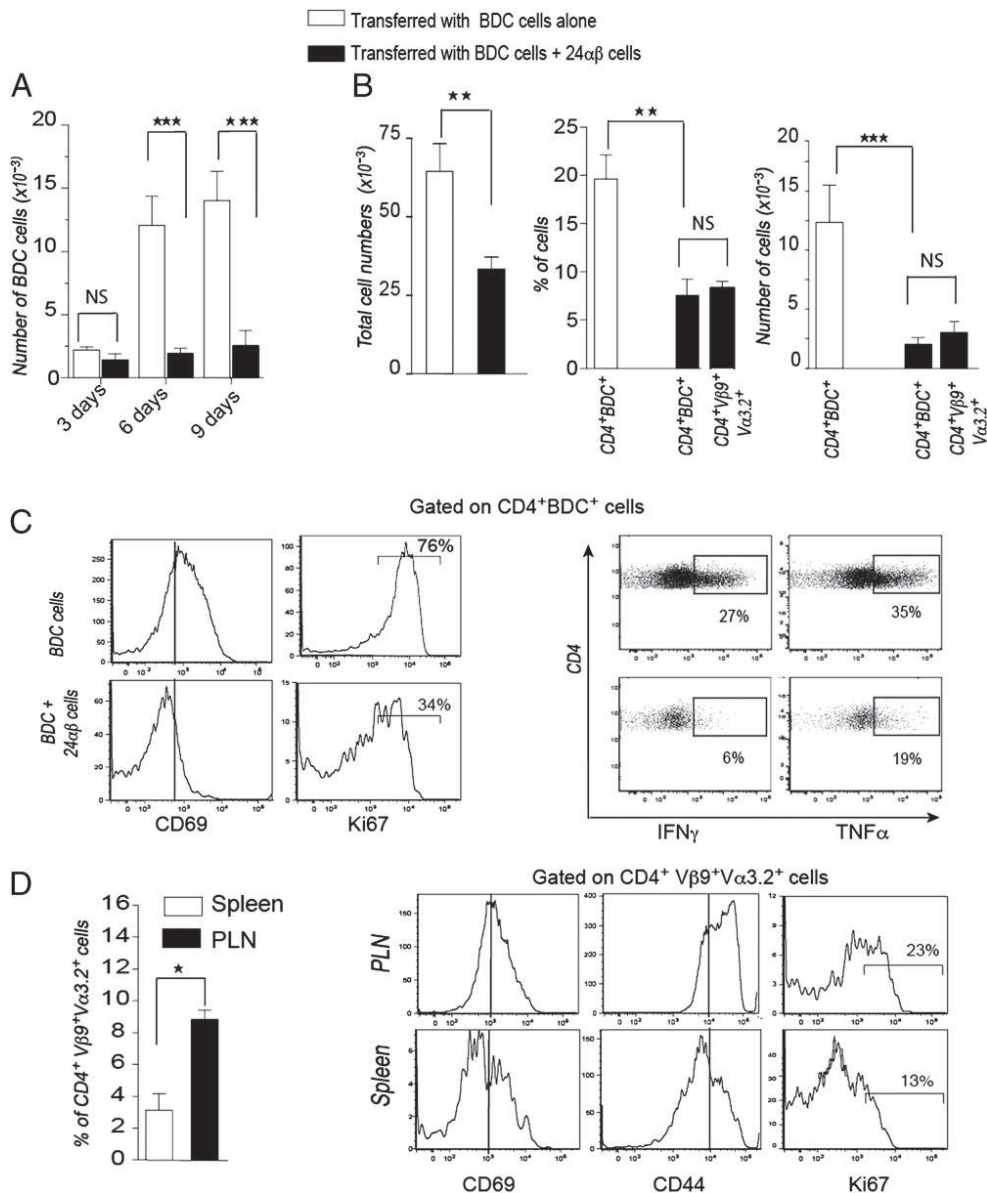


FIGURE 3. Activated CD4⁺ type II NKT cells in the PLNs associated with reduced CD4⁺ BDC2.5 NOD cell activation. NOD.scid mice were transferred with BDC cells alone (BDC) or cotransferred with CD4⁺ 24αβNOD spleen cells (BDC + 24αβ cells), and PLNs were isolated on the indicated days (**A**) or day 7 (**B–D**). (**A**) Absolute numbers of BDC cells in PLNs different days after transfer of BDC cells alone (open bars) or of BDC cells together with CD4⁺ 24αβNOD cells (filled bars). Each bar represents data from three to five mice in one experiment of two performed with similar results. (**B**) Total cell numbers in PLNs after injection with BDC cells alone ($n = 9$) or together with 24αβ cells ($n = 9$) (left panel). Frequency (middle panel) and absolute numbers (right panel) of BDC cells and Vα3.2⁺Vβ9⁺CD4⁺ cells in PLNs are shown. (**C**) PLN cells from mice injected with BDC cells alone (top panels) or together with CD4⁺ 24αβNOD cells (lower panels) were stained for flow cytometry. Some cells were stimulated and stained for surface markers and intracellularly for cytokines (right panels). Data are from a pool of three to five mice and are representative of three independent experiments. (**D**) NOD.scid mice were injected with BDC cells and CD4⁺ 24αβNOD cells and stained for flow cytometry. Frequencies of CD4⁺Vβ9⁺Vα3.2⁺ cells in the indicated organs (left panel, $n = 9$) and proportions of cells positive for CD69, CD44, and Ki67 (right panels) are displayed. (**B** and **C**) Data are representative of three independent experiments, each using a pool of three to four mice. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

IFN-γ, and IL-2 were 3- to 5-fold higher than in DN 24αβNOD type II NKT cells. Both subsets produced low levels of IL-4, IL-13, and IL-17, but negligible amounts of IL-10. Thus, phenotypic analysis demonstrated several differences between CD4⁺ 24αβNOD type II NKT and DN 24αβNOD type II NKT cells, consistent with distinct functional capacities of the two subsets in the regulation of T1D.

ICOS/ICOS-L interaction was necessary for type II NKT cell regulation of BDC cells

In the search for the regulatory mechanism induced by CD4⁺ 24αβ type II NKT cells, we first investigated a number of known immunoregulatory pathways previously associated with NKT and

other regulatory cells (6, 14, 33), including some of the cytokines produced by CD4⁺ 24αβ type II NKT cells. Using different approaches we could exclude a role for IL-4 and IL-10 (Supplemental Fig. 3A), IL-13 and TGF-β (Supplemental Fig. 3B, 3C), and pDCs and the tryptophan catabolizing enzyme IDO (Supplemental Fig. 3D–F). Next, we turned to ICOS, expressed at high levels on CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells (Fig. 4A). ICOS, a T cell costimulatory molecule upregulated on activated T cells, has also been implicated in the regulatory function of Tregs (24, 34, 35). Administration of blocking Ab to ICOS completely abrogated protection by CD4⁺ 24αβNOD type II NKT cells (Fig. 5A). Expression of ICOS by BDC cells was not relevant for

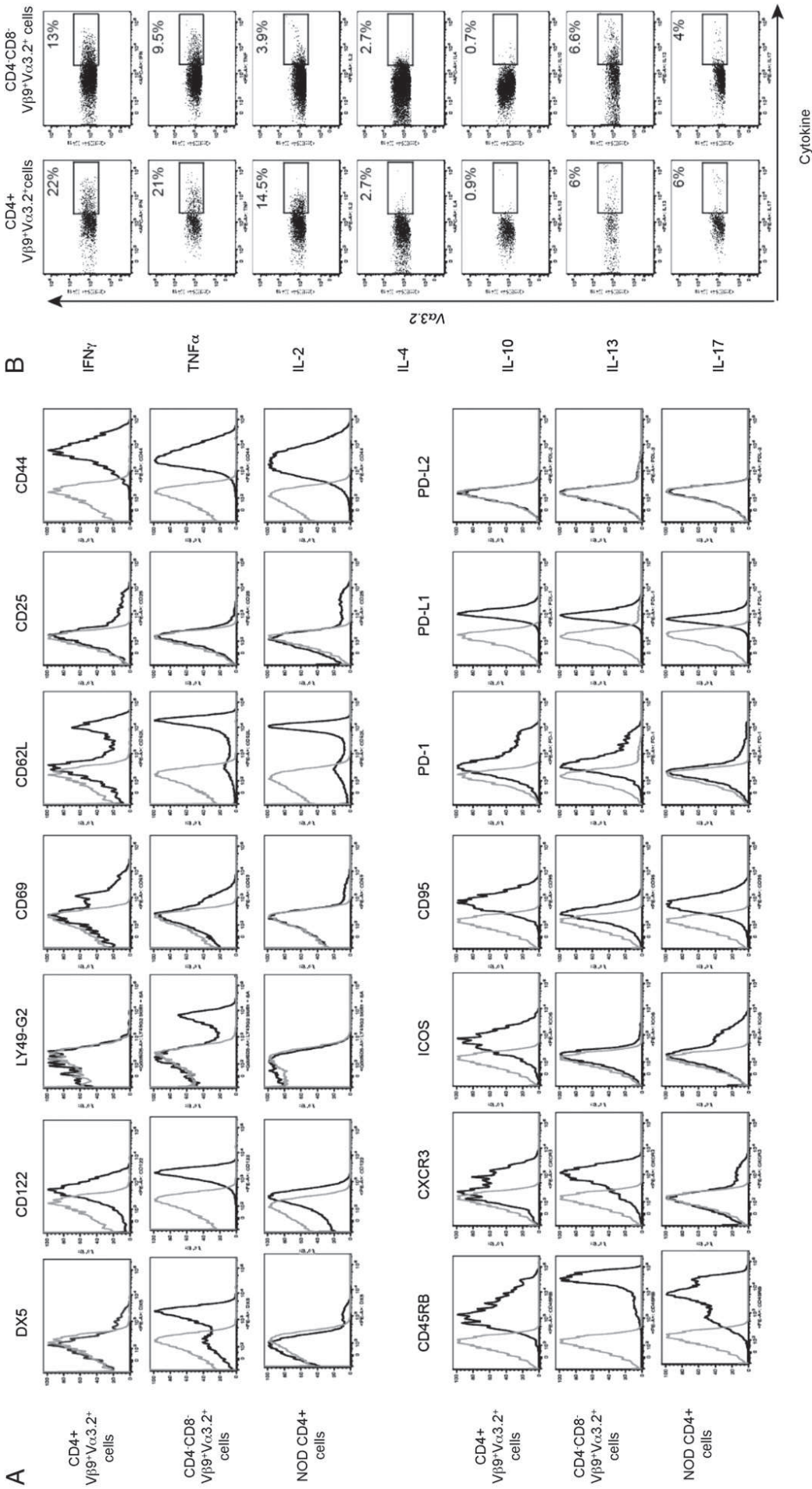


FIGURE 4. CD4⁺ type II NKT cells were distinct from DN cells in the expression of surface molecules and cytokine production. Splenocytes from 24αβ NOD mice were isolated and stained for surface markers (A) or first stimulated followed by staining for surface markers and intracellular cytokines (B). (A) CD4⁺ Vβ9⁺ Vα3.2⁺ Vβ9⁺ cells (top panels), CD4⁺ CD8⁻ Vα3.2⁺ Vβ9⁺ cells (middle panels), and control CD4⁺ splenocytes from wild-type NOD mice are displayed for the expression of the indicated surface markers (black lines) and negative control stains (gray lines). Data are representative of at least three independent experiments. (B) Splenocytes from 24αβNOD transgenic mice were stimulated and stained for flow cytometry. The data show Vα3.2⁺ versus cytokine expression by CD4⁺ and CD4⁻ CD8⁻ cells among Vα3.2⁺ Vβ9⁺ cells and are representative of at least three experiments. Numbers indicate percentage of positive cells.

regulation in this model, as BDC cells lacking ICOS could still transfer diabetes and be downregulated by 24 α βNOD type II NKT cells to the same extent as BDC cells expressing ICOS (Fig. 5B). Although not directly demonstrated, this suggests that ICOS expression by CD4⁺ 24 α βNOD type II NKT cells was required for suppression to be observed. Because ICOS has been implicated in the homeostasis and activation of type I NKT cells (36, 37), we tested whether ICOS blockade affected 24 α βNOD type II NKT cells in vivo. Injection of 24 α βNOD mice with the anti-ICOS Ab did not reduce numbers of V α 3.2⁺V β 9⁺ cells in lymph nodes or in the spleen after 9 d treatment, suggesting that ICOS was not required for 24 α βNOD type II NKT cell homeostasis (data not shown). Furthermore, in recipient NOD.scid mice the number of 24 α βNOD type II NKT cells and their state of activation (CD44 and CD69 levels) after cotransfer with BDC cells were not altered in the presence of anti-ICOS compared with control mAb (days 3–4 after transfer; Fig. 5C). This implies that ICOS signaling was required for the regulatory function of CD4⁺ 24 α βNOD type II NKT cells.

24 α β Type II NKT cell regulation of T1D was dependent on PD-1/PD-L1 interaction

Expression levels of some surface markers, in particular CD62L and PD-1, divided the CD4⁺ 24 α β type II NKT cell population into two subsets (Fig. 4). Interestingly, although there was a correlation between high expression of PD-1 and ICOS, CD62L^{hi} cells were low for ICOS and PD-1 expression (Fig.

5D). PD-1 can act as a negative regulator of T cells, but it has also been implied in the mechanism of action of regulatory cells (38–40). We therefore tested whether blocking of the PD-1 receptor would influence the regulation of disease by 24 α β type II NKT cells or diabetes development induced by the transfer of BDC cells. Administration of anti-PD-1 mAb from day -1 to day 10 did not influence the kinetics of disease induced by 5 × 10⁵ BDC cells, but it reversed the protective effect of 24 α β type II NKT cells on disease incidence (Fig. 6A). Blocking of the two PD-1 ligands, PD-L1 or PD-L2, demonstrated a role for PD-L1, but not for PD-L2 (Fig. 6B). Reversal of regulation caused by blocking of PD-1/PD-L1 could result from inhibition of the regulatory pathway induced by CD4⁺ 24 α βNOD type II NKT cells but may also result from potentiation of the autoaggressive nature of BDC CD4⁺ T cells. To investigate the latter possibility we titrated the number of BDC cells to identify the minimum number of cells that would induce disease in at least a fraction of the recipient mice and then tested the effect of blocking PD-1 signaling. Transfer of 5 × 10⁵ BDC cells resulted in 100% T1D incidence, whereas transfer of 10⁴ BDC cells resulted in reduced incidence and delayed kinetics of onset (Fig. 6C). Blocking PD-L1 in mice transferred with 10⁴ BDC cells increased disease incidence and resulted in earlier onset of diabetes, but this was still delayed compared with that induced by 5 × 10⁵ BDC cells. This suggested that when using 10⁴ BDC cells the anti-PD-L1 treatment resulted in a slight increase of diabetogenicity that was less

FIGURE 5. ICOS/ICOS-L interaction was necessary for type II NKT cell regulation of CD4⁺ BDC2.5 NOD cells. **(A)** BDC cells were injected alone in the presence of rat IgG (■, n = 6) or anti-ICOS (*, n = 10) or cotransferred with CD4⁺ 24 α βNOD cells in the presence of rat IgG (⊕, n = 10) or anti-ICOS mAb (○, n = 10). Data are pooled from two independent experiments. **(B)** BDC cells were injected alone in the presence of rat IgG (×, n = 5). ICOS-deficient BDC cells were injected alone in the presence of rat IgG (■, n = 4) or anti-ICOS mAb (○, n = 4) or cotransferred with CD4⁺ 24 α βNOD cells in the presence of rat IgG (▼, n = 5) or anti-ICOS mAb (◆, n = 4). **(C)** NOD.scid mice were transferred with BDC cells together with CD4⁺ 24 α βNOD splenocytes in the presence of rat IgG (n = 9, open bars) or anti-ICOS mAb (n = 9, filled bars). Three to 4 d later, mice were sacrificed and cells were isolated from PLNs and stained for flow cytometry. Total cell number and absolute number of V α 3.2⁺ V β 9⁺CD4⁺ cells are displayed in the left panels. Stainings for CD69 and CD44 on V α 3.2⁺V β 9⁺ CD4⁺ cells are displayed in the right panels (rat IgG, solid lines; anti-ICOS, dotted lines; background stain, gray area). Data are representative of three independent experiments, each using a pool of three to five mice. **(D)** CD4⁺ 24 α βNOD splenocytes were analyzed by flow cytometry. Plots are representative of at least three independent experiments.

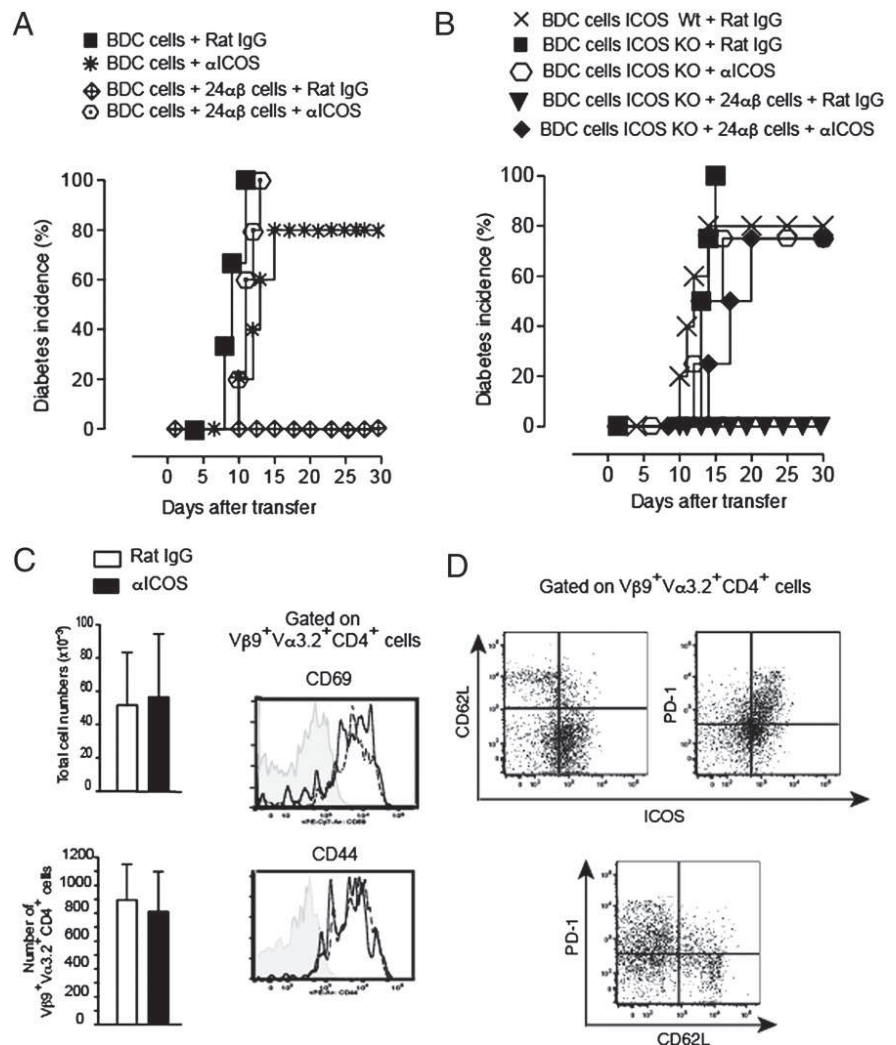
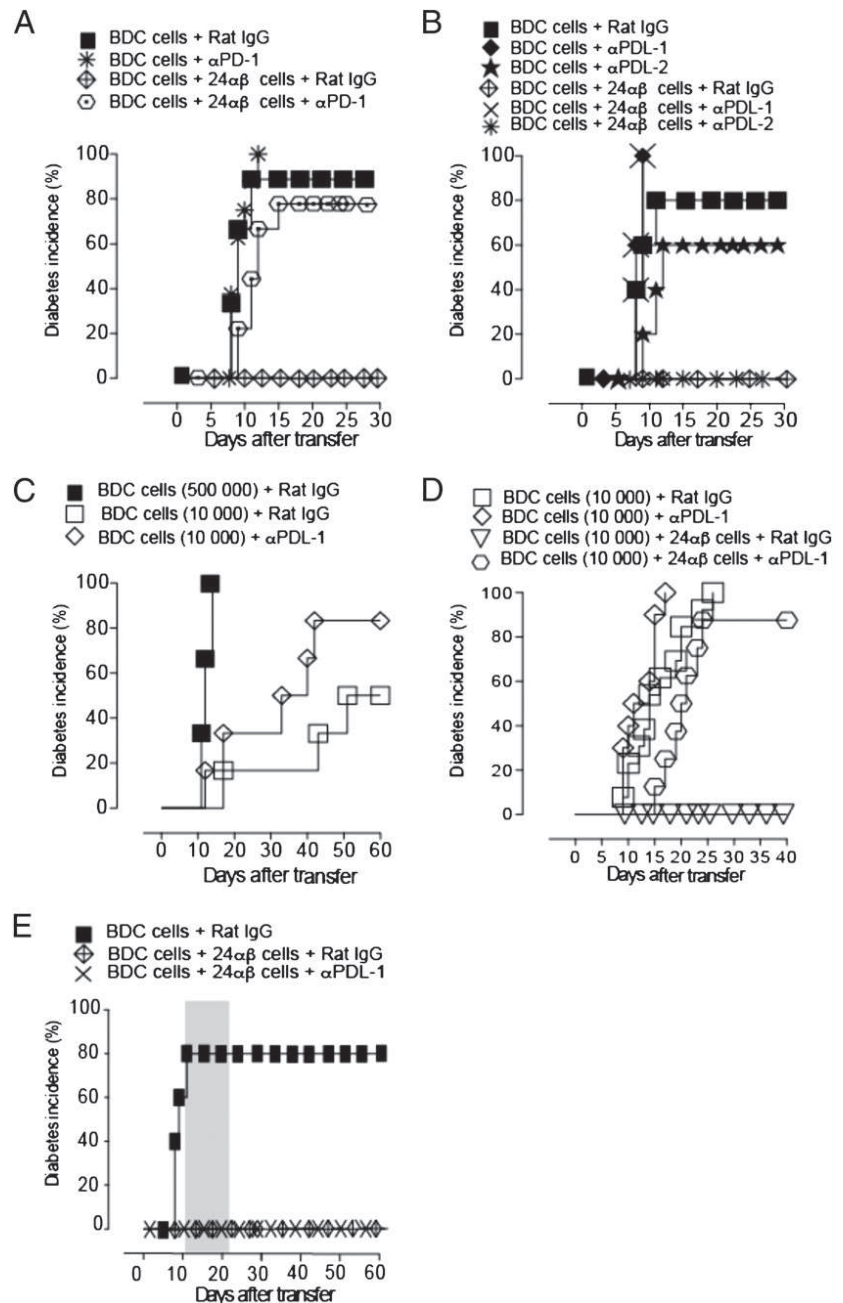


FIGURE 6. The PD-1/PD-L1 pathway played a key role in the regulation of T1D by type II NKT cells. NOD.*scid* mice were transferred with BDC cells alone or simultaneously with CD4⁺ 24 α β NOD splenocytes. (A) BDC cells were transferred to NOD.*scid* mice alone in the presence of rat IgG (■, *n* = 8) or anti-PD-1 mAb (*, *n* = 12) or cotransferred with CD4⁺ 24 α β NOD cells in the presence of rat IgG (⊕, *n* = 12) or anti-PD-1 mAb (◇, *n* = 6). (B) BDC2.5 cells were injected alone in the presence of rat IgG (■, *n* = 8), anti-PD-L1 (◆, *n* = 12), or anti-PD-L2 (★, *n* = 12) or cotransferred with CD4⁺ 24 α β NOD cells in the presence of rat IgG (⊕, *n* = 6), anti-PD-L1 (×, *n* = 12), or anti-PD-L2 (*, *n* = 12). (C) BDC cells (5×10^5) (■, *n* = 6) or 10^4 BDC cells were transferred in the presence of rat IgG (□, *n* = 6) or anti-PD-L1 (◇, *n* = 6). (D) BDC cells (1×10^4) were injected alone in the presence of rat IgG (□, *n* = 13) or anti-PD-L1 (◇, *n* = 10) or cotransferred with 24 α β cells in the presence of rat IgG (▽, *n* = 10) or anti-PD-L1 (○, *n* = 10). (E) NOD.*scid* mice were transferred with BDC cells alone (■, *n* = 8) or cotransferred with CD4⁺ 24 α β NOD splenocytes, and cotransferred mice were treated five times with rat IgG (⊕, *n* = 8) or anti-PD-L1 (×, *n* = 8) (0.5 mg) every 3 d starting on day 10 (indicated by the gray area). The data shown are from one of three similar experiments (C) or a pool from two or three independent experiments.



severe than that induced by transfer of 5×10^5 BDC cells and, thus, should readily be regulated by 7×10^5 CD4⁺ 24 α β type II NKT cells. The 24 α β type II NKT cells prevented disease induced by 10^4 BDC cells in the presence of control mAb, but blocking PD-L1 abolished 24 α β type II NKT-mediated suppression of disease induced by the low number of BDC cells (Fig. 6D). This suggests that anti-PD-L1 resulted in a block of the regulatory pathway, in addition to a slight increase in the diabetogenicity of the BDC cells. Finally, we investigated whether delayed administration of the blocking anti-PD-L1 Ab could release a diabetogenic potential of infiltrated BDC cells that had been cotransferred with 24 α β type II NKT cells, but disease did not occur up to 60 d after transfer in the mice that received mAb treatment starting day 10 (Fig. 6E). This suggested that the regulatory process mediated by 24 α β type II NKT cells required PD-1/PD-L1 interaction for the regulation of BDC cells early after cell transfer, rather than for regulation of autoaggressive BDC cells within the pancreas.

Discussion

In this study we investigated in detail the suppression of T1D by type II NKT cells in a transfer model, seeking to clarify the cellular requirements and the mechanisms underlying their ability to regulate autoaggressive diabetogenic CD4⁺ T cells. We provide novel and unique information on the characteristics and regulatory capacity of a specific type II NKT cell population with a defined TCR. To our knowledge, our results identify for the first time the PD-1/PD-L1 pathway as an essential component of the mechanism underlying regulation of autoimmunity by CD1d-restricted NKT cells. Furthermore, we also demonstrate a requirement for ICOS for the regulation to occur.

We found that transfer of sorted CD4⁺ 24 α β type II NKT cells was sufficient to prevent T1D induced by BDC cells in recipient mice. Our data further suggested that CD4⁺ type II NKT cells were able to regulate diabetogenic CD4⁺ T cells without the cooperation of other T cells such as Tregs. In contrast, DN 24 α β type II NKT cells, even when transferred at several fold higher

number, were not able to regulate disease. Differences in surface markers and cytokine production between CD4⁺ and DN type I NKT cells in humans and mice have previously been described, suggesting that CD4⁺ and DN NKT cells may have distinct functions in vivo (41–44); however, none of the studies above has identified features that underlie distinct roles of CD4⁺ and DN NKT cells in vivo. Our detailed analysis of CD4⁺ 24 α β NOD type II NKT cells revealed the expression of cytokines and surface molecules that have previously been implied in the regulation of immunity by NKT and other cells. IL-4 and/or IL-10 were shown to mediate regulation of T1D after transfer of TCR α β ⁺ DN thymocytes, a population enriched for NKT cells, to young female NOD mice (14). In a different model, type II NKT cells were found to downregulate tumor immunity through the production of IL-13, which in turn induced the secretion of immunomodulatory TGF- β by GR-1⁺ cells (6). However, administration of blocking Abs to IL-4, IL-10, or both, or to IL-13 or TGF- β could not prevent 24 α β NOD type II NKT cell regulation of BDC T cell-induced diabetes. Additionally, a CD4⁺ β_2 -microglobulin-dependent NOD T cell subset has been suggested to play a role in regulation diabetogenic BDC2.5 NOD CD4⁺ T cells (transferred to NOD.*scid*) via IFN- γ -dependent modulation of host APCs (45). In our model, blocking mAb to IFN- γ completely abolished BDC-induced disease, precluding investigation of the role of IFN- γ in 24 α β type II NKT cell regulation by this approach (data not shown). pDCs have been reported to be necessary for immune regulation by type I NKT cells in a model of virus-induced T1D (33). Comparing DC subsets in pancreatic lymph nodes after transfer of BDC cells alone or together with CD4⁺ 24 α β NOD cells demonstrated a 2-fold increase of pDCs in cotransferred mice but not of other B cell subsets. However, depletion of pDCs in recipient NOD.*scid* mice before transfer of BDC cells did not alter diabetes development or 24 α β type II NKT cell regulation of the disease, demonstrating that pDCs were not required for either process. Furthermore, chemical blocking of IDO, a tryptophan-catabolizing enzyme associated with suppressive ability of pDCs, did not interfere with disease prevention.

Instead, we found that ICOS, highly expressed on CD4⁺ 24 α β type II NKT cells, and PD-1 were required for 24 α β type II NKT cell regulation of T1D induced by diabetogenic CD4⁺ BDC cells. Costimulatory molecules of the CD28 superfamily are central for the proper function of T cells, including regulatory cells. Previous studies demonstrated that ICOS is critical for the control of the nonaggressive pancreas infiltrate that accumulates in BDC2.5 transgenic NOD mice. Ab-mediated ICOS blockade or genetic deletion of ICOS in BDC2.5 NOD mice resulted in precipitation of disease (24, 34), attributed to abrogated regulation by Tregs. Because ICOS was highly expressed on CD4⁺ 24 α β type II NKT cells, we tested whether ICOS was required for the regulation of disease induced by BDC cells in the transfer model. Blockade of ICOS prevented regulation of BDC cells by 24 α β type II NKT cells, and, moreover, ICOS on BDC cells was not necessary for regulation to occur, suggesting that ICOS expression was mandatory on CD4⁺ 24 α β type II NKT cells, although this was not directly tested in this study. Additionally, dispensable ICOS expression on BDC cells showed that ICOS-dependent natural or induced Tregs derived from the BDC2.5 NOD cells (34) did not play a role in this model, in line with the preserved regulation after transfer of CD25-depleted 24 α β type II NKT and BDC cells. The fact that ICOS blockade did not seem to influence 24 α β type II NKT cell homeostasis or activation in cotransferred mice suggests that ICOS may be important specifically to induce or maintain a regulatory function in CD4⁺ 24 α β type II NKT cells, similar to what has been observed for Tregs in the pancre-

atic infiltrate (34). It also remains a possibility that ICOS on CD4⁺ 24 α β type II NKT cells could modulate DCs by binding ICOS-L on these cells, as it was reported that ligation of ICOS-L influenced the function of bone marrow-derived DCs (46).

PD-1 and its ligands PD-L1 and PD-L2 play an important role in the control of T cell activation and peripheral tolerance (47). They are generally found to negatively influence T cell activation, although PD-L1 has also been found to costimulate T cell proliferation and cytokine secretion. In the NOD strain, the PD-1/PD-L1 pathway has been shown to be crucial in the control of T1D, as blocking Ab treatment in nondiabetic female and male NOD mice resulted in rapid precipitation of disease (48). We found that regulation of BDC cells by 24 α β NOD type II NKT cells was abolished when PD-1 or PD-L1 was blocked by mAb. The blocking mAb reversed regulation by 24 α β type II NKT cells even when cotransferred with a low number (10⁴) of BDC cells, a cell number at which the mAb block only marginally augmented the disease development when BDC cells were transferred alone. We therefore conclude that the PD-L1 mAb blocked immunosuppression by 24 α β type II NKT cells, and that the PD-1/PD-L1 pathway is a necessary component of the 24 α β type II NKT cell-mediated regulatory mechanism. The 24 α β type II NKT cells could potentially mediate PD-1/PD-L1-dependent regulation of BDC cells in different ways. Studies of BDC cells in NOD mice have shown that PD-L1 ligation of PD-1 on BDC cells interferes with TCR signaling, leading to interrupted T cell/DC interaction and aborted T cell activation in the lymph node (49). Thus, PD-L1 expressed on 24 α β type II NKT cells might prevent BDC cell activation by directly interacting with PD-1 on these cells. Furthermore, it was recently found that PD-1 can be expressed on APCs, and engagement of PD-1 on these cells reduced their ability to stimulate T cells through regulation of IL-12 production (50). A second option is therefore that PD-L1 on 24 α β type II NKT cells negatively regulates DCs through interaction with PD-1 on the DCs, leading to decreased activation of BDC cells. Alternatively, PD-1 on 24 α β type II NKT cells may render DCs tolerogenic through reverse signaling through PD-1 ligands on DCs (51). The role of PD-1/PD-L1 in T1D regulation could also be downstream of type II NKT cells. Interaction between 24 α β type II NKT cells and DCs may turn the DCs tolerogenic by increasing the levels of PD-L1 on the DCs, resulting in augmented ligation of PD-1 on BDC cells. Activated DCs upregulate PD-L1 levels, which are further increased upon exposure to IFN- γ (27), a factor abundantly produced by 24 α β type II NKT cells. Additionally, PD-L1 was found to play a role in the peripheral induction of Tregs by CD8⁺ DCs (40, 52), known to express high levels of CD1d. Therefore, 24 α β type II NKT cells might act through CD8⁺ DCs and regulate BDC cells by promoting their conversion to induced Tregs in a PD-L1-dependent manner. However, conversion to Tregs was shown to be dependent on TGF- β , and this factor was dispensable for 24 α β type II NKT cell regulation of BDC cells, making this scenario appear unlikely. Interestingly, the PD-1/PD-L1 pathway has also been implied in the suppressive function of Tregs (38–40), suggesting that Tregs and type II NKT cells may share the ability to suppress through this pathway.

In apparent contrast to our findings, PD-L1 was found to restrain activation of type II NKT cells by tolerogenic DCs applied in the murine model for multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (53). Even if the net outcome of PD-1/PD-L1 block is complete reversal of regulation in the T1D model presented in this study, it is possible that blocking PD-1 selectively on 24 α β type II NKT cells would enhance the regulatory potential of these cells, as they do express PD-1 at intermediate to high levels. If so, this would not be incompatible with our results suggesting

an absolute requirement for PD-1/PD-L1 downstream of 24 α β type II NKT cells in the regulation of T1D.

Activated 24 α β type II NKT cells were preferentially localized in PLNs after cotransfer with BDC cells, which showed decreased activation and cell division at this site, and a reduced ability to produce inflammatory cytokines compared with when transferred alone. This suggests that regulation of BDC cells by 24 α β type II NKT cells primarily takes place in the pancreas draining lymph nodes. Late administration of the blocking PD-L1 mAb did not result in T1D in the mice that had received BDC cells together with 24 α β type II NKT cells, further supporting that PD-L1 was important to control BDC cell activation at an early time in the draining lymph nodes, but was not required to maintain a tolerant state in the pancreas infiltrated by both cell types. We did also see, however, that 24 α β type II NKT cells homed to the pancreas when cotransferred and were present in limited infiltrates together with similar numbers of BDC cells. This could reflect an additional, PD-1-independent, level of regulation by type II NKT cells within the site of infiltration.

In conclusion, our results support a model in which CD4⁺ type II NKT cells provide long-term protection against T1D by regulating diabetogenic CD4⁺ T cells during activation in the PLNs, through a regulatory mechanism that requires signaling through the PD-1/PD-L1 and ICOS/ICOS-L pathways. Taken together with other reports of the beneficial effects of type II NKT cells in other autoimmune disease models, our findings encourage further exploration of the immunoregulatory potential of these cells in the development of tolerization strategies to prevent or reduce autoimmunity.

Acknowledgments

We are grateful to Marco Colonna and Susan Gilfillan (Washington University School of Medicine), Anne Cooke (University of Cambridge), and Kate Tomlinson (UCB Celltech) for providing Ab reagents, Lucie Beaudoin (Hôpital Cochin/St. Vincent de Paul) for assistance with C α ^{-/-} BDC NOD mice, and the staff of the animal facility at Gothenburg University for professional assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Anderson, M. S., and J. A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 447–485.
- Lehuen, A., J. Diana, P. Zacccone, and A. Cooke. 2010. Immune cell crosstalk in type I diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 501–513.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4: 231–237.
- Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 297–336.
- Kadri, N., M. Blomqvist, and S. L. Cardell. 2008. Type II natural killer T cells: a new target for immunomodulation? *Expert Rev. Clin. Immunol.* 4: 615–627.
- Terabe, M., J. Swann, E. Ambrosino, P. Sinha, S. Takaku, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, S. Ostrand-Rosenberg, M. J. Smyth, and J. A. Berzofsky. 2005. A nonclassical non- α 14 β 18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J. Exp. Med.* 202: 1627–1633.
- Renukaradhya, G. J., M. A. Khan, M. Vieira, W. Du, J. Gervay-Hague, and R. R. Brutkiewicz. 2008. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* 111: 5637–5645.
- Duarte, N., M. Stenstrom, S. Campino, M.-L. Bergman, M. Lundholm, D. Holmberg, and S. Cardell. 2004. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. *J. Immunol.* 173: 3112–3118.
- Jahng, A., I. Maricic, C. Aguilera, S. Cardell, R. C. Halder, and V. Kumar. 2004. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J. Exp. Med.* 199: 947–957.
- Blomqvist, M., S. Rhost, S. Teneberg, L. Löfbom, T. Osterby, M. Brigl, J. E. Månsson, and S. L. Cardell. 2009. Multiple tissue-specific isoforms of sulfatide activate CD1d-restricted type II NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 39: 1726–1735.
- Ambrosino, E., M. Terabe, R. C. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, V. Kumar, and J. A. Berzofsky. 2007. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J. Immunol.* 179: 5126–5136.
- Halder, R. C., C. Aguilera, I. Maricic, and V. Kumar. 2007. Type II NKT cell-mediated energy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J. Clin. Invest.* 117: 2302–2312.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud, and J. F. Bach. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1⁺-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 26: 2989–2998.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, L. J. Palmisano, P. A. Silveira, D. I. Godfrey, and A. G. Baxter. 1998. α / β -T cell receptor (TCR)⁺CD4⁺CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 187: 1047–1056.
- Fletcher, M. T., and A. G. Baxter. 2009. Clinical application of NKT cell biology in type I (autoimmune) diabetes mellitus. *Immunol. Cell Biol.* 87: 315–323.
- Novak, J., T. Griseri, L. Beaudoin, and A. Lehuen. 2007. Regulation of type I diabetes by NKT cells. *Int. Rev. Immunol.* 26: 49–72.
- Sköld, M., N. N. Faizunnessa, C. R. Wang, and S. Cardell. 2000. CD1d-specific NK1.1⁺ T cells with a transgenic variant TCR. *J. Immunol.* 165: 168–174.
- Katz, J. D., B. Wang, K. Haskins, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 74: 1089–1100.
- Stratmann, T., N. Martin-Orozco, V. Mallet-Designe, L. Poirot, D. McGavern, G. Losyev, C. M. Dobbs, M. B. Oldstone, K. Yoshida, H. Kikutani, et al. 2003. Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. *J. Clin. Invest.* 112: 902–914.
- Gonzalez, A., I. Andre-Schmutz, C. Carnaud, D. Mathis, and C. Benoist. 2001. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5⁺ T cells in autoimmune diabetes. *Nat. Immunol.* 2: 1117–1125.
- Shi, F. D., M. Flodstrom, B. Balasa, S. H. Kim, K. Van Gunst, J. L. Strominger, S. B. Wilson, and N. Sarvetnick. 2001. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6777–6782.
- Kanagawa, O., A. Militech, and B. A. Vaupel. 2002. Regulation of diabetes development by regulatory T cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 168: 6159–6164.
- Feuerer, M., Y. Shen, D. R. Littman, C. Benoist, and D. Mathis. 2009. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 31: 654–664.
- Prevot, N., C. Briet, H. Lassmann, I. Tardivel, E. Roy, J. Morin, T. W. Mak, A. Tafuri, and C. Boitard. 2010. Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur. J. Immunol.* 40: 2267–2276.
- Beaudoin, L., V. Laloux, J. Novak, B. Lucas, and A. Lehuen. 2002. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic β cells. *Immunity* 17: 725–736.
- Yamazaki, T., H. Akiba, A. Koyanagi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 2005. Blockade of B7-1 on macrophages suppresses CD4⁺ T cell proliferation by augmenting IFN- γ -induced nitric oxide production. *J. Immunol.* 175: 1586–1592.
- Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, et al. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* 169: 5538–5545.
- Sorokin, L. M., F. Pausch, M. Frieser, S. Kröger, E. Ohage, and R. Deutzmann. 1997. Developmental regulation of the laminin α 5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev. Biol.* 189: 285–300.
- Alanentalo, T., A. Asayesh, H. Morrison, C. E. Lorén, D. Holmberg, J. Sharpe, and U. Ahlgren. 2007. Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. *Nat. Methods* 4: 31–33.
- Alanentalo, T., A. Hörnblad, S. Mayans, A. Karin Nilsson, J. Sharpe, A. Larefalk, U. Ahlgren, and D. Holmberg. 2010. Quantification and three-dimensional imaging of the insulinitis-induced destruction of β -cells in murine type I diabetes. *Diabetes* 59: 1756–1764.
- Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis. 1995. CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J. Exp. Med.* 182: 993–1004.
- Stenström, M., M. Sköld, A. Ericsson, L. Beaudoin, S. Sidobre, M. Kronenberg, A. Lehuen, and S. Cardell. 2004. Surface receptors identify mouse NK1.1⁺ T cell subsets distinguished by function and T cell receptor type. *Eur. J. Immunol.* 34: 56–65.
- Diana, J., T. Griseri, S. Lagaye, L. Beaudoin, E. Atrusseau, A. S. Gautron, C. Tomkiewicz, A. Herbelin, R. Barouki, M. von Herrath, et al. 2009. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 30: 289–299.
- Herman, A. E., G. J. Freeman, D. Mathis, and C. Benoist. 2004. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the pre-diabetic lesion. *J. Exp. Med.* 199: 1479–1489.
- Miyamoto, K., C. I. Kingsley, X. Zhang, C. Jabs, L. Izikson, R. A. Sobel, H. L. Weiner, V. K. Kuchroo, and A. H. Sharpe. 2005. The ICOS molecule plays a crucial role in the development of mucosal tolerance. *J. Immunol.* 175: 7341–7347.
- Kaneda, H., K. Takeda, T. Ota, Y. Kaduka, H. Akiba, Y. Ikarashi, H. Wakasugi, M. Kronenberg, K. Kinoshita, H. Yagita, and K. Okumura. 2005. ICOS costimulates invariant NKT cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 201–207.
- Arkari, O., P. Stock, E. H. Meyer, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2008. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4⁺ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J. Immunol.* 180: 5448–5456.

38. Polanczyk, M. J., C. Hopke, A. A. Vandenbark, and H. Offner. 2007. Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). *Int. Immunol.* 19: 337–343.
39. Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 2570–2582.
40. Francisco, L. M., V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo, and A. H. Sharpe. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206: 3015–3029.
41. Gumperz, J. E., S. Miyake, T. Yamamura, and M. B. Brenner. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195: 625–636.
42. Lee, P. T., K. Benlagha, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. Distinct functional lineages of human V α 24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 195: 637–641.
43. Coquet, J. M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F. W. McNab, L. A. Pitt, B. S. McKenzie, S. P. Berzins, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4⁺NK1.1[−] NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 11287–11292.
44. Crowe, N. Y., J. M. Coquet, S. P. Berzins, K. Kyparissoudis, R. Keating, D. G. Pellicci, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 202: 1279–1288.
45. Cain, J. A., J. A. Smith, J. K. Ondr, B. Wang, and J. D. Katz. 2006. NKT cells and IFN- γ establish the regulatory environment for the control of diabetogenic T cells in the nonobese diabetic mouse. *J. Immunol.* 176: 1645–1654.
46. Tang, G., Q. Qin, P. Zhang, G. Wang, M. Liu, Q. Ding, Y. Qin, and Q. Shen. 2009. Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 3067–3080.
47. Francisco, L. M., P. T. Sage, and A. H. Sharpe. 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 236: 219–242.
48. Ansari, M. J., A. D. Salama, T. Chitnis, R. N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S. J. Khoury, et al. 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 198: 63–69.
49. Fife, B. T., K. E. Pauken, T. N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* 10: 1185–1192.
50. Yao, S., S. Wang, Y. Zhu, L. Luo, G. Zhu, S. Flies, H. Xu, W. Ruff, M. Broadwater, I. H. Choi, et al. 2009. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* 113: 5811–5818.
51. Kuipers, H., F. Muskens, M. Willart, D. Hijdra, F. B. van Assema, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 36: 2472–2482.
52. Wang, L., K. Pino-Lagos, V. C. de Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9331–9336.
53. Brandl, C., S. Ortler, T. Herrmann, S. Cardell, M. B. Lutz, and H. Wiendl. 2010. B7-H1-deficiency enhances the potential of tolerogenic dendritic cells by activating CD1d-restricted type II NKT cells. *PLoS ONE* 5: e10800.

Changes in MicroRNA Expression Contribute to Pancreatic β -Cell Dysfunction in Prediabetic NOD Mice

Elodie Roggli,¹ Sonia Gattesco,¹ Dorothée Caille,² Claire Briet,^{3,4} Christian Boitard,^{3,4} Paolo Meda,² and Romano Regazzi¹

During the initial phases of type 1 diabetes, pancreatic islets are invaded by immune cells, exposing β -cells to proinflammatory cytokines. This unfavorable environment results in gene expression modifications leading to loss of β -cell functions. To study the contribution of microRNAs (miRNAs) in this process, we used microarray analysis to search for changes in miRNA expression in prediabetic NOD mice islets. We found that the levels of miR-29a/b/c increased in islets of NOD mice during the phases preceding diabetes manifestation and in isolated mouse and human islets exposed to proinflammatory cytokines. Overexpression of miR-29a/b/c in MIN6 and dissociated islet cells led to impairment in glucose-induced insulin secretion. Defective insulin release was associated with diminished expression of the transcription factor Onecut2, and a consequent rise of granuphilin, an inhibitor of β -cell exocytosis. Overexpression of miR-29a/b/c also promoted apoptosis by decreasing the level of the antiapoptotic protein Mcl1. Indeed, a decoy molecule selectively masking the miR-29 binding site on Mcl1 mRNA protected insulin-secreting cells from apoptosis triggered by miR-29 or cytokines. Taken together, our findings suggest that changes in the level of miR-29 family members contribute to cytokine-mediated β -cell dysfunction occurring during the initial phases of type 1 diabetes. *Diabetes* 61:1742–1751, 2012

A fine control of the amount of insulin released by pancreatic β -cells is essential to maintain appropriate blood glucose levels. Type 1 diabetes is an autoimmune disease characterized by progressive destruction of pancreatic β -cells that, if untreated, leads to life-threatening alterations of blood glucose homeostasis and body metabolism. During the initial phases of the disease, β -cells are chronically exposed to elevated concentrations of cytokines released by the immune cells that infiltrate the islets of Langerhans and by endocrine cells themselves (1). This inflammatory environment has a deleterious impact on specialized β -cell functions, resulting in impaired insulin biosynthesis and secretion and in β -cell loss by apoptosis in the long term. A detailed understanding of the molecular events elicited by proinflammatory cytokines, and responsible for β -cell

dysfunction, is essential to pave the way to the development of new approaches for preventing and treating type 1 diabetes.

Global microarray profiling of β -cells chronically exposed to cytokines revealed that these inflammatory mediators induce major changes in gene expression, causing severe impairment in key signaling pathways (1,2). So far, most of the studies investigating the mechanisms underlying the changes in gene expression that occur in the presence of cytokines focused on transcription factors such as nuclear factor κ B (NF κ B) (3). However, there is growing evidence that another class of gene regulators, called microRNAs (miRNAs) play an important role in the control of β -cell functions, under both control and physiopathologic conditions (4–14). These short, noncoding RNA molecules bind to specific sequences of the 3'-untranslated region (3'UTR) of target mRNAs, causing message destabilization and/or translational inhibition (15,16). We recently reported that prolonged exposure of β -cells to proinflammatory cytokines leads to the induction of three miRNAs—miR-21, miR-34a, and miR-146—resulting in defective insulin secretion and apoptosis (11). We found that the level of these miRNAs is increased in the islets of NOD mice, a well characterized type 1 diabetes model (11), suggesting a potential contribution of these small RNA molecules to β -cell failure during the instauration of the disease.

In this study, we used microarray profiling to search for global changes in miRNA expression in pancreatic islets of prediabetic NOD mice. We found that, in addition to the three miRNAs mentioned above, the development of type 1 diabetes in NOD mice is associated with a strong induction in islet cells of the members of the miR-29 family. Studies performed in β -cell lines and dissociated islet cells revealed that overexpression of miR-29 to levels comparable to those observed in NOD mice leads to defective glucose-induced insulin secretion and promotes apoptosis, suggesting a contribution of this family of miRNAs to the initial phases of type 1 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Chemicals. Interleukin-1 β (IL-1 β) was purchased from Sigma (Buchs, Switzerland), recombinant mouse interferon- γ (IFN- γ) from R&D Systems (Minneapolis, MN), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from Alexis Corporation (Lausen, Switzerland). Hoechst dye 33342 was obtained from Invitrogen (Basel, Switzerland).

Isolation and culture of pancreatic islets and MIN6 cells. The insulin-secreting cell line MIN6 clone B1 (17) was cultured at a density of 1.5×10^5 cells/cm² in DMEM-Glutamax medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% FCS, 50 IU/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 70 μ mol/L β -mercaptoethanol.

Mouse pancreatic islets were isolated by collagenase digestion (18) from female NOD or C57BL/6 mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). After isolation, NOD mice islets were immediately processed for RNA purification. C57BL/6 mouse islet cells were dissociated by exposing the islets for 6 min to a Ca²⁺-free buffer containing 116 mmol/L NaCl, 24 mmol/L

From the ¹Department of Cell Biology and Morphology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; the ²Department of Cell Physiology and Metabolism, School of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland; the ³Institut National de Santé et de Recherche Médicale U986, Paris, France; and the ⁴Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
Corresponding author: Romano Regazzi, romano.regazzi@unil.ch.
Received 4 August 2011 and accepted 5 March 2012.
DOI: 10.2337/db11-1086

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db11-1086/-DC1>.

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

See accompanying commentary, p. 1661.

NaHCO₃, 5 mmol/L KCL, 1 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L HEPES, and 0.1% trypsin at 37°C (18). The dispersed cells were then seeded at a density of 5.5×10^4 cells/cm².

Human pancreatic islets were provided by the Cell Isolation and Transplantation Center at the University of Geneva, School of Medicine, thanks to the European Consortium for Islet Transplantation "islets for research" distribution program sponsored by the Juvenile Diabetes Research Foundation. In the current study, we used islet preparations from six donors (five women and one man) who were 56 ± 6 years old and had a BMI of 22 ± 4 kg/m². The purity of the islet preparations was $79 \pm 10\%$ and contained $51 \pm 7\%$ insulin-positive cells.

After isolation, the islets were cultured in CMRL medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mmol/L L-glutamine, and 250 µmol/L HEPES. Islet cell monolayers were prepared by treating the islets for 7 to 9 min with trypsin (5 mg/mL) at 37°C. Trypsinization was terminated by adding serum-containing culture medium. The cells were seeded at a density of 5.5×10^4 cells/cm².

Measurement of miRNA expression. For microarray analysis, total RNA of islets from 4- and 8-week-old NOD mice was extracted using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Global miRNA profiling was performed by the DNA Array Facility of our institution using Agilent Technologies miRNA Gene Microarrays. The analysis permitted to determine the level of all mouse miRNAs available on the Sanger miRBase version 9.1. Quantitative assessment of the level of individual miRNAs was carried out by performing a Universal RT reaction with locked nucleic acid (LNA)-enhanced PCR primers, followed by real-time PCR (Exiqon, Vedbaek, Denmark). The results were normalized using cDNAs amplified with U6 primers in the same samples. This small nuclear RNA is not affected by cytokine treatment. Similar results were obtained when the data were normalized to miR-7.

Localization of miRNAs. To assess whether miRNAs are expressed by islet cells and/or by the intraislet immune cells, islets of 13-week-old female NOD mice were isolated by collagenase digestion and incubated for 24 h to allow spontaneous extrusion of the lymphocytes (19,20). Moreover, cryosections of pancreas of 4-, 8-, and 13-week-old NOD male mice were fixed in 4%

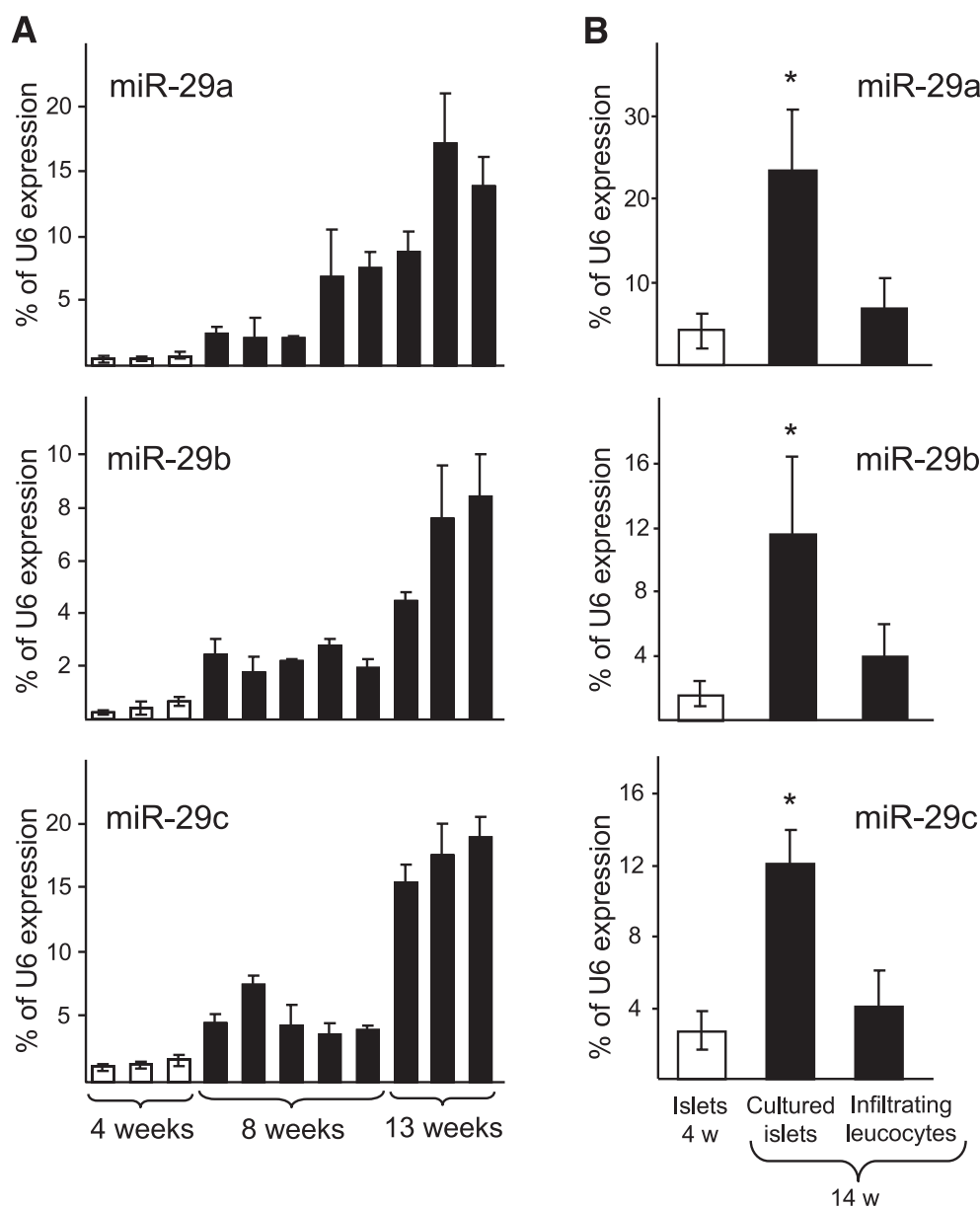


FIG. 1. The expression of the members of the miR-29 family increases with age in the pancreatic islets of NOD mice. **A:** Pancreatic islets were isolated from female NOD mice of different ages. Only animals displaying blood glucose levels within the normal range were included in the study. The levels of miR-29a/b/c were measured by qRT-PCR, expressed as percentage of U6 expression and are shown as mean \pm SEM of three to six independent experiments. **B:** Pancreatic islets were isolated from 4- and 14-week-old NOD mice. Islets of 14-week-old animals were cultured for 16 h to permit the escape of infiltrating lymphocytes. RNA was then separately extracted from the islets and the lymphocytes. The levels of miR-29a/b/c were measured by qRT-PCR, expressed as the percentage of U6 expression and are shown as mean \pm SEM of four independent experiments. * $P < 0.05$ vs. controls.

paraformaldehyde, acetylated, and processed for in situ hybridization (21) of miR-29s and miR-142-3p, using 10 nmol/L 3'-digoxigenin-labeled LNA-oligo probes (Exiqon; mmu-miR29a, MIMAT 0000535; mmu-miR29b, MIMAT 0000127; mmu-miR29c, MIMAT 0000577; mmu-miR-142-3p, MIMAT 0000155). Sections from three mice of each age were analyzed.

Adjacent sections were processed for indirect immunofluorescence staining (22) of insulin, using sheep polyclonal antibodies (Ventrex, 675), diluted 1:700; CD8a, using rat monoclonal antibodies (BD Pharmingen, 553028), diluted 1:200; granuphilin, using a rabbit polyclonal, diluted 1:250 (23); and Mc11, using a rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluted 1:250. Incubations were performed for 2 h at room temperature (insulin, Granuphilin, Mc11) or for 18 h at 4°C (CD8a). The sections were washed, exposed for 1 h to fluoresceinated antibodies against sheep, rat, or rabbit IgGs, counterstained with 0.03% Evans' blue, and photographed with an Axiophot fluorescence microscope (22).

Analysis of the expression of protein-coding genes. Total RNA extraction was performed with the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Conventional quantitative (q)RT-PCR was done as described (24). Real-time PCR reactions were performed on a Bio-Rad MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the following primers: Proinsulin, sense 5'-TGG CTT CTT CTA CAC ACC CA-3' and antisense 5'-TCT AGT TGC AGT TCT CCA-3'; 18S sense 5'-TTT CGC TCT GGT CCG TCT TG-3' and antisense 5'-TTC GGA ACT GAG GCC ATG AT-3'; and Mc11 5'-AGA AAT GTG CTG GCT TT-3'. Samples were tested in triplicates and the results normalized using cDNA amplified with 18S primers in the same samples.

Modulation of miR-29 level and activity. To increase miRNA levels, MIN6 and primary islet cells were transiently transfected with RNA duplexes (Eurogentec, Seraing, BE) corresponding to the mature sequence of the noncoding RNA. Transient transfections of MIN6 cells and islet cells were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. For a 24-well plate, 60 pmol/well oligonucleotide duplexes were used. The transfection efficiency in MIN6 cells and dissociated islet cells evaluated with different anti-miRs and small interfering RNAs ranged between 70 and 80%. An oligonucleotide duplex corresponding to the

green fluorescent protein (GFP) sequence (5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3') was used as control. Transfection of this oligonucleotide does not affect insulin content and insulin release (Supplementary Fig. 1). Transfection of the cells with small interfering GFP (or with any other control oligonucleotide duplex) increased by about 1% the fraction of cells undergoing apoptosis compared with untreated cells.

To reduce the level of miR-29, the cells were transiently transfected with an LNA miRNA inhibitor, whose sequence is 5'-CCG ATT TCA AAT GGT GCT-3' (Exiqon, Vedbaek, Denmark). To selectively prevent the binding of miR-29 to Mc11 mRNA, without interfering with the action of the miRNA on other targets, we used a miScript Target Protector specifically designed for this purpose (Qiagen, Hilden, Germany) (25). The miScript Target Protector was transiently transfected in MIN6 cells with Lipofectamine 2000. The results were compared with those obtained with the Negative Control miScript Target Protector (Qiagen, Hilden, Germany).

Secretion assay. For the assessment of the secretory capacity, MIN6 cells (2×10^5) and dissociated mouse and human islet cells (4×10^4) plated in 24- and 96-well dishes, respectively, were transiently cotransfected with oligonucleotides corresponding to the mature miRNA sequences. After 48 h, the cells were washed and preincubated for 30 min in Krebs buffer (127 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.2 mmol/L MgSO₄, 5 mmol/L NaHCO₃, 0.1% BSA, and 25 mmol/L HEPES, pH 7.4) containing 2 mmol/L glucose. The medium was discarded, and the cells were incubated 45 min in the same buffer (basal condition) or in a Krebs buffer containing 20 mmol/L glucose (stimulatory condition). After supernatants were collected, the cells were lysed in 75% ethanol and 0.55% HCl to evaluate total insulin content. The amount of insulin in the samples was assessed by ELISA (SPI-bio, Montigny-le-Bretonneux, France).

Luciferase assay. The Mc11 3'UTR construct was generated by inserting 29 nucleotides of the 3'UTR of human Mc11 (CAGGCTAGTCTAACC**ATGGTGC TATTATA**) corresponding to the binding sites of miR-29/a/b/c (in bold) between the *Sac*I and *Mlu*I sites of pMir-Report (Ambion) (26). The mutant construct contained the same sequence except for a G-to-C replacement at position 21. Luciferase activities were measured with the dual-luciferase

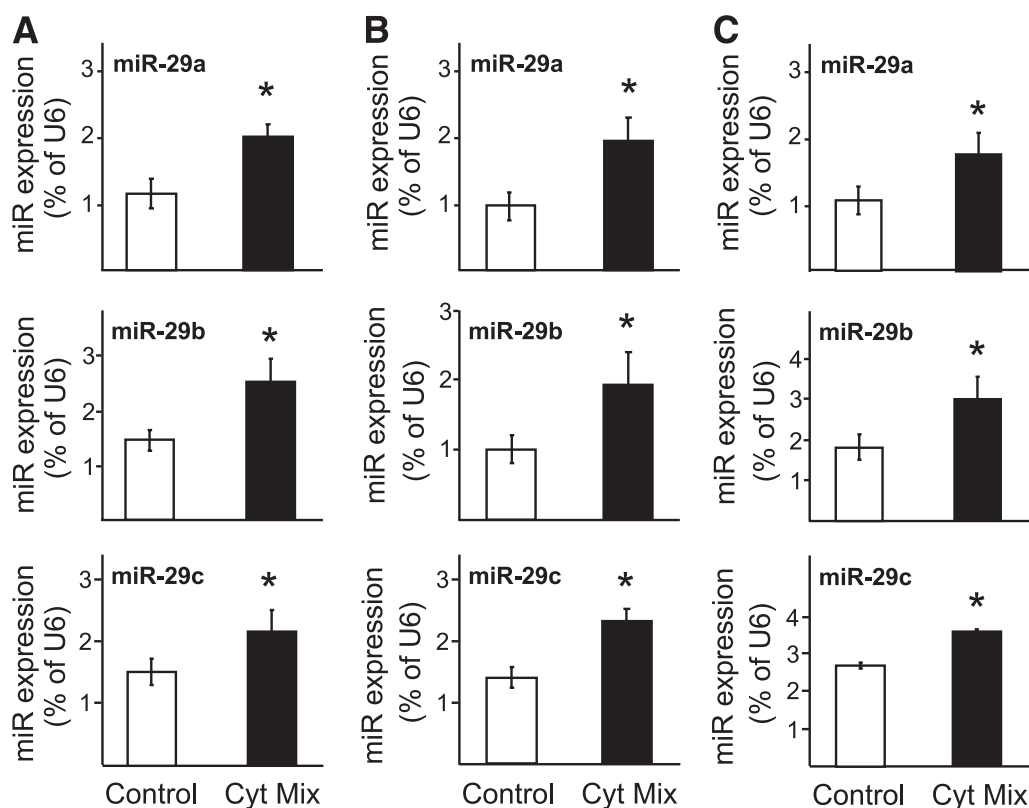


FIG. 2. Proinflammatory cytokines increase miR-29 expression. **A:** MIN6 cells were incubated for 30 h in the presence or absence of a cytokine mixture (Cyt Mix) of IL-1 β (0.1 ng/mL; 50 units/mL), plus TNF- α (10 ng/mL; 500 units/mL) and IFN- γ (30 ng/mL; 50 units/mL). miR-29a/b/c were measured by qRT-PCR and normalized to the level of U6. The results are mean \pm SD of four independent experiments. Mouse (**B**) and human (**C**) islets were incubated for 24 h in the presence or absence of the cytokines mixture indicated above. The levels of miR-29a/b/c were measured by qRT-PCR and normalized to the expression U6. The results are mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. controls.

reporter assay system (Promega, Madison, WI). The *Firefly* luciferase activity was normalized for transfection efficiency with the SV40-driven *Renilla* activity generated by the psiCHECK-1 vector (Promega).

Protein extraction and Western blotting. MIN6 cells or dissociated mouse islet cells were incubated for 15 min on ice in lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 0.5% Triton X-100, 137.5 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1 mmol/L sodium vanadate, 50 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 5 mmol/L EDTA) and Protease Inhibitors Cocktail (Sigma, St. Louis, MO) and then sonicated. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 1 min and the supernatant collected for further analysis. Fifty micrograms of the protein extracts were separated on acrylamide gels and transferred on polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (Amersham Biosciences) after incubation with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies for 1 h at room temperature. The antibodies against Onecut2 (amino acid 36-311) and granuphilin have been previously described (23,27). The antibody directed against Syntaxin 1a (S0664) was purchased from Sigma (Buchs, Switzerland), and that against Mcl-1 (sc-819) was from Santa Cruz Biotechnology. The antibody against actin was from Chemicon International (Temecula, CA).

Evaluation of the fraction of cells undergoing apoptosis. For the assessment of apoptosis, MIN6 cells (1×10^5) or dissociated islet cells (8×10^4) were plated in 24-well dishes and transiently transfected with oligonucleotides leading to miRNA overexpression. Apoptosis was assessed 2 days later by scoring the cells displaying pyknotic nuclei upon Hoechst dye 33342 staining. The experiments were carried out blindly, and at least 800 cells per condition were analyzed. To distinguish between apoptosis and necrosis, the cells were seeded on glass coverslips coated with 2 mg/mL poly-L-lysine (Sigma, Buchs, Switzerland) and 33.2 μ g/mL laminin (Invitrogen, Basel, Switzerland). Cells undergoing apoptosis or necrosis were identified using the Annexin V-EGFP Apoptosis Kit (Biovision, Mountain View, CA) 72 h after the transfection.

Statistical analysis. Statistical differences were tested by ANOVA. The experiments including more than two groups were first analyzed by ANOVA, and multiple comparisons of the means were then carried out using the post hoc Dunnett test, with a discriminating *P* value of 0.05.

RESULTS

We compared the global miRNA expression profile of pancreatic islets of 4- and 8-week-old NOD mice. In agreement with our previous findings (11), the islets of 8-week-old mice displayed an increase in the expression of miR-21, miR-34a, and miR-146a/b (Supplementary Table 1). In addition, we detected significant alterations in the level of several other miRNAs, including miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-155, and miR-216a, which are almost undetectable in the islets of 4-week-old NOD mice (Supplementary Fig. 2 and 3). Because these miRNAs are expected to be particularly abundant in immune cells (28), their expression was evaluated in islets of 14-week-old, pre-diabetic NOD mice, which were cultured to allow for the escaping of the infiltrated lymphocytes (29). These miRNAs were 100- to 1,000-fold more abundant in the immune cells that had escaped the islets than in islet cells (Supplementary Fig. 3). In situ hybridization combined with immunofluorescence staining for insulin and CD8a (the hybridization and the immunostaining were performed on sequential sections of the very same pancreases), confirmed that most of the miR-142-3p is expressed in immune cells and not in insulin-producing cells (Supplementary Fig. 4, *top panels*). We concluded that the increase in the latter miRNA in the islet preparations of aging NOD animals likely reflected mainly the presence of immune cells; for this reason, this group of miRNAs was not investigated any further in this study.

Among the several other miRNAs that were differentially expressed between 4- and 8-week-old animals, we noticed the members of the miR-29 family (miR-29a/b/c) that are among the most abundant miRNAs present in normal β -cells (30) (Supplementary Table 1). These

miRNAs have been shown to downregulate the expression of the β -cell disallowed gene, monocarboxylase transporter 1 (31,32) and to contribute to insulin resistance in insulin target tissues in GK rats (33). Analysis by qPCR confirmed upregulation of miR-29a/b/c in the islets of 8-week-old mice and revealed a further increase in islet preparations of normoglycemic 13- to 14-week-old mice (Fig. 1A). The level of expression of miR-29a/b/c in lymphocytes escaping the islets of NOD mice was comparable to the level detected in the islets of 4-week-old mice (Fig. 1B). Moreover, islets of 14-week-old mice incubated for 24 h to permit the escape of infiltrating lymphocytes retained strongly elevated levels of miR-29a/b/c (Fig. 1B). In agreement with these observations, in situ hybridization of NOD pancreas at different ages, combined with an immunofluorescence staining for insulin on close by sections, confirmed that the bulk of miR-29a (Supplementary Fig. 4, *lower panels*, and Supplementary Fig. 5) and miR-29b (not shown) is concentrated in insulin-producing cells and not in infiltrating immune cells.

Taken together, these findings indicate that the rise of miR-29a/b/c reflects changes occurring in β -cells and is not merely the result of the presence of immune cells in the islets. The observed increase in miR-29 expression is also not the result of mice aging. Indeed, miR-29a/b/c levels

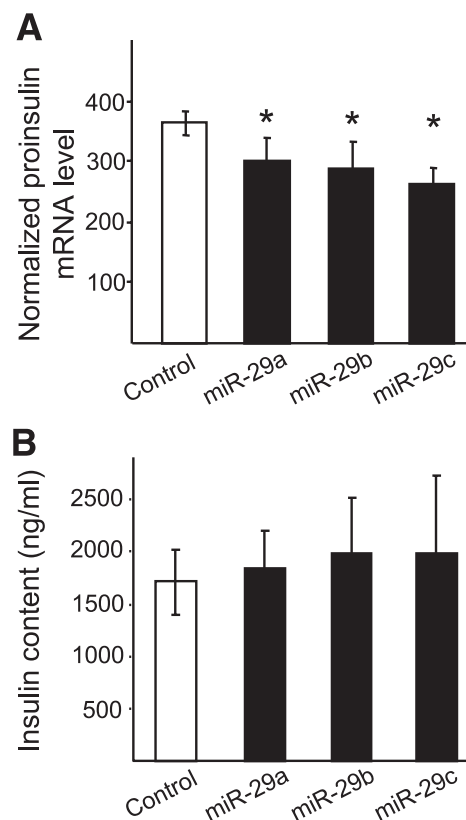


FIG. 3. miR-29 overexpression does not change insulin content. **A:** MIN6 were transfected with a control RNA duplex or with duplexes corresponding to the mature forms of miR-29a, miR-29b, and miR-29c. Proinsulin mRNA levels were measured 2 days later by qPCR. Results are expressed as the ratios between proinsulin and 18S mRNA and shown as mean \pm SD of four independent experiments. **P* < 0.05 vs. controls. **B:** Under these conditions, the insulin content of MIN6 cells, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay, was not significantly altered. The data shown represent the mean \pm SD of seven independent experiments.

were not significantly different between the islets of 6- and 12-week-old C57BL/6 mice (data not shown), and no significant changes were observed in the islets of 13-week-old NOD-SCID mice that do not develop type 1 diabetes. In contrast, proinsulin 2-deficient mice, which display accelerated insulinitis and diabetes (34), showed a dramatic rise in miR-29a/b/c expression already at age 8 weeks (Supplementary Fig. 6).

Incubation of MIN6 cells (Fig. 2A), mouse islets (Fig. 2B), or dissociated human islet cells (Fig. 2C) in the presence of $\text{II-1}\beta$ (0.1 ng/mL; 50 units/mL), $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/mL; 500 unit/mL), and $\text{IFN-}\gamma$ (30 ng/mL; 50 units/mL) led to a two-fold increase in the expression of the three miR-29 family members, suggesting that at least part of the observed induction occurring during early stages of diabetes development in NOD mice was linked to the chronic exposure of β -cells to these proinflammatory cytokines.

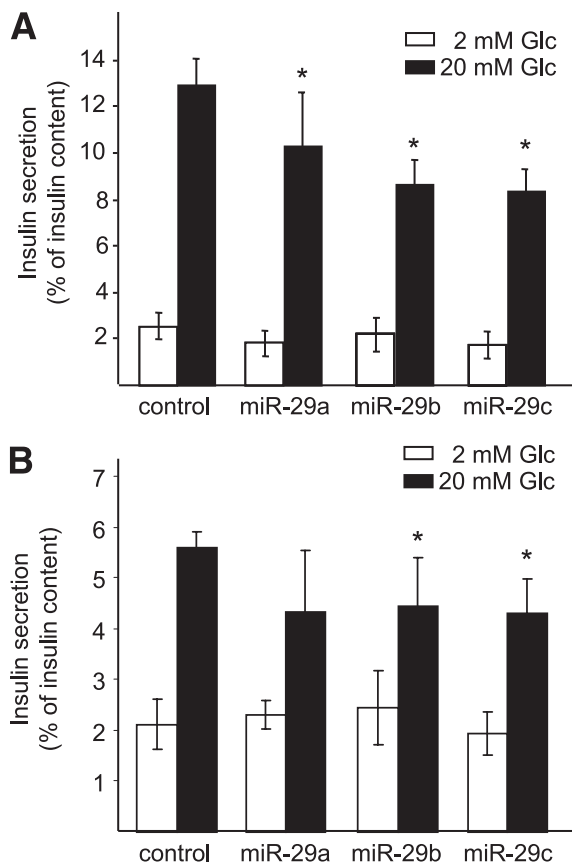


FIG. 4. miR-29 overexpression alters glucose-induced insulin secretion. **A:** MIN6 cells were transiently transfected with a control RNA duplex or with duplexes corresponding to the mature forms of miR-29a, miR-29b, and miR-29c. Two days later, the cells were incubated in the presence of 2 or 20 mmol/L glucose (Glc) for 45 min. The amount of insulin secreted during the incubation period was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values were expressed as percentage of insulin content and are shown as mean \pm SD of five independent experiments. **B:** Cells dispersed from mouse pancreatic islets were plated and transfected with a control small interfering RNA or with the indicated oligonucleotide duplexes. Three days later, the cells were incubated in the presence of 2 or 20 mmol/L glucose for 45 min. The amount of insulin secreted during the incubation period was assessed by ELISA. Values were expressed as the percentage of insulin content and are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. Total insulin content was 16 ± 4 , 18 ± 5 , 16 ± 4 , and 16 ± 5 for control, miR-29a, b, and c, respectively. * $P < 0.05$ vs. control cells stimulated with 20 mmol/L glucose.

To test the effect of miR-29a/b/c overexpression on pancreatic β -cell functions, oligonucleotides mimicking the mature sequence of each of the miR-29 family members were transiently transfected into MIN6 cells. This transfection resulted in a cellular content of the respective miRNA, which was comparable to that observed in the islets of 8-week-old NOD mice (Supplementary Fig. 7). We first assessed the effect of alterations in the level of the three miRNAs on insulin biosynthesis. Overexpression of miR-29 family members led to a small decrease in proinsulin mRNA levels but did not significantly modify total insulin content (Fig. 3). We then investigated the effects on insulin release. The rise of miR-29a/b/c in MIN6 cells did not affect basal insulin secretion (Fig. 4A). In contrast, glucose-induced insulin release was decreased by 20–40%. A similar reduction in insulin secretion elicited in the presence of glucose was detected upon overexpression of miR-29 family members in primary mouse islet cells (Fig. 4B) and in primary human islet cells (Supplementary Fig. 8).

The transcription factor *Onecut2* is a predicted target of miR-29a/b/c (<http://www.targetscan.org>) (35). We previously demonstrated that *Onecut2* modulates the expression of granuphilin, a secretory granule protein acting as a potent inhibitor of insulin exocytosis (8) that is expressed in all β -cells of nondamaged islets, irrespective of the age of NOD mice (data not shown). In agreement with the computational predictions, transfections under the conditions that led to miR-29a/b/c overexpression resulted in a decrease in the level of *Onecut2* and a consequent rise in the expression of granuphilin (Fig. 5) in MIN6 cells and in dissociated mouse islet cells, potentially explaining at least part of the effect of miR-29 family members on glucose-induced insulin release. In contrast, we were unable to detect significant changes in the level of *Syntaxin 1a*, a key component of the machinery of insulin exocytosis (36,37), which is also identified by computational programs as a potential target of miR-29 (Fig. 5).

The effect of elevated levels of miR-29 family members on cell survival was next investigated. Overexpression of miR-29a/b/c in MIN6 cells (Fig. 6A, left panel) and in mouse (Fig. 6B, left panel) and human dissociated islet cells (Fig. 6C) led to a significant increase in cell death, as assessed by scoring the cells displaying pyknotic nuclei.

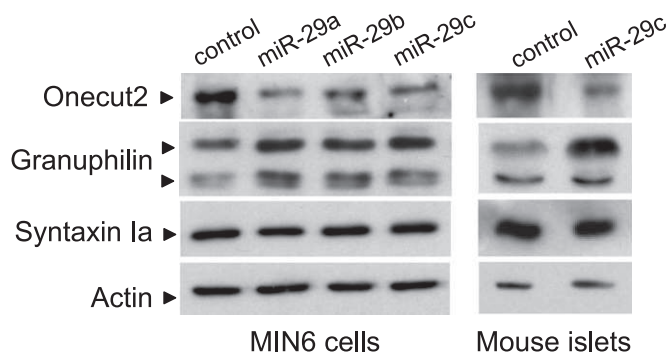


FIG. 5. Overexpression of miR-29 selectively alters the expression of proteins involved in insulin exocytosis. MIN6 cells (left panel) or dissociated mouse islet cells (right panel) were transiently transfected with RNA duplexes that allow for overexpression of miR-29a, b, or c. Western blotting showed that this change was associated to a reduction in the levels of *Onecut2* and to an increase in the levels of granuphilin, without alterations of *Syntaxin 1a*. A representative of three to five experiments is shown.

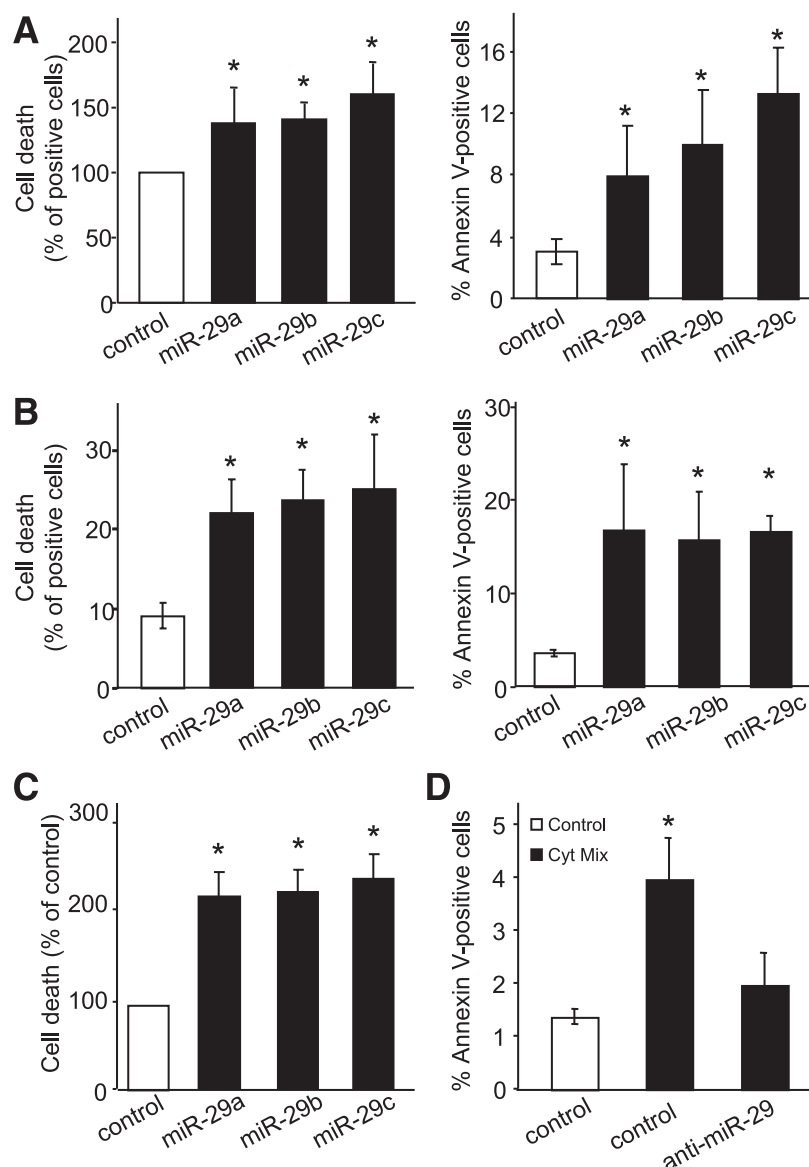


FIG. 6. Overexpression of miR-29 increases the apoptosis of transformed and primary β -cells. **A:** MIN6 cells were transiently transfected with a control RNA duplex or with duplexes leading to miR-29a, miR-29b, and miR-29c overexpression. Three days later, the monolayers were stained with Hoechst dye 33342 to score for dead cells (*left panel*) or with Annexin V-enhanced green fluorescent protein (EGFP) to score for apoptotic cells (*right panel*). **B:** Islet cells were dispersed from mouse islets and plated. Adherent cells were transfected with the indicated duplexes. Three days later, the monolayers were stained with Hoechst dye 33342 (*left panel*) or with Annexin V-EGFP (*right panel*). **C:** Dissociated human islet cells were transfected with a control RNA duplex or with duplexes leading to miR-29a, miR-29b, and miR-29c overexpression. Three days later, the monolayers were stained with Hoechst dye 33342 to score for cells displaying pyknotic nuclei. **D:** MIN6 cells were transfected with a control oligonucleotide or with a modified antisense oligonucleotide that specifically inhibits miR-29c (anti-miR-29c). The day after, the cells were incubated with or without IL-1 β (0.1 ng/mL) plus TNF- α (10 ng/mL) and IFN- γ (30 ng/mL), and 24 h later, the glass coverslips cells were stained with Annexin V-EGFP to score the fraction of apoptotic cells. All figures show the mean \pm SD of three (*B* and *C*) to five (*A*) independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

Identical results were obtained when apoptosis was assessed by Annexin V labeling (Fig. 6A and B, *right panels*). In contrast, the number of necrotic cells determined by propidium iodide labeling remained unchanged (data not shown). Pretreatment with anti-miR-29c significantly decreased, to control levels, the number of MIN6 cells undergoing apoptosis in the presence of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (Fig. 6D).

We then attempted to elucidate the mechanisms through which a rise in the level of miR-29a/b/c can trigger β -cell death. Interestingly, Mcl1, an antiapoptotic protein belonging to the Bcl2 family and playing a key role in β -cell survival (38), is a predicted target of miR-29a/b/c (26,39).

Indeed, we found that increased levels of miR-29a/b/c inhibited the expression by MIN6 cells of a luciferase construct containing the 3'UTR sequence of Mcl1 (Fig. 7A). This effect was abrogated by mutation of the sequence recognized by these miRNAs, indicating a direct interaction with the 3'UTR of Mcl1. Western blot analysis confirmed a significant reduction of the level of Mcl1 in MIN6 cells and in mouse islet cells overexpressing the miR-29 family members (Fig. 7B and C). No significant changes in MCL1 mRNA levels were detected in miR-29 overexpressing cells, indicating that the effect of the miRNAs is mainly post-transcriptional (Supplementary Fig. 9).

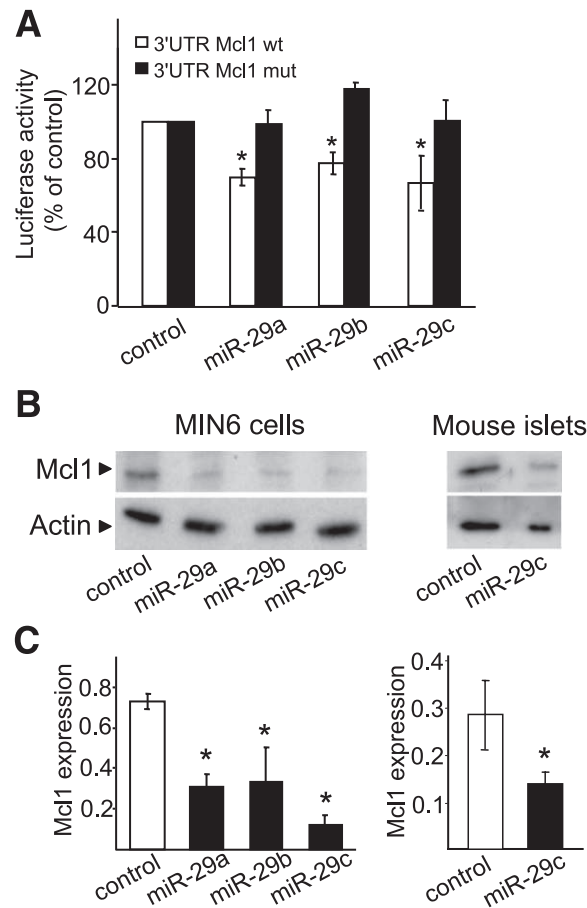


FIG. 7. Mcl1 is a direct target of miR-29 family members. **A:** MIN6 cells were cotransfected with a *Renilla* luciferase construct and *Firefly* luciferase reporter plasmids containing the wild-type (wt) or a mutated (mut) sequence of the 3' UTR of mouse Mcl1 and RNA duplexes, leading to miR-29a, miR-29b, or miR-29c overexpression. Luciferase activities were measured 3 days later. *Firefly* luciferase activities were divided by the *Renilla* luciferase activities to correct for differences in transfection efficiency. The value obtained under control condition was set to 100%. Values are mean \pm SD of four independent experiments. **B:** MIN6 cells (*left panel*) or dissociated mouse islet cells (*right panel*) were transfected with the indicated duplexes. Expression of Mcl1 and actin was assessed by Western blotting. A representative of three experiments is shown. **C:** Quantification of the effect of miR-29a/b/c overexpression on Mcl1 expression by densitometric scanning of the films in MIN6 cells (*left panel*) and mouse islets (*right panel*). The results are expressed as means \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

To demonstrate a direct link between the reduction of Mcl1 and the effect of miR-29 on β -cell apoptosis, MIN6 cells were transfected with an oligonucleotide designed to specifically protect the Mcl1 mRNA from miR-29 binding, without interfering with the regulation of other miR-29 targets (25). The reduction in Mcl1 levels elicited by miR-29c overexpression or by proinflammatory cytokines was efficiently prevented by transfection of this target protector (Supplementary Fig. 10A and B). As shown in Fig. 8A, the cells expressing the Mcl1 target protector were resistant to apoptosis induced by miR-29 overexpression. Moreover, the cells transfected with the Mcl1 target protector were not sensitive to cytokine-induced apoptosis (Fig. 8B), indicating that at least part of the deleterious effect of these inflammatory mediators on β -cell survival is caused by a miR-29-induced drop in the expression of the antiapoptotic Mcl1 protein.

DISCUSSION

During the initial phases of type 1 diabetes, pancreatic β -cells are chronically exposed to inflammatory mediators released by immune cells invading the islets of Langerhans. This results in major changes in gene expression, with

consequent defects in the accomplishment of specialized functions, and loss of the cells by apoptosis (1). We recently demonstrated that part of the changes in gene expression triggered by proinflammatory cytokines reflects alterations in the level of a new class of regulatory molecules, the miRNAs (11). Indeed, we found that prolonged exposure to IL-1 β or TNF- α results in a strong upregulation of miR-21, miR-34a, and miR-146a, with large effects on the secretory capacities of β -cells and their sensitivity to apoptosis (11). In this study, we confirm these findings and further extend them via the identification of additional miRNAs, whose expression level is markedly altered with the onset of type 1 diabetes in NOD mice. The members of the miR-29 family, which are among the most abundant miRNAs expressed in mouse pancreatic β -cell (11,30), increased with the age of prediabetic but still normoglycemic NOD mice. In situ hybridization and qPCR analysis, coupled with immunofluorescence for insulin, demonstrated that the rise in miR-29 expression occurred in β -cells and not in invading immune cells.

The mechanism responsible for this induction of miR-29a/b/c in NOD mice remains to be fully elucidated. We found that exposure of MIN6 cells and human islets to proinflammatory cytokines causes a twofold increase in

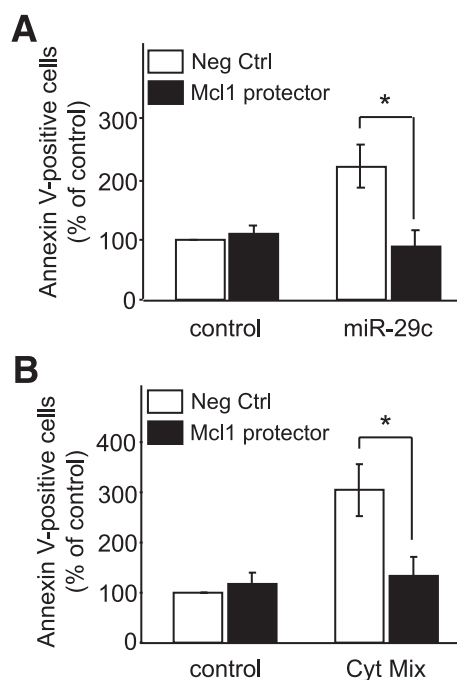


FIG. 8. miR-29- and cytokine-induced apoptosis is blocked by preventing binding to Mcl1. **A:** MIN6 cells were transfected with a control RNA duplex or with duplexes corresponding to the mature form of miR-29c, together with a scrambled miScript Target Protector as a negative control or a Mcl1 miScript Target Protector. Three days after transfection, the cells were stained with Annexin V-enhanced green fluorescent protein (EGFP) to score the fraction of apoptotic cells. **B:** MIN6 cells were transfected with the scrambled miScript Target Protector as a negative control or with the Mcl1 miScript Target Protector. Two days later, the cells were treated for 24 h with a mix of cytokines (Cyt Mix) including IL-1 β (0.1 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL), and IFN- γ (30 ng/mL). At the end of the incubation, the cells were stained with Annexin V-EGFP to score the fraction of apoptotic cells. All figures show the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

the expression of miR-29 family members. These results are in good agreement with those obtained previously by microarray analyses (11). The signaling pathways involved in the induction of miR-29 family members have not been dissected yet. Zhou et al. (40) have recently identified in the promoter of miR-29a potential binding sites for NF κ B, a transcription factor known to contribute to cytokine-mediated β -cell dysfunction and to the development of type 1 diabetes (41). Expression of miR-29 was also reported to be modulated by p53 (42), a transcription factor that is induced in response to proinflammatory cytokines (43) and that we have shown controls the expression of other miRNAs (7). Additional cytokines, such as IL-4 and TGF- β , which are defectively produced in NOD mice (44–46), have been reported to inhibit miR-29 expression in other cell systems (47). A deficit of these cytokines may potentially contribute to the strong upregulation of miR-29a/b/c that is observed in the islets of prediabetic NOD mice.

Our results demonstrate that miR-29 overexpression downregulates glucose-induced insulin secretion of primary mouse and human islet cells as well as of MIN6 cells. This downregulation is associated with the interaction of the miRNAs with Onecut2, one of their putative targets. This transcription factor controls the expression of granuphilin/Syt1-4 (8), a Rab guanine triphosphate (GTP)ase effector that colocalizes with the dense-core, insulin-containing granules of pancreatic β -cells and acts as a potent inhibitor of insulin exocytosis (23,48). Thus, by decreasing Onecut2 levels, miR-29 enables the expression of increased amounts of granuphilin, resulting in impaired stimulation of insulin secretion. Consistent with this mechanism, we found that granuphilin is abundant in most β -cells, irrespective of the

age of the NOD mice, and the presence of peri- or intraislet insulinitis.

Prolonged exposure to proinflammatory cytokines is known to affect β -cell survival. Overexpression of miR-29a, -b, or -c to levels comparable to those observed in 8-week-old NOD mice mimics the effect of the cytokines. Moreover, blockade of miR-29 protects β -cells from the deleterious effect of these inflammatory mediators. In line with results obtained in other cell types (26,39,49), Western blot analysis and luciferase reporter assays demonstrated a decrease in the level of the antiapoptotic protein Mcl1 on miR-29 overexpression. Downregulation of this antiapoptotic protein is a crucial event, leading to β -cell apoptosis in response to cytokines (38). Our data are in good agreement with these observations and suggest that, as it is the case in other cell systems, even a modest reduction of Mcl1 levels caused by miR-29 overexpression can result in loss of mitochondrial potential, cytochrome c release, and activation of caspase-3 (39). Indeed, an oligonucleotide specifically designed to mask the binding site of miR-29 on Mcl1 3'UTR, without affecting the stability or the translation of the mRNA (25), restored the expression of the antiapoptotic protein, and prevented both miR-29- and cytokine-mediated apoptosis. Our findings suggest that molecules capable of protecting individual targets represent attractive tools to precisely dissect the mode of action of miRNAs and could also serve as therapeutic strategies to selectively promote the expression of single genes beneficial for β -cells.

The miR-29 family members have been shown to contribute to insulin resistance in insulin target tissues of GK rats (33). Interestingly, type 1 diabetes in NOD mice is associated with insulin resistance (50). Moreover, miR-29

has recently been reported to inhibit innate and adaptive immune responses by suppressing the production of IFN- γ in natural killer cells and T lymphocytes (51). Thus, changes in miR-29 expression may play a broader role in the pathogenesis of type 1 diabetes.

The current study was carried out in NOD mice, an animal model sharing many characteristics of type 1 diabetes in humans and that has significantly contributed to our understanding of the molecular processes associated with the development of this disease (52). It will now be important to confirm that the mechanisms identified in NOD mice and β -cell lines are indeed also operating during the initial phases of type 1 diabetes in humans. Should this turn out to be the case, a better knowledge of islet miRNA dysfunction may open the way to alternative strategies to delay and prevent the development of the disease in newly diagnosed type 1 diabetic patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The team led by R.R. is supported by the Swiss National Science Foundation Grant 31003A-127254. The team led by P.M. is supported by grants from the Swiss National Science Foundation (310000-141162, CR32I3_129987, IZ7320-127935), the Juvenile Diabetes Research Foundation (40-2011-11), and the European Union (BETAIMAGE 222980, IMIDIA, C2008-T7).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

E.R. researched data, contributed to discussion, and wrote the manuscript. S.G. and D.C. researched data. C.Br. researched data and contributed to discussion. C.Bo. contributed to discussion. P.M. researched data, contributed to discussion, and reviewed and edited the manuscript. R.R. contributed to discussion, and wrote, reviewed, and edited the manuscript. R.R. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors are grateful to Dr. Justin Mott (Mayo Clinic, Minneapolis, MN) for providing the luciferase reporter plasmids containing the wild-type and the mutated form of the 3' UTR of Mcl1 and to Dr. Patrick Jacquemin (Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium) for generously supplying the antibody against Onecut2.

REFERENCES

- Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:219–226
- Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:325–331
- Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Störling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol* 2006;20:1867–1879
- Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, et al. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 2007;282:19575–19588
- El Ouamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2008;57:2708–2717
- Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 2008;389:305–312
- Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2008;57:2728–2736
- Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 2006;281:26932–26942
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226–230
- Poy MN, Hausser J, Trajtkovski M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5813–5818
- Roggli E, Britan A, Gattesco S, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2010;59:978–986
- Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007;5:e203
- Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns* 2009;9:109–113
- Avnit-Sagi T, Kantorovich L, Kredon-Russo S, Hornstein E, Walker MD. The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS ONE* 2009;4:e5033
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835–840
- Lilla V, Webb G, Rickenbach K, et al. Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology* 2003;144:1368–1379
- Charollais A, Gjinovci A, Huarte J, et al. Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest* 2000;106:235–243
- Faideau B, Larger E, Lepault F, Carel JC, Boitard C. Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* 2005;54(Suppl. 2):S87–S96
- Halbout P, Briand JP, Bécourt C, Muller S, Boitard C. T cell response to preproinsulin I and II in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 2002;169:2436–2443
- Yaylaoglu MB, Titmus A, Visel A, Alvarez-Bolado G, Thaller C, Eichele G. Comprehensive expression atlas of fibroblast growth factors and their receptors generated by a novel robotic in situ hybridization platform. *Dev Dyn* 2005;234:371–386
- Klee P, Allagnat F, Pontes H, et al. Connexins protect mouse pancreatic β cells against apoptosis. *J Clin Invest* 2011;121:4870–4879
- Coppola T, Frantz C, Perret-Menoud V, Gattesco S, Hirling H, Regazzi R. Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol Biol Cell* 2002;13:1906–1915
- Abderrahmani A, Steinmann M, Plaisance V, et al. The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1). *Mol Cell Biol* 2001;21:7256–7267
- Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, et al. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res* 2010;70:9641–9649
- Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007;26:6133–6140
- Briançon N, Bailly A, Clotman F, Jacquemin P, Lemaigre FP, Weiss MC. Expression of the alpha7 isoform of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 is activated by HNF6/OC-2 and HNF1 and repressed by HNF4alpha1 in the liver. *J Biol Chem* 2004;279:33398–33408
- Wu H, Neilson JR, Kumar P, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE* 2007;2:e1020
- Vigneau-Hermellin M, Vitali L, Tardivel I, Rabaud M, Holers MV, Carel JC. Rejection of islets differing by a single antigen is dependent on donor MHC. *Diabetes* 1997;46:765–769
- Bravo-Egana V, Rosero S, Molano RD, et al. Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:922–926
- Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Mol Cell Biol* 2011;31:3182–3194
- Thorrez L, Laudadio I, Van Deun K, et al. Tissue-specific disallowance of housekeeping genes: the other face of cell differentiation. *Genome Res* 2011;21:95–105
- He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007;21:2785–2794
- Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 2003;111:851–857

35. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20
36. Nagamatsu S, Nakamichi Y, Yamamura C, et al. Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* 1999;48:2367–2373
37. Martín F, Moya F, Gutierrez LM, Reig JA, Soria B. Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1995;38:860–863
38. Allagnat F, Cunha D, Moore F, Vanderwinden JM, Eizirik DL, Cardozo AK. Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to β -cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2011;18:328–337
39. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51:836–845
40. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 2010;38:3222–3232
41. Eldor R, Yeffet A, Baum K, et al. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5072–5077
42. Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J* 2011;30:2219–2232
43. Kim WH, Lee JW, Gao B, Jung MH. Synergistic activation of JNK/SAPK induced by TNF-alpha and IFN-gamma: apoptosis of pancreatic beta-cells via the p53 and ROS pathway. *Cell Signal* 2005;17:1516–1532
44. Creusot RJ, Yaghoubi SS, Kodama K, et al. Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin Immunol* 2008;127:176–187
45. Kaminski A, Welters HJ, Kaminski ER, Morgan NG. Human and rodent pancreatic beta-cells express IL-4 receptors and IL-4 protects against beta-cell apoptosis by activation of the PI3K and JAK/STAT pathways. *Biosci Rep* 2010;30:169–175
46. Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL. Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and -10, transforming growth factor-beta, and prostaglandin-E. *Am J Pathol* 1995;147:1193–1199
47. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1733–1743
48. Gomi H, Mizutani S, Kasai K, Itohara S, Izumi T. Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol* 2005;171:99–109
49. Ye Y, Hu Z, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2010;87:535–544
50. Koulmanda M, Budo E, Bonner-Weir S, et al. Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13074–13079
51. Ma F, Xu S, Liu X, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol* 2011;12:861–869
52. Chaparro RJ, Diloranzo TP. An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6:939–955

BIBLIOGRAPHIE

- (2006). "Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999." Diabet Med **23**(8): 857-866.
- Abdulghani, J. and W. S. El-Deiry (2010). "TRAIL receptor signaling and therapeutics." Expert Opin Ther Targets **14**(10): 1091-1108.
- Acha-Orbea, H. and H. O. McDevitt (1987). "The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2435-2439.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Aggarwal, B. B., S. C. Gupta, et al. (2012). "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey." Blood **119**(3): 651-665.
- Aggarwal, R. and C. V. Oddis (2012). "Therapeutic advances in myositis." Curr Opin Rheumatol.
- Ai, X. Y., G. C. Shi, et al. (2012). "4-1BB Ligand-mediated Imbalance of Helper 17 T Cells and Regulatory T Cells in Patients with Allergic Asthma." J Int Med Res **40**(3): 1046-1054.
- Akbayram, S., M. Dogan, et al. (2011). "Clinical features and prognosis with Guillain-Barre syndrome." Ann Indian Acad Neurol **14**(2): 98-102.
- Akiba, H., H. Oshima, et al. (1999). "CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells." J Immunol **162**(12): 7058-7066.
- Alegre, M. L., K. A. Frauwirth, et al. (2001). "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4." Nat Rev Immunol **1**(3): 220-228.
- Allenbach, Y., S. Solly, et al. (2009). "Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis." Am J Pathol **174**(3): 989-998.
- Alsheklee, A., Z. Hussain, et al. (2008). "Guillain-Barre syndrome: incidence and mortality rates in US hospitals." Neurology **70**(18): 1608-1613.
- Anderson, A. C., D. E. Anderson, et al. (2007). "Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells." Science **318**(5853): 1141-1143.
- Ansari, M. J., A. D. Salama, et al. (2003). "The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice." J Exp Med **198**(1): 63-69.
- Appleman, L. J., A. Berezovskaya, et al. (2000). "CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression." J Immunol **164**(1): 144-151.
- Bach, J. F. (1994). "Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease." Endocr Rev **15**(4): 516-542.
- Bacorro, E. A. and R. Tehrani (2010). "Stiff-person syndrome: persistent elevation of glutamic acid decarboxylase antibodies despite successful treatment with rituximab." J Clin Rheumatol **16**(5): 237-239.
- Baekkeskov, S., H. J. Aanstoot, et al. (1990). "Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase." Nature **347**(6289): 151-156.
- Baker, M. R., M. Das, et al. (2005). "Treatment of stiff person syndrome with rituximab." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(7): 999-1001.
- Barbe-Tuana, F. M., D. Klein, et al. (2006). "CD40-CD40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets." Diabetes **55**(9): 2437-2445.

- Barmeier, H., J. Ahlmen, et al. (1992). "Quantitative analysis of islet glutamic acid decarboxylase p64 autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus." Autoimmunity **13**(3): 187-196.
- Barnett, A. H., C. Eff, et al. (1981). "Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs." Diabetologia **20**(2): 87-93.
- Barohn, R. J., J. T. Kissel, et al. (1989). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Clinical characteristics, course, and recommendations for diagnostic criteria." Arch Neurol **46**(8): 878-884.
- Baxter, A. G. and P. D. Hodgkin (2002). "Activation rules: the two-signal theories of immune activation." Nat Rev Immunol **2**(6): 439-446.
- Baxter, A. G., A. C. Horsfall, et al. (1994). "Mycobacteria precipitate an SLE-like syndrome in diabetes-prone NOD mice." Immunology **83**(2): 227-231.
- Bernard, N. F., F. Ertug, et al. (1992). "High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice." Diabetes **41**(1): 40-46.
- Bettelli, E., M. P. Das, et al. (1998). "IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice." J Immunol **161**(7): 3299-3306.
- Bhatia, S., M. Eddidin, et al. (2006). "B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties." Immunol Lett **104**(1-2): 70-75.
- Bieg, S., J. Seissler, et al. (1994). "GAD65 is recognized by T-cells, but not by antibodies from NOD-mice." Autoimmunity **17**(3): 189-194.
- Bishop, G. A. and B. S. Hostager (2003). "The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 297-309.
- Biswas, P., P. Rovere, et al. (2000). "Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human gamma delta T cells." Eur J Immunol **30**(8): 2172-2180.
- Blank, C., I. Brown, et al. (2003). "Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells." J Immunol **171**(9): 4574-4581.
- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Bohan, A. and J. B. Peter (1975). "Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts)." N Engl J Med **292**(7): 344-347.
- Bohan, A. and J. B. Peter (1975). "Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts)." N Engl J Med **292**(8): 403-407.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.
- Bouguermouh, S., G. Fortin, et al. (2009). "CD28 co-stimulation down regulates Th17 development." PLoS One **4**(3): e5087.
- Bour-Jordan, H. and J. A. Bluestone (2009). "Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells." Immunol Rev **229**(1): 41-66.
- Bour-Jordan, H., J. H. Esensten, et al. (2011). "Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family." Immunol Rev **241**(1): 180-205.
- Bour-Jordan, H., H. L. Thompson, et al. (2005). "Distinct effector mechanisms in the development of autoimmune neuropathy versus diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **175**(9): 5649-5655.
- Briones, J., S. Novelli, et al. (2011). "T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus-host disease: therapeutic implications." Bone Marrow Res **2011**: 976793.
- Brodie, D., A. V. Collins, et al. (2000). "LICOS, a primordial costimulatory ligand?" Curr Biol **10**(6): 333-336.

- Bromberg, M. B., E. L. Feldman, et al. (1992). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison of patients with and without an associated monoclonal gammopathy." Neurology **42**(6): 1157-1163.
- Bromley, S. K., A. Iaboni, et al. (2001). "The immunological synapse and CD28-CD80 interactions." Nat Immunol **2**(12): 1159-1166.
- Buchbinder, R., A. Forbes, et al. (2001). "Incidence of malignant disease in biopsy-proven inflammatory myopathy. A population-based cohort study." Ann Intern Med **134**(12): 1087-1095.
- Busse, M., M. Krech, et al. (2012). "ICOS Mediates the Generation and Function of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Conveying Respiratory Tolerance." J Immunol **189**(4): 1975-1982.
- Butler, M. H., M. Solimena, et al. (1993). "Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome." J Exp Med **178**(6): 2097-2106.
- Cabal-Hierro, L. and P. S. Lazo (2012). "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." Cell Signal **24**(6): 1297-1305.
- Calbo, S., H. Delagreviere, et al. (2008). "Functional tolerance of CD8+ T cells induced by muscle-specific antigen expression." J Immunol **181**(1): 408-417.
- Carnaud, C., B. Legrand, et al. (1992). "Acquired allo-tolerance to major or minor histocompatibility antigens indifferently contributes to preventing diabetes development in non-obese diabetic (NOD) mice." J Autoimmun **5**(5): 591-601.
- Carrasco-Marin, E., J. Shimizu, et al. (1996). "The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders." J Immunol **156**(2): 450-458.
- Carreno, B. M. and M. Collins (2002). "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 29-53.
- Casciola-Rosen, L., F. Andrade, et al. (1999). "Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity." J Exp Med **190**(6): 815-826.
- Casciola-Rosen, L. and A. L. Mammen (2012). "Myositis autoantibodies." Curr Opin Rheumatol.
- Castro, C. and M. Gourley (2012). "Diagnosis and treatment of inflammatory myopathy: issues and management." Ther Adv Musculoskelet Dis **4**(2): 111-120.
- Cha, S., H. Nagashima, et al. (2002). "Two NOD Idd-associated intervals contribute synergistically to the development of autoimmune exocrinopathy (Sjogren's syndrome) on a healthy murine background." Arthritis Rheum **46**(5): 1390-1398.
- Chahin, N. and A. G. Engel (2008). "Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM." Neurology **70**(6): 418-424.
- Chakravarti, S., C. A. Sabatos, et al. (2005). "Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity." J Exp Med **202**(3): 437-444.
- Charbonnier, L. M., B. Vokaer, et al. (2012). "CTLA4-Ig Restores Rejection of MHC Class-II Mismatched Allografts by Disabling IL-2-Expanded Regulatory T Cells." Am J Transplant **12**(9): 2313-2321.
- Chatenoud, L., J. Primo, et al. (1997). "CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice." J Immunol **158**(6): 2947-2954.
- Chen, L. (2004). "Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity." Nat Rev Immunol **4**(5): 336-347.
- Chen, T. T., L. Li, et al. (2005). "TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis." J Exp Med **202**(7): 955-965.
- Chen, Y., S. Shen, et al. (2012). "Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression." J Immunol **188**(4): 1698-1707.

- Cheung, T. C., M. W. Steinberg, et al. (2009). "Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15): 6244-6249.
- Chevenne, D., S. Deghmoun, et al. (2011). "Evaluation of an ELISA assay for total proinsulin and establishment of reference values during an oral glucose tolerance test in a healthy population." Clin Biochem **44**(16): 1349-1351.
- Chiba, A., S. Kusunoki, et al. (1993). "Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome: clinical and immunohistochemical studies." Neurology **43**(10): 1911-1917.
- Choi, B. K., Y. H. Kim, et al. (2010). "Peripheral 4-1BB signaling negatively regulates NK cell development through IFN-gamma." J Immunol **185**(3): 1404-1411.
- Choi, B. K., Y. H. Kim, et al. (2009). "4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells." J Immunol **182**(7): 4107-4115.
- Choi, Y. S., R. Kageyama, et al. (2011). "ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6." Immunity **34**(6): 932-946.
- Chou, S. M. (1967). "Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis." Science **158**(3807): 1453-1455.
- Christgau, S., H. Schierbeck, et al. (1991). "Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble." J Biol Chem **266**(31): 21257-21264.
- Christopher-Stine, L., L. A. Casciola-Rosen, et al. (2010). "A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy." Arthritis Rheum **62**(9): 2757-2766.
- Chuang, E., T. S. Fisher, et al. (2000). "The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A." Immunity **13**(3): 313-322.
- Claus, C., C. Riether, et al. (2012). "CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth." Cancer Res **72**(14): 3664-3676.
- Collins, A. V., D. W. Brodie, et al. (2002). "The interaction properties of costimulatory molecules revisited." Immunity **17**(2): 201-210.
- Collins, M., V. Ling, et al. (2005). "The B7 family of immune-regulatory ligands." Genome Biol **6**(6): 223.
- Colucci, F., C. M. Cilio, et al. (1996). "Programmed cell death in the pathogenesis of murine IDDM: resistance to apoptosis induced in lymphocytes by cyclophosphamide." J Autoimmun **9**(2): 271-276.
- Cote, A. L., P. Zhang, et al. (2011). "Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens." J Immunol **186**(1): 275-283.
- Crispin, J. C. and G. C. Tsokos (2009). "Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity." Autoimmun Rev **8**(3): 190-195.
- Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 265-273.
- Croft, M., W. Duan, et al. (2012). "TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights." Trends Immunol **33**(3): 144-152.
- Curtiss, M. L., J. V. Gorman, et al. (2012). "Tim-1 regulates Th2 responses in an airway hypersensitivity model." Eur J Immunol **42**(3): 651-661.
- Cuzzocrea, S., G. Nocentini, et al. (2006). "Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation." J Immunol **177**(1): 631-641.
- Cuzzola, M., M. Fiasche, et al. (2012). "Molecular and computational diagnostic approach identifies FOXP3, ICOS, CD52 and CASP1 as the most informative biomarkers in acute graft versus host disease." Haematologica.

- Dace, D. S., A. A. Khan, et al. (2009). "Interleukin-10 overexpression promotes Fas-ligand-dependent chronic macrophage-mediated demyelinating polyneuropathy." PLoS One **4**(9): e7121.
- Dalakas, M. C. (2005). "Intravenous immunoglobulin in patients with anti-GAD antibody-associated neurological diseases and patients with inflammatory myopathies: effects on clinicopathological features and immunoregulatory genes." Clin Rev Allergy Immunol **29**(3): 255-269.
- Dalakas, M. C. (2011). "Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP." Nat Rev Neurol **7**(9): 507-517.
- Dalakas, M. C. and R. Hohlfeld (2003). "Polymyositis and dermatomyositis." Lancet **362**(9388): 971-982.
- Dalakas, M. C., B. Koffman, et al. (2001). "A controlled study of intravenous immunoglobulin combined with prednisone in the treatment of IBM." Neurology **56**(3): 323-327.
- Daw, K., N. Ujihara, et al. (1996). "Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus exhibit similarities and differences in epitope recognition." J Immunol **156**(2): 818-825.
- de Jong, R., W. A. Loenen, et al. (1991). "Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors." J Immunol **146**(8): 2488-2494.
- de Souza, A. J. and L. P. Kane (2006). "Immune regulation by the TIM gene family." Immunol Res **36**(1-3): 147-155.
- Decallonne, B., E. van Etten, et al. (2003). "Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes." J Autoimmun **20**(3): 219-226.
- Dimitri, D. (2009). "[Inflammatory myopathies: diagnosis and classifications]." Presse Med **38**(7-8): 1141-1163.
- Dimitri, D. and B. Eymard (2012). "[Inflammatory myopathies, autoimmune necrotizing myopathies and adult-onset genetic myopathies: differential diagnosis]." Rev Med Interne **33**(3): 134-142.
- Dinkel, K., H. M. Meinck, et al. (1998). "Inhibition of gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome." Ann Neurol **44**(2): 194-201.
- Dong, C., A. E. Juedes, et al. (2001). "ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function." Nature **409**(6816): 97-101.
- Dong, C. and R. I. Nurieva (2003). "Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS." J Autoimmun **21**(3): 255-260.
- Duhen, T., C. Pasero, et al. (2004). "LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation." Eur J Immunol **34**(12): 3534-3541.
- Eerligh, P., B. P. Koeleman, et al. (2011). "No extreme genetic risk for type 1 diabetes among DR3/4-DQ8 siblings sharing both extended HLA haplotypes with their diabetic proband." Tissue Antigens **77**(4): 338-340.
- El-Bayoumi, M. A., A. M. El-Refaey, et al. (2011). "Comparison of intravenous immunoglobulin and plasma exchange in treatment of mechanically ventilated children with Guillain Barre syndrome: a randomized study." Crit Care **15**(4): R164.
- Elliott, J. F., J. Liu, et al. (2003). "Autoimmune cardiomyopathy and heart block develop spontaneously in HLA-DQ8 transgenic IAbeta knockout NOD mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13447-13452.
- Ellis, T. M. and M. A. Atkinson (1996). "The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase." Nat Med **2**(2): 148-153.
- Emslie-Smith, A. M., K. Arahata, et al. (1989). "Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies." Hum Pathol **20**(3): 224-231.

- Engel, D., T. Seijkens, et al. (2009). "The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis." *Semin Immunol* **21**(5): 308-312.
- Erickson, L. D., B. G. Durell, et al. (2002). "Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40." *J Clin Invest* **109**(5): 613-620.
- Eymard, B. (2003). "[Polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis, nosological aspects]." *Presse Med* **32**(35): 1656-1667.
- Fan, Z., P. Yu, et al. (2006). "NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors." *Blood* **107**(4): 1342-1351.
- Feau, S., Z. Garcia, et al. (2012). "The CD4(+) T-cell help signal is transmitted from APC to CD8(+) T-cells via CD27-CD70 interactions." *Nat Commun* **3**: 948.
- Ferri, C., M. Colaci, et al. (2012). "Polymyositis following Pandemic Influenza A (H1N1) and 2009-10 Seasonal Trivalent Vaccines." *Case Report Rheumatol* **2012**: 836930.
- Fos, C., A. Salles, et al. (2008). "ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse." *J Immunol* **181**(3): 1969-1977.
- Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, et al. (2010). "TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity." *Immunol Rev* **235**(1): 172-189.
- Galicia, G., A. Kasran, et al. (2009). "ICOS deficiency results in exacerbated IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Clin Immunol* **29**(4): 426-433.
- Gallardo, E., R. Rojas-Garcia, et al. (2001). "Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients." *Neurology* **57**(11): 2136-2138.
- Galli-Tsinopoulou, A. (2011). "Insulin therapy in children and adolescents with diabetes." *Diabetes Res Clin Pract* **93** Suppl 1: S114-117.
- Galuppo, M., G. Nocentini, et al. (2011). "The glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein (GITR) is critical to the development of acute pancreatitis in mice." *Br J Pharmacol* **162**(5): 1186-1201.
- Gardner, J. M., J. J. Devoss, et al. (2008). "Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells." *Science* **321**(5890): 843-847.
- Garlepp, M. J., B. Laing, et al. (1994). "HLA associations with inclusion body myositis." *Clin Exp Immunol* **98**(1): 40-45.
- Ginsberg-Fellner, F., M. E. Witt, et al. (1984). "Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies." *Diabetologia* **27** Suppl: 87-89.
- Gomez de Agüero, M., M. Vocanson, et al. (2012). "Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells." *J Clin Invest* **122**(5): 1700-1711.
- Gonsky, R., R. L. Deem, et al. (1999). "CD28 costimulation augments IL-2 secretion of activated lamina propria T cells by increasing mRNA stability without enhancing IL-2 gene transactivation." *J Immunol* **162**(11): 6621-6629.
- Gonzalo, J. A., J. Tian, et al. (2001). "ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses." *Nat Immunol* **2**(7): 597-604.
- Goodnow, C. C. (1996). "Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2264-2271.
- Gordon, P. A., J. B. Winer, et al. (2012). "Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis." *Cochrane Database Syst Rev* **8**: CD003643.
- Goto, N., H. Tsurumi, et al. (2012). "Serum soluble CD27 level is associated with outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone." *Leuk Lymphoma* **53**(8): 1494-1500.
- Greenberg, M. I. and D. Veerrier (2012). "Guillain-Barre syndrome." *N Engl J Med* **367**(10): 974; author reply 974.

- Greenberg, S. A. (2012). "Pathogenesis and therapy of inclusion body myositis." Curr Opin Neurol **25**(5): 630-639.
- Greenberg, S. A., G. S. Pinkus, et al. (2007). "Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis." Muscle Nerve **35**(1): 17-23.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-548.
- Hachem, A., D. Yacoub, et al. (2012). "Involvement of nuclear factor kappaB in platelet CD40 signaling." Biochem Biophys Res Commun **425**(1): 58-63.
- Hadden, R. D., N. A. Gregson, et al. (2001). "Guillain-Barre syndrome serum and anti-Campylobacter antibody do not exacerbate experimental autoimmune neuritis." J Neuroimmunol **119**(2): 306-316.
- Harada, Y., M. Tokushima, et al. (2001). "Critical requirement for the membrane-proximal cytosolic tyrosine residue for CD28-mediated costimulation in vivo." J Immunol **166**(6): 3797-3803.
- Hathcock, K. S., G. Laszlo, et al. (1994). "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function." J Exp Med **180**(2): 631-640.
- Hawiger, D., E. Tran, et al. (2008). "ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice." J Immunol **180**(5): 3140-3147.
- Hayward, S. L., N. Bautista-Lopez, et al. (2006). "CD4 T cells play major effector role and CD8 T cells initiating role in spontaneous autoimmune myocarditis of HLA-DQ8 transgenic IAb knockout nonobese diabetic mice." J Immunol **176**(12): 7715-7725.
- Hengstman, G. J., H. J. ter Laak, et al. (2006). "Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy." Ann Rheum Dis **65**(12): 1635-1638.
- Herman, A. E., G. J. Freeman, et al. (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion." J Exp Med **199**(11): 1479-1489.
- Hirschhorn-Cymerman, D., G. A. Rizzuto, et al. (2009). "OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis." J Exp Med **206**(5): 1103-1116.
- Hjern, A., U. Soderstrom, et al. (2012). "East Africans in Sweden have a high risk for type 1 diabetes." Diabetes Care **35**(3): 597-598.
- Ho, T. W., H. J. Willison, et al. (1999). "Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome." Ann Neurol **45**(2): 168-173.
- Hong, Y. H., J. J. Sung, et al. (2011). "Axonal conduction block at intermediate nerve segments in pure motor Guillain-Barre syndrome." J Peripher Nerv Syst **16**(1): 37-46.
- Hoogendijk, J. E., A. A. Amato, et al. (2004). "119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **14**(5): 337-345.
- Hoshino, K., Y. Muro, et al. (2010). "Anti-MDA5 and anti-TIF1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis." Rheumatology (Oxford) **49**(9): 1726-1733.
- Howard, O. M., H. F. Dong, et al. (2002). "Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells." J Exp Med **196**(6): 781-791.
- Hu, H., X. Wu, et al. (2011). "Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(31): 12827-12832.
- Hughes, R. A. and D. R. Cornblath (2005). "Guillain-Barre syndrome." Lancet **366**(9497): 1653-1666.
- Hughes, R. A., A. V. Swan, et al. (2012). "Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barre syndrome." Cochrane Database Syst Rev **7**: CD002063.

- Hutchings, P., G. Hedlund, et al. (1999). "Effect of the synthetic immunomodulator, linomide, on experimental models of thyroiditis." Immunology **96**(3): 340-347.
- Hyoty, H., M. Hiltunen, et al. (1995). "A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." Diabetes **44**(6): 652-657.
- Ikemizu, S., R. J. Gilbert, et al. (2000). "Structure and dimerization of a soluble form of B7-1." Immunity **12**(1): 51-60.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, et al. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." J Exp Med **180**(5): 1849-1860.
- Inoue, S., M. Niikura, et al. (2012). "Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing gammadelta T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(30): 12129-12134.
- Ishida, K., H. Mitoma, et al. (1999). "Selective suppression of cerebellar GABAergic transmission by an autoantibody to glutamic acid decarboxylase." Ann Neurol **46**(2): 263-267.
- Ishida, M., Y. Iwai, et al. (2002). "Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues." Immunol Lett **84**(1): 57-62.
- Ito, T., M. Yang, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." J Exp Med **204**(1): 105-115.
- Iwai, H., Y. Kozono, et al. (2002). "Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation." J Immunol **169**(8): 4332-4339.
- Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." J Exp Med **165**(2): 302-319.
- Jenkins, S. J., G. Perona-Wright, et al. (2007). "Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo." J Immunol **179**(6): 3515-3523.
- Kadkhoda, K., S. Wang, et al. (2011). "ICOS ligand expression is essential for allergic airway hyperresponsiveness." Int Immunol **23**(4): 239-249.
- Kadri, N., E. Korpos, et al. (2012). "CD4(+) type II NKT cells mediate ICOS and programmed death-1-dependent regulation of type 1 diabetes." J Immunol **188**(7): 3138-3149.
- Kaehler, K. C., S. Piel, et al. (2010). "Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma: identification of clinical and biological response patterns, immune-related adverse events, and their management." Semin Oncol **37**(5): 485-498.
- Kaida, K., D. Morita, et al. (2007). "Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS." J Neuroimmunol **182**(1-2): 212-218.
- Kalliora, M. I., A. Vazeou, et al. (2011). "Seasonal variation of type 1 diabetes mellitus diagnosis in Greek children." Hormones (Athens) **10**(1): 67-71.
- Kaplan, G., A. Totsuka, et al. (1996). "Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus." EMBO J **15**(16): 4282-4296.
- Karulf, M., A. Kelly, et al. (2010). "OX40 ligand regulates inflammation and mortality in the innate immune response to sepsis." J Immunol **185**(8): 4856-4862.
- Katsumata, Y. and D. P. Ascherman (2008). "Animal models in myositis." Curr Opin Rheumatol **20**(6): 681-685.
- Katz, J., C. Benoist, et al. (1993). "Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice." Eur J Immunol **23**(12): 3358-3360.

- Kaur, D. and C. Brightling (2012). "OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma." Chest **141**(2): 494-499.
- Keir, M. E., M. J. Butte, et al. (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **26**: 677-704.
- Kerfoot, S. M., G. Yaari, et al. (2011). "Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone." Immunity **34**(6): 947-960.
- Keymeulen, B., E. Vandemeulebroucke, et al. (2005). "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." N Engl J Med **352**(25): 2598-2608.
- Kieseier, B. C., H. C. Lehmann, et al. (2012). "Autoimmune diseases of the peripheral nervous system." Autoimmun Rev **11**(3): 191-195.
- Kieseier, B. C., H. Wiendl, et al. (2006). "The inflamed peripheral nervous system: update on immune therapies." Curr Opin Neurol **19**(5): 433-436.
- Kikutani, H. and S. Makino (1992). "The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains." Adv Immunol **51**: 285-322.
- Kim, J. I., S. B. Sonawane, et al. (2010). "Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival." Eur J Immunol **40**(5): 1369-1374.
- King, P. D., A. Sadra, et al. (1997). "Analysis of CD28 cytoplasmic tail tyrosine residues as regulators and substrates for the protein tyrosine kinases, EMT and LCK." J Immunol **158**(2): 580-590.
- Klein, D., F. Barbe-Tuana, et al. (2005). "A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells." Diabetologia **48**(2): 268-276.
- Klein, L., M. Hinterberger, et al. (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." Nat Rev Immunol **9**(12): 833-844.
- Knickelbein, J. E., A. J. de Souza, et al. (2006). "Cutting edge: inhibition of T cell activation by TIM-2." J Immunol **177**(8): 4966-4970.
- Koarada, S., Y. Wu, et al. (2004). "Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain." J Immunol **173**(4): 2315-2323.
- Komiyama, Y., S. Nakae, et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-573.
- Konforte, D., N. Simard, et al. (2009). "IL-21: an executor of B cell fate." J Immunol **182**(4): 1781-1787.
- Kornete, M., E. Sgouroudis, et al. (2012). "ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice." J Immunol **188**(3): 1064-1074.
- Kosuge, H., J. Suzuki, et al. (2003). "Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway." Transplantation **75**(8): 1374-1379.
- Kroczek, R. A., H. W. Mages, et al. (2004). "Emerging paradigms of T-cell co-stimulation." Curr Opin Immunol **16**(3): 321-327.
- Krug, J., A. J. Williams, et al. (1991). "Parathyroiditis in the non-obese diabetic mouse--a new finding." J Endocrinol **131**(2): 193-196.
- Kuchroo, V. K., D. T. Umetsu, et al. (2003). "The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease." Nat Rev Immunol **3**(6): 454-462.
- Kuerten, S., F. S. Lichtenegger, et al. (2006). "MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice." J Neuroimmunol **177**(1-2): 99-111.
- Kumanogoh, A., S. Marukawa, et al. (2002). "Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2." Nature **419**(6907): 629-633.
- Kusunoki, S. and K. Kaida (2011). "Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome and related disorders." J Neurochem **116**(5): 828-832.
- Kwek, S. S., V. Dao, et al. (2012). "Diversity of Antigen-Specific Responses Induced In Vivo with CTLA-4 Blockade in Prostate Cancer Patients." J Immunol.
- Lafferty, K. J., L. Andrus, et al. (1980). "Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses." Immunol Rev **51**: 279-314.

- Larimore, K., L. Liang, et al. (2012). "B7h-expressing dendritic cells and plasma B cells mediate distinct outcomes of ICOS costimulation in T cell-dependent antibody responses." BMC Immunol **13**(1): 29.
- Lathrop, S. K., C. A. Huddleston, et al. (2004). "A signal through OX40 (CD134) allows anergic, autoreactive T cells to acquire effector cell functions." J Immunol **172**(11): 6735-6743.
- Lenschow, D. J., K. C. Herold, et al. (1996). "CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes." Immunity **5**(3): 285-293.
- Lenschow, D. J., S. C. Ho, et al. (1995). "Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse." J Exp Med **181**(3): 1145-1155.
- Levin, M. I., T. Mozaffar, et al. (1998). "Paraneoplastic necrotizing myopathy: clinical and pathological features." Neurology **50**(3): 764-767.
- Levy, L. M., M. C. Dalakas, et al. (1999). "The stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid." Ann Intern Med **131**(7): 522-530.
- Liang, L., E. M. Porter, et al. (2002). "Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling." J Exp Med **196**(1): 97-108.
- Lieberman, S. M. and T. P. DiLorenzo (2003). "A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes." Tissue Antigens **62**(5): 359-377.
- Lin, G. H., F. Edele, et al. (2012). "Contribution of 4-1BBL on radioresistant cells in providing survival signals through 4-1BB expressed on CD8(+) memory T cells in the bone marrow." Eur J Immunol.
- Lindqvist, A. K., B. Nakken, et al. (2005). "Influence on spontaneous tissue inflammation by the major histocompatibility complex region in the nonobese diabetic mouse." Scand J Immunol **61**(2): 119-127.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, et al. (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." Immunity **4**(6): 535-543.
- Linsley, P. S., J. L. Greene, et al. (1992). "Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes." J Exp Med **176**(6): 1595-1604.
- Linterman, M. A., R. J. Rigby, et al. (2009). "Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS." Immunity **30**(2): 228-241.
- Liossis, S. N. and P. P. Sfikakis (2004). "Costimulation blockade in the treatment of rheumatic diseases." BioDrugs **18**(2): 95-102.
- Liu, C., H. Ding, et al. (2012). "LIGHT regulates the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells." J Cell Biochem.
- Liu, Z. and A. Davidson (2011). "BAFF and selection of autoreactive B cells." Trends Immunol **32**(8): 388-394.
- Lo, Y. L. (2007). "Clinical and immunological spectrum of the Miller Fisher syndrome." Muscle Nerve **36**(5): 615-627.
- Lohning, M., A. Hutloff, et al. (2003). "Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10." J Exp Med **197**(2): 181-193.
- Lotz, B. P., A. G. Engel, et al. (1989). "Inclusion body myositis. Observations in 40 patients." Brain **112** (Pt 3): 727-747.
- Louvet, C., B. G. Kabre, et al. (2009). "A novel myelin P0-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy." J Exp Med **206**(3): 507-514.
- Love, L. A., R. L. Leff, et al. (1991). "A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups." Medicine (Baltimore) **70**(6): 360-374.

- Lu, H., B. L. Kaplan, et al. (2009). "Suppression of T cell costimulator ICOS by Delta9-tetrahydrocannabinol." J Leukoc Biol **85**(2): 322-329.
- Luce, S., F. Lemonnier, et al. (2011). "Single insulin-specific CD8+ T cells show characteristic gene expression profiles in human type 1 diabetes." Diabetes **60**(12): 3289-3299.
- Luhder, F., P. Hoglund, et al. (1998). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes." J Exp Med **187**(3): 427-432.
- Lutgens, E., L. Gorelik, et al. (1999). "Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis." Nat Med **5**(11): 1313-1316.
- Lyons, P. A., W. W. Hancock, et al. (2000). "The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137." Immunity **13**(1): 107-115.
- Madireddi, S., R. H. Schabowsky, et al. (2012). "SA-4-1BBL Costimulation Inhibits Conversion of Conventional CD4(+) T Cells into CD4(+)FoxP3(+) T Regulatory Cells by Production of IFN-gamma." PLoS One **7**(8): e42459.
- Makino, S., K. Kunimoto, et al. (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice." Jikken Dobutsu **29**(1): 1-13.
- Mammen, A. L., T. Chung, et al. (2011). "Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy." Arthritis Rheum **63**(3): 713-721.
- Marie, I. and L. Mouthon (2011). "Therapy of polymyositis and dermatomyositis." Autoimmun Rev **11**(1): 6-13.
- Marti, R. M., A. Sorolla, et al. (2012). "New Therapeutic Targets in Melanoma." Actas Dermosifiliogr.
- Martin-Orozco, N., Z. Chen, et al. (2003). "Paradoxical dampening of anti-islet self-reactivity but promotion of diabetes by OX40 ligand." J Immunol **171**(12): 6954-6960.
- Martin, S., D. Wolf-Eichbaum, et al. (2001). "Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency." N Engl J Med **345**(14): 1036-1040.
- Marttila, J., S. Juhela, et al. (2001). "Responses of coxsackievirus B4-specific T-cell lines to 2C protein-characterization of epitopes with special reference to the GAD65 homology region." Virology **284**(1): 131-141.
- Masteller, E. L., E. Chuang, et al. (2000). "Structural analysis of CTLA-4 function in vivo." J Immunol **164**(10): 5319-5327.
- Matsumoto, K., M. Terakawa, et al. (2004). "Extremely rapid and intense induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 antibody treatment in vitro." J Immunol **172**(4): 2186-2193.
- McAdam, A. J., R. J. Greenwald, et al. (2001). "ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching." Nature **409**(6816): 102-105.
- McKinstry, K. K., T. M. Strutt, et al. (2008). "The effector to memory transition of CD4 T cells." Immunol Res **40**(2): 114-127.
- Mellanby, R. J., D. Thomas, et al. (2007). "Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." Immunology **121**(1): 15-28.
- Mellanby, R. J., D. C. Thomas, et al. (2009). "Role of regulatory T-cells in autoimmunity." Clin Sci (Lond) **116**(8): 639-649.
- Meyer Zu Horste, G., J. Reiners, et al. (2009). "CD73 is expressed on invading T lymphocytes in the inflamed peripheral nerve." Muscle Nerve **40**(2): 287-289.
- Meyers, J. H., S. Chakravarti, et al. (2005). "TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation." Nat Immunol **6**(5): 455-464.
- Middendorp, S., Y. Xiao, et al. (2009). "Mice deficient for CD137 ligand are predisposed to develop germinal center-derived B-cell lymphoma." Blood **114**(11): 2280-2289.
- Mittrucker, H. W., M. Kursar, et al. (2002). "Inducible costimulator protein controls the protective T cell response against *Listeria monocytogenes*." J Immunol **169**(10): 5813-5817.

- Miyahira, Y., H. Akiba, et al. (2003). "Involvement of ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in the regulation of immune responses to *Leishmania major* and *Nippostrongylus brasiliensis* infections." *Immunol Lett* **89**(2-3): 193-199.
- Miyanishi, M., K. Segawa, et al. (2012). "Synergistic effect of Tim4 and MFG-E8 null mutations on the development of autoimmunity." *Int Immunol* **24**(9): 551-559.
- Mora, C., F. S. Wong, et al. (1999). "Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice." *J Immunol* **162**(8): 4576-4588.
- Morel, Y., J. M. Schiano de Colella, et al. (2000). "Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor." *J Immunol* **165**(8): 4397-4404.
- Mori, M., S. Kuwabara, et al. (1999). "Haemophilus influenzae has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillain-Barre syndrome." *Neurology* **52**(6): 1282-1284.
- Morris, G. P. and Y. C. Kong (2006). "Interference with CD4+CD25+ T-cell-mediated tolerance to experimental autoimmune thyroiditis by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody." *J Autoimmun* **26**(1): 24-31.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
- Motta, A. C., J. L. Vissers, et al. (2009). "GITR signaling potentiates airway hyperresponsiveness by enhancing Th2 cell activity in a mouse model of asthma." *Respir Res* **10**: 93.
- Munroe, M. E. (2009). "Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: the role of CD40 in lymphocyte homeostasis." *Semin Immunol* **21**(5): 283-288.
- Muriglian, S. J., T. Ramirez-Montagut, et al. (2004). "GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in graft-versus-host disease." *J Exp Med* **200**(2): 149-157.
- Murinson, B. B., M. Butler, et al. (2004). "Markedly elevated GAD antibodies in SPS: effects of age and illness duration." *Neurology* **63**(11): 2146-2148.
- Nagaraju, K., N. Raben, et al. (2000). "Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9209-9214.
- Nakae, S., M. Asano, et al. (2001). "IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells." *J Immunol* **167**(1): 90-97.
- Nakajima, A., H. Oshima, et al. (2000). "Involvement of CD70-CD27 interactions in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **109**(2): 188-196.
- Nandedkar, T. D. (1992). "Immunoendocrine interrelationship--effect of ovariectomy on spleen and thymus in mouse." *Indian J Exp Biol* **30**(11): 1101-1104.
- Nanji, S. A., W. W. Hancock, et al. (2004). "Multiple combination therapies involving blockade of ICOS/B7RP-1 costimulation facilitate long-term islet allograft survival." *Am J Transplant* **4**(4): 526-536.
- Nanji, S. A., W. W. Hancock, et al. (2006). "Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse." *Diabetes* **55**(1): 27-33.
- Ndejemi, M. P., J. R. Teijaro, et al. (2006). "Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway." *J Immunol* **177**(11): 7698-7706.
- Needham, M. and F. L. Mastaglia (2007). "Inclusion body myositis: current pathogenetic concepts and diagnostic and therapeutic approaches." *Lancet Neurol* **6**(7): 620-631.
- Nimmerjahn, F. and J. D. Lunemann (2011). "Expression and function of the inhibitory Fcγ-receptor in CIDP." *J Peripher Nerv Syst* **16 Suppl 1**: 41-44.

- Nishimoto, H., H. Kikutani, et al. (1987). "Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice." Nature **328**(6129): 432-434.
- Nishimura, H. and T. Honjo (2001). "PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance." Trends Immunol **22**(5): 265-268.
- Nishimura, H., T. Honjo, et al. (2000). "Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 891-898.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." Immunity **11**(2): 141-151.
- Nocentini, G., S. Cuzzocrea, et al. (2008). "Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related (GITR)-Fc fusion protein inhibits GITR triggering and protects from the inflammatory response after spinal cord injury." Mol Pharmacol **73**(6): 1610-1621.
- Nocentini, G. and C. Riccardi (2009). "GITR: a modulator of immune response and inflammation." Adv Exp Med Biol **647**: 156-173.
- Nocentini, G., S. Ronchetti, et al. (2000). "Identification of three novel mRNA splice variants of GITR." Cell Death Differ **7**(4): 408-410.
- Noelle, R. J., M. Roy, et al. (1992). "A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6550-6554.
- Nolte, M. A., R. W. van Olfen, et al. (2009). "Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology." Immunol Rev **229**(1): 216-231.
- Nurieva, R. I., P. Treuting, et al. (2003). "Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis." J Clin Invest **111**(5): 701-706.
- Nurtanio, N. and P. C. Yang (2011). "Role of TIM-4 in innate or adaptive immune response." N Am J Med Sci **3**(5): 217-221.
- O'Keeffe, G. W., H. Gutierrez, et al. (2008). "NGF-promoted axon growth and target innervation requires GITRL-GITR signaling." Nat Neurosci **11**(2): 135-142.
- O'Sullivan, B. and R. Thomas (2003). "CD40 and dendritic cell function." Crit Rev Immunol **23**(1-2): 83-107.
- Oflazoglu, E., T. E. Boursalian, et al. (2009). "Blocking of CD27-CD70 pathway by anti-CD70 antibody ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis." J Immunol **183**(6): 3770-3777.
- Oflazoglu, E., I. S. Grewal, et al. (2009). "Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases." Adv Exp Med Biol **647**: 174-185.
- Okazaki, T., A. Maeda, et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13866-13871.
- Okazaki, T., Y. Tanaka, et al. (2003). "Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice." Nat Med **9**(12): 1477-1483.
- Okkenhaug, K. and R. Rottapel (1998). "Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction." J Biol Chem **273**(33): 21194-21202.
- Olmos, P., R. A'Hern, et al. (1988). "The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins." Diabetologia **31**(10): 747-750.
- Oomizu, S., T. Arikawa, et al. (2012). "Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner." Clin Immunol **143**(1): 51-58.
- Orlikowski, D., H. Prigent, et al. (2004). "Respiratory dysfunction in Guillain-Barre Syndrome." Neurocrit Care **1**(4): 415-422.

- Ou, X., S. Xu, et al. (2012). "Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(38): 15401-15406.
- Overell, J. R. and H. J. Willison (2005). "Recent developments in Miller Fisher syndrome and related disorders." Curr Opin Neurol **18**(5): 562-566.
- Ozkaynak, E., W. Gao, et al. (2001). "Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection." Nat Immunol **2**(7): 591-596.
- Pakala, S. V., P. Bansal-Pakala, et al. (2004). "Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions." Eur J Immunol **34**(11): 3039-3046.
- Palma, C., S. Vendetti, et al. (2010). "Role of 4-1BB receptor in the control played by CD8(+) T cells on IFN-gamma production by Mycobacterium tuberculosis antigen-specific CD4(+) T Cells." PLoS One **5**(6): e11019.
- Palmer, J. P., C. M. Asplin, et al. (1983). "Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment." Science **222**(4630): 1337-1339.
- Pan, X. C., L. Guo, et al. (2008). "Further study of anti-ICOS immunotherapy for rat cardiac allograft rejection." Surg Today **38**(9): 815-825.
- Pasero, C., D. E. Speiser, et al. (2012). "The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy." Curr Opin Pharmacol **12**(4): 478-485.
- Paulie, S., A. Rosen, et al. (1989). "The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction." J Immunol **142**(2): 590-595.
- Pequignot-Planche, E., P. De Gasquet, et al. (1977). "Lipoprotein lipase activity at onset of development of white adipose tissue in newborn rats." Biochem J **162**(2): 461-463.
- Piconese, S., B. Valzasina, et al. (2008). "OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection." J Exp Med **205**(4): 825-839.
- Placke, T., H. G. Kopp, et al. (2010). "Glucocorticoid-induced TNFR-related (GITR) protein and its ligand in antitumor immunity: functional role and therapeutic modulation." Clin Dev Immunol **2010**: 239083.
- Planelles, L., J. P. Medema, et al. (2008). "The expanding role of APRIL in cancer and immunity." Curr Mol Med **8**(8): 829-844.
- Podojil, J. R. and V. M. Sanders (2003). "Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation." J Immunol **170**(10): 5143-5151.
- Pop, S. M., C. P. Wong, et al. (2005). "Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes." J Exp Med **201**(8): 1333-1346.
- Poropatich, K. O., C. L. Walker, et al. (2010). "Quantifying the association between Campylobacter infection and Guillain-Barre syndrome: a systematic review." J Health Popul Nutr **28**(6): 545-552.
- Powell, D. J., Jr., M. E. Dudley, et al. (2005). "Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy." Blood **105**(1): 241-250.
- Prevot, N., C. Briet, et al. (2010). "Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system." Eur J Immunol **40**(8): 2267-2276.
- Qui, H. Z., A. T. Hagymasi, et al. (2011). "CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation." J Immunol **187**(7): 3555-3564.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, et al. (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." Science **332**(6029): 600-603.

- Racke, M. K., D. E. Scott, et al. (1995). "Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis." J Clin Invest **96**(5): 2195-2203.
- Rakocevic, G. and M. K. Floeter (2012). "Autoimmune stiff person syndrome and related myelopathies: understanding of electrophysiological and immunological processes." Muscle Nerve **45**(5): 623-634.
- Raphael, J. C., S. Chevret, et al. (2012). "Plasma exchange for Guillain-Barre syndrome." Cochrane Database Syst Rev **7**: CD001798.
- Rasheed, A. U., H. P. Rahn, et al. (2006). "Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression." Eur J Immunol **36**(7): 1892-1903.
- Rau, S. J., E. Hildt, et al. (2012). "CD40 inhibits replication of hepatitis C virus in primary human hepatocytes by JNK activation independent from the interferon pathway." Hepatology.
- Ray, A., S. Basu, et al. (2012). "A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand." J Immunol **188**(7): 3188-3198.
- Rees, J. H., S. E. Soudain, et al. (1995). "Campylobacter jejuni infection and Guillain-Barre syndrome." N Engl J Med **333**(21): 1374-1379.
- Rennert, P. D., T. Ichimura, et al. (2006). "T cell, Ig domain, mucin domain-2 gene-deficient mice reveal a novel mechanism for the regulation of Th2 immune responses and airway inflammation." J Immunol **177**(7): 4311-4321.
- Richter, C., S. Messerschmidt, et al. (2012). "The tumor necrosis factor receptor stalk regions define responsiveness to soluble versus membrane-bound ligand." Mol Cell Biol **32**(13): 2515-2529.
- Rider, L. G., V. P. Werth, et al. (2011). "Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ), Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS), Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT), Disease Activity Score (DAS), Short Form 36 (SF-36), Child Health Questionnaire (CHQ), physician global damage, Myositis Damage Index (MDI), Quantitative Muscle Testing (QMT), Myositis Functional Index-2 (FI-2), Myositis Activities Profile (MAP), Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS), Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), Cutaneous Assessment Tool (CAT), Dermatomyositis Skin Severity Index (DSSI), Skindex, and Dermatology Life Quality Index (DLQI)." Arthritis Care Res (Hoboken) **63 Suppl 11**: S118-157.
- Riella, L. V., T. Liu, et al. (2012). "Deleterious effect of CTLA4-Ig on a Treg-dependent transplant model." Am J Transplant **12**(4): 846-855.
- Rivero, V. E., C. Cailleau, et al. (1998). "Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP)." J Autoimmun **11**(6): 603-610.
- Rodig, N., T. Ryan, et al. (2003). "Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis." Eur J Immunol **33**(11): 3117-3126.
- Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, et al. (2009). "The costimulatory role of TIM molecules." Immunol Rev **229**(1): 259-270.
- Rodriguez-Manzanet, R., J. H. Meyers, et al. (2008). "TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival." J Immunol **180**(7): 4706-4713.
- Roivainen, M. (2006). "Enteroviruses: new findings on the role of enteroviruses in type 1 diabetes." Int J Biochem Cell Biol **38**(5-6): 721-725.
- Ronchetti, S., G. Nocentini, et al. (2007). "Glucocorticoid-induced TNFR-related protein lowers the threshold of CD28 costimulation in CD8+ T cells." J Immunol **179**(9): 5916-5926.

- Rose, M. R., M. P. McDermott, et al. (2001). "A prospective natural history study of inclusion body myositis: implications for clinical trials." *Neurology* **57**(3): 548-550.
- Rothstein, D. M. and M. H. Sayegh (2003). "T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance." *Immunol Rev* **196**: 85-108.
- Rottman, J. B., T. Smith, et al. (2001). "The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE." *Nat Immunol* **2**(7): 605-611.
- Rowell, E. A., M. C. Walsh, et al. (2005). "Opposing roles for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in the control of CD4+ T cell proliferation and effector function." *J Immunol* **174**(6): 3359-3368.
- Rutitzky, L. I., E. Ozkaynak, et al. (2003). "Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis." *Infect Immun* **71**(7): 4040-4044.
- Salajegheh, M., T. Lam, et al. (2011). "Autoantibodies against a 43 KDa muscle protein in inclusion body myositis." *PLoS One* **6**(5): e20266.
- Salomon, B. and J. A. Bluestone (2001). "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." *Annu Rev Immunol* **19**: 225-252.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-440.
- Salomon, B., L. Rhee, et al. (2001). "Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice." *J Exp Med* **194**(5): 677-684.
- Samuelsson, U., J. Carstensen, et al. (2007). "Seasonal variation in the diagnosis of type 1 diabetes in south-east Sweden." *Diabetes Res Clin Pract* **76**(1): 75-81.
- Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, et al. (2003). "Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance." *Nat Immunol* **4**(11): 1093-1101.
- Schaer, C., S. Hiltbrunner, et al. (2011). "HVEM signalling promotes colitis." *PLoS One* **6**(4): e18495.
- Schaer, D. A., A. D. Cohen, et al. (2010). "Anti-GITR antibodies--potential clinical applications for tumor immunotherapy." *Curr Opin Investig Drugs* **11**(12): 1378-1386.
- Schmidt-Ott, R., H. Schmidt, et al. (2006). "Improved serological diagnosis stresses the major role of *Campylobacter jejuni* in triggering Guillain-Barre syndrome." *Clin Vaccine Immunol* **13**(7): 779-783.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* **21**: 305-334.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* **6**(1): 90-98.
- See, D. M. and J. G. Tilles (1998). "The pathogenesis of viral-induced diabetes." *Clin Diagn Virol* **9**(2-3): 85-88.
- Seijkens, T., D. Engel, et al. (2010). "The role of CD154 in haematopoietic development." *Thromb Haemost* **104**(4): 693-701.
- Sejvar, J. J., A. L. Baughman, et al. (2011). "Population incidence of guillain-barre syndrome: a systematic review and meta-analysis." *Neuroepidemiology* **36**(2): 123-133.
- Seki, M., S. Oomizu, et al. (2008). "Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis." *Clin Immunol* **127**(1): 78-88.
- Serreze, D. V., H. D. Chapman, et al. (1996). "B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice." *J Exp Med* **184**(5): 2049-2053.

- Serreze, D. V., S. A. Fleming, et al. (1998). "B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **161**(8): 3912-3918.
- Shalaby, K. H., T. Jo, et al. (2012). "ICOS-Expressing CD4 T Cells Induced via TLR4 in the Nasal Mucosa Are Capable of Inhibiting Experimental Allergic Asthma." J Immunol **189**(6): 2793-2804.
- Shao, Z. and H. Schwarz (2011). "CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction." J Leukoc Biol **89**(1): 21-29.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-126.
- Shekhar, S. and X. Yang (2012). "The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency." Cell Mol Immunol **9**(5): 380-385.
- Shin, H. H., S. J. Kim, et al. (2005). "Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) stimulates osteoclast differentiation in response to receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in osteoclast cells." Bone **36**(5): 832-839.
- Shipkova, M. and E. Wieland (2012). "Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation." Clin Chim Acta **413**(17-18): 1338-1349.
- Shui, J. W., M. W. Steinberg, et al. (2011). "Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling." J Leukoc Biol **89**(4): 517-523.
- Sibilia, J., E. Chatelus, et al. (2010). "[How can we diagnose and better understand inflammatory myopathies? The usefulness of auto-antibodies]." Presse Med **39**(10): 1010-1025.
- Siddiqui, S., V. Mistry, et al. (2010). "Airway wall expression of OX40/OX40L and interleukin-4 in asthma." Chest **137**(4): 797-804.
- Simhadri, V. L., H. P. Hansen, et al. (2012). "A novel role for reciprocal CD30-CD30L signaling in the cross-talk between natural killer and dendritic cells." Biol Chem **393**(1-2): 101-106.
- Skowera, A., R. J. Ellis, et al. (2008). "CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope." J Clin Invest **118**(10): 3390-3402.
- Slattery, R. M., L. Kjer-Nielsen, et al. (1990). "Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-Ak transgenic mice." Nature **345**(6277): 724-726.
- Snell, L. M., A. J. McPherson, et al. (2010). "CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection." J Immunol **185**(12): 7223-7234.
- Solimena, M., F. Folli, et al. (1988). "Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus." N Engl J Med **318**(16): 1012-1020.
- Somada, S., H. Muta, et al. (2012). "CD30 Ligand/CD30 Interaction Is Involved in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease." Dig Dis Sci **57**(8): 2031-2037.
- Song, D. G. and D. J. Powell (2012). "Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy." Oncoimmunology **1**(4): 547-549.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu Rev Immunol **23**: 683-747.
- Spinicelli, S., G. Nocentini, et al. (2002). "GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis." Cell Death Differ **9**(12): 1382-1384.
- Sporici, R. A., R. L. Beswick, et al. (2001). "ICOS ligand costimulation is required for T-cell encephalitogenicity." Clin Immunol **100**(3): 277-288.
- Steck, A. K. and M. J. Rewers (2011). "Genetics of type 1 diabetes." Clin Chem **57**(2): 176-185.
- Stillwell, W. and H. T. Tien (1977). "Acidification, bleaching and oxygen consumption with chlorophyll-containing lipid microvesicles." Biochim Biophys Acta **461**(2): 239-252.

- Strutt, T. M., K. K. McKinstry, et al. (2012). "Memory CD4+ T-cell-mediated protection depends on secondary effectors that are distinct from and superior to primary effectors." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(38): E2551-2560.
- Sun, X., H. Yamada, et al. (2010). "CD30 ligand/CD30 plays a critical role in Th17 differentiation in mice." J Immunol **185**(4): 2222-2230.
- Sun, Y., S. E. Blink, et al. (2005). "Regulation of follicular dendritic cell networks by activated T cells: the role of CD137 signaling." J Immunol **175**(2): 884-890.
- Sun, Y., X. Lin, et al. (2002). "Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **168**(3): 1457-1465.
- Susuki, K., M. Odaka, et al. (2004). "Acute motor axonal neuropathy after Mycoplasma infection: Evidence of molecular mimicry." Neurology **62**(6): 949-956.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, et al. (1999). "B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha." Immunity **11**(4): 423-432.
- Tafari, A., A. Shahinian, et al. (2001). "ICOS is essential for effective T-helper-cell responses." Nature **409**(6816): 105-109.
- Tajima, N., K. Tezuka, et al. (2008). "Critical role of activation-inducible lymphocyte immunomediatory molecule/inducible costimulator in the effector function of human T cells: a comparative in vitro study of effects of its blockade and CD28 blockade in human beings and monkeys." Hum Immunol **69**(7): 399-408.
- Takeda, I., S. Ine, et al. (2004). "Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells." J Immunol **172**(6): 3580-3589.
- Takeda, K., Y. Harada, et al. (2008). "CD28 stimulation triggers NF-kappaB activation through the CARMA1-PKCtheta-Grb2/Gads axis." Int Immunol **20**(12): 1507-1515.
- Taplin, C. E. and J. M. Barker (2008). "Autoantibodies in type 1 diabetes." Autoimmunity **41**(1): 11-18.
- Targoff, I. N., A. E. Johnson, et al. (1990). "Antibody to signal recognition particle in polymyositis." Arthritis Rheum **33**(9): 1361-1370.
- Tesciuba, A. G., S. Subudhi, et al. (2001). "Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease." J Immunol **167**(4): 1996-2003.
- Tesselaar, K., Y. Xiao, et al. (2003). "Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo." J Immunol **170**(1): 33-40.
- Tezak, Z., E. P. Hoffman, et al. (2002). "Gene expression profiling in DQA1*0501+ children with untreated dermatomyositis: a novel model of pathogenesis." J Immunol **168**(8): 4154-4163.
- Thebault-Baumont, K., D. Dubois-Laforgue, et al. (2003). "Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice." J Clin Invest **111**(6): 851-857.
- Thomson, G., W. P. Robinson, et al. (1988). "Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus." Am J Hum Genet **43**(6): 799-816.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-547.
- Todd, J. A., H. Acha-Orbea, et al. (1988). "A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity." Science **240**(4855): 1003-1009.
- Todd, J. A. and L. S. Wicker (2001). "Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models." Immunity **15**(3): 387-395.
- Tousoulis, D., E. Androulakis, et al. (2010). "From atherosclerosis to acute coronary syndromes: the role of soluble CD40 ligand." Trends Cardiovasc Med **20**(5): 153-164.
- Troyanov, Y., I. N. Targoff, et al. (2005). "Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients." Medicine (Baltimore) **84**(4): 231-249.

- Tsugawa, T., K. Nikaido, et al. (2004). "Guillain-Barre syndrome with meningoencephalitis after *Campylobacter jejuni* infection." *Pediatr Infect Dis J* **23**(10): 966-968.
- Umeda, K., X. Sun, et al. (2011). "Innate memory phenotype CD4+ T cells play a role in early protection against infection by *Listeria monocytogenes* in a CD30L-dependent manner." *Microbiol Immunol* **55**(9): 645-656.
- van der Auwera, B. J., H. Heimberg, et al. (1993). "5' insulin gene polymorphism confers risk to IDDM independently of HLA class II susceptibility." *Diabetes* **42**(6): 851-854.
- van der Pas, J., G. J. Hengstman, et al. (2004). "Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**(1): 136-139.
- Vazquez-Abad, D. and N. F. Rothfield (1996). "Sensitivity and specificity of anti-Jo-1 antibodies in autoimmune diseases with myositis." *Arthritis Rheum* **39**(2): 292-296.
- Vehik, K. and D. Dabelea (2011). "The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof?" *Diabetes Metab Res Rev* **27**(1): 3-13.
- Velthuis, J. H., W. W. Unger, et al. (2010). "Simultaneous detection of circulating autoreactive CD8+ T-cells specific for different islet cell-associated epitopes using combinatorial MHC multimers." *Diabetes* **59**(7): 1721-1730.
- Vinay, D. S., B. K. Choi, et al. (2004). "CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses." *J Immunol* **173**(6): 4218-4229.
- Vinay, D. S. and B. S. Kwon (2012). "Immunotherapy of cancer with 4-1BB." *Mol Cancer Ther* **11**(5): 1062-1070.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." *Science* **273**(5271): 104-106.
- von Herrath, M., S. Sanda, et al. (2007). "Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?" *Nat Rev Immunol* **7**(12): 988-994.
- Voskammer, M., B. Korf, et al. (1989). "Paraneoplastic necrotizing myopathy: a rare disorder to be differentiated from polymyositis." *J Neurol* **236**(8): 489-490.
- Vu, M. D., X. Xiao, et al. (2007). "OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs." *Blood* **110**(7): 2501-2510.
- Wahl, P., R. Schoop, et al. (2002). "Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand)." *J Am Soc Nephrol* **13**(6): 1517-1526.
- Waitz, R., M. Fasso, et al. (2012). "CTLA-4 blockade synergizes with cryoablation to mediate tumor rejection." *Oncoimmunology* **1**(4): 544-546.
- Waksman, B. H. and R. D. Adams (1955). "Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants." *J Exp Med* **102**(2): 213-236.
- Walter, M. C., H. Lochmuller, et al. (2000). "High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study." *J Neurol* **247**(1): 22-28.
- Wang, J., J. C. Lo, et al. (2001). "The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT." *J Clin Invest* **108**(12): 1771-1780.
- Wang, J., T. Yoshida, et al. (2005). "Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11823-11828.
- Wang, W., K. Carper, et al. (2008). "PD-L1/PD-1 signal deficiency promotes allogeneic immune responses and accelerates heart allograft rejection." *Transplantation* **86**(6): 836-844.
- Wang, Y., S. K. Subudhi, et al. (2005). "The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses." *J Clin Invest* **115**(3): 711-717.
- Watanabe, M., S. Nakajima, et al. (2012). "AP-1 is involved in ICOS gene expression downstream of TCR/CD28 and cytokine receptor signaling." *Eur J Immunol* **42**(7): 1850-1862.

- Watanabe, M., K. Nakano, et al. (2011). "Targeted repression of overexpressed CD30 downregulates NF-kappaB and ERK1/2 pathway in Hodgkin lymphoma cell lines." *Oncol Res* **19**(10-11): 463-469.
- Watanabe, M., Y. Takagi, et al. (2008). "Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses." *J Immunol* **180**(8): 5222-5234.
- Watanabe, R., Y. Harada, et al. (2006). "Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation." *J Immunol* **177**(2): 1085-1091.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4." *Science* **270**(5238): 985-988.
- Watts, A. D., N. H. Hunt, et al. (1999). "A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'." *EMBO J* **18**(8): 2119-2126.
- Weinberg, A. D., A. T. Vella, et al. (1998). "OX-40: life beyond the effector T cell stage." *Semin Immunol* **10**(6): 471-480.
- Wenzlau, J. M., K. Juhl, et al. (2007). "The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(43): 17040-17045.
- Whitehead, G. S., R. H. Wilson, et al. (2012). "IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease." *J Allergy Clin Immunol* **129**(1): 207-215 e201-205.
- Wilson, E. H., C. Zaph, et al. (2006). "B7RP-1-ICOS interactions are required for optimal infection-induced expansion of CD4+ Th1 and Th2 responses." *J Immunol* **177**(4): 2365-2372.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* **322**(5899): 271-275.
- Wing, K., T. Yamaguchi, et al. (2011). "Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation." *Trends Immunol* **32**(9): 428-433.
- Wolf, C., T. Menge, et al. (2010). "Natalizumab treatment in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." *Arch Neurol* **67**(7): 881-883.
- Wright, C. W., J. M. Rumble, et al. (2007). "CD30 activates both the canonical and alternative NF-kappaB pathways in anaplastic large cell lymphoma cells." *J Biol Chem* **282**(14): 10252-10262.
- Wu, H. (2004). "Assembly of post-receptor signaling complexes for the tumor necrosis factor receptor superfamily." *Adv Protein Chem* **68**: 225-279.
- Wu, X., J. T. Rosenbaum, et al. (2011). "Activation of OX40 prolongs and exacerbates autoimmune experimental uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(11): 8520-8526.
- Xiao, S., C. R. Brooks, et al. (2012). "Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(30): 12105-12110.
- Xiao, S., B. Zhu, et al. (2011). "Tim-1 stimulation of dendritic cells regulates the balance between effector and regulatory T cells." *Eur J Immunol* **41**(6): 1539-1549.
- Xiao, X., W. Gong, et al. (2012). "New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo." *J Immunol* **188**(2): 892-901.
- Xiao, Y., V. Peperzak, et al. (2008). "CD27 instructs CD4+ T cells to provide help for the memory CD8+ T cell response after protein immunization." *J Immunol* **181**(2): 1071-1082.
- Xu, G., D. Liu, et al. (2007). "LIGHT is critical for IL-12 production by dendritic cells, optimal CD4+ Th1 cell response, and resistance to *Leishmania major*." *J Immunol* **179**(10): 6901-6909.
- Yagi, H., M. Matsumoto, et al. (1992). "Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice." *Eur J Immunol* **22**(9): 2387-2393.

- Yagi, J., Y. Arimura, et al. (2003). "Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development." J Immunol **171**(2): 783-794.
- Yao, S., Y. Zhu, et al. (2011). "B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human." Immunity **34**(5): 729-740.
- Ying, H., L. Yang, et al. (2010). "Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation." J Immunol **185**(3): 1375-1378.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." Nature **402**(6763): 827-832.
- You, S., L. Poulton, et al. (2009). "Key role of the GITR/GITRLigand pathway in the development of murine autoimmune diabetes: a potential therapeutic target." PLoS One **4**(11): e7848.
- Yu, K. Y., H. S. Kim, et al. (2003). "Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells." Biochem Biophys Res Commun **310**(2): 433-438.
- Yuki, N., H. Yoshino, et al. (1990). "Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following Campylobacter enteritis." Neurology **40**(12): 1900-1902.
- Zehn, D., C. King, et al. (2012). "TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory." Cell Mol Life Sci **69**(10): 1565-1575.
- Zeng, M., E. Guinet, et al. (2009). "B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells." Transpl Immunol **20**(3): 171-179.
- Zhang, Y., Y. Chung, et al. (2006). "Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11695-11700.
- Zhou, P., L. L'Italien, et al. (2007). "Pivotal roles of CD4+ effector T cells in mediating agonistic anti-GITR mAb-induced-immune activation and tumor immunity in CT26 tumors." J Immunol **179**(11): 7365-7375.
- Zhou, Z., K. Hoebe, et al. (2005). "Antagonism between MyD88- and TRIF-dependent signals in B7RP-1 up-regulation." Eur J Immunol **35**(6): 1918-1927.
- Ziegler, A. G., R. Ziegler, et al. (1989). "Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type I diabetes." Diabetes **38**(10): 1320-1325.
- Zietara, N., M. Lyszkiewicz, et al. (2011). "ICOS-dependent stimulation of NKT cells by marginal zone B cells." Eur J Immunol **41**(11): 3125-3134.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le modèle murin le plus utilisé pour le diabète de type 1 est la souris NOD. L'activation des lymphocytes T autoréactifs vis à vis des cellules bêta nécessite la reconnaissance par le TCR de l'auto antigène présenté par le CMH ainsi que des signaux de co stimulation.

Nous apportons la preuve que la voie de costimulation ICOS/ICOSL est indispensable au développement du diabète chez la souris NOD. En effet, les souris invalidées pour le gène *Icos* ou *IcosL* sont protégées du diabète. Nous avons démontré que cette protection est liée à un défaut d'activation des LT diabétogènes.

De façon inattendue, nous avons observé chez ces souris ICOS^{-/-} et ICOSL^{-/-} une neuromyopathie. Cette pathologie se développe parallèlement au diabète chez la souris ICOSL^{+/+}. Sur le plan histologique, le muscle strié périphérique et le nerf périphérique est envahi par un infiltrat lymphocytaire et par des cellules présentatrices d'antigène.

Nous avons démontré par des expériences de transfert adoptif que la neuromyopathie est une maladie auto-immune dépendante des lymphocytes T -CD4⁺. Pour confirmer ces données, nous avons étudié les souris NOD ICOSL^{-/-} CIITA^{-/-}. Ces souris sont dépourvues de lymphocytes T -CD4⁺ et ne développent pas de neuromyopathie ni de diabète. De même, nous avons étudié les souris NOD ICOSL^{-/-} bêta2m^{-/-}. Ces souris sont dépourvues de lymphocytes T-CD8⁺ et développent une neuromyopathie.

Cette déviation de l'auto-immunité est liée à l'interaction entre les LT et les lymphocytes B via le signal ICOS/ICOSL. Nous avons prouvé via des expériences de transfert et de chimères que l'absence de signal ICOS/ICOSL entre les lymphocytes T et les lymphocytes B oriente l'auto-immunité vers le système nerveux périphérique et le muscle strié.

Enfin, l'analyse du spectre de spécificité des anticorps présent chez la souris ICOSL^{-/-} par western blot puis par spectrométrie de masse a précisé les cibles antigéniques de la myopathie.

L'invalidation de la voie ICOS/ICOSL conduit donc à une déviation de l'auto-immunité du pancréas vers le muscle et le système nerveux périphérique. Ces données prouvent que la voie ICOS/ICOSL est indispensable à l'initiation du diabète, mais aussi au contrôle de l'auto-immunité.