



HAL
open science

Effet des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR sur le muscle strié squelettique

Louiza Arouche-Delaperche

► **To cite this version:**

Louiza Arouche-Delaperche. Effet des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR sur le muscle strié squelettique. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066389 . tel-01589654

HAL Id: tel-01589654

<https://theses.hal.science/tel-01589654>

Submitted on 18 Sep 2017

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

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

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Complexité du vivant ED515

Centre de recherche en myologie/ Équipe muscle inflammatoire et thérapies innovantes

Effet des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR sur le muscle strié squelettique

Par Louiza AROUCHE-DELAPERCHE

Thèse de doctorat en Immunologie

M. Olivier BENVENISTE
Mme Gillian BUTLER-BROWNE

Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Soutenue publiquement le 16 Septembre 2016 devant un jury composé de :

M. Pascal LEBLANC
Mme Anne TOURNADRE
M. Onnik AGBULUT
M. Laurent ARNAUD

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Olivier et Gill de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir accompagnée tout au long de ma thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement Yves Allenbach. Merci pour ton aide, soutien et accompagnement malgré ton emploi du temps très chargé. Merci aussi pour tes conseils et ta motivation.

Je remercie les membres du jury, M. Leblanc, Mme Tournadre, M. Agbulut et M. Arnaud d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci aux membres de mon équipe, Leandro, Xavi, Ségolène, Damien, Gaele, Wladimir et Akinori, pour leur soutien au quotidien.

Merci à toutes les personnes du laboratoire qui ont aidé à réaliser ce travail : Esma, Khadija, Vincent, et surtout Kamel pour m'avoir appris la culture cellulaire et Bruno pour son aide en imagerie.

Un grand merci à Alexandra pour la correction de mon français.

Ce travail est aussi le travail de ma famille : mon mari Rodolphe, ma jumelle Yasmina, mes parents Mouloud et Djedjigua, mes sœurs Farida, Nassima et Hayet mes chères Habou et Jida ainsi que mes deux Jeddi.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	3
Table des illustrations	4
Table des tableaux.....	5
INTRODUCTION	6
I. Muscle squelettique	7
I. 1. Structure du muscle squelettique.....	7
I. 2. Régénération musculaire.....	9
a. Cellules satellites.....	9
b. Processus de différenciation cellulaire.....	11
c. Rôle de l'immunité dans la régénération.	13
I. 3. Atrophie musculaire.....	17
a. Définition.....	17
b. Facteurs régulant l'atrophie musculaire	17
c. Cytokines inflammatoires et atrophie	19
I. 4. Nécrose musculaire.....	23
II. Auto-immunité et auto-anticorps	26
II. 1. La réponse immunitaire : le soi et le non-soi	26
II. 2. Distinction soi et du non-soi	27
a. La tolérance centrale.....	28
b. La tolérance périphérique LB et LT.....	30
II. 3. Les Anticorps	32
II. 4. Auto-immunité & auto-anticorps.....	33
III. Myopathies inflammatoires idiopathiques.....	38
III. 1. Définition.....	38
III. 2. Classification	39
III. 3. Myopathie nécrosante auto-immune & auto-anticorps	43
III. 4. Histologie des MNAI	49
III. 5. Pronostique et traitement.....	51
VI. Objectifs.....	54
RESULTATS 1	56
RESULTATS 2.....	95
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	124
BIBLIOGRAPHIE	140

ABBREVIATIONS

aAg	auto-antigène
Ac	anticorps
ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps
<i>AIRE</i>	gène régulateur d'auto-immunité
<i>APECED</i>	polyendocrinopathie auto-immune de type 1
BAFF	<i>B-cell activating factor of the TNF family</i>
BCR	<i>B-cell receptors</i>
BMPS	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
Bregs	LB régulateur
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellules présentatrice d'antigènes
CPK	créatine phosphokinase
CXCR1	<i>C-X-C motif chemokine receptor 1</i>
DAMPs	Molécules associées aux blessures
FGF6	Fibroblast Growth Factor 6
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>human leucocytes antigens</i>
HMGCR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin growth factor 1
IL-	interleukine
KO	knock-out
LB	lymphocyte B
LT	lymphocyte T
MAC	complexe d'attaque membranaire
MII	myopathies inflammatoires idiopathiques
MNAI	myopathies nécrosantes auto-immunes
NF-AT	facteurs nucléaires des LT activés
NK	cellule <i>Natural killer</i>
NO	monoxide d'azote
PAMPs	molécule associée au motif pathogène
PPAR-F	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-F</i>
PRRs	récepteur du motif pathogène
RAG	Recombination Activating Gene
ROS	Espèce réactive oxygénée
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
TCR	<i>T-cell receptors</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β family</i>
TNF	facteur de nécrose tumorale
Tregs	LT régulateur

Table des illustrations

Figure 1. Structure du muscle squelettique.

Figure 2. Caractéristiques des cellules satellites.

Figure 3. Représentation de la régulation moléculaire de l'activation des cellules satellites lors de la régénération musculaire.

Figure 4. Rôle des cellules immunitaires dans la réparation musculaire.

Figure 5. Rôle de l'IL-4 dans la croissance musculaire.

Figure 6. Régulation de la masse musculaire.

Figure 7. Classification des MII en fonction des aAc.

Figure 8. Représentation schématique de la structure de la protéine SRP.

Figure 9. Représentation schématique du site antigénique des aAc anti-SRP₅₄.

Figure 10. Représentation de la structure de l'enzyme HMGCR.

Figure 11. Histologie musculaire de patient MNAI à anti-SRP.

Figure 12. Histologie des MNAI à anti-HMGCR.

Figure 13. Schéma récapitulatif des évènements suggérés au cours des MNAI.

Figure 14. Schéma récapitulatif des évènements *in vitro*.

Table des tableaux

Tableau 1 : Illustration des différentes causes conduisant à la nécrose musculaire.

Tableau 2. Auto-anticorps et maladies auto-immunes spécifiques d'organe.

Tableau 3. Critères histologiques et sérologiques permettant le diagnostic des MII.

Tableau 4. Aspect clinique associée aux auto-anticorps.

INTRODUCTION

I. Muscle squelettique

Le muscle squelettique représente une proportion importante de la masse corporelle, environ 30% chez la femme et 38% chez l'homme (Janssen *et al.*, 2000).

Le muscle squelettique contribue à de multiples fonctions. Ses propriétés d'être excitable, contractile, élastique et extensible lui permettent de générer force et mouvement nécessaires à la vie (la locomotion et le maintien de la posture). Le muscle squelettique a aussi un rôle métabolique, il constitue un réservoir d'acides aminés ainsi que des hydrates de carbone. Il a aussi un rôle fondamental dans l'homéostasie thermique.

I. 1. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique a une structure organisée, caractérisée par un ensemble de fibres musculaires, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses.

En périphérie, le muscle est circonscrit par une enveloppe peu compliante : l'aponévrose, qui délimite des groupes musculaires. Chaque muscle est délimité en périphérie par un tissu conjonctif appelé épimysium. Au sein d'un muscle, on individualise des faisceaux de fibres musculaires, eux-mêmes délimités par un autre tissu conjonctif appelé périmysium. Ce dernier contient les vaisseaux sanguins nécessaires à l'oxygénation du tissu et à l'approvisionnement en nutriments. Chaque fibre musculaire est aussi entourée d'un tissu conjonctif appelé endomysium (figure 1).

L'unité fondamentale du muscle squelettique est la fibre musculaire. Cette immense cellule de forme cylindrique allongée est multinucléée. Les noyaux ont une localisation périphérique. Chaque fibre musculaire est constituée de myofilaments minces d'actine et de myofilaments

épais de myosine, représentant les éléments contractiles du muscle et appelé sarcomères. Entre la membrane plasmique des fibres musculaires (appelée aussi sarcolemme) et la lame basale résident les cellules souches musculaires appelées cellules satellites ou myoblastes, qui contribuent à la croissance, la réparation et la régénération musculaire.

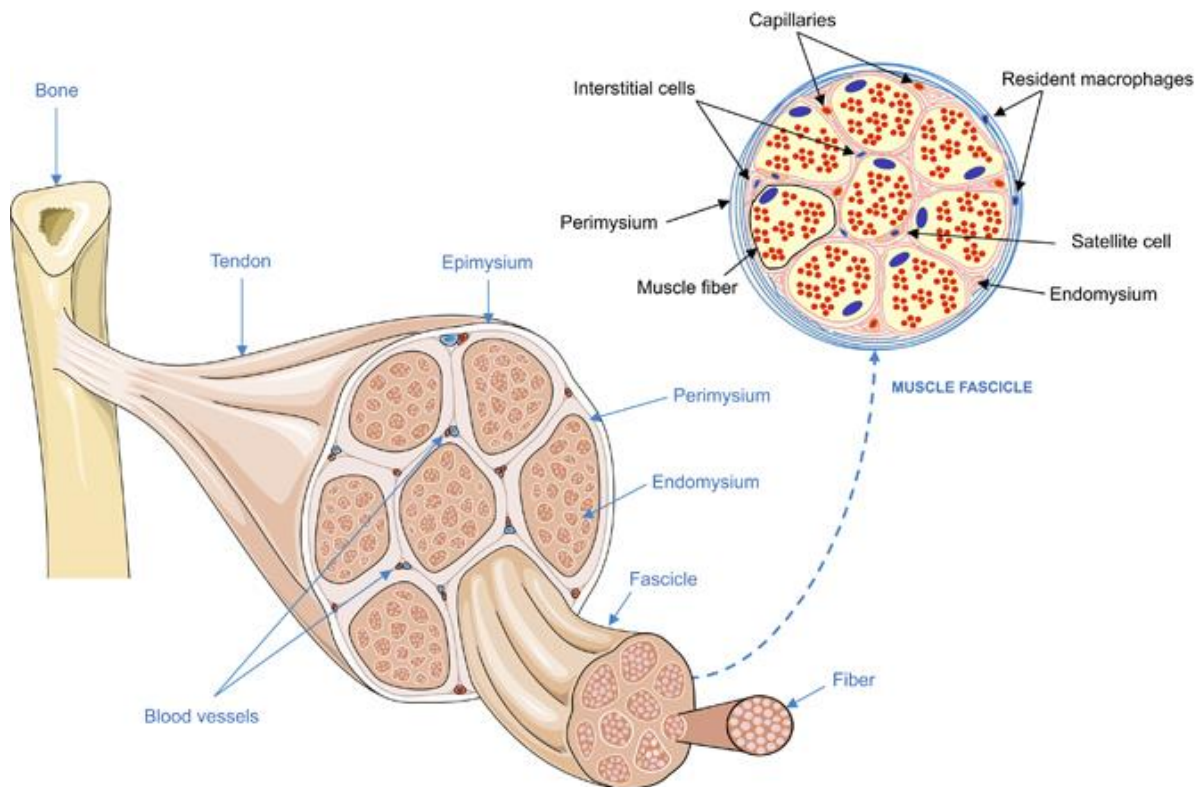


Figure 1. Structure du muscle squelettique.

Le muscle squelettique est attaché aux os par les tendons, constitués de tissu conjonctif. Le muscle est entouré par un tissu conjonctif appelé épimysium qui maintient l'intégrité structurale du tissu. Des groupes de fibres musculaires appelés fascicules, sont recouverts d'un autre tissu conjonctif appelé périmysium. Dans chaque fascicule, chaque fibre est recouverte d'un tissu conjonctif fin appelé endomysium. Les vaisseaux sanguins y résident, ils fournissent les nutriments et l'oxygénation nécessaire. A proximité des fibres se trouvent les cellules satellites (Sciorati et al., 2016).

I. 2. Régénération musculaire

a. Cellules satellites

La formation de fibres musculaires est un processus complexe, régulé par différents mécanismes moléculaires entraînant la différenciation des cellules satellites (ou myoblastes) et leur fusion.

Dans le muscle squelettique adulte, les cellules satellites constituent 2 à 7% des noyaux associés aux fibres (Armand et al., 1983). Les cellules satellites ont été décrites pour la première fois en 1961 par deux auteurs, Mauro et Katz, grâce à la microscopie électronique (Katz, 1961; Mauro, 1961). Ces cellules sont des cellules pluripotentes présentant plusieurs caractéristiques de cellules souches (Dhawan and Rando, 2005; Zammit and Beauchamp, 2001). Ce sont des progénitrices des cellules myogéniques, elles ont un rôle important dans la croissance, la réparation ainsi que le maintien du muscle squelettique (Seale and Rudnicki, 2000). A l'état physiologique, les cellules satellites sont normalement quiescentes et constituent la réserve en cellules souches. Elles ont alors une morphologie allongée avec peu d'organites et un noyau hétérochromatique caractéristique des cellules inactives (Schultz, 1976). Elles résident dans une niche à la surface de chaque fibre musculaire. Les caractéristiques du micro-environnement de la niche, où résident ces cellules satellites, déterminent l'état d'activation des myoblastes : état quiescent ou état activé (Yin et al., 2013).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré qu'il existait de nombreux facteurs permettant d'activer les cellules satellites. Les principaux facteurs sont des facteurs de croissance : les *fibroblast growth factor 6* (FGF6), *hepatocyte growth factor* (HGF), *bone morphogenetic proteins* (BMPS), *insulin growth factor* (IGF), mais aussi des cytokines : *transforming Growth factor-β family* (TGF-β), interleukine 6 (IL-6) et des molécules impliquées dans

l'inflammation comme le NO (*nitric oxide* ou monoxyde d'azote) (Chargé and Rudnicki, 2004).

Les cellules satellites sont identifiables non seulement grâce à leurs topographies particulières mais aussi grâce à des marqueurs spécifiques. Deux principaux marqueurs ont été identifiés : les facteurs de transcription Pax7 (Seale et al., 2000) et Pax3, ce dernier étant un paralogue de Pax7. Pax3 est indispensable à la myogenèse embryonnaire mais son expression est diminuée dans les muscles chez l'adulte, à l'exception de certains comme le diaphragme (Relaix et al., 2006). Les protéines Pax7 et Pax3 se fixent spécifiquement sur le même site d'ADN, suggérant qu'elles régulent les mêmes gènes (Schäfer et al., 1994). De nombreuses études ont démontré le rôle indispensable des cellules satellites dans la régénération musculaire, en particulier chez la souris après invalidation du gène Pax7 (Lepper et al., 2011; Murphy et al., 2011; Sambasivan et al., 2011). L'absence des cellules satellite exprimant Pax7 conduit à une perte de régénération dans un muscle endommagé et induit le recrutement de cellules inflammatoires ainsi que de cellules adipocytes. La régénération peut être complètement restaurée grâce l'ajout de cellules exprimant Pax7 (Sambasivan et al., 2011).

Les cellules satellites expriment aussi d'autres marqueurs comme le c-met (Cornelison and Wold, 1997), la m-cadhérine (Cornelison and Wold, 1997; Irintchev et al., 1994), les protéines d'adhésion NCAM (CD56) (Covault and Sanes, 1986), la cavéoline-1, l'intégrine $\alpha 7$ et les protéines de l'enveloppe nucléaire lamine A/C et émerine (Gnocchi et al., 2009) (Figure 2).

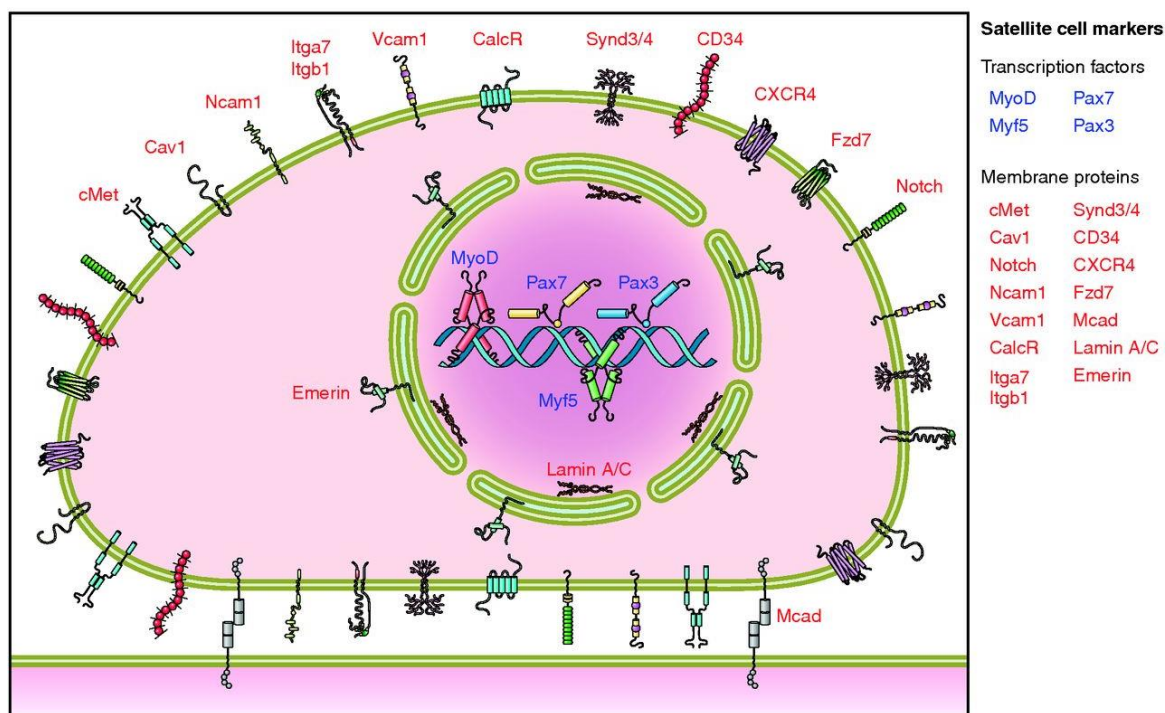


Figure 2. Caractéristiques des cellules satellites.

Les différents marqueurs et protéines exprimés par les cellules satellites musculaires. (Yin et al., 2013).

b. Processus de différenciation cellulaire

La régénération musculaire est un processus qui se produit après un dommage musculaire. Elle implique l'activation, la différenciation et la maturation des cellules satellites. Les voies de régénération musculaire peuvent être divisées en cinq grandes étapes : (A) l'activation des cellules satellites, (B) leur prolifération, (C) leur différenciation, (D) leur fusion, (E) la formation de myotubes et (F) leur retour à l'état de quiescence (figure 3). L'activation des cellules satellites consiste à sortir de la phase G0 et entrer dans le cycle cellulaire. L'activation des cellules satellites se traduit morphologiquement par un grossissement du noyau et une hypertrophie des organites et du cytoplasme (Lepper et al., 2011; Schultz, 1976).

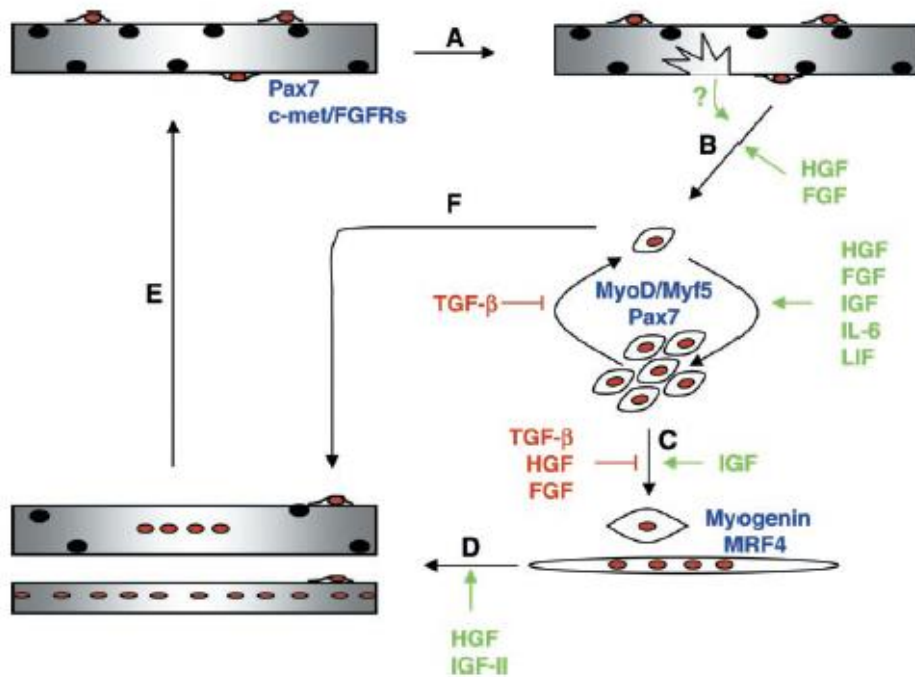


Figure 3. Représentation de la régulation moléculaire de l'activation des cellules satellites lors de la régénération musculaire.

A. Après une lésion, les cellules satellites quiescentes sont activées et commencent à proliférer. B. Les cellules satellites activées expriment fortement les MRF MyoD et Myf5. C. La phase proliférative est suivie de la phase de différenciation. D. Les myoblastes fusionnent avec les fibres endommagées pour la réparation ou la formation de nouvelles fibres. La différenciation terminale des myoblastes est caractérisée par une expression élevée de myogénine et de MRF4. E. À la fin, la fibre réparée ou nouvelle ressemble à la fibre originale. F. Durant la régénération, quelques cellules satellites retournent à leur état quiescent pour reconstituer le pool de cellules satellites. Représentation de plusieurs facteurs de croissance avec un rôle régulateur positif (flèche verte) ou négatif (ligne rouge) sur les cellules (Chargé and Rudnicki, 2004).

Après activation, les cellules satellites commencent à exprimer fortement les facteurs de régulation myogéniques MyoD, Pax7 et Myf5, et prolifèrent. A ce stade, les cellules sont appelées myoblastes. Ces derniers quittent alors leur niche et migrent dans le muscle.

Les myoblastes commencent à exprimer le facteur de transcription myogénine conduisant à leur fusion et à la formation de fibres multinucléées, ou fusionnent avec des fibres préexistantes. Les fibres multinucléées (myotubes) sont caractérisées par l'expression de Mrf4 et de la chaîne lourde de la myosine. Les myoblastes sont aussi capables de s'auto-renouveler

en passant par une division cellulaire asymétrique conduisant à générer des cellules satellites (Le Grand and Rudnicki, 2007; Wang et al., 2013; Weintraub, 1993; Yin et al., 2013).

c. Rôle de l'immunité dans la régénération.

❖ Rôle des macrophages

Si la présence de l'inflammation a longtemps été considérée comme un événement négatif dans le muscle squelettique, quelques travaux récents ont montré le rôle bénéfique des macrophages dans la réparation musculaire.

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée absentes dans le muscle dans les conditions physiologiques normales mais présentes en cas de lésion ou d'inflammation. Elles sont impliquées dans la régénération musculaire, dans l'inflammation et le nettoyage après nécrose ainsi que dans la différenciation myogénique.

Il a été montré que les macrophages avaient un rôle très important dans la régénération musculaire (Paylor et al., 2011). La déplétion en macrophages durant les premières 24 heures suivant une blessure conduit à un défaut dans la régénération du muscle squelettique, caractérisé par une persistance de quelques fibres en nécrose et de cellules immunitaires à 9 jours après la blessure (Summers-DeLuca et al., 2007). Lors d'une lésion musculaire, les macrophages sont recrutés grâce aux chimiokines sécrétées par les cellules musculaires comme les CCL2 et CXCR1. Il a été démontré *in vitro* que les cellules myogéniques sécrètent des chimiokines comme le CCL2, CXCR1, CCL22 et le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et de ce fait attirent les monocytes (Saclier et al., 2013).

Les macrophages sont classés en deux sous-classes :

- Les M1 correspondent aux macrophages avec un phénotype d'activation classique

« pro-inflammatoire » et une fonction du nettoyage phagocytaire.

- Les M2 correspondant aux macrophages avec un phénotype d'activation alternative « anti-inflammatoire » et une fonction régulatrice et réparatrice.

A l'arrivée dans le tissu endommagé, les macrophages ont un phénotype inflammatoire M1 caractérisé par la sécrétion du facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IL-6, l'IL-1 β et l'inhibiteur sécrétoire de la protéase de leucocyte (SLPI). Après la phagocytose des corps apoptotiques ou nécrotiques, les macrophages changent de phénotype et deviennent anti-inflammatoires M2, caractérisés par la forte expression du facteur de croissance-A (TGF-A), de l'IL-10 et du *peroxisome proliferator-activated receptor-F* (PPAR-F) (Chazaud, 2014; Chazaud et al., 2009) (Figure 4).

Trois populations de macrophages M2 sont retrouvées : M2a associée à la fibrogénèse et l'angiogénèse après stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13 ; M2b induite par des complexes immuns ou l'IL-1 β et les anti-inflammatoires ; et M2c, activée par l'IL-10 ou les glucocorticoïdes, et associée à la diminution de l'inflammation et à la réparation tissulaire. Des études ont révélé que les macrophages pro-inflammatoires M1 stimulent la prolifération des myoblastes, mais que les macrophages anti-inflammatoires M2 induisent leur différenciation, *in vitro* (Arnold et al., 2007) et *in vivo* (Bencze et al., 2012).

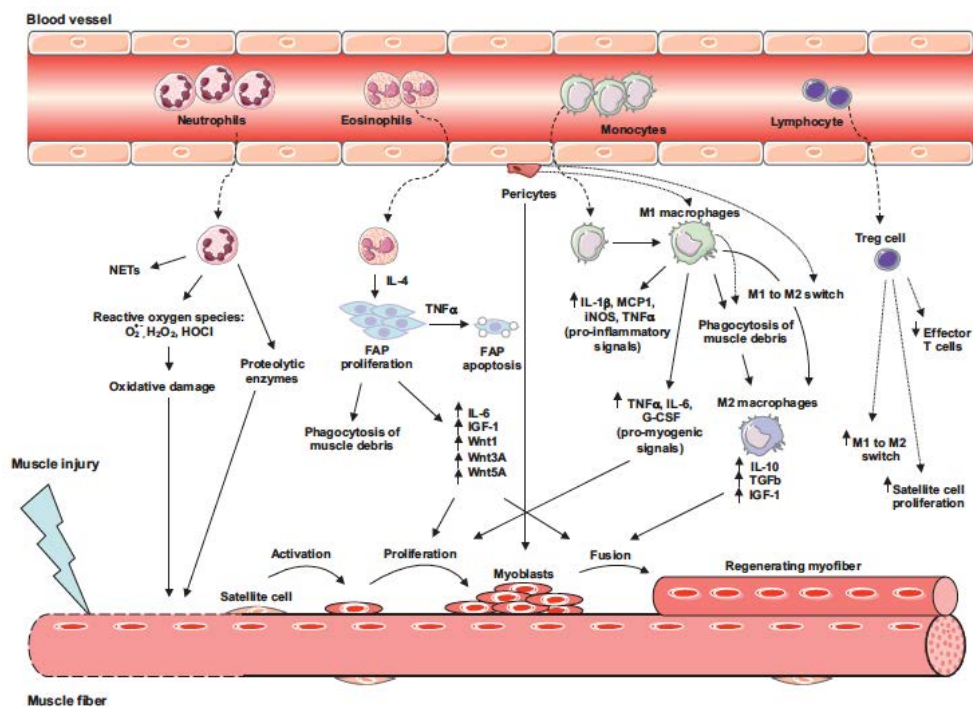


Figure 4. Rôle des cellules immunitaires dans la réparation musculaire (Sciorati et al., 2016).

❖ Rôle des cytokines

Les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires ou par le muscle lui-même ont un rôle direct sur la croissance des myotubes. Il a été décrit que les cytokines IL-4 et IL-13 induisent fortement la fusion des cellules myogéniques (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007) (figure5). Dans un modèle de souris sécrétant une grande quantité de cytokines, incluant l'IL-4 et l'IL-6, par les macrophages, il a été démontré que les cellules myogéniques augmentent significativement leurs capacités régénératives. Cependant, l'inhibition des cytokines IL-4 et IL-6 par des anticorps bloquants abolit le phénomène (Meng et al., 2014). Un autre modèle de souris, où l'IL-4 et IGF-1 sont diminués, a montré une réduction de la masse musculaire avec un défaut de régénération après blessure (Charvet et al., 2006). Il a été démontré, dans une autre étude, que ce phénotype pouvait être corrigé avec l'ajout de l'IL-4 mais pas d'IL-6 (Guerci et al., 2012).

La sécrétion des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13 est connue comme étant sous le contrôle

des facteurs nucléaires des LT activés (NF-AT) dans les cellules lymphoïdes (Rao et al., 1997). NF-AT est un ensemble de facteurs de transcriptions impliqué dans la production cytokinique lors de la réponse immunitaire. Des études ont montré que les souris déficientes en NF-ATc2 ou NF-ATc3, avaient une masse musculaire réduite, conséquence d'une diminution de la taille ou du nombre des fibres (Horsley et al., 2001; Kegley et al., 2001). Il a été démontré que le NF-ATc2 était impliqué dans le contrôle de la fusion et de la croissance des myoblastes. Il a un rôle direct sur la sécrétion de cytokines comme l'IL-4. Le blocage de la cytokine IL-4 ou de son récepteur *in vitro* ou *in vivo* conduit à une réduction de taille des myotubes ou des fibres (Horsley et al., 2003). Le NF-ATc3 induit le facteur de croissance IGF-1, qui est un puissant facteur impliqué dans l'hypertrophie musculaire (Musarò and Rosenthal, 1999; Vandeburgh et al., 1991). L'IGF1 stimule la sécrétion de l'IL-13 par les myotubes, via les voies AKT et le NF-ATc2 ; cela conduit au recrutement des myoblastes pour la fusion (Jacquemin et al., 2007). Les NF-AT montrent un rôle spécifique lors de la différenciation myogénique en régulant l'activation cytokiniques (Abbott et al., 1998). Ils sont eux-mêmes régulés par des voies calcium-dépendantes (Delling et al., 2000).

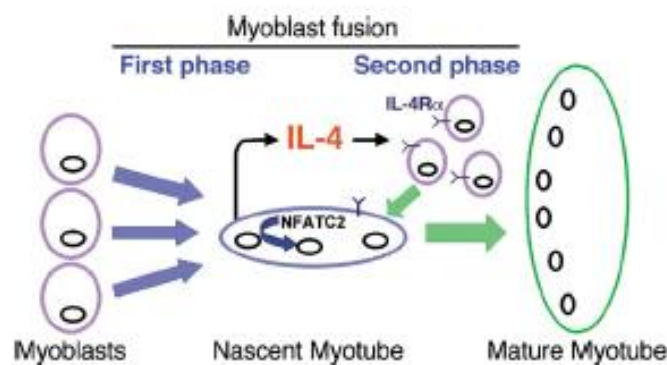


Figure 5. Rôle de l'IL-4 dans la croissance musculaire.

La fusion des myoblastes se fait en deux phases. La première phase consiste en la différenciation des myoblastes et la fusion primaire qui donnent naissance à un myotube jeune avec un nombre limité de noyaux. La seconde phase est une phase de croissance où d'autres myoblastes fusionnent avec les myotubes jeune. Sous le contrôle des NF-ATc2, les myotubes jeunes sécrètent de l'IL-4 qui induit la fusion secondaire via son récepteur. Cela conduit à la formation de myotubes matures (Horsley et al., 2003).

D'autres cytokines peuvent aussi avoir un impact sur la myogenèse. Le TNF agit sur la croissance et la différenciation des myoblastes en altérant les taux circulatoires des hormones de croissance ou en inhibant la différenciation des myoblastes, ce qui peut conduire à une mauvaise régénération musculaire (Guttridge et al., 2000; Layne and Farmer, 1999; Li et Reid, 2000). Par contre à faible dose, le TNF induit une différenciation des cellules musculaires (Chen et al., 2007)

I. 3. Atrophie musculaire

a. Définition

L'homéostasie de la masse musculaire implique un équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique, entre les processus anaboliques et cataboliques. La masse musculaire augmente (hypertrophie) lors d'un excès de synthèse protéique alors que l'atrophie musculaire survient en cas d'excès de dégradation protéique (Bonaldo and Sandri, 2013). L'atrophie musculaire est définie par la diminution de la taille des fibres musculaire induite par la perte protéique, d'organites et de cytoplasme. Cependant le nombre de noyaux n'est pas affecté par ce processus (Gundersen and Bruusgaard, 2008). La perte de masse musculaire contribue à une faiblesse et une fatigabilité, avec une perte de mobilité qui peut se traduire par un handicap.

b. Facteurs régulant l'atrophie musculaire

Le phénomène d'atrophie peut être observé au cours de nombreuses situations différentes. En particulier lors de situations où il existe un catabolisme cellulaire important, telles que les infections aiguës (sepsis) ou chroniques (infection non contrôlée par le VIH), les maladies néoplasiques ou l'insuffisance cardiaque.

La synthèse protéique, quant à elle, est régulée par des facteurs de croissance comme l'insuline-IGF-1 (facteur de croissance insuline 1). Cette croissance induit l'activation d'une cascade protéique : la voie AKT/mTOR/FoxO (Glass, 2010). La dégradation protéique implique plusieurs mécanismes ou systèmes : la voie ubiquitine-protéasome (UPS) mais aussi de l'autophagie (lysosomes activés par les facteurs de transcription FoxO) (Sandri et al., 2004; Zhao et al., 2007) et le NF- κ B (Cai et al., 2004). Les gènes FoxO, NF- κ B sont donc considérés comme des atrogènes : des gènes reliés à l'atrophie (Figure 6). Par ailleurs, l'atrogin-1 (*MAFbx*) et le MuRF1 (*Trim63*) sont des ubiquitine-ligases spécifiques liées à l'atrophie.

Dans un modèle *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, il a été décrit que l'inhibition de Foxo3 protège l'induction de l'expression d'atrogin-1 lors d'un jeûne (Sandri et al., 2004). Dans un autre modèle de knockdown pour atrogin-1 chez les souris ainsi que dans un modèle *in vitro*, les auteurs ont démontré une protection de la perte musculaire durant le jeûne (Cong et al., 2011). Par contre chez des souris knock-out pour MuRF1 (mais pas atrogin-1), les auteurs ont montré un défaut de développement d'atrophie induite par la dexaméthasone (Baehr et al., 2011).

Plusieurs facteurs, incluant les cytokines inflammatoires, agissent sur différentes molécules pouvant conduire à une activation des gènes induisant de l'atrophie.

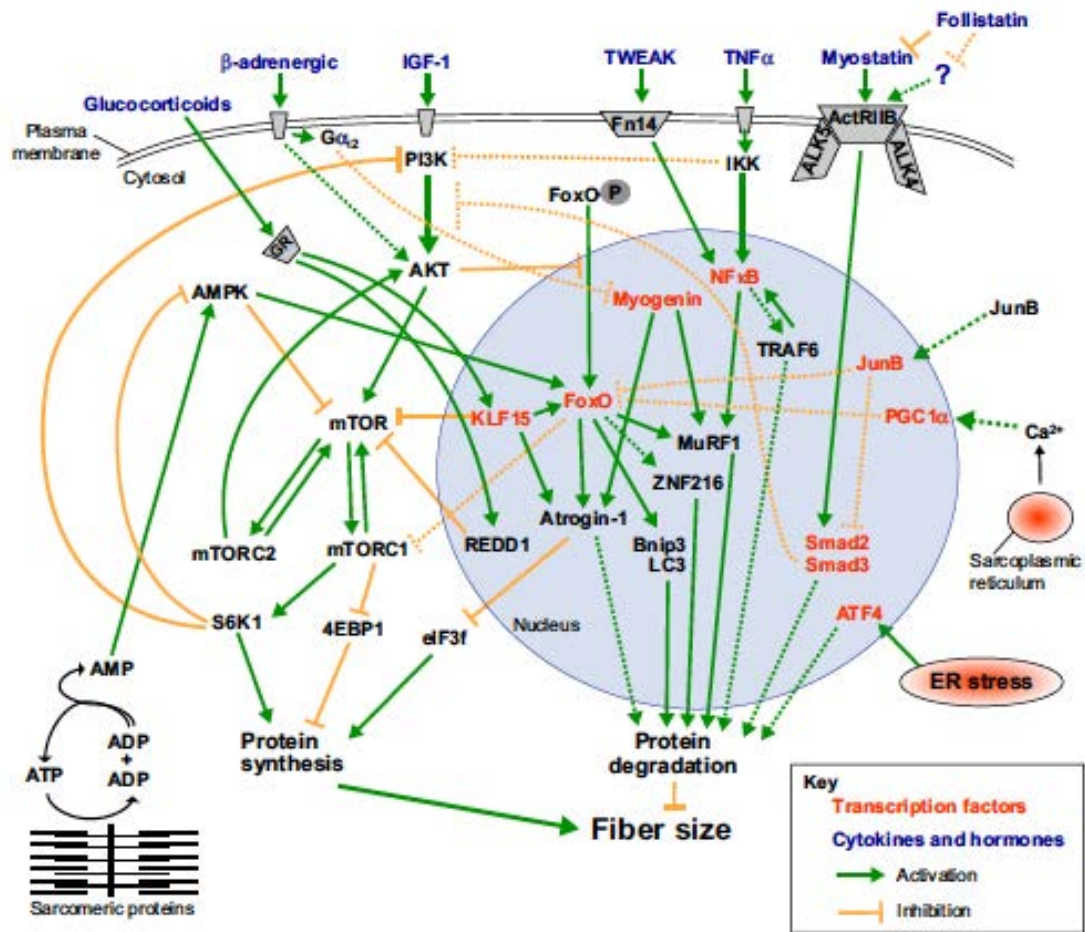


Figure 6. Régulation de la masse musculaire.

La synthèse et la dégradation protéique sont régulées par plusieurs stimuli, qui activent différentes voies de signalisation. Les lignes discontinues représentent les voies dont les mécanismes moléculaires dans le muscle squelettique adulte ne sont pas encore complètement définis. GR : glucocorticoid receptor. (Bonaldo and Sandri, 2013).

c. Cytokines inflammatoires et atrophie

Les situations pathologiques associées à l'atrophie, comme le cancer ou les infections, sont des conditions caractérisées par une inflammation systémique impliquant des cytokines pro-inflammatoires.

❖ TNF

Le rôle déterminant du TNF au cours de l'atrophie a pu être montré (Espat et al., 1994; Reid and Li, 2001; Tisdale, 1999). L'importance de ce rôle dans la perte de la masse musculaire a même conduit à sa première appellation : la « cachectine » (Tracey et al., 1988). Le TNF est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de l'immunité, les lymphocytes et les macrophages, mais aussi par les cellules du muscle strié (Chen et al., 2007). Le TNF régule plusieurs aspects de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Le TNF stimule la voie catabolique via différents mécanismes, en stimulant l'activation des voies protéases-ubiquitine (Llovera et al., 1998; Steffen et al., 2008).

Le taux circulant de TNF chez un sujet sain est de quelques pg/ml, ce taux est indétectable par les tests de mesure courants (Nakashima et al., 1995; Vreugdenhil et al., 1992). En revanche, lors d'une maladie inflammatoire, ces taux augmentent et peuvent atteindre 3 ng/ml chez un patient atteint d'arthrite rhumatoïde (Vreugdenhil et al., 1992) et 6 ng/ml chez un malade du cancer (Nakashima et al., 1995). Ces valeurs cliniques correspondent aux taux sériques induisant de l'atrophie musculaire dans les modèles animaux (Oliff et al., 1987; Tayek, 1996; Tracey et al., 1988).

Le mécanisme conduisant à une atrophie par le TNF a été proposé par Li et Reid. Le schéma proposé est que le TNF induit une dégradation protéique en activant la voie NF- κ B (Li and Reid, 2000). Ce dernier est le résultat de la liaison du TNF à son récepteur de type I (TNFR1) (Llovera et al., 1998), qui va induire une augmentation de la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par la mitochondrie (Li and Reid, 2000). Notons que le second récepteur de TNF n'induit pas cette observation, il est même associé à un rôle protecteur (Sasi et al., 2015). Un traitement par la catalase (un antioxydant) a montré une inhibition de l'activation du NF- κ B ainsi qu'une protection contre la perte protéique (Li et al., 1998). L'activation du NF- κ B

augmente l'activité des voies protéasome-ubiquitine, qui accélèrent la dégradation des protéines musculaires et donc favorisent la perte musculaire (Reid and Li, 2001).

Il a été aussi montré que le TNF augmente la production de l'IL-6 (Roher et al., 2008). L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire induite lors de réponses immunitaires mais qui est également définie comme une myokine, car produite par le muscle en réponse à des stimuli comme l'exercice et la nutrition (Pedersen and Fischer, 2007).

❖ IL-6

L'IL-6 est par définition une cytokine avec un rôle important dans la réponse immunitaire. Elle induit une différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps. L'IL-6 est aussi impliquée dans la croissance et la différenciation des lymphocytes T. Des souris KO à l'IL-6 produisent moins d'IgG/ IgA mais pas d'effet sur les IgM et montrent une altération de la réponse lymphocytaire T (Hirano, 1998).

Dans des modèles animaux atteints d'inflammation et de tumeurs induisant une cachexie, les taux sériques d'IL-6 élevés ainsi que d'autres médiateurs de l'inflammation ont été relevés (Fearon et al., 2012). L'administration de taux élevés d'IL-6 chez le rat ou la souris, pour une longue durée, induit une augmentation de la dégradation protéique (Goodman, 1994). L'ajout d'un anticorps neutralisant de l'IL-6 présente un rôle bénéfique sur la masse corporelle (Oldenburg et al., 1993; Strassmann et al., 1992).

Cependant, le rôle de l'IL-6 dans l'atrophie reste encore controversé. En effet, l'injection d'IL-6 aux souris (Williams et al., 1998) ou l'exposition des fibres musculaires à l'IL-6 (García-Martínez et al., 1994; Goodman, 1994), n'augmentent pas toujours la dégradation protéique. De même, des myotubes murins cultivés en présence d'IL-6 n'ont montré aucun changement dans le taux de protéolyse (Ebisui et al., 1995). Ces résultats controversés

pourraient s'expliquer par des différences expérimentales de la quantité d'IL-6 et/ou de son taux ainsi que la durée de l'exposition dans les différentes études.

Les médiateurs spécifiques de l'IL-6 sur l'atrophie musculaire n'ont pas encore été caractérisés, néanmoins quelques molécules ont été proposées. Une étude chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6 a montré une réduction de leur masse corporelle associée à l'induction de l'expression de SOCS3 (Lieskovska et al., 2003), suggérant une atrophie musculaire après activation de SOCS3. D'autres travaux sur la souris ont validé ce gène (Franckhauser et al., 2008; Haddad et al., 2005).

De façon autocrine, l'IL-6 induit sa propre production via la voie du NF- κ B dans le muscle squelettique (Keller et al., 2003; Weigert et al., 2007). Il est important de noter que les différents effets de l'IL-6 sur le muscle dépendent de la dose et de la voie d'administration (Bodell et al., 2009; Haddad et al., 2005).

I. 4. Nécrose musculaire

Trois principales formes de mort cellulaire sont rapportées : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose. Leurs caractéristiques morphologiques sont bien définies (Kroemer et al., 2009). L'apoptose est une mort génétiquement programmée, son mécanisme est associé à l'activation de protéases (caspases). La mort par apoptose participe du développement et de l'homéostasie. L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion impliquant des enzymes provenant des lysosomes des mêmes cellules. La nécrose musculaire est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, une perte des lignes Z, un gonflement des mitochondries et une perturbation sarcoplasmique suivie par une libération de fraction intracellulaire, y compris la myoglobine, les créatine-phosphokinases (CPK) et d'autres protéines sarcoplasmiques, dans la circulation sanguine (Lopes-Ferreira et al., 2001). L'apoptose, l'autophagie et la nécrose représentent des réponses extrêmes du muscle et coexistent souvent après une lésion.

Mon projet de thèse repose sur les myopathies nécrosantes, donc nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux différents mécanismes connus pour induire la nécrose. La nécrose peut être due à des agents exogènes comme des toxines, des médicaments, des pathogènes ou des traumatismes. Elle peut être aussi due à des agents endogènes ou à une perturbation de l'homéostasie comme une agression auto-immune, un désordre métabolique ou l'hypoxie musculaire (tableau 1).

Tableau 1 : Illustration des différentes causes conduisant à la nécrose musculaire.

Catégories		Causes	
Non-immune	causes non physiques	Médicaments/ Toxiques	Médicament : antipsychotiques, inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, statines; Toxiques : éthanol, héroïne, drogues récréatives (cocaïne, amphétamines), venin, Virales : grippe A/B, VIH, fièvres hémorragiques Dengue, entérovirus, coxsackie virus. Bactériennes: <i>legionella sp</i> , <i>salmonella sp</i> , <i>streptococcus pneumoniae</i> , <i>staphylococcus aureus</i> , <i>enterococcus</i> , <i>pseudomonas aeruginosa</i> , <i>leptospira sp</i> , <i>mycoplasma</i> , Autres : <i>candida fungal sp</i> et <i>paludisme</i>
		Endocrine	hypo/hyperthyroïdie, acidocétose diabétique, coma diabétique hyperosmolaire, hyperaldostéronisme
		Métabolique	hypokaliémie, hypophosphatémie, hypo/hypernatrémie
	Causes Physiques	Blessures	Le syndrome d'écrasement, immobilisation, brûlures, électrocution
		Hypoxie	Obstructions artérielles (chirurgie, embolie, thrombose), occlusion microvasculaire (drépanocytose, paludisme, états de choc)
		Exercice	Exercice intense, convulsions
		Autres	hypothermie, hyperthermie maligne, coup de chaleur, syndrome malin des neuroleptiques
Immune	Avec aAc	MSA MAA	anti-SRP, anti-HMGCR, anti-Jo-1 anti-PM/Scl avec ou sans sclérodémie
	sans aAc		cancer associé aux myosites MN séronégative

Lors d'une blessure aiguë, dans le muscle squelettique, la mitochondrie génère ROS dans un premier temps. Les molécules associées aux blessures (DAMP) sont aussi libérées et leurs actions inflammatoires contribuent à recruter des cellules immunitaires comme les macrophages (Sciorati et al., 2016).

La nécrose peut être une conséquence d'une inflammation aiguë. En effet ces acteurs principaux comme les macrophages, les lymphocytes, le complément ou les auto-anticorps peuvent participer à la nécrose (Engel and Biesecker, 1982). Les lymphocytes T cytotoxiques,

après activation par la synapse TCR – épitope - CMH de type I (voir plus bas), peuvent induire une nécrose par sécrétion de molécules cytotoxiques comme la perforine et le granzyme ou via des signaux cytotoxiques (Berke, 1994). La nécrose peut aussi être induite par des aAc après activation du complément conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire (C5b9, MAC). Ce dernier forme un pore au niveau de la membrane conduisant à une lyse cellulaire (Nicholson-Weller and Halperin, 1993). Le complexe aAc-complément peut aussi activer différentes cellules incluant les natural killers (NK) et les macrophages, conduisant à un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC) (Grossmayer et al., 2008). Il est important de noter que, seules les IgM et les sous-classes d'IgG de types 1 et 3 et faiblement IgG2 sont capables d'activer la voie classique du complément (Redpath et al., 1998).

Une nouvelle entité de mort cellulaire par nécrose programmée, appelée la nécroptose, a été récemment identifiée. Les voies du TNF lui ont été associées (Degterev et al., 2005; He et al., 2009). Elle dépend de l'activation du nécrosome qui est un complexe protéique dans lequel le récepteur interagissant avec la protéine-kinase 3 (RIPK 3) est activé (Berghe et al., 2016; Holler et al., 2000). La nécroptose induite par le TNF peut être inhibée par la nécrostatine (Degterev et al., 2008). La capacité du TNF à induire la nécroptose au sein des myoblastes ou des myotubes reste controversée. Cependant quelques études ont démontré un rôle apoptotique du TNF via la cascade des caspases après liaison au TNFR1 (Liu et al., 1996; Zhou et al., 2016), et un rôle anti-apoptotique via NF- κ B après liaison au TNFR1 ou via Akt après liaison au récepteur TNFR2 (Liu et al., 1996; Zhou et al., 2016). Il faut noter que ces deux récepteurs sont exprimés à la surface des cellules musculaires (Zhang et al., 2000).

Le mécanisme précis de la physiopathologie de la nécrose reste encore mal compris. Dans le cas précis des myopathies nécrosantes auto-immunes, le mécanisme de l'immunité impliquant les aAc durant la nécrose est le sujet de ce travail de thèse.

II. Auto-immunité et auto-anticorps

Le concept d'auto-immunité a été utilisé pour la première fois par Paul Ehrlich au début du XX^e siècle. L'auto-immunité est le résultat d'une réponse immunitaire aberrante contre ses propres antigènes, conduisant à des lésions tissulaires responsables de maladies auto-immunes.

II. 1. La réponse immunitaire : le soi et le non-soi

L'une des fonctions essentielles du système immunitaire est d'assurer la protection contre les agents pathogènes extérieurs pouvant menacer la survie. Le système immunitaire doit donc être capable de discriminer entre le soi et le non-soi (Klein, 1984).

a. Principe de l'immunité

On distingue deux systèmes de défense complémentaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense. Sa mise en place est rapide mais non spécifique. La seconde est l'immunité adaptative. Sa mise en place est plus lente après la première exposition, mais elle est spécifique et d'une grande efficacité.

Le système de l'immunité innée est composé de différentes cellules incluant les monocytes/macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les granulocytes (basophiles, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles) et les cellules dendritiques. Ces cellules peuvent reconnaître l'agent pathogène grâce aux molécules associées aux motifs pathogènes (PAMP) par leurs récepteurs de surface : les récepteurs des motifs pathogènes (PRR).

En seconde ligne, le système immunitaire adaptatif est plus complexe avec une capacité de reconnaissance spécifique des différents pathogènes. Les cellules responsables de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). La spécificité de reconnaissance est assurée par des récepteurs à la surface des cellules B (BCR, ou B-cell receptors) et des cellules T (TCR, ou T-cell receptors) qui présentent une grande diversité de répertoire. Cette diversité est due à la recombinaison et aux différents assemblages des segments de gènes V (variable), D (diversity), J (joining). Le complexe enzymatique de la recombinase RAG (Recombination Activating Gene) est essentiel à l'ouverture et l'accessibilité de la chromatine pour la recombinaison (Charles A Janeway et al., 2001; Goodnow et al., 2005).

Le BCR reconnaît la forme native de l'antigène. Le TCR, quant à lui, reconnaît des fragments de l'antigène qui sont présentés par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

b. Soi et non-soi

Un enjeu fondamental de l'ontogénie du système est la distinction entre le soi et le non-soi. Le système immunitaire de l'hôte doit s'activer uniquement en présence d'un agent extérieur et non en présence de constituants du soi, qu'il doit tolérer.

II. 2. Distinction soi et du non-soi

L'apprentissage de la distinction du soi et du non-soi concerne exclusivement les acteurs de l'immunité adaptative. Deux niveaux sont identifiés pour la tolérance au soi : la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La tolérance centrale s'acquiert au niveau des organes

lymphoïdes primaires : la moëlle osseuse pour les cellules B et le thymus pour les cellules T. La tolérance périphérique se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires : la rate et les ganglions lymphatiques. Dans cette partie nous aborderons les mécanismes de tolérance pour les LT, mais aussi et surtout ceux pour les LB.

a. La tolérance centrale

L'ontogénie des cellules de l'immunité adaptative passe par une sélection positive pour les cellules qui ne présentent pas une avidité trop importante pour les antigènes du soi et une sélection négative pour celles qui reconnaissent avec une forte avidité les antigènes du soi.

❖ Les lymphocytes T

La maturation des LT se fait dans le thymus. Les LT subissent plusieurs étapes de sélection stricte reposant sur la reconnaissance par le TCR du complexe épitope-CMH présenté par les cellules épithéliales thymiques corticales. Après le réarrangement du TCR, une première sélection pour les LT est la sélection positive des cellules présentant une affinité modérée pour le complexe épitope-CMH. Les cellules ayant une très faible réponse subiront une mort par anergie. Les lymphocytes présentant une très forte affinité pour le complexe épitope-CMH seront éliminés par une sélection négative (Nitta and Suzuki, 2016).

L'expression des antigènes périphériques du soi est sous la dépendance du gène régulateur d'auto-immunité AIRE. Ce système permet l'expression antigénique dans le thymus des protéines présentes dans les tissus périphériques. En cas d'absence de cette expression antigénique dans le thymus, les LT autoréactifs échappent à la sélection négative (tolérance centrale) et se retrouvent dans la circulation (Anderson et al., 2002). En particulier le déficit génétique de *AIRE* est responsable du syndrome APECED (*auto-immune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy* en anglais ou polyendocrinopathie auto-immune de type 1

en français) qui est une maladie génétique autosomale récessive avec un défaut du gène *AIRE* associant une candidose cutanéomuqueuse chronique, une hypoparathyroïdie et une insuffisance surrénale d'origine auto-immune

❖ Les lymphocytes B

Le développement des LB ressemble en partie à celui des LT. Durant leur développement, les LB passent par plusieurs étapes de maturation marquées par le réarrangement des gènes V(D)J constituant le BCR. Dans la moelle osseuse, les LB naïfs formés ont un récepteur membranaire fonctionnel présentant une spécificité unique. Ce développement est marqué par des étapes de formation et de réarrangement du récepteur ainsi qu'une sélection proche de celles des LT.

- Stade pro-B : caractérisé par l'apparition des immunoglobulines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ à la membrane.
- Stade pré-B : caractérisé par le réarrangement des gènes V(D)J des chaînes lourdes puis des chaînes légères. Cette étape est définie par la formation de l'IgM à la surface des cellules immatures qui n'ont jusque-là que des IgD^- .
- Stade de transition : caractérisé par IgD^{low} et IgM^{high}
- LB mature : caractérisé par un IgD^{high} et IgM^+

Les points de contrôle des LB lors du développement dépendent :

- du succès de l'expression des $Ig\alpha$ et $Ig\beta$,
- du succès des réarrangements des chaînes lourdes,
- du réarrangement des chaînes légères.

La tolérance au soi des LB commence avec l'apparition d'IgM à leur surface. Leur développement peut être bloqué si leur IgM interagit avec un auto-antigène. A ce stade, pour

éviter la mort, les LB peuvent réarranger, « éditer », leurs récepteurs afin de poursuivre leur développement. Environ 20 à 50 % des BCR générés par les recombinaisons V(D)J ont une affinité potentiellement « dangereuse » avec les antigènes du soi (Wardemann et al., 2003; Zerrahn et al., 1997), mais seulement 3 à 8% de la population participeront au développement d'une maladie auto-immune (Goodnow et al., 2005).

La cellule B mature est à ce stade naïve, elle migre alors vers les organes lymphoïdes secondaires, où elle pourra rencontrer son antigène spécifique et être ainsi activée.

b. La tolérance périphérique LB et LT

La tolérance périphérique se produit au niveau des organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques ou la rate.

❖ Mécanismes passifs

Les LB immatures expriment l'antigène stable à la chaleur (HSA) et migrent vers la rate, dans la zone des cellules T. La sélection négative des LB se produit principalement dans cette zone. Les LB auto-réactifs sont neutralisés par un processus dit d'« anergie ». Ce mécanisme représente la voie principale de tolérance périphérique où les clones auto-réactifs ne sont pas stimulés par l'antigène et donc restent inactivés (MacDonald, 1989). Les LB auto-réactifs peuvent aussi être neutralisés en prévenant leurs migration dans le follicule B et aussi en induisant leurs mort.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules B passent une sélection négative pour les antigènes du soi en fonction de l'affinité du BCR mais aussi en fonction des taux de BAFF (B cell activating factor of the TNF family). BAFF est une cytokine découverte récemment qui présente un rôle fondamental dans l'activation des lymphocytes B. Cette

activation concerne essentiellement des LB auto-réactifs. La cytokine BAFF est aussi exprimée dans les cellules du tissu cible de l'auto-immunité sous l'influence du TNF ou de l'IFN γ . Dans certaines études, le taux de BAFF a été corrélé à l'activité de la maladie (ex : Lupus).

En l'absence de LT auto-réactifs fonctionnels, les LB auto-réactifs sont peu ou pas activés et ne sécrètent donc que des aAc naturels de type IgM à faibles titres.

La tolérance périphérique des LT est contrôlée par différents mécanismes :

- La séquestration qui se traduit par la dissimulation de l'antigène au système immunitaire,
- L'expression des LT dans un site privilégié comme le cerveau, où les LT pro-inflammatoires sont contrôlés soit par apoptose soit par l'expression de TGF β et IL-10,
- La délétion : si le LT est activé par l'auto-antigène, il subit alors une mort cellulaire induite par activation ou mort cellulaire passive,

La régulation immunitaire, dans ce cas la réponse immunitaire est régulée par d'autres LT sécréteurs de cytokines suppressives

❖ Mécanismes actifs

Un autre contrôle existe pour les cellules auto-réactives qui échappent à la sélection négative passive, appelée sélection négative active. Cette sélection utilise différentes cellules de surveillance comme des lymphocytes T CD4 ou CD8, des NKT, des LT régulateurs (Tregs) ou des LB régulateurs (Bregs).

Les Tregs sont reconnus par leurs marqueurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ et les Bregs sont reconnus par leurs productions d'IL10 et TGF-1 (Mizoguchi and Bhan, 2006; Yang et al., 2013).

II. 3. Les Anticorps

Les anticorps (Ac) sont des immunoglobulines composées de deux chaînes lourdes (IgH) et de deux chaînes légères (Igκ ou Igy). Chaque chaîne comprend une région constante et une région variable. La région variable est la région responsable de la reconnaissance antigénique, la région constante confère la fonction effectrice de l'Ac. Au cours d'une réponse immunitaire, les lymphocytes B naïfs peuvent être stimulés. Cette activation conduira en particulier à une prolifération lymphocytaire et à la maturation des LB en plasmocytes sécrétant des Ig. En outre cette stimulation conduit aussi à une seconde phase de diversification du répertoire lymphocytaire B.

Cette seconde diversification est très largement dépendante de l'antigène et repose sur 2 mécanismes principaux :

- Le commutation de classe : il correspond au remplacement de la fraction constante de la chaîne lourde μ par d'autres fractions constantes conduisant à des IgG, IgA ou IgE ayant chacune des propriétés effectrices différentes
- Les mutations somatiques qui correspondent à l'introduction de mutations ponctuelles (grâce à l'enzyme AID) dans les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères. Ces mutations conduisent à une variation de la spécificité du paratope. Théoriquement, les gènes formant les Ac peuvent aboutir à 10^9 combinaisons d'Ac possibles.
- La polyréactivité qui définit un Ac capable de se lier spécifiquement à différents aAg. Ces Ac sont retrouvés chez des individus sains sans immunisation préalable et sont appelés Ac naturels. La caractéristique des Ac naturels est leur faible affinité de

liaison. Les Ac polyréactifs peuvent être induits suite à une exposition à des agents déstabilisateurs, des molécules oxydatives ou des co-facteurs.

Pour se débarrasser des pathogènes plusieurs mécanismes d'action ont été attribués aux anticorps :

- Formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) : La liaison de l'anticorps à son antigène peut conduire à la fixation et l'activation du complément. Cette activation de la voie classique du complément conduit à la formation de MAC qui crée un pore au niveau de la membrane conduisant à une lyse cellulaire.
- Opsonisation : L'Ac fixé à son antigène peut être internalisé par les cellules phagocytaires (ex macrophages) qui détruiront ce complexe.
- Neutralisation : En se fixant sur la cible, l'Ac permet le blocage de l'antigène.
- Toxicité cellulaire médiée par l'anticorps (ADCC) : La liaison de l'anticorps à son antigène peut aussi activer des cellules de l'immunité possédant des récepteurs spécifiques de fractions constantes des IgG : les Récepteurs du fragment Fc. L'activation de ces cellules comme par exemple les lymphocytes NK conduit à des phénomènes de cytotoxicité induisant la mort cellulaire (ADCC).
- Formation de complexes immuns circulants : formation de complexes constitués de plusieurs Ac liant leurs antigènes. Ces complexes sont de différentes tailles et sont rapidement phagocytés par des macrophages.

II. 4. Auto-immunité & auto-anticorps

De façon inappropriée la réponse immunitaire peut parfois être activée par « le soi » conduisant à des maladies auto-immunes. Le mécanisme du dommage tissulaire lors d'une

maladie auto-immune reste essentiellement identique à celui engendré dans le cas de l'immunité contre un pathogène après activation du système immunitaire adaptatif. Au cours d'une maladie auto-immune, le système immunitaire n'arrive pas à éliminer complètement les antigènes et reste activé, causant une inflammation chronique, responsable des lésions tissulaires.

L'étiologie des maladies auto-immunes, en particulier des myosites où le muscle est reconnu comme composante étrangère, reste encore non élucidée. Il est généralement discuté que les maladies auto-immunes surviennent sur un terrain prédisposé génétiquement, et que des facteurs exogènes environnementaux, infectieux en particulier, pourraient être les facteurs déclenchants. A ce titre il est important de souligner qu'au cours des myosites, des prédispositions génétiques ont été identifiées (Chinoy et al., 2012). En particulier au cours des myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI, voir plus bas) associées aux anti-HMGCR, l'haplotype HLA classe II DRB1*11:01 est fortement associé chez les patients exposés ou non aux statines (Casciola-Rosen and Mammen, 2012). Par définition pour démontrer le caractère auto-immun d'une pathologie, il faut transférer le système immunitaire (SI) (Ac et/ou cellules immunitaires) de l'individu malade à un sujet sain et voir se développer la même maladie. En médecine, cette démonstration n'a été qu'exceptionnellement faite chez l'homme. La condition physiologique se rapprochant le plus de cette situation est la grossesse, moment où le fœtus reçoit les IgG maternelles. Le plus souvent le caractère auto-immun est suggéré par arguments indirects : la présence de lésions tissulaires impliquant le système immunitaire en l'absence de tout pathogène, la présence d'auto-anticorps (dont le titre peut être corrélé à l'activité de la maladie) et/ou la réponse thérapeutique (en cas de lésions réversibles) à des traitements immunosuppresseurs. Le caractère auto-immun peut-être aussi démontré grâce à l'expérimentation animale. Dans ces modèles animaux, le SI humain (Ac ou Lymphocytes) est transféré à l'animal qui développera des lésions tissulaires comparables à

celles observées en pathologie humaine. De même des modèles expérimentaux peuvent aussi reproduire les caractéristiques de la maladie après immunisation contre des antigènes du soi. Ces éléments définissent les critères de Witebsky (Witebsky, 1957) pour les pathologies auto-immunes.

❖ Rôle pathogène des Ac au cours des pathologies AI

Au cours des maladies auto-immunes les lésions peuvent être secondaires à l'immunité cellulaire et/ou humorale. Bien que le rôle pathogène des Ac au cours des maladies AI soit un sujet débattu, dans cette partie nous décrirons les principales preuves suggérant leurs effets délétères au cours des maladies auto-immunes (tableau 2).

Concernant l'activation lymphocytaire B, il faut ici rappeler le rôle déterminant des LT dans cette activation. Cependant il a été démontré que le LB peut être activé spécifiquement indépendamment du LT, en particulier en présence de forte concentration de BAFF (Puga et al., 2012) et/ou activation des TLR portés par les LB (Ehlers et al., 2006).

Les Ac ont la capacité de détruire leurs cibles via différentes actions (cf II.3. les anticorps). Au cours d'une maladie AI, différents mécanismes de destruction tissulaire médiés par l'aAc spécifique peuvent être observés. Après liaison de l'Ac à la surface cellulaire, ce dernier peut neutraliser sa cible et/ou médier l'activation du complément, l'opsonisation et/ou l'ADCC.

La myasthénie auto-immune est une maladie neuromusculaire associée dans 80% des cas à des aAc anti-récepteurs à l'acétylcholine (anti-AChR). Le récepteur à l'acétylcholine est localisé à la surface de la fibre musculaire au niveau de la jonction neuromusculaire (ou plaque motrice). Cette maladie est transférable de la mère au fœtus lors d'une grossesse (induisant une arthrogrypose chez le fœtus), avec une corrélation entre l'apparition de la myasthénie néonatale et le titre des anti-AChR (Vernet-der Garabedian et al., 1994). Le

mécanisme de destruction de la membrane post synaptique est généré par l'activation de la voie du complément en formant le complexe d'attaque membranaire (Tüzün and Christadoss, 2013). Un autre mécanisme d'action des aAc est le blocage de la signalisation des récepteurs (Verschuuren et al., 2013).

Les aAc anti-gangliosides conduisent à une neuropathie auto-immune dont le syndrome de Guillain-barré. Les anti-gangliosides se lient à leurs antigènes gangliosides situés à la surface axonale et inhibent la croissance des axones. Le transfert passif des anti-gangliosides chez la souris a montré une inhibition sévère de la régénération axonale, attestant du rôle pathogénique de ces aAc (Lehmann et al., 2007). Ces aAc peuvent aussi activer la voie du complément et le recrutement des cellules immunitaires (Plomp and Willison, 2009).

Le transfert des aAc anti-ADN, provenant de patients atteints de lupus, chez des souris conduit à la formation de complexes immuns délétères responsables d'une neuropathie (Ehrenstein et al., 1995; Fenton et al., 2010).

Il n'est pas exclu qu'un aAc interagisse avec une autre molécule (réactivité croisée). Les anti-ADN, reconnaissant l'ADN double brin peuvent reconnaître les phospholipides (Lafer et al., 1981) ou les laminines qui sont retrouvées à la membrane plasmique (Amital et al., 2005).

Des Ac naturels, présents chez des individus sains, peuvent devenir toxiques comme au cours de la maladie Goodpasture où le dépôt d'aAc à la membrane basale des tissus pulmonaires et rénaux induit hémorragie pulmonaire et glomérulonéphrite. Ces Ac naturels reconnaissent la membrane basale glomérulaire mais après une mutation au niveau de la protéine du collagène IV. Cette dernière induit ainsi une reconnaissance de ces aAc et initie la pathogénicité (Pedchenko et al., 2011).

Tableau 2. Auto-anticorps et maladies auto-immunes spécifiques d'organes.

Organe cible	Anticorps associé	Localisation de la cible antigénique	Maladie
Muscle	anti-SRP	cytoplasme	Myopathies nécosantes
	anti-HMGCR	cytoplasme	
Jonction neuro-musculaire	anti-RACH	membrane	Myasthénies
	anti-MuSK	membrane	
	anti-LRP4	membrane	
Nerf	anti-myéline (MAG)	membrane	Neuropathies auto-immunes
	anti-gangliosides	membrane	
	anti-sulfatides	membrane	
	anti-neurofilaments NFS	cytoplasme	
Cerveau	anti-NMDAR	membrane	Encéphalopathies auto-immunes
	anti-VGKC	membrane	
Globules rouges	anti-globules rouges	membrane	Anémie hémolytique auto-immune
Plaquettes	anti-glycoprotéines (anti-GPIIb-IIIa)	membrane	Purpura thrombopénique auto-immun
	anti-ADAMs-13	secrétée	
Surrénale	anti-21 hydroxylase	endoplasmique	Maladie d'Addison
Pancréas	anti-insuline	secrétée	Diabète insulino-dépendant
	anti-GAD65	cytoplasme/ membrane	
	anti-IA-2	membrane	
	anti-ZnT8	membrane	
Thyroïde	anti-RTSH	membrane	Maladie de Basedow
	Anti-thyroglobuline (TG)	secrétée	Thyroïdite d'Hashimoto
	anti-TPO	secrétée	
Intestin	anti-endomysium		Maladie cœliaque
	anti-réticuline	extracellulaire	
	anti-gliadine	secrétée	
	anti-transglutaminase	cytoplasme	
Estomac	anti-facteur intrinsèque (Fi)	secrétée	Maladie de Biermer
	anti-cellules pariétales gastriques (CPG)	cellules	
Foie	anti-mitochondrie	cytoplasme	Cirrhose biliaire
	anti-actine	cytoplasme	Hépatite auto-immune
	anti-LKM	cytoplasme	
Rein/Poumon	anti-membrane basale glomérulaire	membrane	Syndrome de Goodpasture
	anti-phospholipase A2 receptor	membrane	
Peau	anti-desmoglérine 1 et 2	membrane	Maladies bulleuses auto-immunes
	anti-desmoplakine I et II	membrane	
	anti-BP180 et anti-BP230	membrane	

III. Myopathies inflammatoires idiopathiques

III. 1. Définition

Les myopathies inflammatoires idiopathiques (MII) sont des maladies musculaires acquises. L'agent causal n'est par définition pas identifié. Ce diagnostic est porté après avoir écarté d'autres causes de maladies musculaires acquises comme les causes endocriniennes (ex : dysthyroïdie), infectieuses (ex : virus influenza) ou toxiques (ex : alcool ou statines). Les MII sont le plus souvent considérées comme des maladies auto-immunes musculaires. Les MII sont caractérisées par une atteinte musculaire (clinique, biologique et morphologique) aspécifique. Le caractère acquis de la myopathie est suggéré par des symptômes d'installation subaiguë (inférieure à 6 mois) et le caractère « idiopathique » est retenu après exclusion des causes suscitées.

C'est l'examen histologique musculaire qui permet d'affirmer le diagnostic en montrant des lésions des fibres musculaires (ex : nécrose ou atrophie) associées le plus souvent à la présence d'infiltrats inflammatoires.

Néanmoins, le groupe des MII reste hétérogène puisque les caractéristiques de l'atteinte musculaire sont variables, en particulier sur les plans cliniques et histologiques. En outre, les MII peuvent être accompagnées de manifestations extra-musculaires très variables. De même, plus de 60% des patients présentent des auto-anticorps (aAc) de spécificités variables. Les différents cadres nosologiques seront discutés dans le chapitre suivant.

De par leur atteinte motrice, les MII sont des maladies handicapantes et parfois très invalidantes. De par leur(s) atteintes extra-musculaires squelettiques (respiratoires ou cardiaques) les MII peuvent engager le pronostic vital.

Les MII sont des maladies rares et peuvent survenir à tout âge. La prévalence mondiale des MII est estimée entre 2,4 à 33,8 pour 100 000 personnes (Meyer et al., 2015). Les MII affectent plus les femmes avec un ratio de femme/homme 3 :1 (Mastaglia, 2008; Mastaglia and Phillips, 2002), l'âge moyen de survenue est d'environ 44,2 ans (de 7 à 74ans) et l'âge du diagnostic à 55,1 ans (Meyer et al., 2015).

III. 2. Classification

Comme précisé ci-dessus, les MII sont un groupe hétérogène. Depuis plus de 60 ans, avec les classifications de Walton et Adams (1958) puis de Pearson en 1966, il a été tenté de définir des groupes homogènes de patients. Au fil des années, le nombre de cadres nosologiques s'est agrandi. En 1975, la classification proposée par Bohan et Peter définissait 2 entités : les polymyosites et les dermatomyosites. Depuis le 119th séminaire européen du centre neuromusculaire (ENMC) en 2003, on dénombre 5 cadres nosologiques : les polymyosites, les dermatomyosites, les myosites à inclusions, les myopathies nécrosantes et les myosites non spécifiques (Hoogendijk et al., 2004) (tableau 3).

Table 1. Criteria Supporting the Diagnosis of Inflammatory Myopathies.

Criterion	Dermatomyositis	Polymyositis	Necrotizing Autoimmune Myositis	Inclusion-Body Myositis
Pattern of muscle weakness	Subacute onset of proximal symmetric weakness with characteristic skin rash in patients of any age	Subacute onset of proximal symmetric weakness in adults (diagnosis is made when other causes have been ruled out)*	Acute or subacute onset of proximal, often severe weakness in adults	Slow onset of proximal and distal weakness; atrophy of quadriceps and forearms; frequent falls; mild facial muscle weakness in people older than 50 years of age
Creatine kinase level	High, up to 50 times the upper limit of normal; can at times be normal	High, up to 50 times the upper limit of normal in early active disease; may linger at up to 10 times the upper limit of normal	Very high; more than 50 times the upper limit of normal in early active disease	Up to 10 times the upper limit of normal; can be normal or slightly elevated
Electromyography	Myopathic units (active and chronic)	Myopathic units (active and chronic)	Active myopathic units	Myopathic units (active and chronic) with some mixed large-size potentials
Muscle biopsy	Perivascular, perimysial, and perifascicular inflammation; necrotic fibers in "wedge-like" infarcts; perifascicular atrophy; reduced capillaries†	CD8+ cells invading healthy fibers; widespread expression of MHC class I antigen; no vacuoles; ruling out of inflammatory dystrophies	Scattered necrotic fibers with macrophages; no CD8+ cells or vacuoles; deposits of complement on capillaries‡	CD8+ cells invading healthy fibers; widespread expression of MHC class I antigen; autophagic vacuoles;§ ragged-red or ragged-blue fibers; congophilic amyloid deposits¶
Autoantibodies	Anti-MDA-5, anti-Mi-2; anti-TIF-1 and anti-NXP-2 (implicated in cancer-associated dermatomyositis)	Antisynthetase antibodies (often seen in overlap myositis) associated with interstitial lung disease, arthritis, fever, and "mechanic's hands"	Anti-SRP and anti-HMGCR, specific for necrotizing autoimmune myositis	Anti-cN1A (of uncertain pathologic significance)
Magnetic resonance imaging	May show active inflammation	May show active inflammation; could guide biopsy site	May show active inflammation; could guide biopsy site	Shows selective muscle involvement, but might be difficult to distinguish atrophy from chronic inflammation

* Drug-induced myopathies (e.g., penicillamine, statins, or antiretrovirals), inflammatory dystrophies (such as those due to mutations in the genes encoding dysferlin, calpain, or anoctamin; Becker's muscular dystrophy; facioscapulohumeral muscular dystrophy; or myofibrillar myopathies), inclusion-body myositis, necrotizing autoimmune myositis, metabolic myopathies, and fasciitis or fibromyalgia need to be ruled out.

† Similar pathologic changes in the perifascicular, perimysial, and interfascicular areas (to a lesser degree of severity) can be seen in overlap myositis (without skin lesions) or the antisynthetase syndrome.

‡ Metabolic muscle diseases presenting as myoglobinuria and toxic or drug-induced myopathies need to be ruled out.

§ In clinical inclusion-body myositis, when patients have the typical inclusion-body myositis phenotype, vacuoles are absent; such patients are erroneously thought to have polymyositis because of polymyositis-like inflammation; ragged-red fibers or cytochrome oxidase-negative fibers are frequently present and are helpful in diagnosis.

¶ TDP43 and p62 deposits, detected with the use of immunostaining, have been proposed as tissue biomarkers.

Tableau 3. Critères histologiques et sérologiques permettant le diagnostic des MII. (Dalakas, 2015)

Les méthodes de classification des MII utilisent deux approches distinctes : une approche clinico-histologique vs une approche clinico-sérologique. La première suit la tradition neurologique où l'analyse de la lésion neurologique (musculaire) domine. La classification histologique la plus aboutie est celle du 119th l'ENMC en 2003 qui définit 5 formules histologiques caractérisant les 5 grands cadres nosologiques. Parallèlement, une approche davantage rhumatologique et/ou immunologique s'est développée dans les années 90, après les découvertes des premiers anticorps spécifiques des myosites dans les années 70-80. Cette approche clinico-sérologique est fondée sur la présence des aAc et les manifestations extra-musculaires (Figure 7).

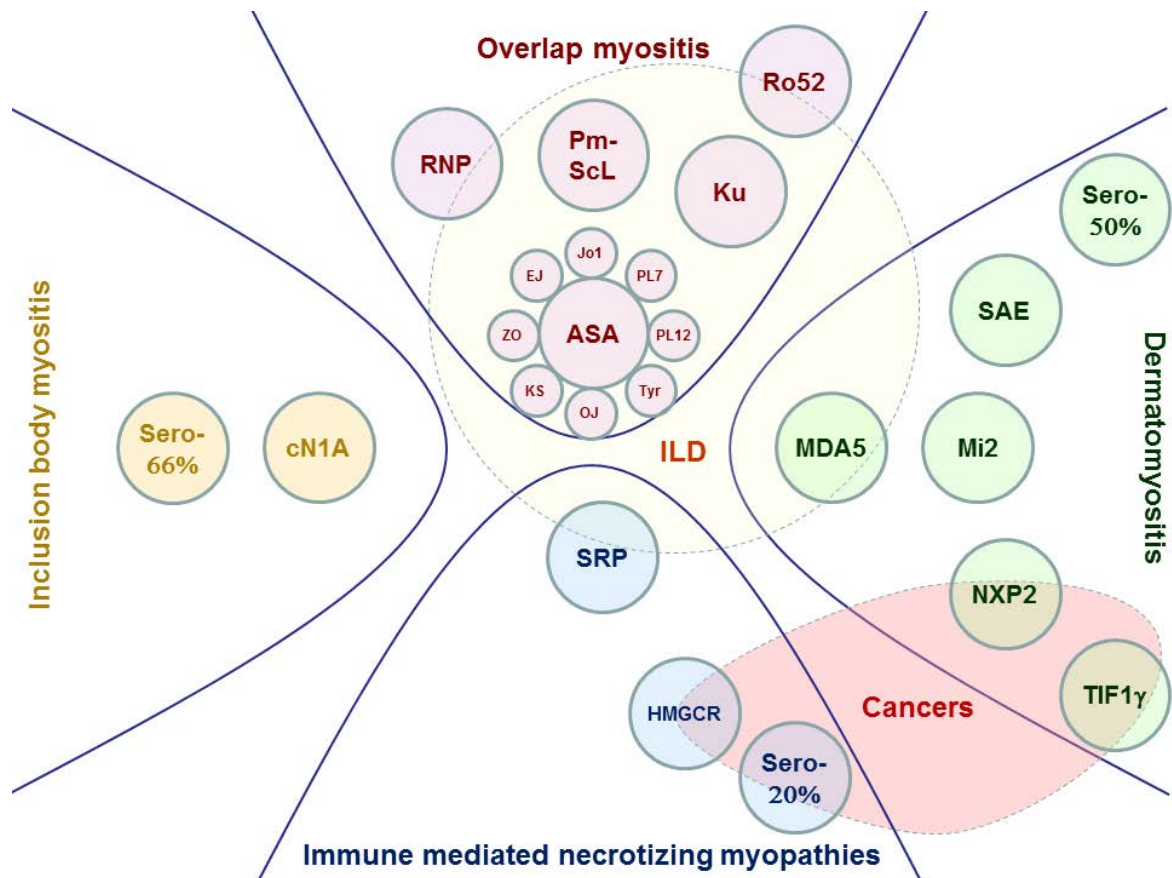


Figure 7. Classification des MII en fonction des aAc.

ASA: anti-synthetase antibodies, sero-: seronegative MII (Benveniste, 2016).

En effet, selon le type d'Ac présent, il est possible de définir des groupes homogènes de patients en terme de manifestations musculaires mais aussi extra-musculaires. Cette approche a été proposée la première fois en 1991 par Love *et al.* qui, en particulier, avaient isolés le syndrome des anti-synthétases défini par la présence d'Ac anti-synthétases, de mains de mécaniciens, d'un phénomène de Raynaud, d'arthralgies, d'une myosite et d'une atteinte pulmonaire interstitielle (Dalakas, 2015). En 2005, Trojanov *et al.* élargissaient le nombre de cadres nosologiques sans tenir compte des résultats de l'histologie musculaire. A ce jour, il existe plus d'une quinzaine d'aAc spécifiques des myosites qui pour la plupart sont associés à des phénotypes musculaires et extra-musculaires homogènes (cf Tableau 4 et figure 7).

	Ac Spécifiques	Atteinte extra-musculaire				Risque	
		cutanée	pulmonaire	articulaire	cancer	vital	rechute
Syndrome anti-synthétase	anti-Jo1	Raynaud/ Main Mécanicien	++/+++	++	-	Cœur/poumon	++/+++
	anti-PL7/PL12	Raynaud/ Main Mécanicien	+++	++	-	Cœur/poumon	++/+++
Dermatomyosites	anti-MDA-5	Rash DM/Ulcères	+++	++/+++	-	Poumon+++	+
	anti-NXP2	Rash DM/Calcification	-/+	-/+	++	Cancer ?	++
	anti-TIF1-G	Rash DM	-/+	-/+	+++	Cancer+++	++
	anti-MI2	Rash DM	-/+	-/+	++	Cancer ?	+
	anti-SAE	Rash DM	-/+	-/+	-		+
Myopathies nécrosantes auto- immunes	anti-SRP	-	-/+	-	-	Cœur	+++
	anti-HMGCR	-	-	-	+	Cancer	+++++
	Séronégative	-	-	-	+++	Cancer	++

Tableau 4. Aspect clinique associée aux auto-anticorps.

Environ 50% des patients MII présentent des aAc (Brouwer et al., 2001). Les aAc peuvent être spécifiques des myosites (ASM) ou associés à des myosites (AAM), ces derniers peuvent alors être retrouvés dans d'autres maladies. Les ASM sont souvent dirigés contre des protéines ubiquitaires cytoplasmiques impliquées dans la synthèse protéique (par ex : l'histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1)), le transport des polypeptides (par ex : le « Signal Recognition Particle (SRP) »), la synthèse du cholestérol (la « 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR) ») (cf III.3. myopathie nécrosante auto-immune & auto-anticorps), une protéine de l'immunité innée reconnaissant les ARN viraux (MDA-5) ou des protéines du remodelage du nucléosome (NURD/Mi-2).

Les aAc anti-ARN nucléaires ou cytoplasmiques sont les plus fréquemment retrouvés, soit chez environ 60% des patients avec des MII. Le rôle de ces aAc reste inconnu. Les anti-ARN incluent les aAc anti-ARS (aminoacyl tRNA synthetases), qui sont détectés chez 20 à 30% des patients. L'anti-Jo-1 fait partie des anti-ARS et représente 75% des aAc associés au syndrome anti-synthétase.

Les aAc associés aux DM incluent les anti-Mi2, qui sont associés à des lésions cutanées typiques (érythème des zones photo-exposées telles que le décolleté ou le « signe du châte », papules de Gottron, etc.) ; les anti-MDA-5, sont associés à une DM amyopathique avec une maladie pulmonaire interstitielle et des ulcérations cutanées caractéristiques ; les anti-Tifl γ sont fortement associés aux cancers (Dalakas, 2015; Mammen, 2011).

Les anti-SRP et anti-HMGCR sont le sujet de notre travail de thèse. Ils sont associés aux myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) qui ne présentent pas ou peu d'atteinte extra-musculaire.

III. 3. Myopathie nécrosante auto-immune & auto-anticorps

Les MNAI sont un groupe à part de MII. Elles se distinguent par une atteinte musculaire quasi-exclusive (avec pas ou peu de manifestations extra-musculaires) et une atteinte musculaire caractéristique sur le plan clinique et histologique. Cette entité a été définie pour la première fois en 2004 (Hoogendijk et al., 2004) (critères ENMC). Le critère majeur est par définition la présence de fibres musculaires en nécrose ou en régénération comme élément sémiologique histologique dominant alors que l'inflammation musculaire est faible ou absente (cf critères ENMC). Les MNAI sont souvent associées spécifiquement à deux auto-anticorps (aAc) : anti-Signal Recognition Particle (anti-SRP) et anti-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (anti-HMGCR).

Les MNAI anti-SRP sont le plus souvent retrouvées chez l'adulte avec une moyenne d'âge de 45 ans (Allenbach and Benveniste, 2013), et représentent environ 4 à 6% des patients MII (Targoff et al., 1990). Les MNAI anti-HMGCR sont retrouvées chez 6% (Mammen et al., 2011).

Typiquement les MNAI ont en commun l'apparition d'un déficit musculaire d'installation rapide en quelques semaines ou mois. L'atteinte motrice est bilatérale, proximale et symétrique. Les MNAI sont caractérisées par une faiblesse musculaire importante. Puisque la lésion élémentaire est la nécrose, sur le plan biologique on observe une élévation marquée des enzymes musculaires comme la créatine-phosphokinase (CPK) dans le sérum avec des taux moyens entre 6600 à 15000 UI/L chez les patients avec anti-SRP (Miller et al., 2002) et 9700 UI/L chez les anti-HMGCR (Mammen et al., 2011).

En plus de cette forme classique, aiguë, il existe un sous-groupe représentant un tiers environ des patients, qui présente un tableau moins bruyant. Les signes moteurs sont alors d'installation insidieuse et d'aggravation progressive. Ce tableau se rapproche de ce qui est observé au cours des myopathies génétiques de type dystrophie musculaire (Benveniste and Romero, 2011).

L'anti-HMGCR est associé à l'exposition aux statines, un inhibiteur de l'enzyme HMGCR utilisé comme traitement dans le but de baisser le taux de cholestérol. Cependant, des patients naïfs aux statines peuvent aussi développer des aAc anti-HMGCR (Limaye et al., 2015; Mammen et al., 2011). Mammen *et al* ont rapporté dans une étude que 67 % des patients anti-HMGCR étaient sous statines (Mammen et al., 2011) alors que dans l'étude menée en France, Drouot *et al* ainsi qu'Allenbach *et al* ont rapporté que 50% des patients étaient exposés aux statines (Allenbach et al., 2014; Drouot et al., 2014). Une autre étude menée au Japon a montré que seulement 18% des patients étaient sous statines (Watanabe et al., 2016).

Dans une étude de cohorte comportant 150 patients avec un diagnostic de suspicion de MNAI, les anti-HMGCR ont été détectés chez environ 24% des patients (Drouot et al., 2014). Ils ont été retrouvés chez 6% de patients dans une cohorte de 750 cas de MII toutes confondues (Mammen et al., 2011). Il a été démontré, dans une série de 15 patients anti-HMGCR positifs, que le sous-type des IgG était seulement IgG1 (Drouot et al., 2014). Le

taux des aAc anti-HMGCR était corrélé avec le taux sérique des CPK ainsi que le niveau de faiblesse musculaire suggérant un rôle pathologique des anti-HMGCR (Allenbach et al., 2014; Werner et al., 2012). De la même façon, les taux des anti-SRP sont corrélés à ceux des CPK (Benveniste et al., 2011).

a. Protéine SRP et Ac anti-SRP

SRP est un complexe ribonucléoprotéique ubiquitaire composé d'une chaîne d'ARN (7SL) et de six polypeptides de 72 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 19 kDa, 14 kDa et 9 kDa (Walter and Blobel, 1980, 1983) (Figure 8). SRP₅₄ reconnaît la séquence signal qui permet la translocation du polypeptide nouvellement synthétisé vers le reticulum endoplasmique, le signal est porté principalement par les protéines sécrétées et les protéines membranaires (Walter et al., 1984). SRP₅₄ est composé de 3 domaines principaux : la partie N-terminale (domaine N), la partie centrale (domaine G), ces deux cores portent le domaine catalytique GTPase, et la partie C-terminale (domaine M) qui est responsable de la reconnaissance de la séquence signale (Keenan et al., 2001; Luirink and Sinning, 2004). Le complexe SRP délivre les polypeptides nouvellement synthétisés au reticulum endoplasmique. Le récepteur SRP présente une homologie de séquence avec les domaines G et N de la protéine SRP₅₄, cette donnée suggère que les anti-SRP peuvent reconnaître les SRP cytosoliques ainsi que leurs récepteurs situés au niveau du reticulum endoplasmique (Römisch et al., 2006) (Figure 9).

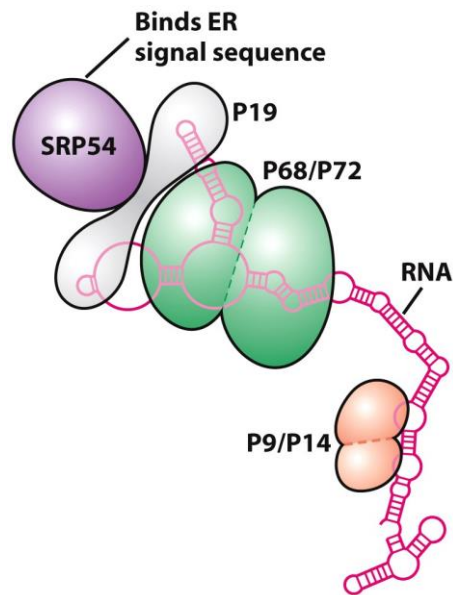


Figure 8. Représentation schématique de la structure de la protéine SRP (Berg et al., 2012).

Les aAc anti-SRP ont été décrits pour la première fois en 1986 par Reeves qui a montré qu'ils reconnaissent fortement la sous unité SRP₅₄ et dans une moindre mesure les autres composants du complexe (Reeves et al., 1986). Une étude de Römisch *et al.* a pu montrer dans un système cellulaire synthétique (Cell-free system) que les aAc anti-SRP reconnaissent les domaines N et G et de ce fait bloquent le relargage des polypeptides portant le signal vers le reticulum endoplasmique. Cependant, les anti-SRP ne reconnaissent pas le domaine M (Römisch et al., 2006) (Figure 8). L'isotype des IgG anti-SRP est principalement l'IgG1 qui est retrouvé dans environ 80% des sérums de patients anti-SRP positif. Le deuxième isotype est l'IgG4 qui est retrouvé chez environ 29%. A noter que l'IgG2 et IgG3 peuvent aussi être retrouvés alors toujours associés aux IgG1 ou IgG4 (Benveniste et al., 2011).

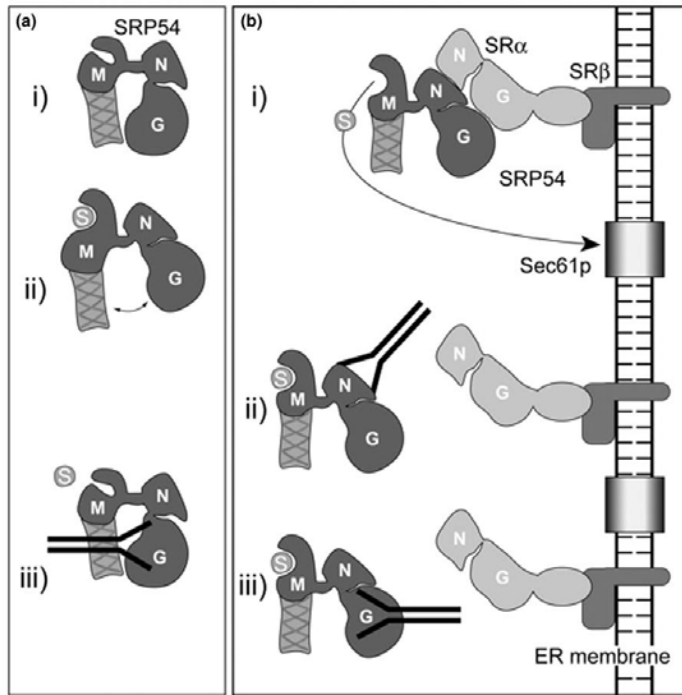


Figure 9. Représentation schématique du site antigénique des aAc anti-SRP₅₄ (Römisch et al., 2006).

(a) Les aAc dirigées contre le domaine SRP54G inhibe la liaison à la séquence signal. (b) Les aAc dirigés contre le domaine SRP₅₄N ou SRP₅₄G empêche le relargage de la séquence signal de la SRP₅₄ vers la membrane.

b. Protéine HMGCR et Ac anti-HMGCR

L'HMGCR est l'enzyme clef des premières étapes de la biosynthèse du cholestérol, réduisant l'HMG-CoA en mévalonate (Goldstein and Brown, 1990). C'est une protéine complexe de 97 kDa constituée de deux principaux domaines : le domaine C-terminal qui se trouve face au cytosol et qui porte le domaine catalytique de l'enzyme (Istvan et al., 2000) et le domaine N-terminal face au lumen contenant les 8 domaines transmembranaires du reticulum (Roitelman et al., 1992) (Figure 10). Cette enzyme est directement inhibée par les statines qui sont fréquemment utilisées comme traitement hypocholestérolémiant pour les maladies cardiovasculaire.

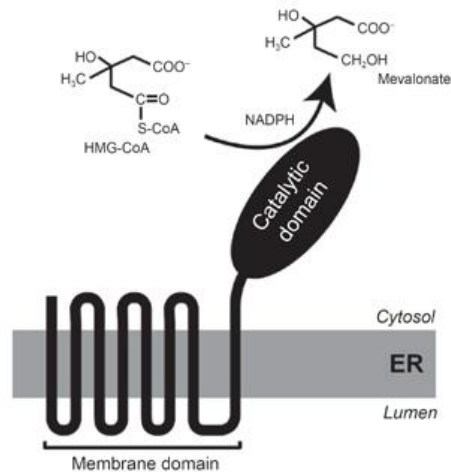


Figure 10. Représentation de la structure de l'enzyme HMGCR (DeBose-Boyd, 2008).

Les aAc anti-HMGCR ont été décrits récemment par le groupe de Mammen en 2010. Ce groupe a montré que des patients atteints de myopathies nécrosantes après traitement aux statines présentaient des aAc reconnaissant deux protéines aux poids moléculaires de 100 kDa et 200 kDa. Sachant que les statines inhibent l'enzyme HMGCR et qu'après traitement aux statines les cellules augmentent l'expression de cette dernière, ils ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la protéine HMGCR pourrait induire une réponse immunitaire humorale anti-HMGCR ce qu'ils ont confirmé par des techniques d'immunoprécipitation et de compétition. Leurs travaux ont démontré que les aAc anti-HMGCR reconnaissent la partie C terminal de l'enzyme localisée dans le cytosol, mais pas la partie N-terminal (Christopher-Stine et al., 2010). La cible, le retentissement biochimique et la sous-classe des aAc anti-HMGCR n'ont pas encore été clairement définis.

III. 4. Histologie des MNAI

Par définition le diagnostic des MNAI repose sur l'examen histologique musculaire. L'analyse de la biopsie musculaire montre la présence de fibres en nécrose et d'autres en régénération.

Par définition, les MNAI se distinguent des autres classes de myosites par le peu ou l'absence d'infiltrat inflammatoire (Grable-Esposito et al., 2010; Miller et al., 2002; Sadeh and Dabby, 2008) en particulier lymphocytaire T. Cependant la présence de macrophages assurant la détertion des fibres musculaires en nécrose est fréquente (Watanabe et al., 2016). L'absence d'inflammation musculaire est soulignée par l'absence d'expression sarcolemmique diffuse du CMH I (Dalakas, 2011). Les fibres musculaires à l'état physiologique n'expriment pas à un niveau détectable le CMH-I à la différence de la grande majorité des autres types cellulaires de l'organisme. Cependant les fibres immatures en régénération expriment transitoirement de manière physiologique le CMH-I (Pavlath, 2002).

Une des caractéristiques des MII est une expression diffuse du CMH-I par les fibres musculaires. Cette caractéristique est retrouvée au cours de tous les MII à l'exception des MNAI dans la définition de l'ENMC qui en fait un critère d'exclusion. Cependant, il a déjà été rapporté qu'au cours des MNAI, il est parfois observé l'expression du CMH-I sur quelques fibres (Allenbach and Benveniste, 2013; Watanabe et al., 2016) (figure 11 et 12), voire de manière parfois diffuse et sur des fibres non en régénération.

Les MNAI à anti-SRP et anti-HMGCR présentent beaucoup de similitudes cliniques et histologiques. Les différentes analyses de biopsies de patients MNAI ont montré la présence de fibres en nécrose ainsi que des fibres en régénération (Allenbach and Benveniste, 2013; Alshehri et al., 2015; Mammen, 2016). Une autre caractéristique est une variation de taille des

fibres musculaires suggérant une hypotrophie ou une atrophie chez les patients MNAI (Alshehri et al., 2015; Miller et al., 2002). Si dans sa définition ENMC, les MNAI ne présentent pas de dépôt de complexe d'attaque membranaire C5b9 sur les fibres musculaires, leur présence a déjà été rapportée chez certains patients anti-SRP ou anti-HMGCR (Allenbach and Benveniste, 2013; Miller et al., 2002; Watanabe et al., 2016) (figure 11 et 12).

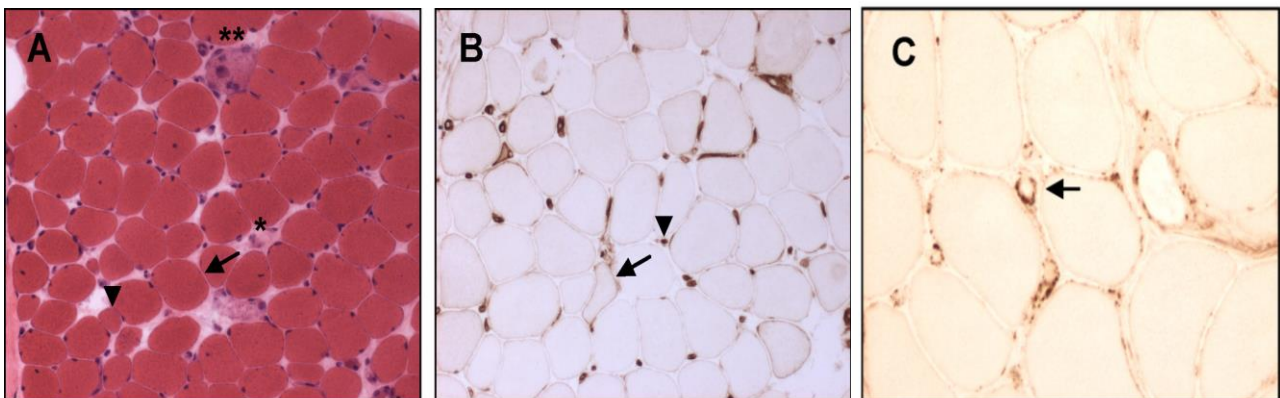


Figure 11. Histologie musculaire de patient anti-SRP MNAI.

A. Biopsie musculaire, coloration à l'hématine éosine, fibre de grande taille (flèche), fibre de taille réduite (tête de flèche), des fibres en nécroses (*) et fibre en régénération (**). B. Immuno-marquage CMH-1 à la surface d'une fibre musculaire (flèche) et CMH-1 à la surface des cellules endothéliales capillaires (tête de flèche). C. Dépôt de complexes d'attaque membranaire (flèche).

(Allenbach and Benveniste, 2013a)

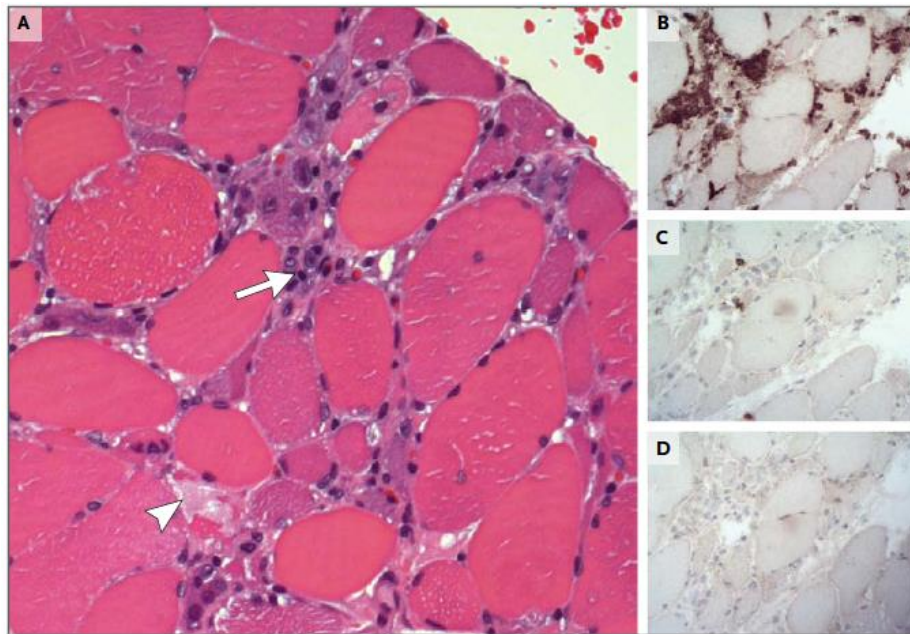


Figure 12. Histologie des MNAI à anti-HMGCR.

A. Biopsie musculaire de patient MNAI à anti-HMGCR colorée à l'hématine éosine, présentant une inégalité du diamètre des fibres et des fibres en nécrose (tête de flèche) avec un important infiltrat inflammatoire constitué de macrophages (flèche). B. Marquage des macrophages (CD68). C. Marquage des lymphocytes T cytotoxique (CD8). D. Marquage des lymphocytes B (CD20) (Mammen, 2016).

III. 5. Pronostique et traitement

Le traitement des MNAI a pour objectif de restituer la force musculaire des patients et de prévenir des rechutes de cette maladie chronique. Le traitement n'est pas standardisé. Aucun essai thérapeutique contrôlé n'a été réalisé spécifiquement pour ce groupe de patient.

a. Corticoïdes et immunosuppresseurs

Le traitement repose principalement sur la corticothérapie à forte dose (1mg/kg/j). L'intérêt de la corticothérapie au cours des MNAI n'a jamais été formellement démontré mais le

sombre pronostic observé dans des séries historiques ne laisse place à aucun doute quant à son efficacité.

Les MNAI SRP et HMGCR sont des maladies chroniques. Elles ont une longue durée d'évolution émaillée par un nombre important de rechutes (Allenbach et al., 2014; Benveniste et al., 2011; Hengstman et al., 2006; Miller et al., 2002). Ainsi, pour éviter une corticothérapie à forte dose de manière prolongée qui s'associe à une morbidité élevée (diabète induit, risque cardio-vasculaire accru, prise de poids importante, fragilité cutanée et osseuse, troubles hormonaux,...), un traitement *de fond* avec un immunosuppresseur est le plus souvent proposé à visée d'épargne cortisonique.

Là encore, pour les MNAI aucune étude n'a été réalisée pour savoir quelle molécule privilégier. Par analogie avec les MII, le méthotrexate ou l'azathioprine sont utilisés en première ligne. En effet, ces traitements ont montré leur efficacité au cours des MII (Choy and Isenberg, 2002). En cas d'échec de ces traitements, il est discuté en troisième ligne d'autres immunosuppresseurs tels que le cyclophosphamide, du rituximab ou des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses (IgIV).

b. Le rituximab, les IgIV et les échanges plasmatiques.

Les MNAI étant associées à des MSA, rapidement il a été envisagé d'utiliser des traitements ciblant l'immunité humorale.

Des cas rapportés suggèrent le bénéfice de traitement anti-LB notamment du rituximab, qui est un Ac monoclonal anti-CD20 présent sur les LB (Mahler et al., 2011). Cependant aucune étude prospective n'a pu montrer son intérêt. De même, des cas rapportés décrivent le bénéfice des échanges plasmatiques suggérant le rôle pathogène de « substances plasmatiques circulantes » (Choy and Isenberg, 2002).

Les IgIV sont aussi largement utilisées au cours des MII avec des essais prospectifs montrant leur effet rapide. Dans le cas particulier des MNAI, il n'existe pas d'étude prospective, mais de nombreuses séries de cas soulignent l'importance de l'effet bénéfique des IgIV (Allenbach and Benveniste, 2013a; Lahaye et al., 2014). Récemment il a été publié une série de 3 patients MNAI à anti-HMGCR traités efficacement par IgIV en monothérapie (en raison du risque important d'effet secondaire de la corticothérapie), avec un contrôle satisfaisant de la maladie (Mammen and Tiniakou, 2015).

Dans tous les cas, le traitement doit être prolongé en raison du nombre important de rechutes avec une durée d'au-moins 3 ans. Les patients insuffisamment traités risquent de développer des séquelles avec un déficit musculaire définitif par amyotrophie et/ou dégénérescence musculaire adipeuse.

VI. Objectifs

Les MNAI présentent de la nécrose musculaire ainsi que de l'atrophie conduisant à une maladie handicapante. L'objectif de cette étude est de comprendre le lien entre les lésions observées et la possible action des anticorps anti-SRP et anti-HMGCR.

Au cours de cette étude nous avons émis l'hypothèse que les aAc pouvaient jouer un rôle dans les lésions musculaires survenant au cours des MNAI anti-SRP et anti-HMGCR. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons :

1. Etudier les biopsies musculaires des patients MNAI à anti-SRP et anti-HMGCR en analysant la nécrose, l'atrophie et la composition de l'infiltrat inflammatoire ainsi que les mécanismes physiopathologiques impliqués.
2. Analyser la régénération et l'atrophie musculaire *in vitro* en définissant le rôle des anti-SRP et anti-HMGCR dans ces aspects.
3. Tenter de comprendre comment les anticorps anti-SRP et anti-HMGCR rencontrent leurs cibles antigéniques.

RESULTATS

RESULTATS 1

Dans cette étude nous avons voulu décrire les différentes altérations survenues au niveau du muscle squelettique des patients anti-SRP et anti-HMGCR. Nous avons analysé les biopsies musculaires des patients et nous les avons comparé à des biopsies d'autres patients atteints de myosites (le syndrome anti-synthétase (SAS) et les dermatomyosites (DM)).

Les biopsies anti-SRP ont montré une plus grande proportion de fibres en nécrose, cependant, les patients anti-HMGCR et les SAS ont montré la même proportion.

La distribution des fibres en nécroses chez les patients anti-SRP ou anti-HMGCR était aléatoire. En revanche, la distribution était périfasciculaire chez les patients SAS ou DM. Les taux sériques de CPK étaient corrélés avec la proportion de fibres en nécrose. Les lymphocytes ont été régulièrement détectés, à des niveaux comparables aux autres types de myosites chez un quart des patients anti-SRP et anti-HMGCR. L'activation de la voie classique du complément avec des dépôts du complexe d'attaque membranaire a été observée. Ce résultat a été accompagné par le dépôt des IgG sur les fibres musculaires ainsi qu'un marquage des protéines SRP et HMGCR à la membrane.

L'analyse de l'infiltrat inflammatoire a révélé la présence de macrophage de type M2 CD206⁺STAT6⁺ au niveau de l'endomysium. Les macrophages M1 CD68⁺iNOS⁺ et l'environnement TH-1 ont aussi été détectés et ils sont impliqués dans la myophagocytose.

Nous en concluons que les myopathies anti-SRP et anti-HMGCR ne peuvent plus être considérées comme des entités non-inflammatoires sachant que l'inflammation est corrélée avec la nécrose musculaire, qui elle-même implique l'immunité humorale et des auto-anticorps spécifiques des myosites.

From 'Immune mediated Necrotizing Myopathy' to 'Antibody-mediated Necrotizing Myositis: towards the pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR antibodies'

Yves Allenbach^{1-3*}, Louiza Arouche-Delaperche^{3*}, Corinna Preusse¹, Gillian Buttler-Brown³, Nicolas Champtiaux², Kuberaka Mariampillai², Aude Rigolet², Peter Hufnagl⁴, Norman Zerbe⁴, Damien Amelin³, Thierry Maisonobe⁵, Sarah Louis-Leonard⁵, Charles Duyckaerts⁵, Bruno Eymard⁶, Hans-Hilmar Goebel¹, Laurent Drouot⁷, Olivier Boyer⁷, Olivier Benveniste^{2,3§}, and Werner Stenzel^{1§}

From 'Immune mediated Necrotizing Myopathy' to 'Antibody-mediated Necrotizing Myositis: towards the pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR antibodies'

Yves Allenbach^{1-3*}, Louiza Arouche-Delaperche^{3*}, Corinna Preusse¹, Gillian Buttler-Brown³, Nicolas Champiaux², Kuberaka Mariampillai², Aude Rigolet², Peter Hufnagl⁴, Norman Zerbe⁴, Damien Amelin³, Thierry Maisonobe⁵, Sarah Louis-Leonard⁵, Charles Duyckaerts⁵, Bruno Eymard⁶, Hans-Hilmar Goebel¹, Laurent Drouot⁷, Olivier Boyer⁷, Olivier Benveniste^{2,3§}, and Werner Stenzel^{1§}

1 Charité - Universitätsmedizin, Department of Neuropathology, Berlin, Germany

2 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Hospital University Department: inflammation, immunopathology and biotherapy (DHU i2B), Paris, France

3 Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Myology research center, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

4 Department of Pathology, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, Germany.

5 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Department of Neuropathology, Paris, France

6 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Department of Myology, Paris, France

7 INSERM, U905; Normandie University, UROUEN, Institute for Biomedical Research and Innovation (IRIB); Rouen University Hospital, Department of Immunology, Rouen, France

*§ These authors contributed equally to this work

Financial support : Société Nationale Française de Médecine Interne (SFNMI), Association

Française contre les Myopathies (AFM), Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.

(DGM) to YA.

Correspondence : Dr. Y. ALLENBACH, Service de Médecine Interne 1, Centre de Référence

des Maladies Neuro-musculaires Paris Est, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Assistance

Publique Hôpitaux de Paris, 83 boulevard de l'Hôpital Paris Cedex 13 France, Phone : +33

(0) 1 42 16 10 66 Fax : +33 (0) 1 42 16 10 65, email: yves.allenbach@aphp.fr

Conflict of interest with regard to the work: None

Abstract

Immune mediated necrotizing myopathy (IMNM) is recognized as a separate entity among inflammatory myopathies. IMNM is morphologically defined by predominant muscle fiber necrosis and no or little inflammation. Two autoantibodies are specifically associated with IMNM: anti-signal recognition particle (SRP) antibody and anti 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase antibody (HMGCR). However, the pathological features and their putative similarities have not been studied extensively. Further, molecular mechanisms, especially those involved in immunity and necrosis, are unknown. It is of importance to gain insight into the pathophysiology of these diseases with respect to their severity and refractory clinical course.

In this study, we describe the morphology of skeletal muscle alterations occurring in both conditions of anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ patients, and analyze the molecular immune mechanisms. Muscle biopsies from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients were analyzed, and compared to biopsies from myositis patients (anti-synthetase syndrome (ASS) - associated myositis and dermatomyositis).

Anti-SRP⁺ patients showed the highest proportion of necrotic fibers and strikingly, this proportion was similar in anti-HMGCR⁺ and ASS patients. Necrotic fibers were randomly distributed in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, whereas in ASS patients they were concentrated in perifascicular regions. Creatine kinase levels and muscle regeneration were correlated with the proportion of necrotic fibers. Lymphocytes were regularly detected, in a quarter of the anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ muscles at the same level as in the other myositis controls. Humoral immunity with activation of the classical pathway of the complement cascade was observed in IMNM. This finding was accompanied by deposition of sarcolemmal immunoglobulins, sarcolemmal staining of SRP and HMGCR protein and presence of

CD206⁺STAT6⁺ macrophages endomysially. CD68⁺iNOS⁺ macrophages and a Th-1 immune environment were also observed and involved in ongoing myophagocytosis.

Anti-SRP and anti-HMGCR myopathies can no longer be considered as non-inflammatory myopathies since the inflammation is correlated with muscle necrosis, which involves humoral immunity including myositis-specific autoantibodies.

Keywords

Necrotizing myopathy; myositis-specific antibodies; autoantibodies; anti-SRP antibodies; anti-HMGCR antibodies, idiopathic inflammatory myopathy.

Introduction

Idiopathic inflammatory myopathies are a heterogeneous group of acquired muscle diseases including dermatomyositis, polymyositis, sporadic inclusion body myositis and, more recently, immune mediated necrotizing myopathy (IMNM) has been added to this group [18]. The clinical and morphological criteria of IMNM were defined in 2003 by an international consensus and highlighted by (i) muscle fiber necrosis, (ii) no or few inflammatory infiltrates, and (iii) absence of complement deposition as characteristic biopsy features [18].

In addition to the morphological classification criteria, the discovery of myositis-specific auto-antibodies has led to the serological classification and characterization of numerous clinical sub-entities of myositis [21, 36]. Two autoantibodies (aAb) are specifically associated with IMNM and held to be paradigmatic for this disease. The anti-signal recognition particle (SRP) aAb was identified [30] and, interestingly, patients were at that time classified as suffering from polymyositis. In a land-mark paper, Miller *et al.* pointed out that anti-SRP aAb positive (anti-SRP⁺) myositis patients were characterized by the presence of necrotic myofibers in their muscle biopsies [25]. SRP is an ubiquitous ribonucleoprotein that plays a key role in the delivery of newly synthesized resident and secretory proteins to the endoplasmic reticulum [33]. In 2012, Mammen *et al.* characterized a new aAb in a group of IMNM patients (based on a pathological definition), which was later identified as targeting the 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase (HMGCR) [10, 22]. HMGCR is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, localized in the endoplasmic reticulum membrane [16]. Although both enzymes, SRP and HMGCR, have different functional properties, it is of note that they are both confined to the same intracellular anatomical compartment *i.e.*, the endoplasmic reticulum.

Anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients show a similar clinical phenotype, with predominant affection of skeletal muscle and no or minor extra-muscular manifestations [3, 17, 22]. The

myopathy is generally severe, with acute onset and severe proximal weakness. In addition, IMNMs are frequently refractory to standard treatment regimens [3, 17, 22], showing the limits of current therapeutic approaches.

It is interesting to note that, at present, it is unknown to what extent the pathological features of both diseases are similar. In addition, description of muscle morphology in anti-SRP⁺ patients are scarce and heterogeneous [14, 17, 25] and furthermore, some anti-HMGCR⁺ patients seem to harbor significant inflammatory infiltrates [3, 10]. Finally, the underlying molecular mechanisms involved in myofiber-necrosis, comparing anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺-associated myopathies have not yet been explored in the skeletal muscle to date. A recent study has highlighted the presence of myonuclear pathology and perimysial connective tissue as well as lymphocytes in a third of patients [4].

Thus, the aim of this study was to precisely describe and quantify necrosis and inflammation in both entities in a large series of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, and to investigate the mechanisms involved in myofiber necrosis.

Material and methods

Patients and samples

We identified 25 muscle biopsies from anti-SRP⁺ patients, and 19 from anti-HMGCR⁺ patients (of note, one anti-SRP⁺ and two anti-HMGCR⁺ patients had two biopsies). The first inclusion criterion was a positive anti-SRP or anti-HMGCR aAb test determined as previously described [15]. Anti-synthetase syndrome-associated myositis with anti-Jo-1 Ab (n=21) and dermatomyositis (DM) patients (n=7) were also enrolled in the study as a pathological control group. Anti-Jo-1 aAb was analyzed and controlled by two different methods (Luminex -100 system; Luminex, Austin, TX, USA, and ENA-LISA-kit; Biomedical Diagnostics, Marne-La-Vallée, France). DM was diagnosed based on ENMC criteria [18].

The following patients' characteristics were documented: epidemiological characteristics, presence of muscle weakness, creatine kinase level (CK), presence of typical skin rash of DM [18], and presence of interstitial lung disease [32].

Histological and immunohistological analysis

All frozen samples were analyzed in the Department of Neuropathology at the Charité – Universitätsmedizin, Berlin (Germany) following standardized procedures. Seven µm cryostat sections of muscle biopsies were used. The following stains were performed: H&E or combined Eosin & Dystrophin 2, and Gömöri trichrome. Immunohistochemical analysis using the following Abs was performed: anti-major histocompatibility complex class I (MHC-I) (mouse, clone W6/32 Dako, Glostrup Denmark), anti-CD3 (rabbit, polyclonal, Dako, Denmark), anti-CD4 (mouse monoclonal, clone 4B12, Novocastra, Newcastle, GB), anti-CD8 (mouse monoclonal, clone C8/144B, Dako), anti-CD68 (mouse monoclonal, clone EBM11, Dako), anti-CD79a (mouse monoclonal, clone EP82, Epitomics, Burlingame, CA, USA), anti-CD206 (mouse monoclonal, clone 7-450, Acris, Herford, Germany), anti-C1q, (rabbit polyclonal, Dako), anti-C5b9 (mouse monoclonal, clone aE11, Dako), anti-human IgG

(Dako), Myosin heavy chain neonatal (mouse monoclonal, WB-MHCn, Leica Biosystem, Newcastle, UK), anti-Dystrophin 2 (mouse monoclonal, Dy8/6C5, Novocastra, Newcastle, UK), anti-SRP54 (rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK), anti-HMGCR (rabbit monoclonal, clone EPR1685(N), Abcam), anti-STAT1 (mouse monoclonal, clone246523, R&D, Abingdon, OX14 3NB, UK), anti-STAT6 (clone253806, R&D), anti-dysferlin (rabbit monoclonal, clone JAI-1-49-3, Abcam), anti-iNOS (rabbit polyclonal, Upstate, Lake Placid, NY, USA) and anti-neural cell adhesion (NCAM) molecule (mouse monoclonal, clone ERIC-1, AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom).

We also purified polyclonal anti-SRP Ab, and anti-HMGCR Ab from plasmapheresis of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients using recombinant SRP or HMGCR protein by affinity chromatography (Suppl. Fig. 1). Specific affinity of purified aAb was checked using ALBIA SRP and ALBIA HMGCR immunoassays [7, 14]. Then purified aAbs were coupled with Alexa fluor (AF) 555 or 488, according to the manufacturers instructions (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France).

An automated slide staining system (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson) was used, except for C1q and IgG, which were stained manually, as these two aAb are directly coupled to a fluorophore. Double immunofluorescence was performed of SRP54 with NCACM or HMGCR with NCAM as well as SRP54 with dysferlin or HMGCR with dysferlin, CD68 with STAT1, CD68 with iNOS, CD206 with STAT6, by serial incubation using appropriate fluorescence-labeled secondary Ab, as described previously [29].

For *in vitro* myotube staining, primary myoblasts were obtained from human muscle biopsies of non myopathic patients as previously described [8]. Myotubes at 2 days of differentiation were fixed with 4% of paraformaldehyde and permeabilized or not with 0.4% of Triton 100X. After blocking with 2% bovine serum, cells were incubated with an affinity-purified anti-SRP⁺ Ab coupled or not with AF 555 (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) or with an affinity-purified anti-HMGCR⁺ Ab [14] coupled or not with AF 488 or AF 555

(ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), co-stained with Myosin heavy chain (MyHC, MF20: Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) or MHC-I (see above). The primary Ab was revealed with the appropriate secondary Ab coupled with AF 488 or AF 594. Nuclei were stained by Hoechst (Sigma, St Louis, MO, USA). Image acquisition was obtained by confocal microscopy Olympus FluoView FV 1000, fitted with the objective 60X NA1.35 or with Epi-fluorescence using a Nikon Ti microscope equipped with a CoolSNAP HQ2 camera (Roper Scientific).

Histological quantification

All slides were retrospectively analyzed by three myopathologists (WS, H-HG and YA). Presence or absence of each item is mentioned in the study.

For quantitative analysis, slides were digitalized using Pannoramic 250 (3DHitech) at a resolution of 0.244 μm per pixel. Whole slide images were processed using an ImageJ [34] based virtual microscope [38]. Density of immune cells was calculated after counting positively stained cells in the complete cross-section of the biopsy. Of note, only CD68 positive-macrophages were assessed using a semi-quantitative score since macrophages frequently clustered densely together limiting the reliability of a precise count (0: absence, 1: few, 2: moderate and 3: intense). Myofiber necrosis, defined as pale and/or hyalinized muscle fibers combined with a loss of sarcolemmal integrity was evaluated on combined Eosin and dystrophin 2 immunohistochemical staining. Neonatal myosin heavy chain positive fibers were defined as regenerating/immature. The perifascicular area was defined as the two penultimate myofiber layers at the periphery of the fascicle [23]. For each muscle sample, the number of pictures (200x magnification, randomly selected) covering 50% of the total area of the section was analyzed. For each patient the total number of muscle fibers was manually counted, and the percentages of necrotic fibers and regenerating fibers were assessed.

Real time qPCR

For RNA extraction from the muscle tissue samples, reverse transcription and quantitative PCR (qPCR) reactions, were performed, by employing the same methods as described previously [28]. Briefly, the expression levels of gene transcripts, were analyzed by quantitative real-time RT-PCR using the 5'-nuclease technology on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System and the human TaqMan predeveloped assay reagents (both from Applied Biosystems). The assay identification probes were: Hs00204833_m1; interferon (*IFNG*), Hs00989291_m1; *STAT1*, Hs01013989_m1; *IL1B*, Hs00174097_m1; *IL6*, Hs01075666_m1; *TNF*, Hs01113624_g1; *STAT6*, Hs00598625_m1; *NOS2*, Hs01075529_m1. The relative abundance of target transcripts, was normalized to the expression levels of the endogenous control gene: *phosphoglycerate kinase 1*, Hs99999906_m1. For each probe, individual data were expressed as relative quantification (RQ) value. RQ value was equal to $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*i.e.*, normalized fold change relative to the mean gene expression for the 7 healthy controls).

Statistical analysis

Categorical variables are reported as numbers and/or percentages and were compared using the Fisher's exact test. Quantitative variables are reported as mean (\pm SD) and compared using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. Spearman rank-order correlations were used to calculate association's quantitative variables. A *p*-value <0.05 was considered significant. Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for analysis.

Results

Characteristics of patients

Distribution of age and sex in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, as well as in control groups is described in Table 1. Mean age at the time of muscle biopsy was higher in anti-HMGCR⁺ patients, whereas sex ratio was similar in all groups with a female predominance. Muscle strength of the deltoids, where the biopsies were performed, were significantly different. Anti-SRP⁺ aAb patients have the most important muscle deficit. Along that line, CK levels in anti-SRP⁺ patients were highest (5195±5424 I.U/L) whereas the DM group had the lowest values (908±673 I.U/L; p=0.04). CK levels in anti-HMGCR⁺ and in anti-Jo1⁺ patients were within the same range (3133±2345 I.U/L and 3872±4549 I.U/L respectively). Of note, none of anti-SRP⁺, anti-HMGCR⁺ or anti-Jo1⁺ patients had the characteristic skin rash of classical DM patients.

Features of myofiber necrosis

All anti-SRP⁺ anti-HMGCR⁺ patients harbored necrotic and regenerating fibers, but important variations were observed in both groups (Fig. 1a-h). The proportion of fiber necrosis ranged from 0.1% to 10.1% in anti-SRP⁺ patients' muscle and 0.1 to 9.2% in anti-HMGCR⁺ patients' muscle. Quantification of necrosis also showed, that anti-SRP⁺ patients' muscles showed significantly more necrotic fibers (3.2±0.5%) compared to anti-HMGCR⁺ patients (1.8±0.3%; p=0.02). Consistently, the proportion of necrotic myofibers in anti-SRP⁺ patients was higher compared to control groups (1.6±0.5%, p=0.004 and 0.4±0.1%, p=0.005; in anti-Jo-1⁺ and DM patients respectively). Surprisingly, anti-HMGCR⁺ and anti-Jo-1⁺ patients' muscles harbored a similar numbers of necrotic fibers (p=0.7), which is higher than that observed in DM patients (p=0.001) (Fig. 1i).

The distribution of necrotic fibers was diffuse both in muscles of anti-SRP⁺ and in anti-HMGCR⁺ patients with only a minor proportion of necrotic fibers occurring in the perifascicular area (27.6±4% and 26±6.5%). In contrast, in anti-Jo-1⁺ patients necrotic fibers were confined to the perifascicular region (89.7±3.1%; p<0.0001). In DM muscle specimens, necrotic fibers were only rarely observed, however if detectable they were also found in the perifascicular area (80.6±4%, p<0.0001) (Fig. 1j).

In line with these results, the distribution of regenerating/immature neonatal MyHC or CD56 positive fibers were randomly distributed in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients whereas they mainly clustered in perifascicular areas in anti-Jo-1⁺ and DM patients (Fig. 1c-h). The quantification of regenerating/immature fibers revealed no difference between anti-SRP⁺ (17.4±2.5%) and anti-HMGCR⁺ patients (14.2±2.9%; p=0.3), but the percentages were higher compared to those observed in anti-Jo-1⁺ (4.7±1.1%; p=0.002) and DM patients (3.4±0.8%; p=0.005) (Fig. 1k). The proportion of necrotic fibers correlated with the proportion of regenerating fibers (r=0.6, p<0.001) in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ muscle biopsies (Fig. 1l). Of note, the ratio of regenerating: necrotic myofibers, was 5.7±4.0 and 8.3±5.7 in SRP⁺ and HMGCR⁺ patients (p=0.1) indicating that quantification of mechanisms of regeneration/immaturity in combination with assessment of specific features of necrosis are very sensitive in IMNM.

In addition, a good correlation between CK levels and the percentage of myofiber necrosis was noted, both in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients (r=0.6, p<0.001) (Fig. 1m).

Together, these results show that necrosis in IMNM patients with anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ aAb has a different pattern of distribution compared to anti-Jo1⁺ patients, and in addition, regeneration is more prevalent. While the number of necrotic myofibers is higher in anti-SRP⁺ patients, it is similar in anti-HMGCR⁺ and anti-Jo1⁺ patients.

Features of inflammation

After having assessed necrosis and regeneration in IMNM, we analyzed features of skeletal muscle inflammation, of which paucity or absence is considered a key element in the present IMNM definition [18].

All anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients harbored inflammatory infiltrates of which CD68⁺ macrophages were the most abundant. In addition to myophagocytosis, macrophages were diffusely distributed throughout the endomysium (Fig. 2a, b). A semi-quantitative estimation of CD68⁺ macrophage density showed no significant difference between anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients (1.8 ± 0.7 and 1.8 ± 0.8 , respectively; $p=0.9$). Although, CD68⁺ macrophages were more abundant in Jo-1 patients (2.2 ± 0.7), this feature did not reach statistical significance ($p=0.08$). However, macrophage distribution was strikingly different, since CD68⁺ cells were mainly localized in the endomysium of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, whereas they were largely confined to the perimysium in Jo1 (Fig. 2c), and in DM patients (Fig. 2d).

In addition to macrophages, CD3⁺ lymphocytes were also present in all of the anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ muscles analyzed (9.4 ± 18.5 cells/mm² and 12.1 ± 10.1 cells/mm², $p=0.08$) with a patchy distribution, mainly in the endomysium (Fig. 2e, f), mostly close to necrotic fibers (data not shown). In anti-Jo1⁺, and DM patients, CD3⁺ lymphocytes were mainly observed in the perimysium and/or perivascular areas (Fig. 2g, h) and densities were higher as compared to those in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients (Jo-1: 33.2 ± 31.6 cells/mm²; $p<0.005$ and DM: 35 ± 14.6 cells/mm²; $p<0.0001$) (Fig. 2i). A significant proportion of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients showed CD3⁺ lymphocyte densities that were within the same range as in anti-Jo1⁺ and DM patients. 32.2% of anti-SRP⁺ patients, 57.8% of anti-HMGCR⁺ patients and 77.7% of anti-Jo1⁺ patients had significant numbers of CD3⁺ T cells (defined as more than >5 cells/mm²) (Fig. 2i). Furthermore, presence of CD3⁺ lymphocytes in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' skeletal muscle correlated well with the proportion of necrotic fibers ($r=0.4$, $p=0.004$) (Fig. 2j). Results for CD8⁺ lymphocytes showed the same trend (data not

shown). It should be noted that invasion of non-necrotic muscle fibers by cytotoxic CD8⁺ T cells was never observed in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ muscles, and surrounding of muscle fibers by T cells was a rare event.

CD3⁺ CD4⁺ T cells constituted the most abundant T cell subtype in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles (data not shown).

In addition to inflammatory infiltrates, MHC-I expression was detectable in all muscle biopsies from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, but with significant variations, and always with a patchy distribution without any perifascicular predominance (Suppl. Fig. 2). Roughly half of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles harbored less than 30% of fibers expressing MHC-I on the sarcolemma, but a quarter of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles showed strong sarcolemmal and sarcoplasmic MHC-I positivity (> 60% of fibers) (Suppl. Fig. 2). Of note, the proportion of MHC class I⁺ fibers was correlated with the number of necrotic myofibers ($r=0.3$, $p=0.03$) (Suppl. Fig. 2).

Together, these results show that the majority of muscles derived from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients harbored mild but conspicuous signs of lymphocytic infiltration, and that the level of muscular inflammation was correlated with myofiber necrosis. Of note, a quarter of the patients' muscles exhibited significant inflammatory features similar to those observed in patients with other form of myositis.

Activation of the classical pathway of complement in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles

We next explored how specific aAb, complement activation as well as macrophage activation was involved in myofiber necrosis. The presence of the membrane attack complex (MAC; C5b-9) was analyzed because its formation represents the final common pathway of complement activation. A large number of the muscle fibers showed sarcolemmal deposits of MAC with a diffuse distribution in the fascicles (Fig. 3a, b): $12.8\pm 11.7\%$ in anti-SRP⁺ and

15.4±20.1% in anti-HMGCR⁺ patients, without significant differences between groups (p=0.7). It should be noted that in addition, necrotic fibers showed a strong sarcoplasmic immune reaction (Fig. 3a). The range of MAC positive fibers was between 0 and 35.9 % (in anti-SRP⁺ patients), and between 0 and 60.7 % (in anti-HMGCR⁺ patients), with only one single patient completely lacking complement deposits in each group. As controls for complement stains, we tested non-immune necrotizing myopathies: Fukutin-related protein associated muscular dystrophy and Duchenne Muscular Dystrophy (Fig. 3c and d).

Of the three known complement pathways, we sought for the presence of C1q, since this molecule is involved in the antibody-driven classical pathway. Indeed, C1q was present in conspicuous proximity to the sarcolemma of numerous muscle fibers in both anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients (Fig. 3e). Moreover, IgG deposits were also detectable close to the sarcolemma (Fig. 3f).

To test if cells from the B cell lineage, associated with a humoral response, were present in the skeletal muscle compartment, we looked for the presence of CD79⁺ B cells and CD138⁺ plasma cells. Yet, in both anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ muscles, CD79⁺B cell density was low (0.8±0.8 and 0.3±0.2 cells/mm², respectively), as well as CD138⁺ plasma cell density (1.3±1.2 and 1±0.8 cells/mm², respectively) (data not shown).

Together these results suggest that the classical pathway of complement activation is involved in myofiber necrosis in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients.

Expression of SRP and HMGCR in skeletal muscle

Both SRP, and HMGCR proteins are located in the endoplasmic reticulum inside of the cell, raising the question of how they can be reached by the circulating aAb. We investigated whether they could also be present at the sarcolemmal surface, which would make it possible that anti-SRP and anti-HMGCR aAb could trigger complement activation at the surface of myofibers. In muscles of anti-SRP⁺ patients, a clear sarcolemmal staining for SRP was observed after co-labeling the basal lamina of the sarcolemma with dysferlin (Fig. 4a-c).

Immunostaining revealed SRP⁺ fibers co-labelling in part with NCAM on muscle fibers of anti-SRP⁺ patients (Fig. 4b). In muscle of anti-HMGCR⁺ patients, HMGCR staining was detected at the sarcolemma (Fig. 4d-f). Labeling of HMGCR shows also a co-localization with NCAM in anti-HMGCR⁺ patients (Fig. 4e). These SRP⁺ and HMGCR⁺ fibers were randomly distributed, with both a cytoplasmic but also a sarcolemmal distribution (Fig. 4).

To further confirm that anti-HMGCR and anti-SRP aAb from patients can recognize their cognate antigens at the sarcolemmal surface, we repeated stains with anti-HMGCR or anti-SRP aAb purified from patients and directly coupled with a fluorochrome (AF555). Specific anti-SRP and anti-HMGCR deposits on the sarcolemma of the muscle fibers were observed (Fig. 4d, e respectively).

To confirm this result, *in vitro* experiments using cultured control primary myoblasts were performed. To show the localization of SRP and HMGCR proteins in skeletal muscle, staining of myotubes at initial stages of their differentiation were performed on non-permeabilized cells and permeabilized cells (controls), using anti-SRP and anti-HMGCR purified Ab from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients. Both aAb were coupled to AF 555 or AF488. In permeabilized cells, as expected an intracellular detection of SRP and HMGCR proteins were observed (Fig. 5a, b). The positivity of the immuno-staining for the intracellular protein myosin heavy chain confirmed the permeability of the membrane (Fig. 5a, b). Whereas, when cells were not permeabilized, attested by a negative immunostaining for myosin heavy chain, a positive immunostaining for SRP and HMGCR at the surface of myofibers was observed (Fig. 5c, d). Finally, to confirm that the serum of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients contains aAb able to recognize SRP and HMGCR proteins respectively at the surface of myotubes, we performed a confocal microscopy analysis using myotubes with purified anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ aAb. Indeed, these analyses confirm the colabelling of anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ with the membrane protein MHC-I (Fig. 5e, f).

Together, these results show that anti-SRP and anti-HMGCR aAb from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ IMNM patients can recognize their cognate auto-antigen ectopically exposed at the surface of myofibers, and activate the classical complement pathway to induce subsequent muscle damage.

Dual role of macrophages in IMNM

Since we showed that necrotic fibers are associated with predominant macrophage infiltrates in the presence of complement activation, we hypothesized that antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) could contribute to myofiber necrosis. ADCC is mediated by macrophages but also by natural killer (NK) cells. We tested for the presence of NK cells, and found only occasional NK cells in some samples with a random distribution (data not shown). We thus focused on the role of macrophages since these cells are involved in opsonization, a basic mechanism in complement-mediated necrosis. For this, we analyzed the RNA transcript of a series of macrophage-expressed genes. Genes of pro-inflammatory cytokines were expressed in the skeletal muscle. Indeed, high levels of *IL1B* mRNA were observed in muscle samples of anti-SRP⁺ (31.5±6.1; RQ values) and anti-HMGCR⁺ patients (28.3±8.5; RQ values). In anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, *IL6* (6.8±1.1 and 5.4±1.2; RQ values, respectively) and *TNF* (2.2±0.4 and 2.7±0.6, respectively), were also significantly up-regulated (Fig. 6a-c).

Analysis of *NOS2* mRNA showed significant up-regulation of gene expression in both groups (9.1±2 in anti-SRP⁺ and 5.6±1.3 in anti-HMGCR⁺ patients; RQ values). Similarly, elevated levels of transcription of the *IFNG* gene were observed (19.9±7.3 and 16.3±4.5; RQ values in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles, respectively) (Fig. 6d). In line with these results, *STAT1* (2.6±0.8 and 1.5±0.1) gene expression was also increased (Fig. 6e), illustrating classical activation of macrophages in the context of a Th1 commitment of T cells. To

underpin these mRNA data, we confirmed the presence of STAT1⁺CD68⁺ macrophages (Fig. 6g). The specific pathogenic role of ‘classically’ activated macrophages was further illustrated by the double positivity for CD68 and NOS2 of cells invading a myofiber (Fig. 6h). The interaction between anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ positive fibers and macrophages was further illustrated by the intimate contact between CD68⁺ macrophages and anti-SRP⁺ myofibers (Fig. 6i).

In addition to these NOS2⁺ macrophages, we identified different macrophage populations, which were neither iNOS⁺ or STAT1⁺. Quantitative PCR analysis showed an up-regulation of *STAT6* and *MRC1/CD206* gene expression (Fig. 6j, k), transcription factors involved in humoral immunity and so called ‘alternative’ activation of macrophages. We then determined which cells expressed STAT6, and observed that it was mainly the CD206⁺ macrophages that were positive for STAT6 staining (Fig. 6l, m). These macrophages were mainly located around and not within necrotic myofibers. Of note, only occasional CD3⁺ T cells co-localized with STAT6 (data not shown).

Together, these results suggest that macrophages have a dual role both myodestructive involved in active myophagocytosis, and also a further population, which is double STAT6⁺CD206⁺ and located in the endomysial vicinity of myofibers undergoing necrosis.

Discussion

In this study, we show that anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients are both characterized by muscle biopsies containing necrotic fibers associated with numerous macrophages whereas lymphocytes are usually sparse and when abundant, they positively correlate with the amount of necrosis. We also show activation of the classical complement pathway and abundant deposits of MAC. We demonstrate presence of SRP and HMGCR proteins at the sarcolemma in muscle. Although it is generally thought that they are restricted to the intracellular compartment, we have evidenced that anti-SRP and anti-HMGCR aAb can bind to their cognate auto-antigen at the myofiber surface and therefore could be directly pathogenic in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ myopathies through activation of complement. Finally, analysis of innate immunity reveals that macrophages follow specific modes of activation corroborating the functional diversity of the most abundant effector cell in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ myopathies.

The concept of IMNM being a distinct entity among the idiopathic inflammatory myopathies was first put forward at an ENMC workshop in 2003, and a first attempt to define criteria was pursued. At that time, the specific association between necrotizing myopathies and presence of anti-SRP Ab had been reported only one year before [25], and the description of a myopathy associated with anti-HMGCR Ab was not yet known[10]. Now, the strict application of ENMC criteria to the patients enrolled in the present study shows that only exceptionally, anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients correspond to this IMNM definition, essentially because of i) the regular presence of sarcolemmal MAC deposits on non-necrotic fibers (nearly all patients) ii) necrotic fibers were not always the predominant abnormal histological feature iii), and scattered endomysial CD8⁺ T cell infiltrates neither surrounding nor invading intact muscle fibers were in fact frequently observed. In addition, they cannot be

assigned to any other of the proposed sub-groups including polymyositis [1]. Therefore, we suggest that the definition of criteria for IMNM should be adjusted.

A major finding of our present study is that the spectrum of pathological alterations such as necrosis, regeneration, and inflammation are in fact very broad, ranging from a few isolated necrotic fibers to large amounts of necrosis with conspicuous inflammation.

We clearly observed signs of inflammation (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells and MHC-I expression, as well as complement deposition), and this was frequently within the same range as in other forms of myositis, underpinning the immune-driven character of the condition.

These results are in line with a recent study by Mammen *et al.* showing frequent pathological features of inflammation in anti-HMGCR⁺ IMNM, comparable to those observed in dermatomyositis [12]. Pestronk *et al.* also recently published data in anti-HMGCR⁺ IMNM showing mild signs of muscular inflammation with lymphocyte infiltration in a quarter of cases [4]. Our precise quantitative measurements of cell densities in entire biopsies clearly demonstrated that a proportion of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ IMNM patients have prominent signs of inflammation as other myositides.

Similarly, in numerous cases, fiber necrosis was a rare event, and regeneration and immature fibers were predominant and present even if necrosis was sparse. Notably, distribution of necrosis and signs of inflammation were randomly disseminated throughout the endomysium in a patchy pattern. This specific topography has also been noticed by others before [3, 10, 11, 17]. However, most of these studies did not precisely measure cellular densities and quantification of necrosis neither did they compare these values with other entities. We conclude that a patchy distribution of regenerating/immature fibers is in fact a very sensitive marker of the disease, although it may lack specificity when considered alone.

Based on our findings we propose to modify and expand the pathological definition of IMNM and conversely use the term Immune Mediated Necrotizing ‘Myositis’ instead of ‘Myopathy’ because:

- i) Presence of myofiber necrosis at different stages of the necrotic process and/or myophagocytosis associated with signs of regeneration in a randomly distributed manner.
- ii) Presence of randomly distributed sarcolemmal complement deposits.
- iii) Presence of inflammatory lympho-monocytic infiltrates randomly distributed, predominantly in the endomysium.

We were able to show a close correlation between the proportion of muscle fiber necrosis and CK levels, indicating that the CK level is, as expected, a good surrogate marker of disease activity.

A comparison of the percentages of muscular fiber necrosis in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ IMNM showed that necrotic features were more pronounced in anti-SRP⁺ patients than in anti-HMGCR⁺ patients, whereas they were similar in anti-HMGCR⁺ patients compared to those in anti-Jo-1⁺ patients. Together these data, with the more pronounced muscle weakness and higher CK levels in anti-SRP⁺ patients suggest that anti-SRP⁺ IMNM is more severe than anti-HMGCR⁺ IMNM.

The pathogenesis of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ myopathy remains largely elusive, although we have proven the involvement of a Th1 adaptive immune response that promotes classically activated macrophages [28] in a series of patients, which, however, encompassed heterogeneous etiologies of IMNM.

In the present large series of patients with a homogenous aAb profile, we demonstrated strong complement deposition. For the first time, the observation of C1q on the sarcolemma supports the hypothesis of a direct pathogenic role of aAb that activate the classical complement pathway, which is in line with an antibody-mediated etiology. This concept is reinforced by our previous observation that the isotypes of circulating anti-SRP and anti-HMCGR aAb are those capable of activating complement [7, 15] and by the observation of IgG deposition on

the sarcolemma. Moreover, antibodies can bind to macrophage Fc γ R and activate macrophages in an alternative manner as suggested by the STAT6 positivity [26] as well as C1q, via complement receptor (CR)1 [9]. The effector functions of alternatively activated macrophages are broad and depend on specific stimuli, but macrophages stimulated through their Fc γ R support humoral responses [5]. Similarly, Mammen *et al.* also demonstrated the presence of M2 macrophages in anti-HMGCR⁺ IMNM [12].

In this sense and as mentioned above, the pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR aAb has been suggested by the correlation of aAb titers and clinical severity of the disease [3, 7, 37], but has never been demonstrated conclusively in muscle tissue. Indeed, expression of SRP and HMGCR proteins was observed on muscle fibers, essentially on regenerating fibers *in vitro* [31] and *in vivo* [11, 22]. In line with these results, we found SRP⁺ and HMGCR⁺ regenerating fibers *in vivo* as well as *in vitro*. More importantly, the positive staining on permeabilized myotubes *in vitro* shows the putative ability of anti-HMGCR and anti-SRP aAb to target their cognate antigens. The illustration of SRP Ab co-localizing on the sarcolemma in immature/regenerating fibers as well as the presence of classical complement activation cascade *in vivo* further add to the concept of pathogenicity of anti-SRP and anti-HMCR aAb in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ IMNM. Although, it cannot be formally excluded that other yet unknown aAb may be pathogenic in anti-SRP⁺ and/or anti-HMGCR⁺ patients as it was recently show by Lundberg *et al.* [2].

Moreover, we show ‘classical’ activation of macrophages in myophagocytosis. In addition, to the presence of NOS2⁺ macrophages, we observed high levels of IFN γ and the presence of TNF in muscle biopsies: two conditions required for classical activation [35]. Macrophages promote the inflammatory response by secreting IL-1 and IL-6 cytokines, which we also found to be elevated, and which are involved in tissue damage. The source of IFN- γ could be the innate immune cells and the macrophages themselves [13], the NK cells but also the Th1 CD4⁺ T cells, immune cells that we detected in the patients muscle biopsies. It should be

noted that the presence of IFN γ may explain the high proportion of MHC-I⁺ myofibers, since this cytokine is an inducer of MHC-I expression [27]. However, we did not detect the typical characteristics of immune cellular cytotoxicity mediated by MHC-I restricted CD8⁺ T cells which is, in fact, rarely observed in idiopathic inflammatory myopathies [24].

Co-existence in the same tissue of different macrophage phenotypes is not a conflicting result, it is rather expected since necrosis and myophagocytosis on one hand, and regeneration on the other hand are key features of IMNM [6, 19]. Macrophages are constantly encountering various stimuli (antibodies, complement, protein, cellular debris) leading to continuous changes in terms of phenotype, termed macrophage plasticity [20].

To conclude, this study shows that the definition of IMNM following ENMC criteria should be modified since significant signs of inflammation and a complex immune response including classical complement activation are present in the skeletal muscle. In addition, the presence of SRP and HMGCR proteins on the surface of muscle fibers further corroborate the conceptual model of a pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR aAb in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ myositis.

Acknowledgments

We thank the MYOBANK-AFM from l'Institut de Myologie for providing primary human muscle cells. We thank the Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière for confocal microscopy. This study was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM).

Compliance with ethical standard

Patients had undergone muscle biopsy for diagnostic purposes in the 'myositis database' of the reference center for myositis at the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). All patients had given informed consent for their muscle biopsy to be stocked for further research analyses in a biobank called Myobank (reference AC 2012 1724 from the French Ministry of Higher

Education and Scientific Research). Additionally, the local ethical committee has approved the Myobank, and the registry.

References

1. Albayda J, Mammen AL (2014) Is statin-induced myositis part of the polymyositis disease spectrum? *Curr Rheumatol Rep* 16:433. doi: 10.1007/s11926-014-0433-8
2. Albrecht I, Wick C, Hallgren Å, Tjärnlund A, Nagaraju K, Andrade F, Thompson K, Coley W, Phadke A, Diaz-Gallo L-M, Bottai M, Nennesmo I, Chemin K, Herrath J, Johansson K, Wikberg A, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Danielsson O, Krystufkova O, Vencovsky J, Landegren N, Wahren-Herlenius M, Padyukov L, Kämpe O, Lundberg IE (2015) Development of autoantibodies against muscle-specific FHL1 in severe inflammatory myopathies. *J Clin Invest* 125:4612–4624. doi: 10.1172/JCI81031
3. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, Charuel JL, Jouen F, Romero NB, Maisonobe T, Dubourg O, Behin A, Laforet P, Stojkovic T, Eymard B, Costedoat-Chalumeau N, Campana-Salort E, Tournadre A, Musset L, Bader-Meunier B, Kone-Paut I, Sibilia J, Servais L, Fain O, Larroche C, Diot E, Terrier B, De Paz R, Dossier A, Menard D, Morati C, Roux M, Ferrer X, Martinet J, Besnard S, Bellance R, Cacoub P, Arnaud L, Grosbois B, Herson S, Boyer O, Benveniste O, French Myositis Network (2014) Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. *Medicine (Baltimore)* 93:150–157. doi: 10.1097/MD.0000000000000028
4. Alshehri A, Choksi R, Bucelli R, Pestronk A (2015) Myopathy with anti-HMGCR antibodies: Perimysium and myofiber pathology. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2:e124. doi: 10.1212/NXI.0000000000000124
5. Anderson CF, Mosser DM (2002) A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol* 72:101–106.
6. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204:1057–69. doi: 10.1084/jem.20070075
7. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, Charuel JL, Bloch-Queyrat C, Behin A, Amoura Z, Marie I, Guiguet M, Eymard B, Gilbert D, Tron F, Herson S, Musset L, Boyer O (2011) Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 63:1961–71. doi: 10.1002/art.30344
8. Bigot A, Jacquemin V, Debacq-Chainiaux F, Butler-Browne GS, Toussaint O, Furling D, Mouly V (2008) Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* 100:189–199. doi: 10.1042/BC20070085
9. Bohlsón SS, O’Conner SD, Hulsebus HJ, Ho M-M, Fraser DA (2014) Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* 5:402. doi: 10.3389/fimmu.2014.00402
10. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL (2010) A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 62:2757–66. doi: 10.1002/art.27572
11. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL (2010) A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 62:2757–66. doi: 10.1002/art.27572
12. Chung T, Christopher-Stine L, Paik JJ, Corse A, Mammen AL (2015) The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. *Muscle Nerve* 52:189–195. doi: 10.1002/mus.24642
13. Darwich L, Coma G, Peña R, Bellido R, Blanco EJJ, Este JA, Borrás FE, Clotet B, Ruiz L, Rosell A, Andreo F, Parkhouse RME, Bofill M (2009) Secretion of interferon- γ by

- human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology* 126:386–393. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x
14. Dimitri D, Andre C, Roucoules J, Hosseini H, Humbel RL, Authier FJ (2007) Myopathy associated with anti-signal recognition peptide antibodies: clinical heterogeneity contrasts with stereotyped histopathology. *Muscle Nerve* 35:389–95. doi: 10.1002/mus.20693
 15. Drouot L, Allenbach Y, Jouen F, Charuel J-L, Martinet J, Meyer A, Hirschberger O, Bader-Meunier B, Kone-Paut I, Campana-Salort E, Eymard B, Tournadre A, Musset L, Sibilia J, Marie I, Benveniste O, Boyer O (2014) Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 16:R39. doi: 10.1186/ar4468
 16. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35–46. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.022
 17. Hengstman GJD, ter Laak HJ, Vree Egberts WTM, Lundberg IE, Moutsopoulos HM, Vencovsky J, Doria A, Mosca M, van Venrooij WJ, van Engelen BGM (2006) Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. *Ann Rheum Dis* 65:1635–1638. doi: 10.1136/ard.2006.052191
 18. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, Vencovsky J, de Visser M, Hughes RA (2004) 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 14:337–345. doi: 10.1016/j.nmd.2004.02.006
 19. Lesault P-F, Theret M, Magnan M, Cuvellier S, Niu Y, Gherardi RK, Tremblay JP, Hittinger L, Chazaud B (2012) Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cells into MDX skeletal muscle. *PloS One* 7:e46698. doi: 10.1371/journal.pone.0046698
 20. Locati M, Mantovani A, Sica A (2013) Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 120:163–184. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5
 21. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, Miller FW (1991) A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 70:360–374.
 22. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, Casciola-Rosen LA (2011) Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 63:713–21.
 23. Mescam-Mancini L, Allenbach Y, Hervier B, Devilliers H, Mariampillay K, Dubourg O, Maisonobe T, Gherardi R, Mezin P, Preusse C, Stenzel W, Benveniste O (2015) Anti-Jo-1 antibody-positive patients show a characteristic necrotizing perifascicular myositis. *Brain J Neurol* 138:2485–2492. doi: 10.1093/brain/awv192
 24. van der Meulen MF, Bronner IM, Hoogendijk JE, Burger H, van Venrooij WJ, Voskuyl AE, Dinant HJ, Linssen WH, Wokke JH, de Visser M (2003) Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61:316–21.
 25. Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A (2002) Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:420–8.
 26. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958–969. doi: 10.1038/nri2448
 27. Pavlath GK (2002) Regulation of class I MHC expression in skeletal muscle: deleterious effect of aberrant expression on myogenesis. *J Neuroimmunol* 125:42–50.
 28. Preusse C, Goebel HH, Held J, Wengert O, Scheibe F, Irlbacher K, Koch A, Heppner FL, Stenzel W (2012) Immune-mediated necrotizing myopathy is characterized by a specific

- Th1-M1 polarized immune profile. *Am J Pathol* 181:2161–71. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.033
29. Preusse C, Goebel H-H, Pehl D, Rinnenthal JL, Kley RA, Allenbach Y, Heppner FL, Vorgerd M, Authier FJ, Gherardi R, Stenzel W (2015) Th2-M2 immunity in lesions of muscular sarcoidosis and macrophagic myofasciitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. doi: 10.1111/nan.12231
30. Reeves WH, Nigam SK, Blobel G (1986) Human autoantibodies reactive with the signal-recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9507–11.
31. Rojana-udomsart A, Mitrpant C, Bundell C, Price L, Luo Y-B, Fabian V, Wilton SD, Hollingsworth P, Mastaglia FL (2013) Complement-mediated muscle cell lysis: a possible mechanism of myonecrosis in anti-SRP associated necrotizing myopathy (ASANM). *J Neuroimmunol* 264:65–70. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.08.008
32. Saketkoo LA, Mittoo S, Huscher D, Khanna D, Dellaripa PF, Distler O, Flaherty KR, Frankel S, Oddis CV, Denton CP, Fischer A, Kowal-Bielecka OM, LeSage D, Merkel PA, Phillips K, Pittrow D, Swigris J, Antoniou K, Baughman RP, Castellino FV, Christmann RB, Christopher-Stine L, Collard HR, Cottin V, Danoff S, Highland KB, Hummers L, Shah AA, Kim DS, Lynch DA, Miller FW, Proudman SM, Richeldi L, Ryu JH, Sandorfi N, Sarver C, Wells AU, Strand V, Matteson EL, Brown KK, Seibold JR (2014) Connective tissue disease related interstitial lung diseases and idiopathic pulmonary fibrosis: provisional core sets of domains and instruments for use in clinical trials. *Thorax* 69:428–436. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204202
33. Saraogi I, Shan S (2011) Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic Cph Den* 12:535–542. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01171.x
34. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.
35. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787–795. doi: 10.1172/JCI59643
36. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, Goulet JR, Raymond Y, Senecal JL (2005) Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Med Baltim* 84:231–49.
37. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, Pak KS, Kus JE, Daya NR, Lloyd TE, Mammen AL (2012) Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-HMG-CoA reductase-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum*. doi: 10.1002/art.34673
38. Zerbe N, Hufnagl P, Schlüns K (2011) Distributed computing in image analysis using open source frameworks and application to image sharpness assessment of histological whole slide images. *Diagn Pathol* 6:S16.

Figure legend

Table. 1

	IMNM		Myositis		p Values
	SRP (n=25)	HMGCR (n=19)	Jo1 (n=21)	cDM (n=10)	
Age at muscle biopsy	47.3±15.7	60±26.9	41.3±13	47.4±11.4	0.04
Male (%)	33.3	35.2	42.8	16.6	0.68
Muscle manifestations					
Muscle strength (MRC)	3±1	3.3±1	4.1±0.8	3.6±0.5	0.008
CK at MB (I.U/l)	5195±5424	3133±2345	3872±4549	908±673	0.04

Patients' characteristics: cDM: classical dermatomyositis; IMNM: Immune mediated necrotizing myopathy; HMGCR: anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase antibody positive patients; Jo-1: anti-Jo-1 antibody positive patients; MRC: medical research council grading scale is used to measure the muscle strength of the most affected muscle group at the time of muscle biopsy (MB); SRP: anti-signal recognition particle antibody positive patients.

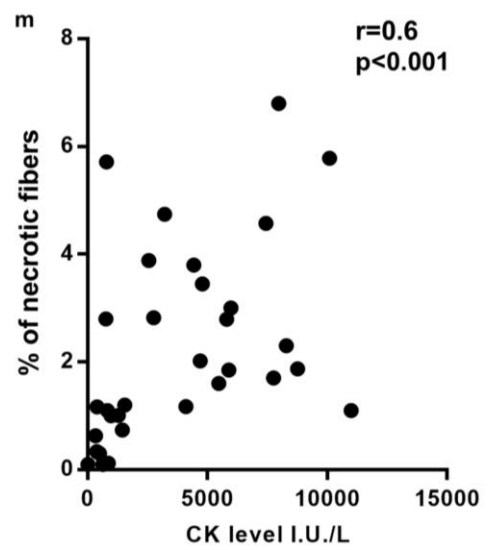
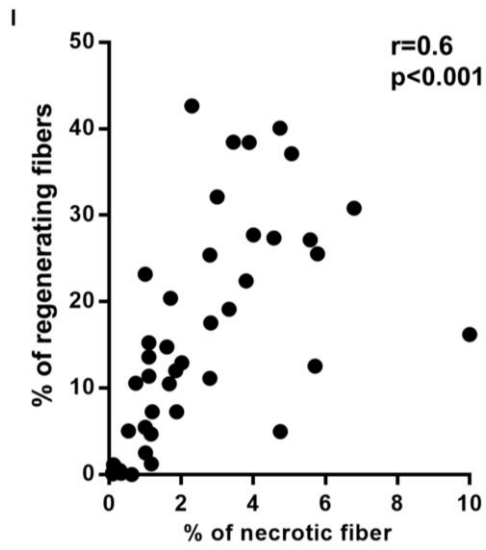
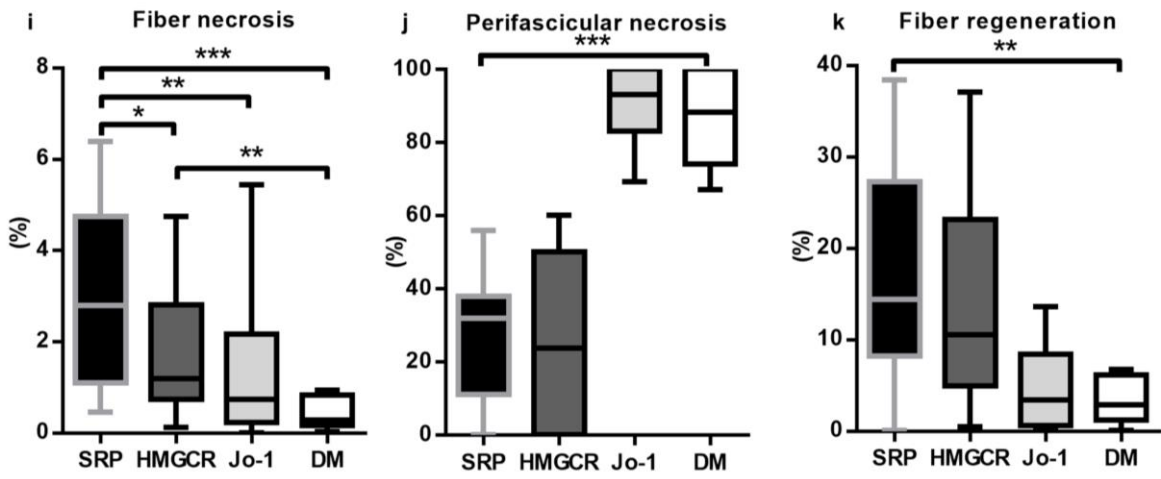
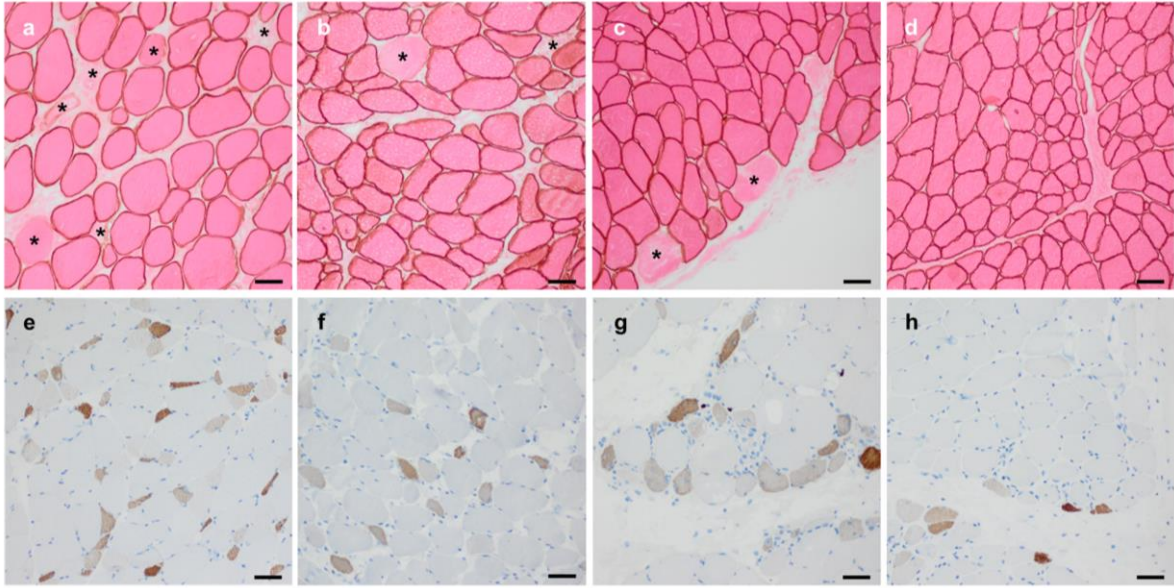


Fig. 1

Characteristics of myofiber necrosis and regeneration in IMNM: Necrotic muscle fibers at different stages of necrosis (asterisk) were observed in an anti-SRP⁺ (a), and anti-HMGCR⁺ (b) patient without any specific topography (diffuse distribution of necrotic myofibers; Dystrophin 2 immunohistochemical stain and eosin counter staining). Necrotic muscle fibers clustered in perifascicular regions in an ASS patient (c). Perifascicular atrophy without overt myofiber necrosis was the main feature in DM patients (d). Neonatal myosin staining showed large numbers of regenerating fibers in an anti-SRP⁺ (e), and anti-HMGCR⁺ (f) patient with a random distribution. Regenerating fibers clustered in perifascicular regions in an ASS patient (g), and in a DM patient (h). Quantification of necrotic muscle fibers is represented for each group of patients (i). The percentage of myofiber necrosis occurring in perifascicular regions is shown for each group of patients (j). Quantification of regenerating fibers is illustrated for each group of patients (k). Correlation between the percentage of necrotic fibers, and the percentage of regenerating fibers in SRP and HMGCR patients (l). Correlation between creatine kinase (CK) levels and the percentage of necrotic fibers in SRP and HMGCR patients (m). Scale bar represents 50 μ m.

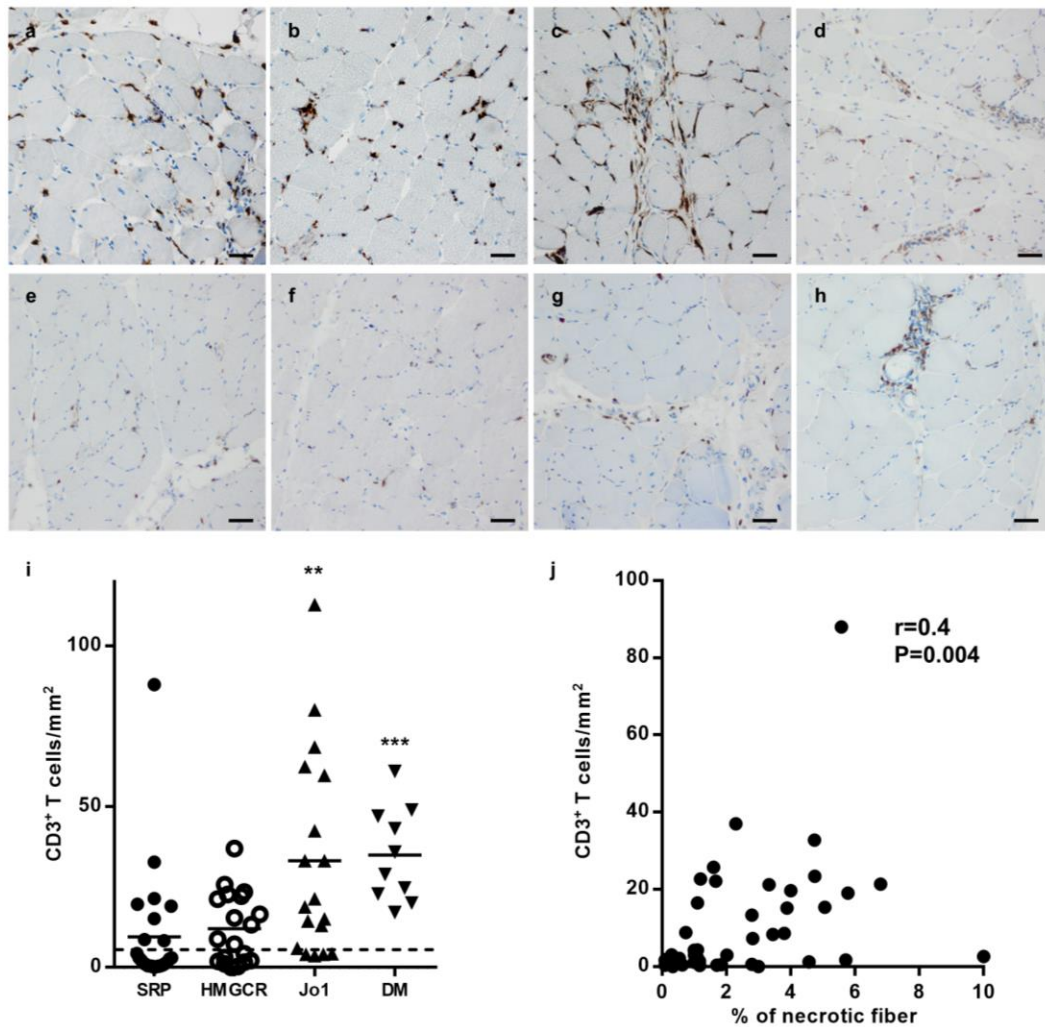


Fig. 2

Characteristics of skeletal muscle inflammation in IMNM: Macrophages (CD68⁺ cells; immunostaining) are diffusely distributed in representative anti-SRP⁺ (a) and anti-HMGCR⁺ (b) patients. Macrophages were mainly found in perifascicular and perimysial regions in a representative ASS patient (c), and additionally in perivascular regions in a DM patient (d). Sparse CD3⁺ T cells occurred in endomysial regions in representative anti-SRP⁺ (e), and anti-HMGCR⁺ (f) patients. CD3⁺ T cells were observed in perifascicular, and perimysial regions in a representative ASS patient (g), and in perivascular regions additionally in DM patients (h). CD3⁺ T cell densities are represented for all groups (i). Correlation between percentage of necrotic fibers and CD3⁺ T cell densities in SRP and HMGCGR patients is represented (j). Scale bar is 50 μ m.

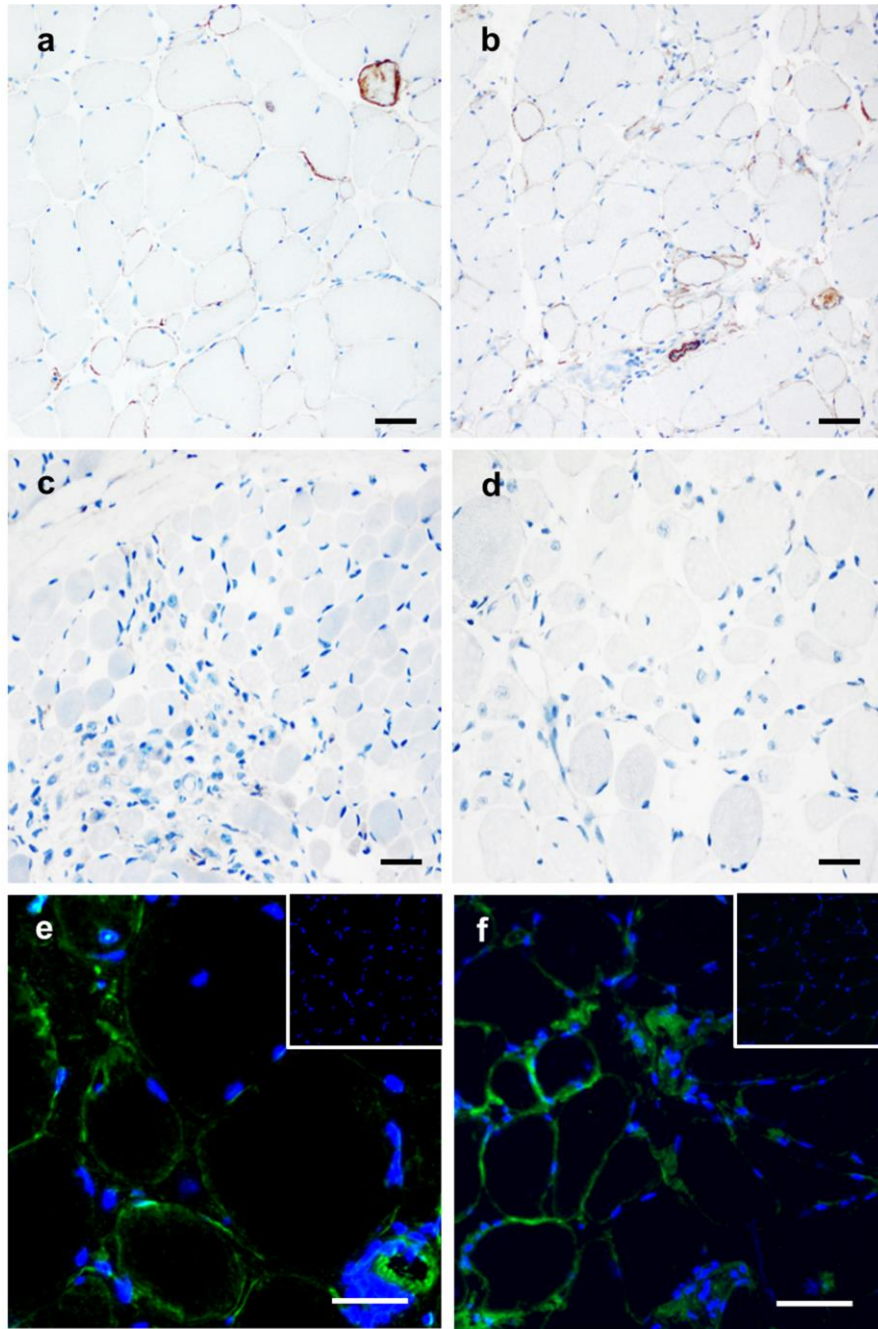


Fig. 3

Pattern of complement deposition in IMNM: Immunohistochemical illustration of membrane attack complex (MAC; C5b9) on the sarcolemma of myofibers of an anti-SRP⁺ patient (a), and an anti-HMGCR⁺ patient (b). Negative staining for MAC in LGMD2i (c), and in Duchenne muscular dystrophy (d). C1q positive (e), and IgG positive sarcolemmal staining (f) of myofibers in an anti-SRP⁺ patient. Scale bar is 50 μm.

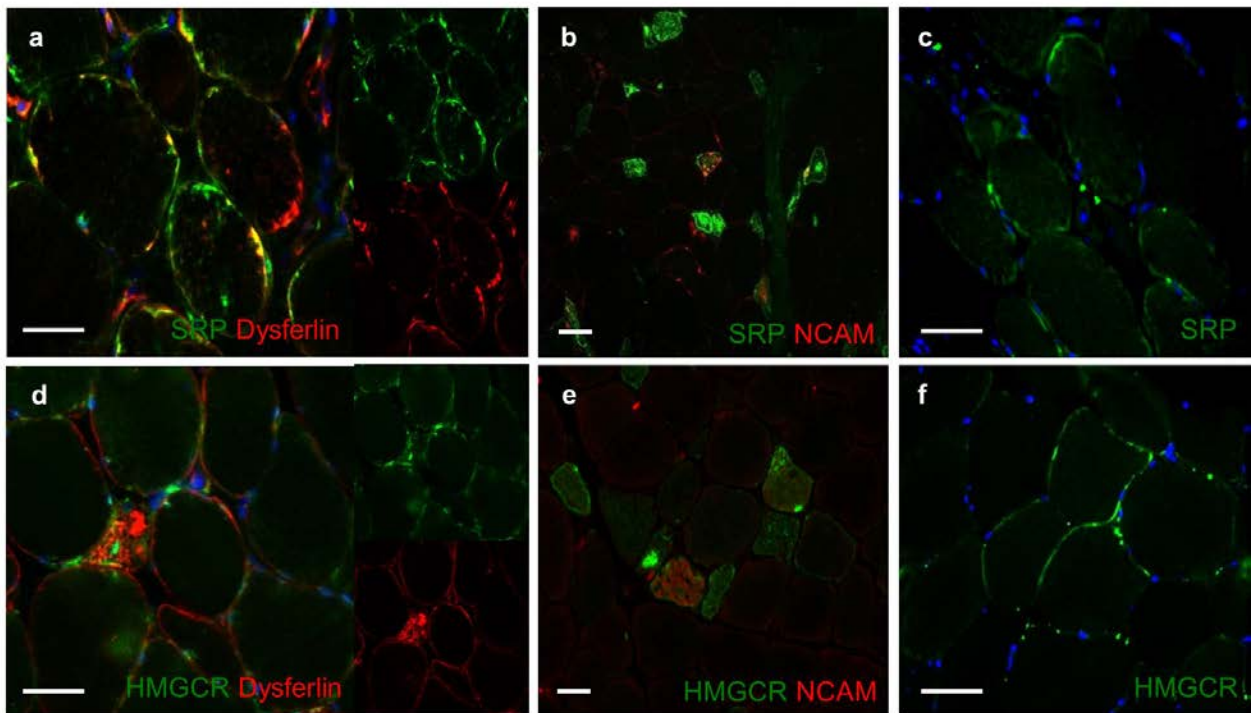


Fig. 4

In vivo SRP and HMGCR localization in muscle tissue: Immunofluorescence of anti-SRP and anti-dysferlin (a) highlighting focal sarcolemmal co-staining in the skeletal muscle of an anti-SRP⁺ patient. Anti-SRP alone (a. upper right corner), anti-dysferlin alone (a. lower right corner). Co-labeling of anti-SRP with NCAM shows that some immature/regenerating fibers are double positive (b). Immunostaining of a coupled purified anti-SRP serum on skeletal muscle of an anti-SRP⁺ patient (c). Co-staining of anti-HMGCR with anti-dysferlin (d) shows sarcoplasmic staining in muscle fibers of anti-HMGCR. Anti-HMGCR alone (d. upper right corner), anti-dysferlin alone (d. lower right corner). Co-staining of anti-HMGCR with NCAM also shows that some immature/regenerating fibers are double positive (e). Immunostaining of coupled purified anti-HMGCR on skeletal muscle of an HMGCR⁺ patient (f). Scale bar is 50 μ m.

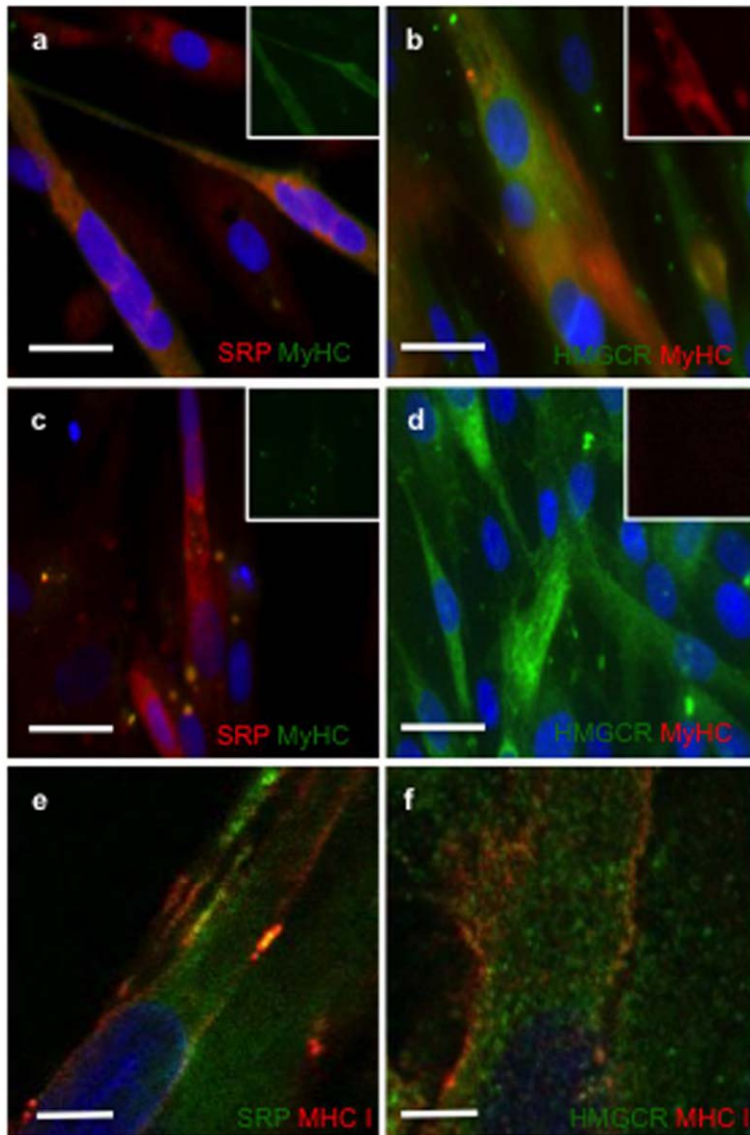


Fig. 5

In vitro SRP and HMGCRC localization in muscle cells: After cell permeabilization, staining for myosin heavy chain (MyHC) and anti-SRP (a) or anti-HMGCRC (b) proteins showed an intracellular localization of SRP and HMGCRC. In non-permeabilized cells, MyHC and SRP (c) or HMGCRC (d) staining demonstrated association of the respective proteins with the sarcolemma of myofibers. Staining of MyHC (an intra-cellular protein) was used as a control staining, highlighting effective permeabilization of the cells. Confocal images showed a co-localization of SRP with MHC-class I (e), and HMGCRC with MHC-class I (f). Scale bar is 50 μm (a-d) and 5 μm (e, f).

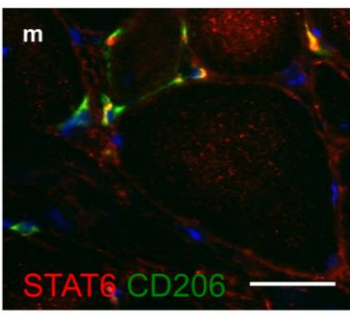
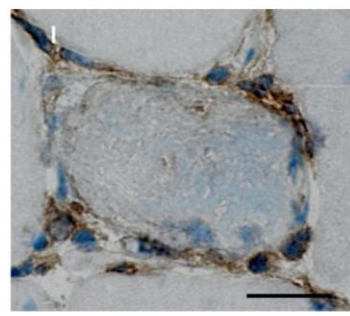
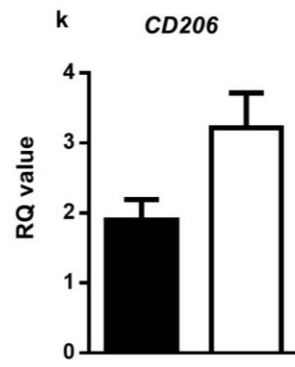
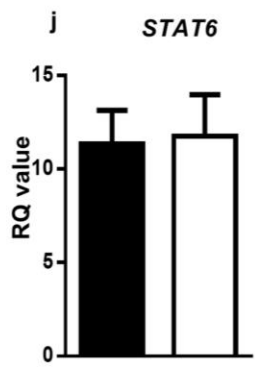
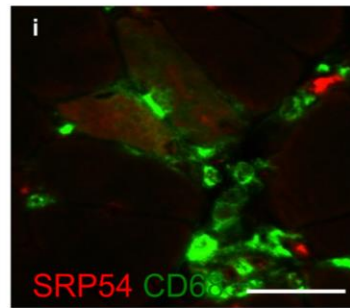
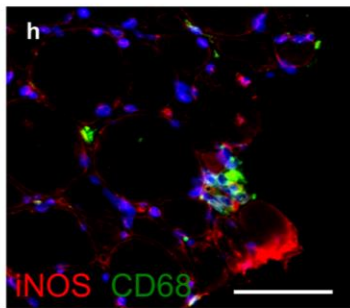
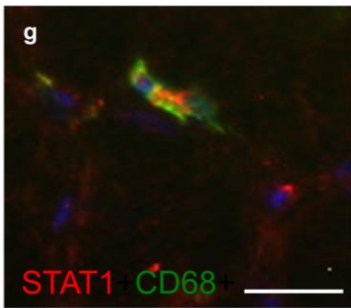
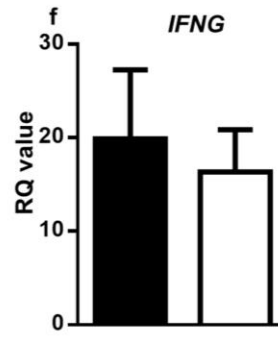
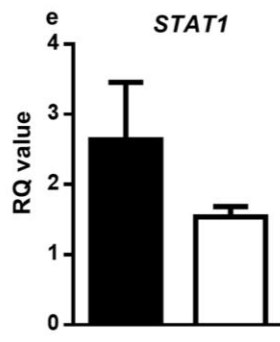
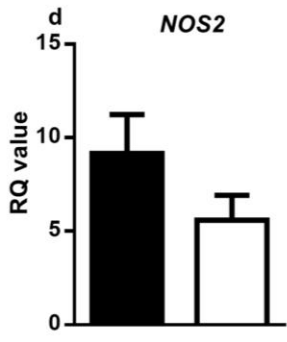
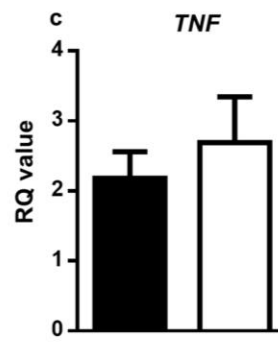
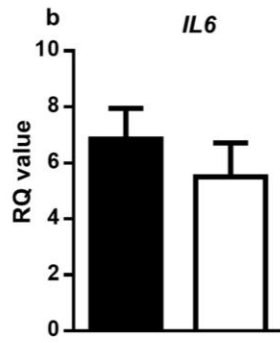
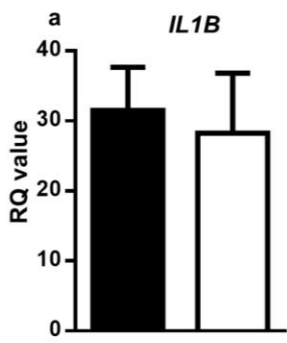
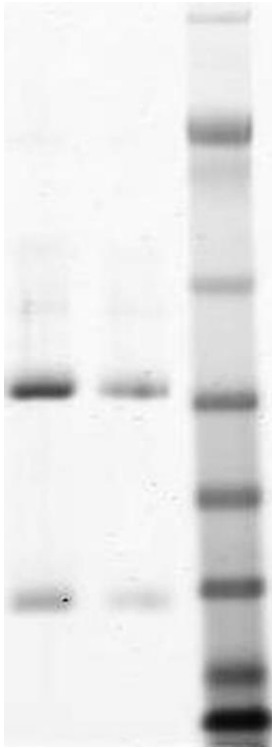


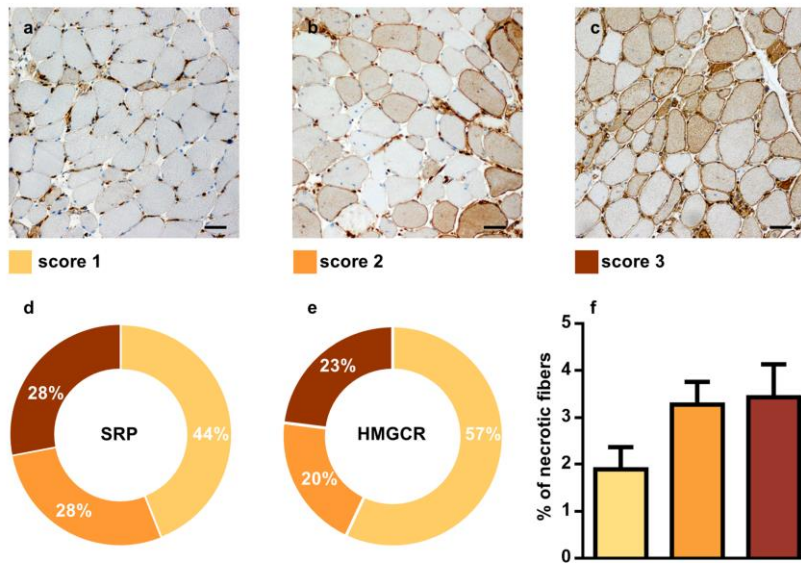
Fig. 6

Activation of different macrophage subtypes in IMNM: Gene expression of cytokines released by innate immune cells (including macrophages) *IL1B*, *IL6*, *TNF* and Th1 cytokines *IFN* as well as *STAT1* and *NOS2* were significantly upregulated both in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients' muscles illustrating active Th1-M1-immunity (a-f). STAT1⁺CD68⁺ activated macrophages (g), and iNOS⁺CD68⁺ double positive macrophages (h) were highlighted in a skeletal muscle biopsy of a patient with IMNM (anti-SRP⁺). Numerous CD68⁺ macrophages were invading and surrounding an anti-SRP54⁺ myofiber (i). In addition, gene expression of *STAT6* and *MRC1/CD206* was upregulated (j & k), and in the endomysium, CD206⁺ macrophages surrounding myofibers were detected frequently (l). They were also co-staining with STAT6 revealing a so called 'alternative' phenotype of activation of these macrophages (m). Black and white bars correspond to SRP and HMGCR patients respectively. Scale bar is 50 μ m.



Suppl. Fig. 1

Anti-SRP and anti-HMGCR aAb purification. Coomassie blue staining of a 4-12% denaturing gel. Anti-SRP Ab in lane 1 and anti-HMGCR in lane 2 show two bands, the heavy and the light chain of Immunoglobulin that reflect the purity of the samples. Standard of migration is used in lane 3.



Suppl. Fig. 2

Skeletal muscle expression of major histocompatibility complex (MHC) class I: Assessment of MHC-I expression is based on a semi-quantitative score. Score 1 corresponds to <30% of MHC-I positive fibers (a); score 2 corresponds to <60% of MHC-I positive fibers (b) and score 3 corresponds to >60% of MHC-I positive fibers (c). Repartition of score 1, 2 and 3 in SRP (d) and HMGCR patients (e) is represented. Percentages of necrotic fibers in patients with score 1, 2, and 3 is shown for SRP and HMGCR patients (f). Scale bar is 50 μm.

RESULTATS 2

Dans cette partie nous avons investigué le rôle des anti-SRP et anti-HMGCR dans l'atrophie et la régénération musculaire. Pour cette étude, quarante biopsies musculaires de patients anti-SRP et anti-HMGCR ont été analysées pour l'atrophie et la régénération. Les fibres ont été caractérisées par leurs tailles et leurs expressions de la myosine chaîne lourde néonatale. Dans le but de comprendre le rôle des aAc anti-SRP et anti-HMGCR dans la pathologie, nous avons étudié l'atrophie et la régénération dans un modèle *in vitro* de co-cultures de cellules musculaires avec les aAc. L'atrophie et la régénération ont été étudiées en se référant à la surface des myotubes, l'index de fusion, l'expression géniques, protéiques et cytokiniques.

Une importante proportion de fibres de petites tailles correspondantes aux fibres atrophiques ou régénératives ont été observées. L'ajout des anti-SRP et anti-HMGCR aux myotubes *in vitro* induit de l'atrophie. Cela a été constaté par une augmentation de *MAFbx* et *Trim63* associé à un taux élevé de cytokines TNF et IL-6 ainsi que ROS et les superoxydes mitochondriaux.

L'étude de la régénération *in vitro* en présence des anti-SRP et anti-HMGCR a révélé un défaut de fusion de myoblastes. Ce défaut a été associé au défaut de sécrétion de cytokines IL-4 et IL-13. L'ajout de ces cytokines a permis restaurer la capacité des myoblastes à fusionner. Ces résultats ont révélé que les anti-SRP et anti-HMGCR avaient un rôle dans l'atrophie et la régénération musculaire contribuant aux lésions musculaire chez les MNAI.

**Pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR antibodies in necrotizing myopathies.
Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune
myopathies**

Louiza Arouche-Delaperche^{1*}, Yves Allenbach^{1,2*}, Damien Amelin¹, Corinna Preusse⁴,
Vincent Mouly¹, Wladimir Mauhin¹, Gaelle Dzangue Tchoupou¹, Laurent Drouot³, Olivier
Boyer³, Werner Stenzel⁴, Gillian Butler-Browne¹ and Olivier Benveniste^{1,2}

**Pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR antibodies in necrotizing myopathies.
Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune
myopathies**

Louiza Arouche-Delaperche^{1*}, Yves Allenbach^{1,2*}, Damien Amelin¹, Corinna Preusse⁴, Vincent Mouly¹, Wladimir Mauhin¹, Gaele Dzangue Tchoupou¹, Laurent Drouot³, Olivier Boyer³, Werner Stenzel⁴, Gillian Butler-Browne¹ and Olivier Benveniste^{1,2}

1 Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Inserm, CNRS, Myology research center, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

2 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Hospital University Department: inflammation, immunopathology and biotherapy (DHU i2B) Paris, France

3 Rouen Normandie University, INSERM, Rouen University Hospital, Department of Immunology, U905, Rouen, France

4 Charité - Universitätsmedizin, Department of Neuropathology, Berlin, Germany

* These authors contributed equally to this work

Financial support: Société Française de Médecine Interne (SFMI), Association Française contre les Myopathies (AFM), Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM) to YA.

Correspondance : Y. ALLENBACH Service de Médecine Interne 1, Centre de Référence des Maladies Neuro-musculaires Paris Est, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 83 boulevard de l'Hôpital Paris Cedex 13 France, Phone : +33 (0) 1 42 16 10 66 Fax : +33 (0) 1 42 16 10 65, email: yves.allenbach@psl.aphp.fr

Conflict of interest with regard to the work: None

Abstract.

Objective. Immune mediated necrotizing myopathies (IMNM) may be associated with either anti-SRP or anti-HMGCR antibodies (Abs) and the titer of these Abs is correlated with the

disease activity. We investigate if anti-SRP and anti-HMGCR Abs could be involved in muscle atrophy and impair muscle regeneration.

Methods. Muscle biopsies of patients were analyzed for atrophy and regeneration, by measuring the fibers size and by performing immunostaining of neonatal myosin heavy chain. To further understand the role of the Abs in the pathology, we performed muscle cell co-culture with the Abs. Atrophy and regeneration were evaluated based on the myotube surface area as well as gene and cytokine profiles.

Results. In muscle biopsies of patients with anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs, a large number of small fibers corresponding to both atrophic and regenerating fibers were observed.

In vitro, anti-SRP and anti-HMGCR Abs induced muscle fiber atrophy and increased the transcription of *MAFbx* and *Trim63*. In addition, the muscle fiber atrophy was associated with high levels of inflammatory cytokines: TNF, IL-6 and reactive oxygen species.

In the presence of anti-SRP or anti-HMGCR Abs, mechanisms involved in muscle regeneration were also impaired due to a defect of myoblast fusion. This defect was associated with a decreased production of IL-4 and IL-13. The addition of IL-4 and/or IL-13 totally rescued fusion capacity.

Interpretation. These data show that molecular mechanisms of atrophy and regeneration are affected and contribute to loss of muscle function occurring in IMNM. This emphasizes the potential interest of targeted therapies addressing these mechanisms.

Keywords: muscle regeneration and atrophy, immune mediated necrotizing myopathies, autoantibodies.

Introduction

Immune mediated necrotizing myopathies (IMNM) is a subgroup of idiopathic inflammatory myopathies. Typically IMNM patients suffer from an acute and severe muscle weakness with

high CK levels, without extra-muscular manifestations¹⁻³. By definition, they harbor characteristic pathological skeletal muscle features on muscle biopsy: dominant necrosis, myophagocytosis and regeneration, with no or sparse lymphocytic infiltrates^{4,5,6}. Anti-Signal Recognition Protein (SRP) and anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) Abs have been specifically associated with IMNM^{2,7}. The titers of anti-SRP and anti-HMGCR Abs are correlated with both clinical and biological markers of disease activity^{8,9,1}. These observations suggest a pathogenic role for these Abs.

Treatments associating corticosteroid and immunosuppressant and/or IVIG are efficient, but patients experience frequent relapses and a long disease duration leading to a risk of muscle damages and handicap^{1,3}. A major damage feature in IMNM is muscle atrophy^{1,10}, which is considered as irreversible¹¹.

Morphological studies of muscle biopsies have shown that IMNM with both anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ Abs showed a large heterogeneity in fiber size^{7,12} suggesting the presence of atrophic and/or regenerating muscle fibers.

Atrophic and regenerating fibers may be very similar in size, however both entities are completely different. Atrophy is defined as the decrease in the cell size involving loss of contractile proteins and upregulation of transcription genes called atrogenes including atrogenin-1/MAFbx or *TRIM63*/MuRF1 that are considered as markers of atrophy^{13,14}. This phenomenon can occur in several conditions including inflammatory state with pro-inflammatory cytokines¹⁵. Whereas muscle regeneration occurs after an injury, and involves activation, differentiation and fusion of satellite cells¹⁶. The regeneration process is tightly controlled by many factors including anti-inflammatory cytokines such IL-4 and IL-13¹⁷.

Atrophy and regeneration have never been characterized in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients. It is crucial to investigate these mechanisms regarding the prognosis of the disease and putative therapeutic strategies.

We hypothesized that anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs could be directly implicated in the pathogenicity and we investigated their effect on muscle regeneration and atrophy on myoblasts and differentiated myotubes *in vitro*.

Methods

Patient's samples

Samples were included depending on the presence of anti-SRP and anti-HMGCR Abs tested by immunoassay as described previously^{18,19}. Twenty-one muscle biopsies from anti-SRP and 18 from anti-HMGCR⁺ Abs patients were included in this study. Muscle biopsies were obtained for diagnostic purposes.

Eluates of plasmapheresis were collected from three anti-SRP⁺ and three anti-HMGCR⁺ patients. Plasmapheresis was performed for therapeutic purpose. These samples were referred to as anti-SRP or HMGCR plasmapheresis. Plasmapheresis from patients suffering from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (n=1) or from transverse myelitis (n=1) were used as controls. Total IgG was purified from plasmapheresis using protein-G affinity chromatography (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). These samples were referred to as anti-SRP or HMGCR IgG. Polyclonal immunoglobulins (CLAIRYG, Courtaboeuf, France) adjusted at the same IgG concentration were used as controls. For extraction of specific anti-SRP and anti-HMGCR Abs, immuno-affinity columns were used for purification as previously described^{18,19}. These samples were referred to as purified anti-SRP or anti-HMGCR. Here the flow through fraction served as control.

All patients signed consent for research analyses and inclusion in a biobank referred to as Myobank (reference AC 2012 1724 from the French Ministry of Higher Education and Scientific Research). Myobank has the approval of the local ethical committee.

Immunohistological analysis

Analysis of muscle sections was assessed in the Department of Neuropathology at the Charité – Universitätsmedizin, Berlin (Germany) using standardized procedures²⁰.

H&E or combined Eosin & dystrophin2 (mouse monoclonal, Dy8/6C5, Novocastra, Newcastle, UK), and mouse Myosin heavy chain neonatal (WB-MHCn, Leica Biosystem, Newcastle, UK) staining were performed on 7µm frozen sections using an automate staining device (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson).

Analysis was performed by two myopathologists (WS and YA). Slides were digitalized using Panoramic 250 (3DHitech) with 0.244 μm per pixel of resolution. Whole slide images were obtained with a virtual microscope using Image J^{21,22}. Fiji software was used for quantitative analysis. Fifty% of the section area was analysed, for each slide. Muscle fibers were manually counted, the variability coefficient and the atrophy factor were evaluated^{23,24}.

Variability coefficient = $1000 \times \text{standard deviation of muscle fiber minimal diameters} / \text{mean muscle fiber minimal diameter}$.

Atrophy factor = $(\text{number of fiber (diameter} < 10 \mu\text{m)} \times 4 + \text{number of fiber (} 10 \mu\text{m} < \text{diameter} < 20 \mu\text{m)} \times 3 + \text{number of fiber (} 20 \mu\text{m} < \text{diameter} < 30 \mu\text{m)} \times 2 + \text{number of fiber (} 30 \mu\text{m} < \text{diameter} < 40 \mu\text{m)} \times 1) / \text{number of total fibers}$.

Primary human muscle cells culture

Muscle biopsies were obtained from the Myobank-AFM (a partner of EuroBioBank), in accordance with European recommendations and French legislation²⁵. To test the pathogenic effect of Abs on myoblasts or myotubes, plasmapheresis, anti-SRP IgG, anti-HMGCR IgG, purified anti-SRP and purified anti-HMGCR were incubated with confluent primary myoblasts or with differentiated primary myotubes, for three days. Plasma was diluted with culture medium at a 1:5 ratio, and anti-SRP IgG, anti-HMGCR IgG, purified anti-SRP and purified anti-HMGCR (and their controls) were used at the following concentrations: total IgG 1mg/ml and purified anti-SRP or anti-HMGCR at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of IgG. Each experiment was repeated at least twice with samples provided by two or three different patients.

To test the role of IL-4 and IL-13 on myoblast differentiation, confluent myoblasts were treated with IL-4 and/or IL-13 (Mabtech, Nacka Strand, Sweden) for 3 days at 5ng/mL and/or 10ng/mL respectively. They were also treated with anti-IL-4 and/or anti-IL-13 (Biolegend, London, United Kingdom) at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and/or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively.

To measure the effect of the auto-Abs and or cytokines, the 'fusion index' (nuclei inside cells divided by the total number of nuclei, reflecting the proportion of fused cells), and 'myotube

surface' (measurement of cell surface in a defined area, reflecting the cell size) was analysed as described below.

Immunocytochemistry and image acquisition

Myotubes were fixed in absolute ethanol and blocked by 2% bovine serum (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). A monoclonal mouse anti-myosin heavy chain II (MF20: Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) Ab was used as primary antibody, followed by an appropriate fluorochrome-conjugated secondary Ab (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were revealed by Hoechst staining (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Image acquisition was performed using the Zeiss microscope fitted with a 10x objective. Myotube surface analysis of 25 pictures for each condition, were obtained using the Metamorph software²⁶. The fusion index was measured using Fiji software.

Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from human myotubes of 6 days using a Qiagen Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA was obtained from 0.5µg of each sample using the kit AMV RT (Roche, Meylan, France). PCR was performed using LightCycler HotStart DNA SYBR Green I mix (Roche). The following primers were used for FBXO32 (*MAFbx/Atrogin-1*) (sense, 5'-CGAAGCAGGTGTTTCCTCTC-3'; antisense, 5'-ATGGAATAATCCCCCTTTGC-3'), *TRIM63/MURF1* (sense, 5'-TGAGCCAGAAGTTTGACACG-3'; antisense, 5'-TGATGAGTTGCTTGGCAGTC-3') and Emerin (sense, 5'-CAGAGTAGTGCTTGCTCCCC-3'; antisense, 5'-ACAAAGTCAGGGTGGCCTTT-3') as a housekeeper. Real-time PCR reactions were performed with LightCycler 480 system. mRNA levels were obtained using a standard obtained after serial dilutions from a reference cDNA sample used concomitantly with the tested samples²⁷. mRNA levels are represented as arbitrary units.

Cytokine detection

Culture medium was collected from myotubes after 3 or 6 days of differentiation and concentrated 10-fold, using Amicon ultra-4 centrifugal filter units 3K (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Gene expression of *IL4*, *IL6*, *IL13*, and *TNF* cytokines were tested in the concentrated media using a cytokine microarray (abcam, Cambridge, United Kingdom). The fluorescence was detected with an MS 200 Microarray Scanner (Roche). Data analysis was performed using Fiji software.

Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial superoxide levels were assessed with dichlorofluorescein (DCF) and mitoSOX (Thermo Fisher Scientific); detection was assessed using FlexStation 3 (Molecular Devices).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis multiple comparisons and Mann-Whitney simple comparison. Analysis was performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla California USA), with significance at $P \leq 0.05$.

Results.

1. Atrophic and regenerating muscle fibers in IMNM patients

To analyse the presence of 'atrophy' *per se* in IMNM patients, we first analysed the size of the fibers on muscle biopsies from 23 anti-SRP and 18 anti-HMGCR patients. Characteristics of patients are described in table 1.

The control muscle sections show normal muscle fibers with no variation in fiber diameter (Fig1A). Anti-SRP⁺ as well as anti-HMGCR⁺ Abs patients showed an important variation in the fiber diameter. This is illustrated for an anti-SRP patient in Fig. 1B. Topographic distribution of small fibers was random within the endomysium and not confined to perifascicular areas (Fig. 1B). Quantitative analysis showed a non-Gaussian repartition of the fiber size, and a non-homogenous distribution of muscle fiber diameter with a predominance of small fibers in the anti-SRP patient in Fig. 1C.

Accordingly, the coefficients of variability in anti-SRP⁺ (397.3 ± 25.3) and in anti-HMGCR⁺ Abs patients (326.7 ± 25.8) were significantly higher than in controls (173.2 ± 11.9 ; $p=0.0001$) (Fig. 1D). To determine if the variability of the size was due to an increased proportion of small or big muscle fibers, we analysed the atrophy factor corresponding to the proportion of small fibers. Atrophy factors in anti-SRP⁺ (533 ± 95.9) and anti-HMGCR⁺ Abs patients (447.8 ± 86.8) were increased compared to normal muscle (6.83 ± 1.7 ; $p=0.0005$) (Fig. 1E) emphasizing the increased proportion of small fibers in anti SRP⁺ and HMGCR⁺ Abs patients. Of note, no difference between atrophy factors in the IMNM anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients groups was observed. Next, to investigate the origin of the small fibers, knowing that small fibers can be atrophic or regenerating, we analyzed the biopsies for the presence of regenerating muscle fibers by staining with one of the developmental myosin heavy chain antibodies. We observed that whereas some small muscle fibers were positive for neonatal myosin heavy chain in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients other small fibers were neonatal myosin negative, suggesting that the small fibers observed in these patients can be either regenerating or atrophic (Fig. 1F).

2. Anti-SRP and anti-HMGCR induce myotube atrophy

Anti-SRP and anti-HMGCR induce hypotrophic myotubes

Since atrophy was observed in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs IMNM muscle, we postulated that these Abs could potentially be involved in the molecular mechanisms of atrophy. To analyse this the effect of anti-SRP and anti-HMGCR Abs on mature muscle cells was investigated *in vitro*. We found that human myotubes showed a significant decrease in their surface area when they were incubated with plasma from anti-SRP⁺ Abs patients ($202.7 \pm 10.1 \mu\text{m}^2$) and plasma from anti-HMGCR⁺ Abs patients ($168.9 \pm 12.4 \mu\text{m}^2$) compared to plasma control ($320.7 \pm 6.6 \mu\text{m}^2$; $p=0.03$ and $p=0.01$ respectively) (Fig 2 A-D). To rule out a potential effect of other components of the plasmapheresis such as cytokines, the same experiments were performed using purified total IgG from the plasmapheresis of anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ Abs patients. A significant decrease in the surface area of the myotubes was measured in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ patients ($149.1 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$) and purified total IgG from anti-HMGCR⁺ patients ($148.4 \pm 7.8 \mu\text{m}^2$) compared to control IgG ($198 \pm 4.9 \mu\text{m}^2$; $p=0.04$ and $p=0.01$ respectively) (Fig 2 E-H). To test the hypothesis that this effect was due to the myositis specific Abs, purified specific Abs were used. The eluate of the non-specific IgG (Fig 2I) was compared to purified specific anti-SRP (Fig 2J) and anti-HMGCR Abs (Fig 2L). The surface area of the myotubes in presence of specific anti-SRP Abs ($116.8 \pm 2 \mu\text{m}^2$) and anti-HMGCR Abs ($117.8 \pm 2 \mu\text{m}^2$) was significantly decreased compared to the control ($172.9 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$; $p=0.05$ and $p=0.05$). As expected, the fusion index for all these conditions did not show any differences (data not shown). Overall, these results indicate that anti-SRP and anti-HMGCR Abs induces atrophy of muscle fibers *in vitro*.

Anti-SRP and anti-HMGCR antibodies induce myofiber atrophy

MAFbx/Atrogin-1 and *TRIM63/MURF1* are well-known transcription factors involved in muscle atrophy and are considered to be makers of muscle atrophy^{13,14}.

To test the hypothesis that purified total IgG from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients, *are involved in atrophy*, *MAFbx/Atrogin-1* and *TRIM63/MURF1* were measured. We observed that in the presence of IgG from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients the expression of *TRIM63/MURF1* illustrated by the fold change values (1.6±0.1 and 1.47±0.05) was significantly higher than with control IgG (1.07±0.05; p=0.002 and p=0.002 respectively) (Fig 3A). In agreement with these results, the levels of transcription of *MAFbx/Atrogin-1* was also significantly increased in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (1.59±0.04) and from anti-HMGCR⁺ patients (1.86±0.06) compared to control (0.94 ± 0.1; p=0.004 and p=0.004 respectively) (Fig 3B). These results show that anti-SRP⁺ and HMGCR⁺ IgG induce *MAFbx*-, and *TRIM63*-mediated atrophy.

Numerous factors are known to trigger muscle atrophy, including pro-inflammatory molecules such as IL-6, TNF and reactive oxygen species (ROS) ^{28,29,30}. When we looked for the presence of these molecules in our *in vitro* myotube cultures we found that in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients, myotubes significantly increased their secretion of *IL6* (1016±52.6 pg/mL; 912.6±38.5 pg/mL respectively) compared to controls (442.1±13.1 pg/mL; p=0.05 and p=0.02). The level of *TNF* was also increased in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (329.4 ± 17.8 pg/mL) compared to controls (224.8 ±25.6 pg/mL, p=0.02), and a trend was observed with anti-HMGCR Abs (312.2 ±42.2 pg/mL, p=0.1) (Fig 3D).

In addition, the levels of ROS were significantly increased in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients (11700±1341 MFI; 12700±2844 MFI respectively) compare to control IgG (5517±647.7 MFI; p=0.007 and p=0.01 respectively) (Fig 3E). It should be noted that the level of ROS expression was in the same range as that measured in the presence of H₂O₂, used as a positive control. Similarly, an increase in the production of mitochondrial superoxide in the presence of anti-SRP and anti-HMGCR IgG

(459.2±8.25 MFI; 535.1±11.7 MFI) compared to control IgG (347.6±31.7; p=0.01 and p=0.004) was also observed.

These results suggest that the atrophy induced by anti-SRP and anti-HMGCR Abs is associated with an increase in secretion of inflammatory molecules such IL-6, TNF and ROS.

3. Anti-SRP and anti-HMGCR Abs reduce myotube formation by decreasing the secretion of IL-4 and IL-13

After testing the effect of anti-SRP and anti-HMGCR on mature myotubes, we wanted to examine the effect of Abs on muscle regeneration, since we observed a large proportion of regenerated muscle fibers in IMNM SRP and HMGCR patients.

Myoblasts were cultured with Abs and the formation of myotubes was analysed by assessing the fusion index and the myotube surface area. A significant decrease in the formation of myotubes was observed with the eluate from plasmapheresis of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ Abs patients compared to controls as confirmed by a lower fusion index (31.9±2.4 % and 48.4±1.1 % vs 68.9±0.9 %; p=0.001 and p=0.02 respectively) (Fig. 4A-D). As expected, the surface area of the myotubes was also decreased (data not shown).

Similarly, experiments with purified total IgG showed lower fusion index in presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients compared to control (37.3±1.3 % and 37.3±2.2 % vs. 57.5±2.5 %; p=0.009 and p =0.001 respectively) (Fig 4E-H). Purified anti-SRP and anti-HMGCR Abs also reduced the formation of myotubes, as indicated by a lower fusion index (35.3±1.5% and 34.2±2.1%) compared to controls (59.5±0.8%; p=0.05 and p=0.05 respectively) (Fig 4I-L). Together, these data show that anti-SRP and anti-HMGCR Abs impair muscle regeneration.

To assess the mechanisms involved in the reduction of myotube formation we checked: (i) the cellular viability, (ii) cell proliferation and (iii) myogenesis. We observed no reduction in the

cell number, no decrease in cell proliferation and no modification in myogenesis (myogenin expression) (data not shown).

Next, we focused on IL-4 and IL-13 that are two cytokines crucial for the accretion of the myoblasts toward myotubes^{17,31}. IL-4 levels were dramatically decreased in the presence of purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (1.3±0.2 pg/mL) and from anti-HMGCR⁺ patients (1.09±0.7 pg/mL) compared to control IgG (11.2±0.4 pg/mL; p=0.02 and p=0.02 respectively) (Fig. 5A). Similarly, the secretion of IL-13 was significantly diminished when myoblasts were incubated with purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (2.7±1.4 pg/mL) and with IgG from anti-HMGCR⁺ patients (10.8±1.3 pg/mL) compare to control (18.6±2.2 pg/mL; p=0.05 and p=0.05) (Fig5B).

To confirm the role of IL-4 and IL-13, these cytokines were added to the culture media to test if the formation of myotubes could be restored. The addition of IL-4 significantly increased the surface area of the myotubes incubated with purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (165±4.1 μm²) or purified total IgG from anti-HMGCR⁺ patients (142.9±4.3 μm²) in comparison to myotubes incubated with Abs alone (98.5±4.4 μm² and 84.27±7.2 μm² respectively; p=0.02 and p=0.02). As expected, the blockage of the IL-4 dramatically reduced the surface of myotubes in controls (108.3±5.7 μm² vs 209.6±7.2 μm²; p=0.05). Of note, blockage of IL-4 in anti-SRP and anti-HMGCR⁺ conditions did not aggravate the impairment of myotube formation.

Similarly, addition of IL-13 restored the myotube formation in the presence of purified total anti-SRP and anti-HMGCR IgG (126.1±2.8 μm², 133.1±3 μm² vs 98.5±4.4 μm² and 84.27±7.2 μm²; p=0.02 and p=0.02 respectively). As expected, the blockage of IL-13 significantly reduced the formation of myotubes in control conditions (49.2±8.7 μm² and 209.6±14.3 μm²; p=0.02 respectively). The blockage of IL-13 showed a decrease of the surface in purified total IgG anti-SRP and anti-HMGCR Abs in comparison of purified anti-

SRP and anti-HMGCR IgG alone ($54.9 \pm 4.4 \mu\text{m}^2$ and $46.4 \pm 2.4 \mu\text{m}^2$ vs $98.5 \pm 4.4 \mu\text{m}^2$ and $84.27 \pm 7.2 \mu\text{m}^2$; $p=0.02$ and $p=0.02$ respectively).

Discussion.

IMNM associated with anti-SRP and anti-HMGCR Abs are characterized by an important proportion of small fibres corresponding to both atrophic and regenerating fibres. We have shown that Anti-SRP and anti-HMGCR specific Abs induce muscle fiber atrophy, and also an impairment of myoblast fusion *in vitro*. The pathogenic role of anti-SRP and anti-HMGCR Abs in myofiber atrophy was shown to involve an increased production of pro-inflammatory molecules (IL-6, TNF and ROS) whereas decreased levels of two anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-13) inhibited myoblast fusion of also resulting in reduced fiber diameter.

HMGCR and SRP are both proteins localized in, and functionally related to the endoplasmic reticulum. HMGCR is a key enzyme for the biosynthesis of cholesterol, it is targeted mainly by cholesterol lowering drugs, the statins. Anti-SRP Abs recognize both, the SRP₅₄, SRP₁₉ subunits of the SRP cytosolic complex³² and the SRP receptor (highly homologous to SRP₅₄) that is located at the endoplasmic reticulum membrane³³. SRP recognizes newly synthesized polypeptides that carry 'signals' and deliver them to the endoplasmic reticulum via the interaction of SRP with the SRP receptor^{34,35}. The question of how these Abs circulating in blood vessels and interstitial spaces can reach their intracellular molecular targets is then raised. It has been described, in specific conditions, that the intracellular antigens can be expressed at the cell surface. For instance, fusing macrophages express at the fusion interfaces plasma membrane endoplasmic reticulum proteins³⁶. It was also reported that chaperone proteins in the endoplasmic reticulum can be expressed at the cell surface in various cells such fibroblast and HeLa cells³⁷. It cannot be excluded that the Abs can enter the muscle fibres, as it has been shown for anti-DNA Abs^{38,39}.

The very large fiber size heterogeneity, with a patchy distribution, observed in IMNM of anti-SRP and anti-HMGCR Ab⁺ patients are in line with previous reports^{7,12}. However, for the first time, we are able to show that small fibres correspond to both atrophic and regenerating

fibers. Small fibers have also been reported in other myositis and especially in DM patients. Nevertheless the typical topography of small fibers in DM, with a perifascicular distribution suggests specific pathomechanisms different from those observed in IMNM. Indeed, Greenberg *et al.* showed, that perifascicular atrophy was associated with activation of the IFN pathway, especially the ISG-15 protein⁴⁰. In other myositis entities, including IBM and PM, they showed another mechanism, which is an up-regulation of MAFbx/Atrogin-1 mRNA expression via the activation of Foxo3A, induced by inflammatory cells⁴¹.

Here for the first time we show that anti-SRP and anti-HMGCR Abs induce muscle fiber atrophy, and the increase of MAFbx and Trim63. In addition, the pro-inflammatory molecules: IL-6, TNF and ROS were also increased in the presence of these Abs. The role of IL-6 in muscle fiber atrophy inducing MAFbx and Trim63 seems to be determinant^{42,43} even if this is sometimes discussed controversially⁴⁴. TNF is also a well-known inflammatory cytokine that leads to atrophy via p38 MAPK to stimulate MAFbx expression in skeletal muscle³⁰. *In vitro*, muscle cells cultured in the presence of TNF increased cell ceramide levels that lead to muscle atrophy⁴⁵.

ROS is also described to induce muscle loss^{46,47}. It must be underlined that TNF is also known to increase ROS within skeletal muscle⁴⁸ suggesting synergistic effects of these pro-inflammatory molecules. TNF also induces oxidative stress via an increase of mitochondrial super oxide production leading to atrophy^{49,50}.

We also showed for the first time, that these auto-Abs can impair muscle regeneration. In line with this, it has also been observed previously that inhibition of HMGCR by statins lead to an impairment of regeneration *in vivo* and a decreased fusion index *in vitro*⁵¹. The process that leads to the formation of myotubes is complex. In the present study, we also demonstrated that the Abs prevented myotube formation by decreasing the cell fusion, but did not affect the differentiation program of the cells as seen by the expression of myogenin. During myotube formation, the myoblasts secrete cytokines such as IL-4 and IL-13 that lead to the accretion of

cells^{17,31}. We demonstrate that the circulating Abs decrease the secretion of IL-4 and IL-13, leading to the impairment of the myoblasts fusion *in vitro*. Those cytokines are crucial since the addition of IL-4 or IL-13 restores the formation of myotubes. These two cytokines induce the same effect presumably because they have a homologous region which can target the same receptor⁵². Nevertheless, the mechanisms that lead to the decrease of the cytokine production are not yet elucidated.

This study strongly supports the view that anti-SRP and anti-HMGCR Abs are pathogenic for muscle. It is maybe an explanation of the systematic (but transient) efficacy we observed after plasma exchanges or IVIg. Nevertheless, it is a plea for a dramatic reduction of these Ab titers by the immunosuppressive and/or modulation approaches we should set-up.

Acknowledgments.

We thank MYOBANK-AFM de l'Institut de Myologie code BB-0033-00012 for providing us with the primary human muscle cells. This study was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM).

Author contributions.

Conception and design of the study was done by OBe. LAD and YA contribute the acquisition and analysis of data and draft the significant portion of the manuscript and figures. DA, CP, WM, GDT and LD contribute to data acquisition. Obo, WS and GBB contribute to the data analysis.

Potential conflicts of interest.

None.

References

1. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. Anti-HMGCR Autoantibodies in European Patients With Autoimmune Necrotizing Myopathies [Internet]. *Medicine (Baltimore)* 2014;93(3)[cited 2016 Mar 25] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632910/>
2. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMGCR) in Patients with Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):713–721.
3. Hengstman GJD, ter Laak HJ, Egberts WTMV, et al. Anti- signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;65(12):1635–1638.
4. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, et al. 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.* 2004;14(5):337–345.
5. Mammen AL. Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(7):664–669.
6. Allenbach Y, Benveniste O. Acquired necrotizing myopathies. *Curr. Opin. Neurol.* 2013;26(5):554–560.
7. Miller T, Al-Lozi M, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002;73(4):420–428.
8. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):1961–1971.
9. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. Antibody Levels Correlate with Creatine Kinase Levels and Strength in Anti-HMG-CoA Reductase-Associated Autoimmune Myopathy. *Arthritis Rheum.* 2012;64(12):4087–4093.
10. Suzuki S, Nishikawa A, Kuwana M, et al. Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients [Internet]. *Orphanet J. Rare Dis.* 2015;10[cited 2016 Mar 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440264/>
11. Isenberg DA, Allen E, Farewell V, et al. International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. *Rheumatology* 2004;43(1):49–54.
12. Alshehri A, Choksi R, Bucelli R, Pestronk A. Myopathy with anti-HMGCR antibodies [Internet]. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2015;2(4)[cited 2016 Feb 25] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459046/>
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294(5547):1704–1708.
14. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(25):14440–14445.
15. Sandri M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* 2008;23(3):160–170.
16. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19(6):628–633.
17. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. IL-4 Acts as a Myoblast Recruitment Factor during Mammalian Muscle Growth. *Cell* 2003;113(4):483–494.

18. Drouot L, Allenbach Y, Jouen F, et al. Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* 2014;16(1):R39.
19. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):1961–1971.
20. Allenbach Y, Leroux G, Suárez-Calvet X, et al. Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies. *Am. J. Pathol.* 2016;186(3):691–700.
21. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 2012;9(7):671–675.
22. Zerbe N, Hufnagl P, Schlüns K. Distributed computing in image analysis using open source frameworks and application to image sharpness assessment of histological whole slide images. *Diagn. Pathol.* 2011;6(Suppl 1):S16.
23. Brooke MH, Engel WK. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 2. Diseases of the upper and lower motor neuron. *Neurology* 1969;19(4):378–393.
24. Briguët A, Courdier-Fruh I, Foster M, et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul. Disord.* 2004;14(10):675–682.
25. Bigot A, Jacquemin V, Debacq-Chainiaux F, et al. Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 2008;100(3):189–199.
26. Garton F, Seto JT, North KN, Yang N. Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis. *Neuromuscul. Disord. NMD* 2010;20(8):540–547.
27. Feferman T, Maiti PK, Berrih-Aknin S, et al. Overexpression of IFN-induced protein 10 and its receptor CXCR3 in myasthenia gravis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2005;174(9):5324–5331.
28. Zhang L, Pan J, Dong Y, et al. Stat3 Activation Links a C/EBP δ to Myostatin Pathway to Stimulate Loss of Muscle Mass. *Cell Metab.* 2013;18(3):368–379.
29. Zhang L, Du J, Hu Z, et al. IL-6 and Serum Amyloid A Synergy Mediates Angiotensin II-Induced Muscle Wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009;20(3):604–612.
30. Li Y-P, Chen Y, John J, et al. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005;19(3):362–370.
31. Jacquemin V, Furling D, Bigot A, et al. IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. *Exp. Cell Res.* 2004;299(1):148–158.
32. Römisch K, Miller FW, Dobberstein B, High S. Human autoantibodies against the 54 kDa protein of the signal recognition particle block function at multiple stages. *Arthritis Res. Ther.* 2006;8(2):R39.
33. Lührink J, Sinning I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 2004;1694(1-3):17–35.
34. Saraogi I, Shan S. Molecular Mechanism of Co-translational Protein Targeting by the Signal Recognition Particle. *Traffic Cph. Den.* 2011;12(5):535–542.
35. Schwartz T, Blobel G. Structural Basis for the Function of the β Subunit of the Eukaryotic Signal Recognition Particle Receptor. *Cell* 2003;112(6):793–803.
36. McNally AK, Anderson JM. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp. Mol. Pathol.* 2005;79(2):126–135.
37. Okazaki Y, Ohno H, Takase K, et al. Cell Surface Expression of Calnexin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 2000;275(46):35751–

35758.

38. Yanase K, Madaio MP. Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. *J. Autoimmun.* 2005;24(2):145–151.
39. Yanase K, Smith RM, Puccetti A, et al. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J. Clin. Invest.* 1997;100(1):25–31.
40. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, et al. Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) Conjugates Proteins in Dermatomyositis Muscle with Perifascicular Atrophy. *Ann. Neurol.* 2010;67(1):53–63.
41. Lee H-K, Rocnik E, Fu Q, et al. Foxo/Atrogin induction in human and experimental myositis. *Neurobiol. Dis.* 2012;46(2):463–475.
42. Bonetto A, Aydogdu T, Jin X, et al. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2012;303(3):E410–E421.
43. Zhang L, Du J, Hu Z, et al. IL-6 and Serum Amyloid A Synergy Mediates Angiotensin II-Induced Muscle Wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009;20(3):604–612.
44. Kostek MC, Nagaraju K, Pistilli E, et al. IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2012;13:106.
45. De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, et al. TNF- α - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skelet. Muscle* 2012;2:2.
46. Muller FL, Song W, Jang YC, et al. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;293(3):R1159–R1168.
47. Abrigo J, Rivera JC, Simon F, et al. Transforming growth factor type beta (TGF- β) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy. *Cell. Signal.* 2016;28(5):366–376.
48. Li X, Moody MR, Engel D, et al. Cardiac-Specific Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α Causes Oxidative Stress and Contractile Dysfunction in Mouse Diaphragm. *Circulation* 2000;102(14):1690–1696.
49. Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J. Appl. Physiol.* 2007;102(5):2056–2063.
50. Byun HS, Won M, Park KA, et al. Prevention of TNF-induced necrotic cell death by rottlerin through a Nox1 NADPH oxidase. *Exp. Mol. Med.* 2008;40(2):186–195.
51. Trapani L, Segatto M, La Rosa P, et al. 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition impairs muscle regeneration. *J. Cell. Biochem.* 2012;113(6):2057–2063.
52. Mueller TD, Zhang J-L, Sebald W, Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2002;1592(3):237–250.

	Anti-SRP⁺ (n=21)	Anti-HMGCR⁺ (n=18)
Age at muscle biopsy	47.8±15.7	50.3±22.7
Sex ratio male : female	0.5	0.45
Muscle strength (MRC 0-5)	2.6±1	2.9±0.8
CK (I.U/l)	5502±5271	4509±3440

Suppl Table 1: Muscular manifestation of anti-SRP and anti-HMGCR Abs positive patients.

Anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients characteristics are summarized. CK levels were measured for each patient at the date of their muscle biopsy.

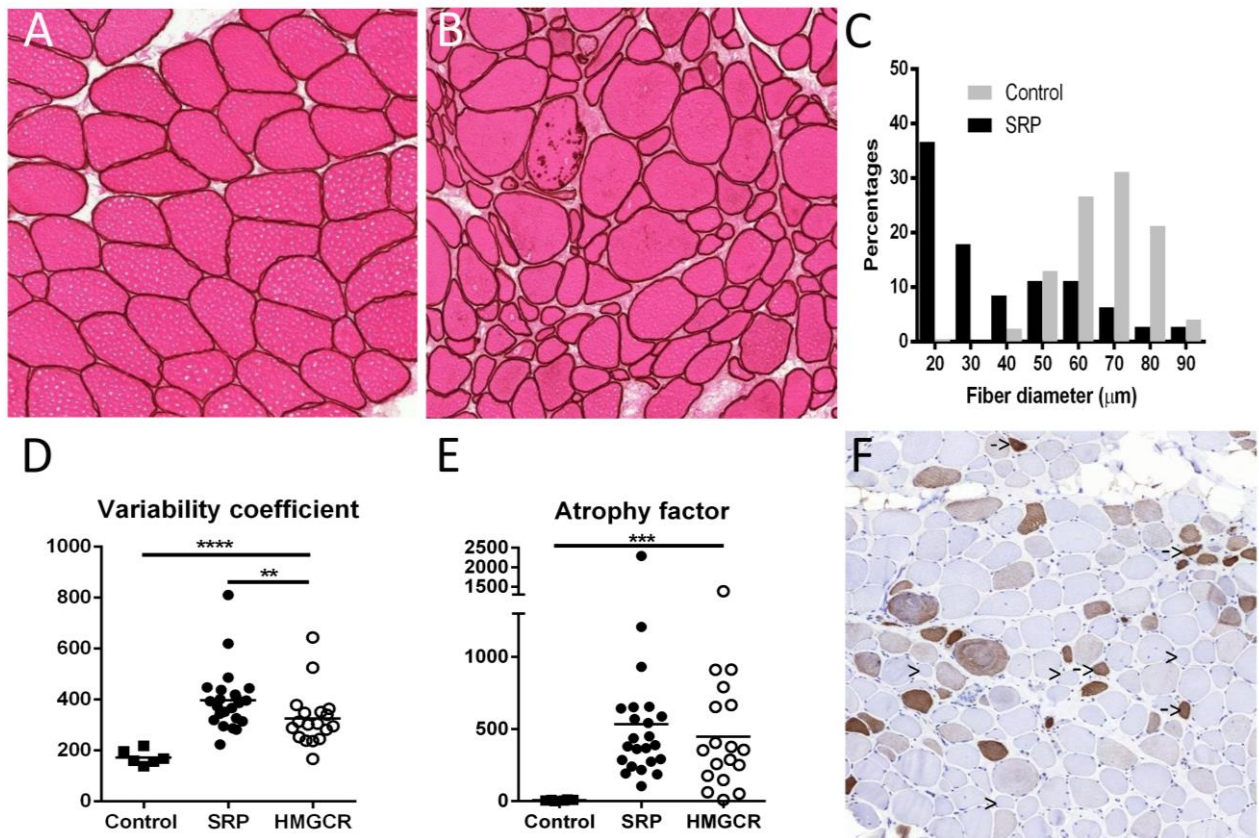


Figure 1: Hypertrophic fibers in IMNM patients can be either regenerating or atrophic fibers.

HE coloration of muscle sections of healthy control (A) and IMNM patients (B) reveal an irregularity of muscle size in IMNM patients. Quantification of the fiber size of SRP IMNM patients shows a predominance of small fibers (C). Variability coefficient demonstrates an increase of the size variability in SRP and HMGCR IMNM muscle (D). Atrophy factor increases in muscle of SRP and HMGCR IMNM patients (E). MHCneo staining shows positive regenerating fibers (*) and negative fibers (>) that can consider as atrophic (F).

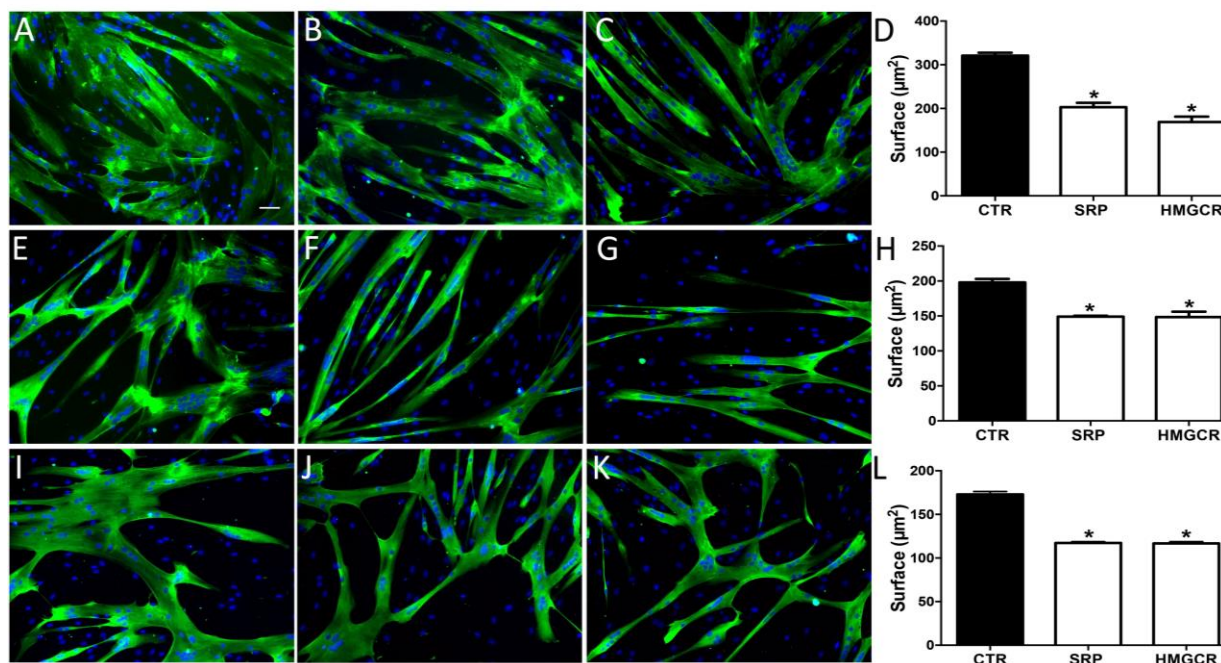


Figure 2: Anti-SRP and anti-HMGCR antibodies induce myotube hypotrophy

Compared to myotubes incubated with control plasmapheresis (A), myotubes incubated in the presence of plasmapheresis from SRP⁺ (B) or HMGCR⁺ (C) Abs patients show a significant decrease of the surface (D). Compare to myotubes cultured with control IgG (E) myotubes cultured with purified total IgG from anti-SRP⁺ patients (F) and purified total IgG from anti-HMGCR⁺ patients (G) have a significant decrease in myotube surface area (H). Compare to myotubes cultured in the presence of IgG depleted from anti-SRP Ab (I) the surface of myotubes cultured in the presence of purified specific anti-SRP IgG (J) and purified specific anti-HMGCR IgG (K) have a significantly decreased surface area (L). Myotubes are stained for myosin heavy chain (green). Scale bar is 50µm. Results presented as mean ± SEM. One-way followed by Kruskal-Wallis multiple comparisons: * $p \leq 0.05$.

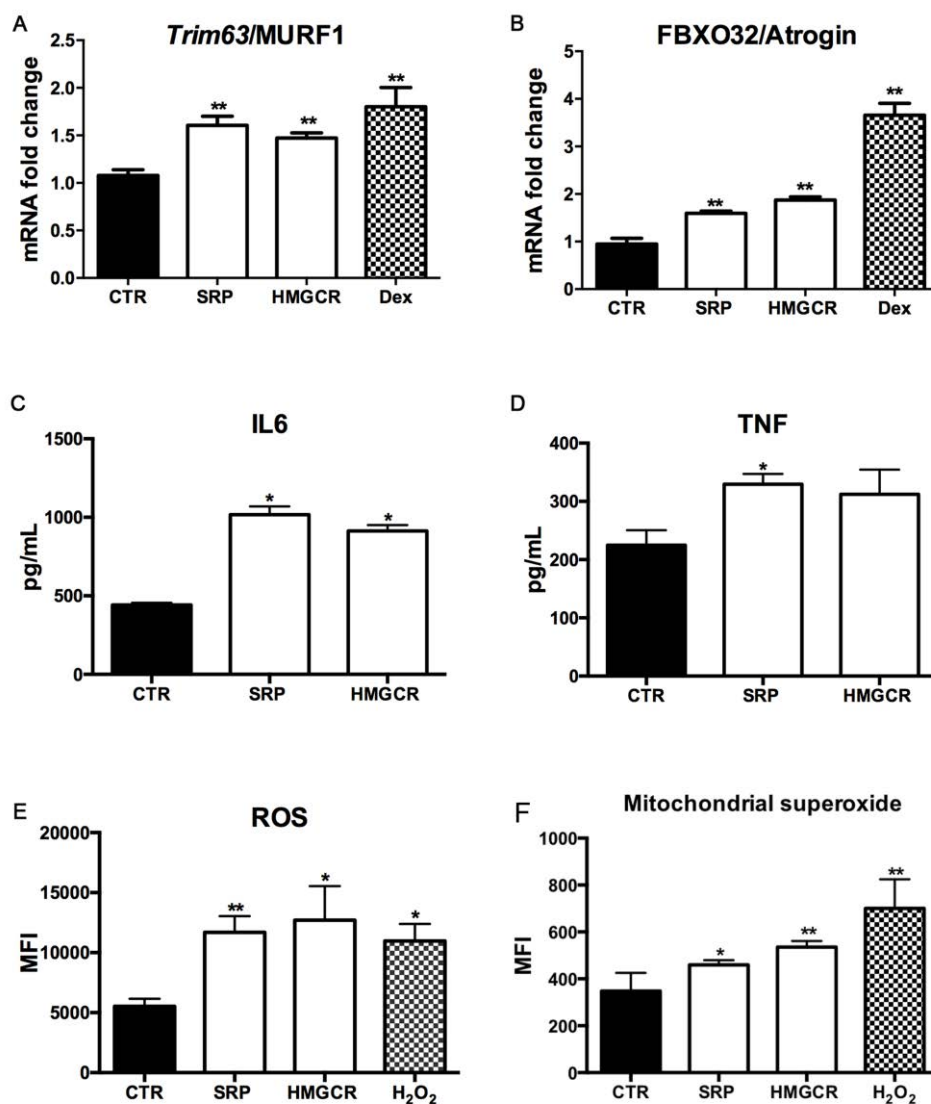


Figure 3: Anti-SRP and anti-HMGCR antibodies induce muscle fiber atrophy

Treatment of myotubes in the presence of anti-SRP or anti-HMGCR Abs induces an up-regulation of the transcription factor *TRIM63/MURF1* (A) and MAFbx/Atrogin-1 (B). Anti-SRP and anti-HMGCR Abs induce an increased level of IL6 (C) and TNF (D) cytokine in the culture media of myotubes. Anti-SRP and anti-HMGCR Abs increase the production of ROS (E) and mitochondrial superoxide (F) in myotubes. Values are presented as mean +SEM, t-test followed by Mann-Whitney simple comparison * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

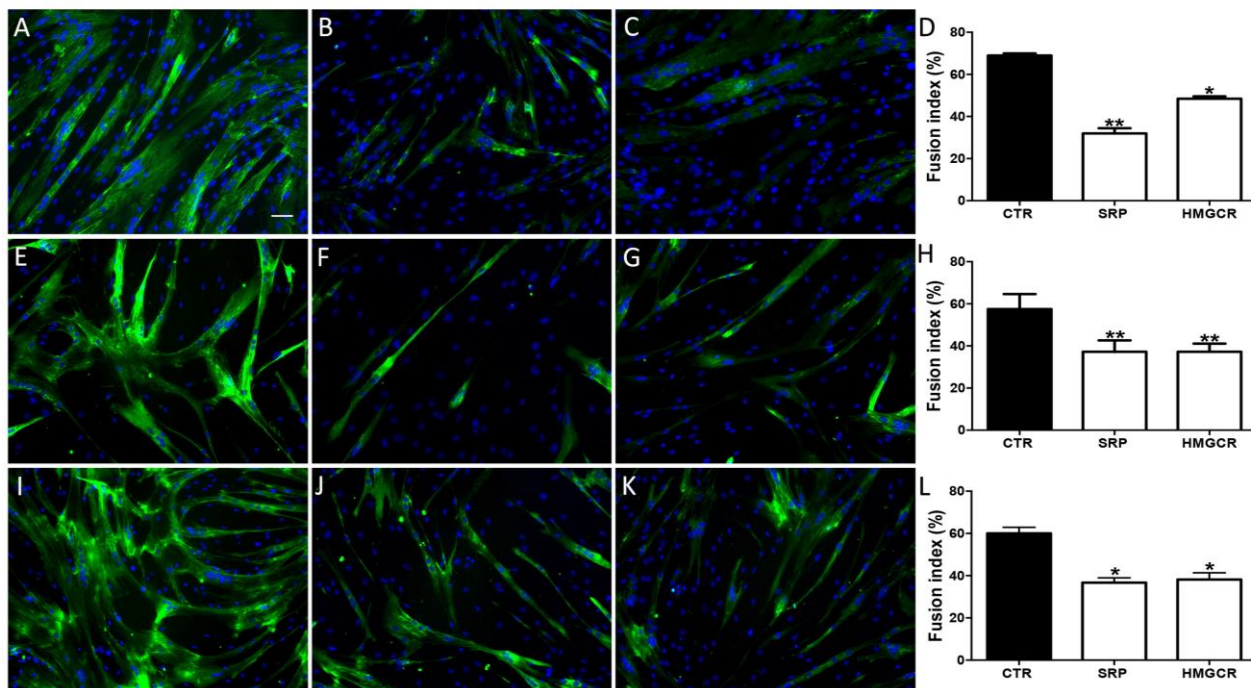


Figure 4: Anti-SRP and anti-HMGCR antibodies decrease myotube formation

Representative picture of normal myotubes incubated with control plasmapheresis (A). Plasmapheresis from anti-SRP⁺ (B) and anti-HMGCR⁺ (C) Abs patients is associated with a significant decrease of the fusion index (D). Representative picture of myotubes cultured with control IgG (E). Purified total IgG from SRP (F) and HMGCR (G) IgG lead to a significant decrease of the fusion index compared to control (H). Purified specific anti-SRP (J) anti-HMGCR (K) IgG induce a significant decrease of the fusion index (I-L). Myotubes are stained for myosin heavy chain (green). Scale bar: 50µm. One-way followed by Kruskal-Wallis multiple comparisons: * $p \leq 0.05$.

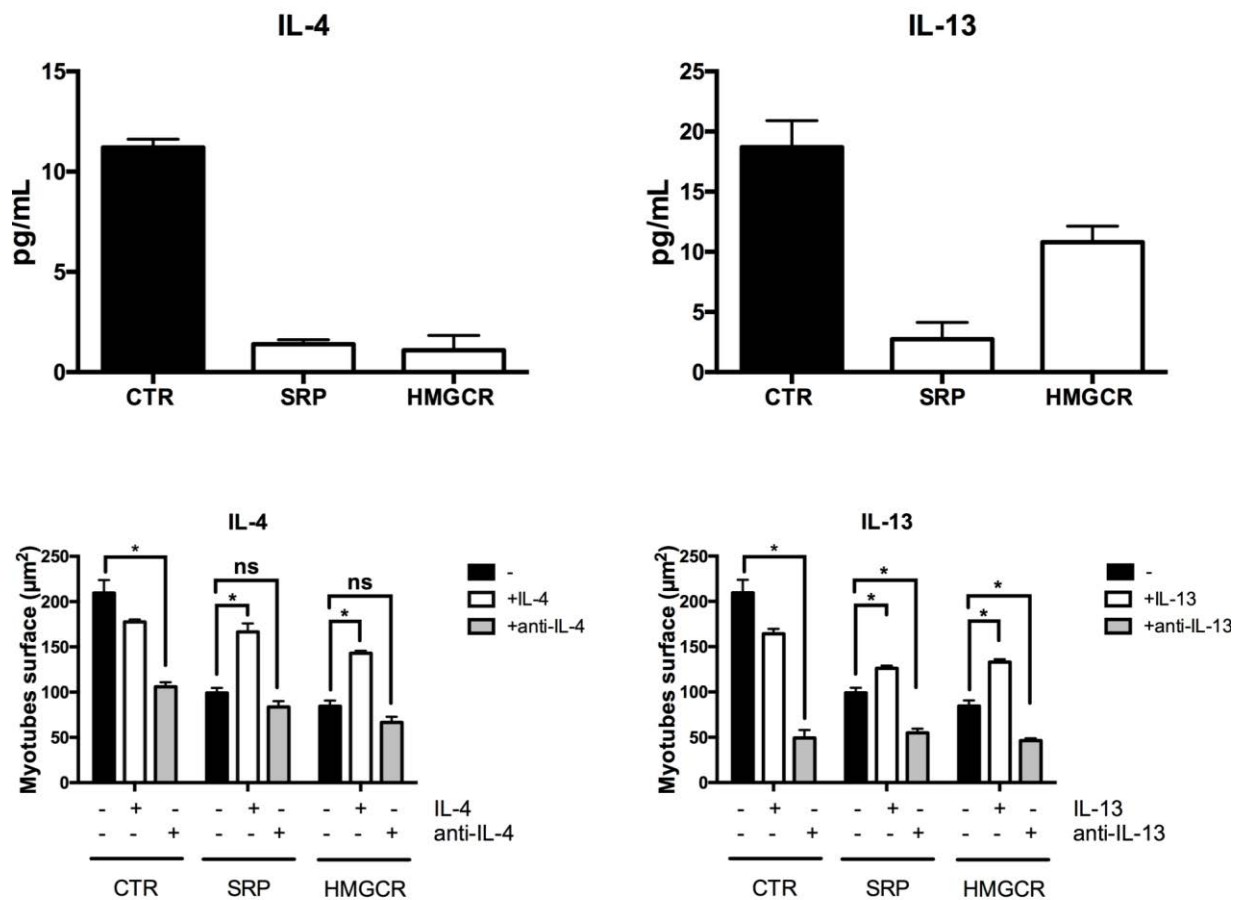


Figure 5. Deficit of IL4 and IL13 production and myoblast fusion

IL4 (A) and IL13 (B) production was measured in confluent myoblasts. In the presence of anti-SRP and anti-HMGCR Abs IL4 and IL13 levels are significantly decreased. The additions of IL4 and/or IL13 in the presence of purified total IgG from SRP or HMGCR restore the surface of myotubes (C, D). Anti-IL4 or anti-IL13 Abs in culture media is associated with a significant decrease in the surface area of myotubes in the same range that it observed in presence of purified total IgG from SRP or HMGCR (C, D). * $p \leq 0.05$.

Discussion et perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les MNAI sont des maladies auto-immunes acquises du muscle associées aux anti-SRP ou aux anti-HMGCR. Rien n'est connu sur le rôle de ces aAc. Au cours de notre étude, les muscles des patients MNAI à anti-SRP et anti-HMGCR ont été caractérisés. Les biopsies musculaires ont montré la présence de nécrose, d'atrophie ainsi que de fibres en régénération de manière diffuse. A noter que les aspects de la nécrose sont plus prononcés chez les patients anti-SRP que chez les anti-HMGCR. Le pourcentage de fibres en nécrose a été corrélé aux taux de CPK ainsi qu'à la proportion de fibres en régénération. Le titre de ces aAc est corrélé aux taux de CPK et à la faiblesse musculaire (Allenbach et al., 2014; Benveniste et al., 2011; Werner et al., 2012). Ces résultats suggèrent un éventuel rôle des aAc dans la pathogénicité.

Nous avons démontré, au cours de cette étude, que les aAc seuls étaient capables d'induire de l'atrophie musculaire *in vitro* en augmentant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, sur les mêmes cellules en culture, nous avons détecté un défaut de formation des myotubes en présence des aAc via la diminution de sécrétion de certaines cytokines indispensables pour la fusion cellulaire.

Il a été déjà décrit, dans les muscles MNAI, que l'infiltrat inflammatoire est faible ou absent (Hoogendijk et al., 2004). Néanmoins, toutes les biopsies anti-SRP et anti-HMGCR révèlent la présence d'un infiltrat inflammatoire composé majoritairement de macrophages localisé principalement dans l'endomysium, mais aussi de lymphocytes T à proximité des fibres nécrotiques. L'analyse du phénotype des macrophages a révélé l'existence de deux types de macrophages, ceux de phénotype activé « myodestructeur » et ceux de phénotype

« alternatif ». Le CMH-I a été détecté avec des taux variables sur toutes les biopsies analysées. De plus, une activation de la voie classique du complément a été démontrée.

Dans la littérature, il est décrit que les SRP et HMGCR sont des protéines intracellulaires. Des marquages effectués sur des fibres en régénération *in vivo* et des myotubes *in vitro* ont révélé l'existence des protéines SRP et HMGCR au niveau de la membrane cytoplasmique.

I. Les lésions musculaires

I. 1. Nécrose

Notre étude histologique des biopsies musculaires des MNAI à anti-SRP et anti-HMGCR a révélés la présence d'une nécrose diffuse dans le muscle. La nécrose, chez les MNAI, reste un évènement rare puisque la quantification des fibres en nécrose a montré une proportion de 0,1 à 10% de l'ensemble des fibres. Cependant, il faut noter que ce pourcentage est sous-estimé car les fibres nécrotiques en cours de myophagocytose ne peuvent être identifiées. D'autre part, il faut souligner que la biopsie est une 'photographie' à un instant T et que les phénomènes nécrotiques doivent être envisagés de manière dynamique et cumulative. Ainsi les phénomènes nécrotiques sont certainement plus importants que ne le suggère le pourcentage mesuré dans notre travail. Ceci est indirectement suggéré par l'importance de la proportion des fibres en régénération (qui sera discutée plus tard). En effet, le pourcentage de fibres en nécrose a été corrélé à la proportion de fibres en régénération.

Il faut aussi ici souligner que le pourcentage de fibres en nécrose a été corrélé aux taux de CPK dans le sang. Cette observation, bien qu'attendue, est la preuve de l'utilité de ce

marqueur sérique simple pour évaluer l'activité de la maladie en pratique clinique. Une telle corrélation n'avait encore jamais été faite au cours des MII.

La comparaison des pourcentages de fibres en nécrose a permis de montrer que les muscles des patients anti-SRP sont plus nécrosants que les muscles des patients anti-HMGCR. Cette observation est en accord avec les taux de CPK plus élevés. Cette plus grande sévérité clinico-biologique a aussi été rapportée indépendamment par le groupe de Nishino (Suzuki et al., 2015) et notre groupe (Allenbach et al., 2016). Nous n'avons pas, à ce jour, d'hypothèses pour expliquer cette observation. Par ailleurs, nous avons pu montrer que les patients Jo1 étaient tout aussi nécrosants que les patients SRP.

La nécrose a aussi été caractérisée pendant les dystrophies musculaires. Cependant, si on compare le taux de moyen de CPK au cours des dystrophies musculaires vs MNAI, on observe que les MNAI ont des taux de CPK parmi les plus élevés. Ceci suggère que le pronostic des MNAI en l'absence de traitement serait très sombre. On note d'ailleurs que certaines MNAI ont été initialement considérées à tort comme des dystrophies, conduisant à un handicap tout à fait comparable (Benveniste and Romero, 2011). En l'absence de traitement, ou en cas de retard thérapeutique, les patients peuvent développer des séquelles irréversibles en partie dues à l'atrophie musculaire.

❖ Mécanismes de la nécrose

a. Rôle des facteurs exogènes

La nécrose est une mort cellulaire non programmée durant laquelle se produit une rupture de la membrane plasmique suivie d'une fuite du contenu cytoplasmique (Kroemer et al., 2009).

La nécrose musculaire peut être le résultat de différentes conditions incluant des facteurs exogènes comme des toxines ou médicaments. L'exposition aux statines induit de la nécrose, par exemple chez le rat (Westwood et al., 2005) par toxicité directe. Mais par ailleurs, les statines représentent le facteur potentiel inducteur d'une MNAI, avec le développement des aAc anti-HMGCR. Il est décrit que 40 à 60% des patients anti-HMGCR ont été exposés aux statines (Allenbach et al., 2014; Drouot et al., 2014; Mammen et al., 2011).

L'arrêt des statines, chez les patients MNAI à anti-HMGCR, n'arrête pas la nécrose. Cela écarte le rôle causal des statines dans la nécrose au cours des MNAI. Aucun facteur n'a été décrit pour les MNAI à anti-SRP.

b. Rôle des facteurs inflammatoires

La nécrose peut donc aussi avoir une origine immunitaire. Elle peut être induite suite à l'action de différents facteurs incluant des aAc impliquant le complément (Engel and Biesecker, 1982) ou les cellules de l'immunité induisant une ADCC (Grossmayer et al., 2008). Il est aussi décrit que des cytokines comme le TNF peut aussi induire une nécrose programmée « nécroptose » (Degterev et al., 2008). A noter que, les patients répondent généralement bien aux immunosuppresseurs avec une rechute en cas d'arrêt de ceux-ci, ce qui laisse à supposer que la pathologie possède une composante inflammatoire.

▪ Rôle des cellules cytotoxique : LT CD8 et/ou NK

La nécrose peut également être médiée par les lymphocytes T cytotoxiques via la sécrétion des molécules cytotoxiques comme la perforine et le granzyme ou via l'expression de signaux cytotoxiques. Dans les muscles des patients analysés, les lymphocytes T sont retrouvés au niveau de l'endomysium, à proximité des fibres nécrotiques. Dans notre étude histologique, les lymphocytes T CD8⁺ sont des événements rares, cependant, leurs présences montrent une

corrélation avec la nécrose. Nous n'avons néanmoins pas fait de marquage pour le granzyme ou la perforine.

Sous certaines conditions, les cellules musculaires sont capables d'exprimer la molécule du CMH de classe I (molécule « ubiquitaire » présentatrice d'antigènes) et de prendre comme fonction la présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative, tout en délivrant des signaux de co-stimulation nécessaires à leur activation. L'expression du CMH-I à la membrane des cellules musculaires peut être induite par des cytokines inflammatoires comme le $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, l' $IL-1\alpha$ et l' $IL-1\beta$ (Marino et al., 2001; Pavlath, 2002). Or en plus des infiltrats inflammatoires, la présence des molécules de CMH-I sur la membrane des fibres musculaires a été observée chez tous les patients étudiés, à des taux variables. Nous avons montré que la proportion des fibres CMH-I⁺ corrèle avec le taux de nécrose musculaire et la présence de LT CD8⁺. Cela peut suggérer qu'un phénomène de cytotoxicité médiée par les LT CD8⁺ pourrait participer à la nécrose des fibres musculaires.

Il est important de noter que l'expression du CMH-I au niveau du muscle peut également conduire à une toxicité en induisant un stress du réticulum endoplasmique. Chez des souris transgéniques surexprimant le CMH-I dans le muscle, on observe une myopathie vacuolaire et inflammatoire souvent accompagnée d'aAc (Nagaraju et al., 2000). Lorsque la surexpression du CMH-I est induite chez des souris jeune, la myopathie est plus sévère (Li et al., 2009).

Au vu de leur rareté dans les biopsies, l'action théorique des lymphocytes T CD8⁺ ne pourrait pas à elle seule expliquer la nécrose musculaire, ce fait étant appuyé par l'absence généralement de l'expression diffuse du CMH I. L'infiltrat inflammatoire au cours des MNAI reste moins important que celui observé lors des PM, DM et IBM durant lesquelles l'infiltrat prédomine au niveau de l'endomysium autour des fibres qu'elles soient ou non entrées en

nécrose (Dalakas, 1991). L'infiltrat est majeur au cours de ces pathologies, il est caractérisé par une invasion des fibres non nécrotiques, un aspect non retrouvé chez les MNAI.

La nécrose médiée par des cellules pourrait être aussi expliquée par les cellules NK qui présentent un grand pouvoir de toxicité cellulaire. Cette hypothèse n'a pu être validée ici, car l'analyse des muscles MNAI a révélé que les cellules NK étaient un événement rare dans l'infiltrat inflammatoire.

▪ **Rôle du complément et des aAc**

Une autre voie potentielle de la nécrose est l'activation des voies du complément. Nous avons montré ici l'activation de la voie classique (C1q) du complément accompagnée de dépôt d'IgG sur la membrane des fibres musculaires ainsi qu'un marquage membranaire positif des protéines SRP et HMGCR. Cela suggère une éventuelle activation du complément par les aAc anti-SRP et anti-HMGCR. Il faut d'ailleurs noter que les aAc anti-SRP et anti-HMGCR sont des IgG majoritairement de type 1, cette classe peut donc tout à fait activer la voie du complément (Redpath et al., 1998). L'activation du complément et le dépôt du complexe d'attaque membranaire sur la membrane conduit à la formation de pore au niveau de la membrane et de ce fait provoque la nécrose (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991). D'autres maladies auto-immunes associées à des aAc montrent une activation du complément conduisant à une nécrose cellulaire. C'est le cas des vascularites, maladies auto-immunes systémiques, associé aux aAc ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) qui induisent la nécrose des petits vaisseaux (Chen et al., 2010).

▪ **Rôle des macrophages**

Un autre mécanisme de nécrose est médié par la toxicité cellulaire dépendante des anticorps. Durant notre étude, nous avons constaté la présence d'infiltrats importants de macrophage.

Sachant que les macrophages peuvent aussi induire une nécrose par l'intermédiaire du complément par le phénomène d'opsonisation. Nous avons observé une interaction entre les fibres positives à l'expression des protéines SRP et HMGCR et les macrophages.

Dans d'autres pathologies auto-immunes associées à des aAc, le mécanisme de destruction tissulaire a aussi impliqué une toxicité cellulaire induite par les macrophages. Lors de la sclérodermie systémique, les aAc anti-TA (Anti-topoisomerase I antibodies) se lient aux fibroblastes, leurs cellules cibles, stimulant l'adhésion et l'activation des monocytes (Hénault et al., 2006). Les macrophages sont souvent associés aux signaux (anticorps, complément, débris protéiques cellulaires) conduisant à des changements phénotypiques, connu comme la plasticité macrophagique (Locati et al., 2013).

▪ **Rôle des cytokines**

Les cellules inflammatoires infiltrant le tissu produisent certaines cytokines comme le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 qui sont connues pour induire des dégâts tissulaires (Schulze-Osthoff et al., 1994; Vercammen et al., 1998). Nous avons investigué le profil des macrophages infiltrant le muscle et nous avons constaté une présence d'un profil pro-inflammatoire M1 avec un profil NOS2 et une expression d'IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN γ . L'expression du TNF et de l'IFN γ suggérant aussi une activation classique des macrophages (Sica and Mantovani, 2012).

c. Rôle bloquant des anticorps

Des données suggèrent que les aAc seuls peuvent aussi induire indirectement de la nécrose, par les fonctions enzymatiques qu'ils sont censés inhiber.

Ainsi, des souris knockout à l'enzyme HMGCR dans le muscle squelettique présentent spontanément de la nécrose musculaire accompagnée de fort taux de créatine kinase (Osaki et

al., 2015). Ces résultats suggèrent que le blocage de la fonction enzymatique des HMGCR induit une nécrose. Cela permet d'émettre l'hypothèse que les anticorps en bloquant leur cible antigénique conduisent à la nécrose musculaire. Pour induire le blocage de HMGCR, il faudrait une entrée de l'Ac dans la cellule pour rencontrer sa cible. Il est possible que ces Acs soient internalisés, comme cela a été démontré pour les aAc anti-DNA qui sont retrouvés dans le noyau cellulaire à proximité de leur cible (Yanase and Madaio, 2005). Cependant, aucun mécanisme montrant ce phénomène n'a été décrit.

Il est aussi décrit que les aAc peuvent directement stimuler ou inhiber leurs cibles en agissant sur le système de signalisation. Les aAc anti-TSHR (thyroid-stimulating hormone receptor) peuvent stimuler le récepteur à la TSH et causer une hyperthyroïdie dans la maladie de Basedow ou le bloquer et causer une hypothyroïdie dans les thyroïdites de Hashimoto ou de Basedow (McLachlan and Rapoport, 2012).

D'autres aAc comme les anti-GPCR (G-protein-coupled receptors) peuvent fixer ce récepteur pouvant ainsi exercer un effet activateur, inhibiteur ou synergique (Wallukat and Schimke, 2014). Ces aAc sont liés à des maladies cardiovasculaires.

La plupart des aAc décrit dans la littérature comme bloquant ont des aAc ayant comme cible des récepteurs membranaires.

I. 2. Atrophie

L'atrophie musculaire se caractérise par la diminution de la taille des fibres musculaires (Gundersen and Bruusgaard, 2008). L'étude histologique des muscles de patients MNAI a révélé un nombre important de fibres de petites tailles, qui ont été définies comme des fibres en atrophie et des fibres en régénération. La définition des fibres atrophiques repose sur la

détection de facteur d'atrophie d'une part mais aussi sur la négativité d'expression de la myosine néonatale qui est spécifique des fibres en régénération.

Des travaux antérieurs avaient aussi noté l'importance de l'irrégularité du diamètre des fibres au cours des MNAI (Alshehri et al., 2015; Miller et al., 2002). Cependant ils n'avaient pas permis d'identifier si les fibres de petites tailles correspondaient à des fibres en régénération et/ou en cours d'atrophie.

Différents facteurs comme l'inactivité physique, le jeûne, le vieillissement ou pathologiques tels que l'infection chronique et la cachexie induite par le cancer peuvent conduire à une atrophie musculaire (Bonaldo and Sandri, 2013). Selon la situation, plusieurs voies peuvent être stimulées et conduire à l'activation des gènes d'atrophie. Dans le cas des autres myopathies auto-immunes idiopathique, des fibres de petites tailles atrophiques ont aussi été décrites. Au cours de la dermatomyosite, l'atrophie a une distribution particulière périfasciculaire. Cette topographie particulière suggère des mécanismes distincts des MNAI. Le groupe de Greenberg a montré que l'atrophie périfasciculaire observée au cours des DM est due à l'activation de la voie des IFN de type I via la protéine ISG-15 (Salajegheh et al., 2010). Dans le cas des PM et IBM, un autre mécanisme a été rapporté montrant une augmentation des gènes MAFbx/atrogin-1 liée aux conditions inflammatoires (Lee et al., 2012).

- **Rôle des cytokines inflammatoires**

Nous avons aussi montré, dans notre modèle *in vitro*, que les anticorps anti-SRP et anti-HMGCR sont capables d'induire une atrophie musculaire en augmentant l'expression de certains facteurs inflammatoires comme l'IL-6, le TNF et aussi des molécules du stress oxydatif comme ROS et les anions superoxydes. Cela conduit à une atrophie en augmentant l'expression des facteurs Trim63 et MAFbx.

Les cytokines inflammatoires sont connues pour être de potentiel inducteur d'atrophie durant les maladies inflammatoires. Le TNF a un rôle important dans l'atrophie, il peut stimuler la voie catabolique via différents mécanismes, en stimulant l'activation des voies du protéasome-ubiquitine (Llovera et al., 1998; Steffen et al., 2008), il peut aussi induire le gène MAFbx via le P38 MAPK (Li et al., 2005).

Il a été décrit dans différentes études que le TNF a une capacité à induire d'autres cytokines comme l'IL-6 (Roher et al., 2008) et des facteurs de stress oxydatif comme les ROS (Llovera et al., 1998; Li and Reid, 2000) et les anions superoxydes mitochondriaux (Byun et al., 2008; Supinski and Callahan, 2007).

L'IL-6 a aussi été impliqué dans l'atrophie musculaire. En effet, l'exposition des fibres musculaire à l'IL-6 conduit à une atrophie en induisant les gènes MAFbx et Trim63 (Bonetto et al., 2012; Williams et al., 1998).

La production des ROS ainsi que les anions superoxydes par la mitochondrie a aussi été impliquée dans la perte musculaire (Muller et al., 2007; Abrigo et al., 2016; Supinski and Callahan, 2007).

L'environnement inflammatoire des muscles MNAI pourrait donc conduire à l'atrophie musculaire. Ces cytokines peuvent être produites par les cellules inflammatoires présentes dans le muscle (macrophages) ou, comme constaté *in vitro*, par le muscle lui-même.

Le mécanisme précis conduisant à l'atrophie en présence des anti-SRP et anti-HMGCR n'est encore pas complètement compris, mais les molécules pro-inflammatoires doivent y jouer un rôle. Néanmoins, le mécanisme précis conduisant à la sécrétion de ces cytokines par les cellules musculaires n'est pas encore compris. Cependant, quelques hypothèses peuvent être émises.

Les anticorps pourraient en bloquant leurs cibles ou autres protéines de surface induire un stress oxydatif conduisant les cellules musculaires à produire des cytokines inflammatoires. Il est décrit en effet que le stress oxydatif peut induire des cytokines inflammatoires comme le TNF et l'IL-6 (Tseng et al., 2016).

II. Régénération

Lors de lésions musculaires, le tissu se répare en activant ses cellules satellites qui commencent à se différencier et à fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires. Au cours des MNAI, en plus des fibres nécrotiques et atrophiques, on observe beaucoup de fibres de petites tailles en régénérations.

▪ Rôle des macrophages dans la régénération.

Un autre type de macrophages a été détecté dans l'infiltrat inflammatoire. Ces macrophages, à profil alternatif (M2) STAT6⁺ et CD206⁺, ont été localisés autour des fibres nécrotiques. Il est décrit dans la littérature que les macrophages à profil M2 ont un rôle dans la réparation du tissu musculaire (Arnold et al., 2007; Bencze et al., 2012; Chazaud, 2014; Chazaud et al., 2009; Sonnet et al., 2006). La présence du profil M2 des macrophages suggère une réparation tissulaire de la part de ces cellules. La réparation tissulaire musculaire implique des cytokines sécrétées par les macrophages. Les cytokines IL-6, TNF et G-CSF induisent l'activation et prolifération des myoblastes, tandis que les cytokines IL-4, IL-13, IL-10, IGF-1 favorisent leur fusion.

Récemment, le groupe de Mammen a également démontré la présence prédominante des macrophages M2 dans le muscle des MNAI à anti-HMGCR (Chung et al., 2015).

- **Rôle des aAc dans la régénération *in vitro***

Dans notre modèle *in vitro*, nous avons observé qu'en présence des anti-SRP et anti-HMGCR, les myoblastes avaient un défaut de formation de myotubes. Ce résultat pourrait être lié à l'observation d'un défaut de régénération induit par les statines *in vitro* et *in vivo* (Trapani et al., 2012).

La formation de myotubes *in vitro* est un processus complexe. Les cellules commencent par entrer en différenciation en changeant leurs programmes lorsqu'il y a contact entre elles, puis fusionnent. Cette fusion est suivie de la formation de jeunes myotubes qui sécrètent des cytokines comme l'IL-4 (Horsley et al., 2003) et l'IL-13 (Jacquemin et al., 2004) dans un but de recrutement d'autres myoblastes pour leur croissance. Au cours de nos travaux, nous avons montré que les myoblastes, en présence des anti-SRP et anti-HMGCR, produisent des petits myotubes et n'arrivent pas à produire des myotubes de grandes tailles. Nous avons montré que le défaut est lié à un défaut de sécrétion des cytokines IL-4 et IL-13 en présence des anticorps anti-SRP et anti-HMGCR. Nous avons montré que ce défaut peut être inversé en rajoutant les cytokines IL-4 et/ou IL-13. Le mécanisme conduisant à ce phénomène reste encore à élucider.

- **Régénération musculaire et exposition d'aAg**

Pendant la régénération musculaire, nous avons montré que les protéines SRP et HMGCR pouvaient se retrouver à la membrane plasmique des fibres de muscle MNAI. Nous avons aussi observé une localisation de ces protéines sur la membrane plasmique de jeunes myotubes contrôles.

Lors de la régénération, des protéines cytoplasmiques comme les protéines HMGCR (Mammen et al., 2011) et les MI-2 (Mammen et al., 2009) sont surexprimées. Il n'est pas exclu que du fait de l'augmentation du taux de ces protéines, elle se retrouve à la surface cellulaire comme cela a été démontré dans d'autres cellules en régénération ou en fusion. Il est décrit que dans certaines conditions, les antigènes intracellulaires peuvent se retrouver à la membrane plasmique. Lors de la fusion des macrophages, des protéines de la membrane du réticulum endoplasmique se retrouvent à la membrane plasmique (McNally and Anderson, 2005). Sur d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes et les cellules HeLa, il a aussi été rapporté que des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique sont retrouvées à la membrane plasmique (Okazaki et al., 2000).

- **Génération d'Ac polyréactifs**

Il n'est pas impossible que les anti-SRP et anti-HMGCR puissent reconnaître d'autres molécules présentes à la surface des fibres musculaires. Un Ac peut acquérir la capacité de se lier à plusieurs Ags présentant des structures différentes. Ce phénomène est appelé « la polyréactivité », elle peut être naturelle ou induite (Dimitrov et al., 2013). La polyréactivité a été associée aux maladies auto-immunes, des LB exprimant une polyréactivité ont été observés chez des malades atteints de Lupus et d'arthrites rhumatoïdes (Samuels et al., 2005; Yurasov et al., 2005). Ces observations ont été expliquées par une perturbation de la tolérance. L'ajout de ces aAc dans le cerveau de souris a conduit à des dommages neurologiques conduisant à un lupus (Zhang et al., 2009).

III. Conclusions

Ce travail a été conduit dans le but de comprendre le rôle des aAc anti-SRP et anti-HMGCR dans la pathologie des MNAI. Nos différentes observations nous conduisent à affirmer un rôle pathologique majeur des anti-SRP et anti-HMGCR au cours des MNAI. Il reste que ce travail devra se poursuivre par les perspectives suivantes.

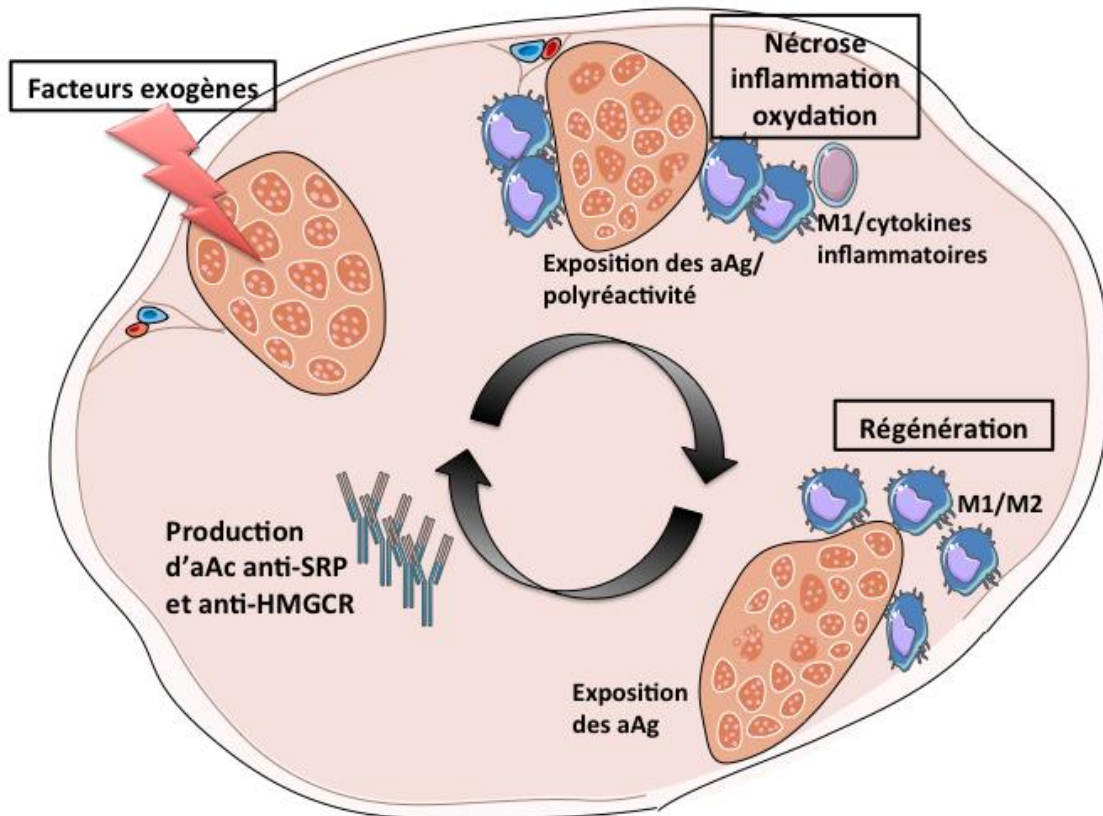


Figure 13. Schéma récapitulatif des événements suggérés au cours des MNAI.

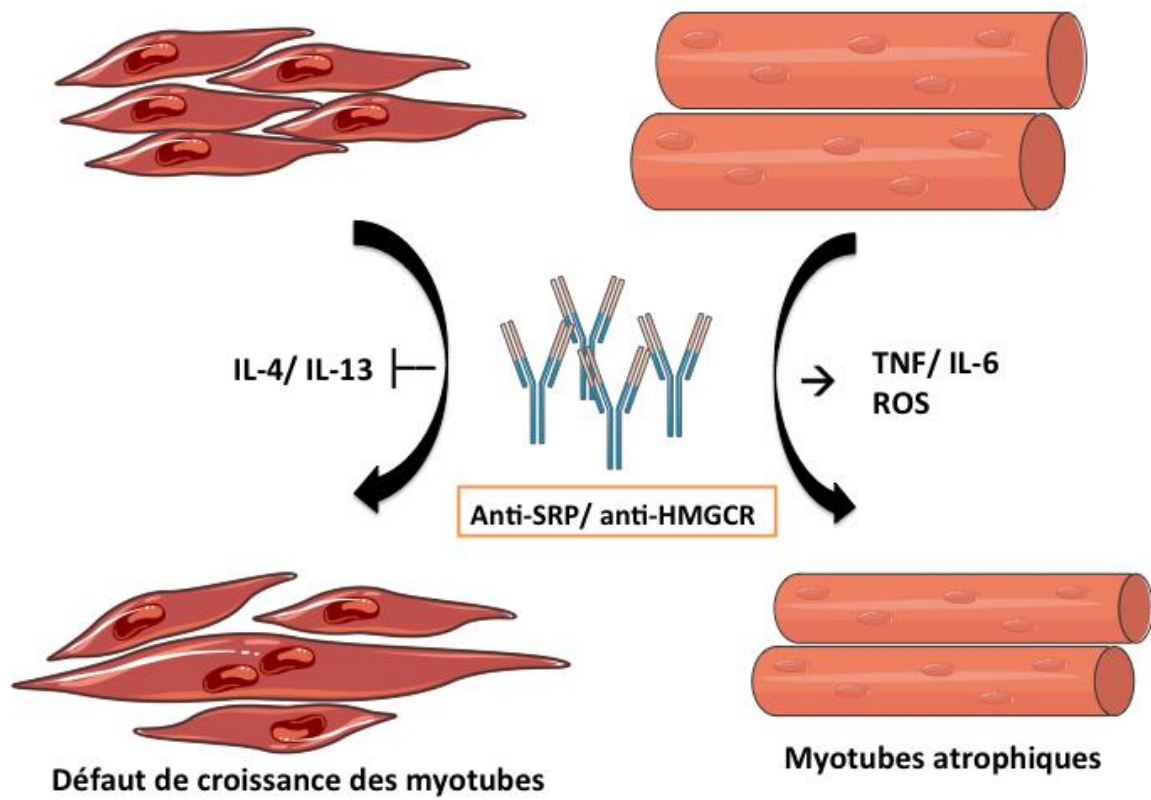


Figure 14. Schéma récapitulatif des évènements *in vitro*.

PERSPECTIVES

1. Localisation précise des cibles Ag

Les protéines SRP et HMGCR sont connues pour être des protéines intracellulaires mais au cours de nos travaux, nous avons constaté que ces protéines pouvaient se retrouver à la membrane lors de la régénération musculaire. Dans le but de consolider nos résultats, nous allons passer à une meilleure résolution d'image avec la microscopie électronique.

2. Endocytose des Ac

Actuellement, nous effectuons des expériences en microscopie confocale pour vérifier si les Ac sont endocytés et s'ils sont capables de rencontrer leur cible antigénique. Nous allons aussi étudier le potentiel rôle neutralisant des anti-HMGCR sur leur cible par mesure de l'activité enzymatique *in vitro*.

3. Cascade intracellulaire conduisant à plus de TNF, IL-6 et moins d'IL-4 et IL-13

Dans le but de comprendre le(s) mécanisme(s) et les voies impliquées dans la surexpression ou le blocage des cytokines par les aAc pendant la régénération et l'atrophie, des analyses de plusieurs voies dont la voie du calcium seront analysées.

4. Traitements ciblés anti : anti-SRP et anti-HMGCR

Nous avons démontré au cours de ces travaux le rôle pathogène des anti-SRP et anti-HMGCR au cours des MNAI. Cela permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques en visant spécifiquement les aAc anti-SRP et anti-HMGCR. Nous envisageons de développer des peptides neutralisant les anti-SRP et anti-HMGCR.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, K.L., Friday, B.B., Thaloor, D., Murphy, T.J., and Pavlath, G.K. (1998). Activation and Cellular Localization of the Cyclosporine A-sensitive Transcription Factor NF-AT in Skeletal Muscle Cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 2905–2916.
- Abrigo, J., Rivera, J.C., Simon, F., Cabrera, D., and Cabello-Verrugio, C. (2016). Transforming growth factor type beta (TGF- β) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy. *Cell. Signal.* 28, 366–376.
- Allenbach, Y., and Benveniste, O. (2013a). Les myopathies nécrosantes acquises. *Rev. Médecine Interne* 34, 363–368.
- Allenbach, Y., and Benveniste, O. (2013b). Acquired necrotizing myopathies. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 554–560.
- Allenbach, Y., Drouot, L., Rigolet, A., Charuel, J.L., Jouen, F., Romero, N.B., Maisonobe, T., Dubourg, O., Behin, A., Laforet, P., et al. (2014). Anti-HMGCR Autoantibodies in European Patients With Autoimmune Necrotizing Myopathies. *Medicine (Baltimore)* 93.
- Allenbach, Y., Keraen, J., Bouvier, A., Jooste, V., Champiaux, N., Hervier, B., Schoindre, Y., Rigolet, A., Gilardin, L., Musset, L., et al. (2016). High risk of cancer in autoimmune necrotizing myopathies: usefulness of myositis specific antibody. *Brain* aww054.
- Alshehri, A., Choksi, R., Bucelli, R., and Pestronk, A. (2015). Myopathy with anti-HMGCR antibodies. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2.
- Amital, H., Heilweil, M., Ulmansky, R., Szafer, F., Bar-Tana, R., Morel, L., Foster, M.H., Mostoslavsky, G., Eilat, D., Pizov, G., et al. (2005). Treatment with a laminin-derived peptide suppresses lupus nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 5516–5523.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395–1401.
- Armand, O., Boutineau, A.M., Mauger, A., Pautou, M.P., and Kieny, M. (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Expérimentale* 72, 163–181.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., Rooijen, N. van, Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204, 1057–1069.
- Baehr, L.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol.* 589, 4759–4776.
- Bencze, M., Negroni, E., Vallese, D., Yacoub-Youssef, H., Chaouch, S., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J.P., Chazaud, B., Butler-Browne, G., et al. (2012). Proinflammatory Macrophages Enhance the Regenerative Capacity of Human Myoblasts by Modifying Their Kinetics of Proliferation and Differentiation. *Mol. Ther.* 20, 2168–2179.
- Benveniste, O. (2016). Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Cur Opin Neurol.*
- Benveniste, O., and Romero, N.B. (2011). Myositis or dystrophy? Traps and pitfalls. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 40, e249–e255.
- Benveniste, O., Drouot, L., Jouen, F., Charuel, J.-L., Bloch-Queyrat, C., Behin, A., Amoura, Z., Marie, I., Guiguet, M., Eymard, B., et al. (2011). Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* 63, 1961–1971.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2012). *Biochemistry* (Basingstoke: W.H. Freeman).

- Berghe, T.V., Hassannia, B., and Vandennebeele, P. (2016). An outline of necrosome triggers. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 2137–2152.
- Berke, G. (1994). The Binding and Lysis of Target Cells by Cytotoxic Lymphocytes: Molecular and Cellular Aspects. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 735–773.
- Bhakdi, S., and Trantum-Jensen, J. (1991). Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today* *12*, 318–320.
- Bodell, P.W., Kodesh, E., Haddad, F., Zaldivar, F.P., Cooper, D.M., and Adams, G.R. (2009). Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* *106*, 443–453.
- Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* *6*, 25–39.
- Bonetto, A., Aydogdu, T., Jin, X., Zhang, Z., Zhan, R., Puzis, L., Koniaris, L.G., and Zimmers, T.A. (2012). JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *303*, E410–E421.
- Brouwer, R., Hengstman, G.J., Vree Egberts, W., Ehrfeld, H., Bozic, B., Ghirardello, A., Grøndal, G., Hietarinta, M., Isenberg, D., Kalden, J.R., et al. (2001). Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann. Rheum. Dis.* *60*, 116–123.
- Byun, H.S., Won, M., Park, K.A., Kim, Y.-R., Choi, B.L., Lee, H., Hong, J.H., Piao, L., Park, J., Kim, J.M., et al. (2008). Prevention of TNF-induced necrotic cell death by rottlerin through a Nox1 NADPH oxidase. *Exp. Mol. Med.* *40*, 186–195.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G.W., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., et al. (2004). IKK β /NF- κ B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell* *119*, 285–298.
- Casciola-Rosen, L., and Mammen, A.L. (2012). Myositis autoantibodies. *Curr. Opin. Rheumatol.* *24*.
- Chargé, S.B.P., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* *84*, 209–238.
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). Autoimmune responses are directed against self antigens.
- Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., et al. (2006). New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6664–6674.
- Chazaud, B. (2014). Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* *219*, 172–178.
- Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., and Chretien, F. (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc. Sport Sci. Rev.* *37*, 18–22.
- Chen, M., Daha, M.R., and Kallenberg, C.G.M. (2010). The complement system in systemic autoimmune disease. *J. Autoimmun.* *34*, J276–J286.
- Chen, S.-E., Jin, B., and Li, Y.-P. (2007). TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *292*, C1660–C1671.
- Chinoy, H., Li, C.K.-C., Platt, H., Fertig, N., Varsani, H., Gunawardena, H., Betteridge, Z., Oddis, C.V., McHugh, N.J., Wedderburn, L.R., et al. (2012). Genetic association study of NF- κ B genes in UK Caucasian adult and juvenile onset idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *51*, 794–799.
- Choy, E.H.S., and Isenberg, D.A. (2002). Treatment of dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology* *41*, 7–13.
- Christopher-Stine, L., Casciola-Rosen, L.A., Hong, G., Chung, T., Corse, A.M., and Mammen, A.L. (2010). A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is

associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* *62*, 2757–2766.

Chung, T., Christopher-Stine, L., Paik, J.J., Corse, A., and Mammen, A.L. (2015). The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. *Muscle Nerve* *52*, 189–195.

Cong, H., Sun, L., Liu, C., and Tien, P. (2011). Inhibition of atrogen-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum. Gene Ther.* *22*, 313–324.

Cornelison, D.D.W., and Wold, B.J. (1997). Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. *Dev. Biol.* *191*, 270–283.

Covault, J., and Sanes, J.R. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *102*, 716–730.

Dalakas, M.C. (2011). Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *37*, 226–242.

Dalakas, M.C. (2015). Inflammatory Muscle Diseases. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1734–1747.

DeBose-Boyd, R.A. (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* *18*, 609–621.

Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 112–119.

Degtarev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., et al. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 313–321.

Delling, U., Tureckova, J., Lim, H.W., De Windt, L.J., Rotwein, P., and Molkentin, J.D. (2000). A Calcineurin-NFATc3-Dependent Pathway Regulates Skeletal Muscle Differentiation and Slow Myosin Heavy-Chain Expression. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6600–6611.

Dhawan, J., and Rando, T.A. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* *15*, 666–673.

Dimitrov, J.D., Planchais, C., Roumenina, L.T., Vassilev, T.L., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2013). Antibody Polyreactivity in Health and Disease: Statu Variabilis. *J. Immunol.* *191*, 993–999.

Drouot, L., Allenbach, Y., Jouen, F., Charuel, J.-L., Martinet, J., Meyer, A., Hirschberger, O., Bader-Meunier, B., Kone-Paut, I., Campana-Salort, E., et al. (2014). Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R39.

Ebisui, C., Tsujinaka, T., Morimoto, T., Kan, K., Iijima, S., Yano, M., Kominami, E., Tanaka, K., and Monden, M. (1995). Interleukin-6 Induces Proteolysis by Activating Intracellular Proteases (Cathepsins B and L, Proteasome) in C2C12 Myotubes. *Clin. Sci.* *89*, 431–439.

Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T.L., Aderem, A., and Ravetch, J.V. (2006). TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J. Exp. Med.* *203*, 553–561.

Ehrenstein, M.R., Katz, D.R., Griffiths, M.H., Papadaki, L., Winkler, T.H., Kalden, J.R., and Isenberg, D.A. (1995). Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int.* *48*, 705–711.

Engel, A.G., and Biesecker, G. (1982). Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann. Neurol.* *12*, 289–296.

Espat, N.J., Copeland, E.M., and Moldawer, L.L. (1994). Tumour necrosis factor and cachexia: a current perspective. *Surg. Oncol.* *3*, 255–262.

Fearon, K.C.H., Glass, D.J., and Guttridge, D.C. (2012). Cancer Cachexia: Mediators,

Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metab.* *16*, 153–166.

Fenton, K.A., Tømmerås, B., Marion, T.N., and Rekvig, O.P. (2010). Pure anti-dsDNA mAbs need chromatin structures to promote glomerular mesangial deposits in BALB/c mice. *Autoimmunity* *43*, 179–188.

Franckhauser, S., Elias, I., Sopasakis, V.R., Ferré, T., Nagaev, I., Andersson, C.X., Agudo, J., Ruberte, J., Bosch, F., and Smith, U. (2008). Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* *51*, 1306–1316.

García-Martínez, C., López-Soriano, F.J., and Argilés, J.M. (1994). Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle. *Cancer Lett.* *76*, 1–4.

Glass, D.J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 225–229.

Gnocchi, V.F., White, R.B., Ono, Y., Ellis, J.A., and Zammit, P.S. (2009). Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PloS One* *4*, e5205.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* *343*, 425–430.

Goodman, M.N. (1994). Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *205*, 182–185.

Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* *435*, 590–597.

Grable-Esposito, P., Katzberg, H.D., Greenberg, S.A., Srinivasan, J., Katz, J., and Amato, A.A. (2010). Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve* *41*, 185–190.

Grossmayer, G.E., Munoz, L.E., Weber, C.K., Franz, S., Voll, R.E., Kern, P.M., Kalden, J.R., Schett, G., Herrmann, M., and Gaip, U.S. (2008). IgG autoantibodies bound to surfaces of necrotic cells and complement C4 comprise the phagocytosis promoting activity for necrotic cells of systemic lupus erythaematosus sera. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1626–1632.

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., et al. (2012). Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* *15*, 25–37.

Gundersen, K., and Bruusgaard, J.C. (2008). Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J. Physiol.* *586*, 2675–2681.

Guttridge, D.C., Mayo, M.W., Madrid, L.V., Wang, C.-Y., and Jr, A.S.B. (2000). NF- κ B-Induced Loss of MyoD Messenger RNA: Possible Role in Muscle Decay and Cachexia. *Science* *289*, 2363–2366.

Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D.M., and Adams, G.R. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* *98*, 911–917.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* *137*, 1100–1111.

Hénault, J., Robitaille, G., Sénécal, J.-L., and Raymond, Y. (2006). DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* *54*, 963–973.

Hengstman, G.J.D., ter Laak, H.J., Egberts, W.T.M.V., Lundberg, I.E., Moutsopoulos, H.M., Vencovsky, J., Doria, A., Mosca, M., van Venrooij, W.J., and van Engelen, B.G.M. (2006). Anti-signal recognition particle autoantibodies: marker of a necrotising myopathy. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1635–1638.

Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* *16*, 249–

- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* *1*, 489–495.
- Hoogendijk, J.E., Amato, A.A., Lecky, B.R., Choy, E.H., Lundberg, I.E., Rose, M.R., Vencovsky, J., Visser, M. de, and Hughes, R.A. (2004). 119th ENMC international workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10–12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* *14*, 337–345.
- Horsley, V., Friday, B.B., Matteson, S., Kegley, K.M., Gephart, J., and Pavlath, G.K. (2001). Regulation of the Growth of Multinucleated Muscle Cells by an Nfatc2-Dependent Pathway. *J. Cell Biol.* *153*, 329–338.
- Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 Acts as a Myoblast Recruitment Factor during Mammalian Muscle Growth. *Cell* *113*, 483–494.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *199*, 326–337.
- Istvan, E.S., Palnitkar, M., Buchanan, S.K., and Deisenhofer, J. (2000). Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* *19*, 819–830.
- Jacquemin, V., Furling, D., Bigot, A., Butler-Browne, G.S., and Mouly, V. (2004). IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. *Exp. Cell Res.* *299*, 148–158.
- Jacquemin, V., Butler-Browne, G.S., Furling, D., and Mouly, V. (2007). IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci* *120*, 670–681.
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z., and Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *J. Appl. Physiol.* *89*, 81–88.
- Katz, B. (1961). The Terminations of the Afferent Nerve Fibre in the Muscle Spindle of the Frog. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *243*, 221–240.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2001). The Signal Recognition Particle. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 755–775.
- Kegley, K.M., Gephart, J., Warren, G.L., and Pavlath, G.K. (2001). Altered Primary Myogenesis in NFATC3^{-/-} Mice Leads to Decreased Muscle Size in the Adult. *Dev. Biol.* *232*, 115–126.
- Keller, P., Keller, C., Carey, A.L., Jauffred, S., Fischer, C.P., Steensberg, A., and Pedersen, B.K. (2003). Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *310*, 550–554.
- Klein, J. (1984). *Immunology: The Science of Self-Nonsel Discrimination* (John Wiley & Sons, Incorporated).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., et al. (2009). Classification of cell death. *Cell Death Differ.* *16*, 3–11.
- Lafer, E.M., Rauch, J., Andrzejewski, C., Mudd, D., Furie, B., Furie, B., Schwartz, R.S., and Stollar, B.D. (1981). Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J. Exp. Med.* *153*, 897–909.
- Lahaye, C., Beaufrère, A.M., Boyer, O., Drouot, L., Soubrier, M., and Tournadre, A. (2014). Immune-mediated myopathy related to anti 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies as an emerging cause of necrotizing myopathy induced by statins. *Joint Bone Spine* *81*, 79–82.

- Layne, M.D., and Farmer, S.R. (1999). Tumor Necrosis Factor- α and Basic Fibroblast Growth Factor Differentially Inhibit the Insulin-like Growth Factor-I Induced Expression of Myogenin in C2C12 Myoblasts. *Exp. Cell Res.* *249*, 177–187.
- Lee, H.-K., Rocnik, E., Fu, Q., Kwon, B., Zeng, L., Walsh, K., and Querfurth, H. (2012). Foxo/Atrogin induction in human and experimental myositis. *Neurobiol. Dis.* *46*, 463–475.
- Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 628–633.
- Lehmann, H.C., Lopez, P.H.H., Zhang, G., Ngyuen, T., Zhang, J., Kieseier, B.C., Mori, S., and Sheikh, K.A. (2007). Passive Immunization with Anti-Ganglioside Antibodies Directly Inhibits Axon Regeneration in an Animal Model. *J. Neurosci.* *27*, 27–34.
- Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3639–3646.
- Li, Y.-P., and Reid, M.B. (2000). NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *279*, R1165–R1170.
- Li, C.K., Knopp, P., Moncrieffe, H., Singh, B., Shah, S., Nagaraju, K., Varsani, H., Gao, B., and Wedderburn, L.R. (2009). Overexpression of MHC Class I Heavy Chain Protein in Young Skeletal Muscle Leads to Severe Myositis. *Am. J. Pathol.* *175*, 1030–1040.
- Li, Y., Schwartz, R.J., Waddell, I.D., Holloway, B.R., and Reid, M.B. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumor necrosis factor α . *FASEB J.* *12*, 871–880.
- Li, Y.-P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L., and Reid, M.B. (2005). TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* *19*, 362–370.
- Lieskovska, J., Guo, D., and Derman, E. (2003). Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. *Growth Horm. IGF Res.* *13*, 26–35.
- Limaye, V., Bundell, C., Hollingsworth, P., Rojana-Udomsart, A., Mastaglia, F., Blumbergs, P., and Lester, S. (2015). Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. *Muscle Nerve* *52*, 196–203.
- Liu, Z., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF Receptor 1 Effector Functions: JNK Activation Is Not Linked to Apoptosis While NF- κ B Activation Prevents Cell Death. *Cell* *87*, 565–576.
- Llovera, M., García-Martínez, C., López-Soriano, J., Agell, N., López-Soriano, F.J., Garcia, I., and Argilés, J.M. (1998). Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett.* *130*, 19–27.
- Locati, M., Mantovani, A., and Sica, A. (2013). Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv. Immunol.* *120*, 163–184.
- Lopes-Ferreira, M., Núñez, J., Rucavado, A., Farsky, S.H., Lomonte, B., Angulo, Y., Moura Da Silva, A.M., and Gutiérrez, J.M. (2001). Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *Int. J. Exp. Pathol.* *82*, 55–64.
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* *1694*, 17–35.
- MacDonald, H.R. (1989). Mechanisms of immunological tolerance. *Science* *246*, 982.
- Mahler, E.A.M., Blom, M., Voermans, N.C., Engelen, B.G.M. van, Riel, P.L.C.M. van, and Vonk, M.C. (2011). Rituximab treatment in patients with refractory inflammatory myopathies. *Rheumatology* *ker088*.
- Mammen, A.L. (2011). Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and

pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 343–354.

Mammen, A.L. (2016). Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *N. Engl. J. Med.* 374, 664–669.

Mammen, A.L., and Tiniakou, E. (2015). Intravenous Immune Globulin for Statin-Triggered Autoimmune Myopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1680–1682.

Mammen, A.L., Casciola-Rosen, L.A., Hall, J.C., Christopher-Stine, L., Corse, A.M., and Rosen, A. (2009). Expression of the dermatomyositis autoantigen Mi-2 in regenerating muscle. *Arthritis Rheum.* 60, 3784–3793.

Mammen, A.L., Chung, T., Christopher-Stine, L., Rosen, P., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L.A. (2011). Autoantibodies against 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMGCR) in Patients with Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *Arthritis Rheum.* 63, 713–721.

Marino, M., Scuderi, F., Mazzarelli, P., Mannella, F., Provenzano, C., and Bartoccioni, E. (2001). Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *J. Neuroimmunol.* 116, 94–101.

Mastaglia, F. (2008). Inflammatory muscle diseases. *Neurol. India* 56, 263.

Mastaglia, F.L., and Phillips, B.A. (2002). Idiopathic inflammatory myopathies: epidemiology, classification, and diagnostic criteria. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 28, 723–741.

Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495.

McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (2012). Thyrotropin-Blocking Autoantibodies and Thyroid-Stimulating Autoantibodies: Potential Mechanisms Involved in the Pendulum Swinging from Hypothyroidism to Hyperthyroidism or Vice Versa. *Thyroid* 23, 14–24.

McNally, A.K., and Anderson, J.M. (2005). Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp. Mol. Pathol.* 79, 126–135.

Meng, J., Zou, X., Wu, R., Zhong, R., Zhu, D., and Zhang, Y. (2014). Accelerated regeneration of the skeletal muscle in RNF13-knockout mice is mediated by macrophage-secreted IL-4/IL-6. *Protein Cell* 5, 235–247.

Meyer, A., Meyer, N., Schaeffer, M., Gottenberg, J.-E., Geny, B., and Sibia, J. (2015). Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. *Rheumatology* 54, 50–63.

Miller, T., Al-Lozi, M., Lopate, G., and Pestronk, A. (2002). Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73, 420–428.

Mizoguchi, A., and Bhan, A.K. (2006). A Case for Regulatory B Cells. *J. Immunol.* 176, 705–710.

Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1159–R1168.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625–3637.

Musarò, A., and Rosenthal, N. (1999). Maturation of the Myogenic Program Is Induced by Postmitotic Expression of Insulin-Like Growth Factor I. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3115–3124.

Nagaraju, K., Raben, N., Loeffler, L., Parker, T., Rochon, P.J., Lee, E., Danning, C., Wada, R., Thompson, C., Bahtiyar, G., et al. (2000). Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9209–9214.

Nakashima, J., Tachibana, M., Ueno, M., Baba, S., and Tazaki, H. (1995). Tumor Necrosis

Factor and Coagulopathy in Patients with Prostate Cancer. *Cancer Res.* 55, 4881–4885.

Nicholson-Weller, A., and Halperin, J.A. (1993). Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex. *Immunol. Res.* 12, 244–257.

Nitta, T., and Suzuki, H. (2016). Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 1021–1037.

Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., and Saito, T. (2000). Cell Surface Expression of Calnexin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 35751–35758.

Oldenburg, H.S.A., Rogy, M.A., Lazarus, D.D., van Zee, K.J., Keeler, B.P., Chizzonite, R.A., Lowry, S.F., and Moldawer, L.L. (1993). Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur. J. Immunol.* 23, 1889–1894.

Oliff, A., Defeo-Jones, D., Boyer, M., Martinez, D., Kiefer, D., Vuocolo, G., Wolfe, A., and Socher, S.H. (1987). Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* 50, 555–563.

Osaki, Y., Nakagawa, Y., Miyahara, S., Iwasaki, H., Ishii, A., Matsuzaka, T., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Yahagi, N., et al. (2015). Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466, 536–540.

Pavlath, G.K. (2002). Regulation of class I MHC expression in skeletal muscle: deleterious effect of aberrant expression on myogenesis. *J. Neuroimmunol.* 125, 42–50.

Paylor, B., Natarajan, A., Zhang, R.-H., and Rossi, F. (2011). Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.* 96, 139–165.

Pedchenko, V., Vanacore, R., and Hudson, B. (2011). Goodpasture’s disease: molecular architecture of the autoantigen provides clues to etiology and pathogenesis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20, 290–296.

Pedersen, B.K., and Fischer, C.P. (2007). Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 152–156.

Plomp, J.J., and Willison, H.J. (2009). Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 587, 3979–3999.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170–180.

Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707–747.

Redpath, S., Michaelsen, T., Sandlie, I., and Clark, M.R. (1998). Activation of complement by human IgG1 and human IgG3 antibodies against the human leucocyte antigen CD52. *Immunology* 93, 595–600.

Reeves, W.H., Nigam, S.K., and Blobel, G. (1986). Human autoantibodies reactive with the signal-recognition particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9507–9511.

Reid, M.B., and Li, Y.-P. (2001). Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* 2, 269–272.

Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* 172, 91–102.

Roher, N., Samokhvalov, V., Díaz, M., MacKenzie, S., Klip, A., and Planas, J.V. (2008). The Proinflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor- α Increases the Amount of Glucose Transporter-4 at the Surface of Muscle Cells Independently of Changes in Interleukin-6. *Endocrinology* 149, 1880–1889.

Roitelman, J., Olender, E.H., Bar-Nun, S., Dunn, W.A., and Simoni, R.D. (1992). Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-

methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *117*, 959–973.

Römisch, K., Miller, F.W., Dobberstein, B., and High, S. (2006). Human autoantibodies against the 54 kDa protein of the signal recognition particle block function at multiple stages. *Arthritis Res. Ther.* *8*, R39.

Saclier, M., Cuvellier, S., Magnan, M., Mounier, R., and Chazaud, B. (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* *280*, 4118–4130.

Sadeh, M., and Dabby, R. (2008). Steroid-Responsive Myopathy: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy or Polymyositis Without Inflammation?: *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* *9*, 341–344.

Salajegheh, M., Kong, S.W., Pinkus, J.L., Walsh, R.J., Liao, A., Nazareno, R., Amato, A.A., Krastins, B., Morehouse, C., Higgs, B.W., et al. (2010). Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) Conjugates Proteins in Dermatomyositis Muscle with Perifascicular Atrophy. *Ann. Neurol.* *67*, 53–63.

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Wittenberghe, L.V., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3647–3656.

Samuels, J., Ng, Y.-S., Coupillaud, C., Paget, D., and Meffre, E. (2005). Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* *201*, 1659–1667.

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* *117*, 399–412.

Sasi, S.P., Rahimi, L., Yan, X., Silver, M., Qin, G., Losordo, D.W., Kishore, R., and Goukassian, D.A. (2015). Genetic deletion of TNFR2 augments inflammatory response and blunts satellite-cell-mediated recovery response in a hind limb ischemia model. *FASEB J.* *29*, 1208–1219.

Schäfer, B.W., Czerny, T., Bernasconi, M., Genini, M., and Busslinger, M. (1994). Molecular cloning and characterization of a human PAX-7 cDNA expressed in normal and neoplastic myocytes. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4574–4582.

Schultz, E. (1976). Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am. J. Anat.* *147*, 49–70.

Schulze-Osthoff, K., Krammer, P.H., and Dröge, W. (1994). Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J.* *13*, 4587–4596.

Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* *23*, 927–937.

Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A New Look at the Origin, Function, and “Stem-Cell” Status of Muscle Satellite Cells. *Dev. Biol.* *218*, 115–124.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* *102*, 777–786.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* *122*, 787–795.

Sonnet, C., Lafuste, P., Arnold, L., Brigitte, M., Poron, F., Authier, F., Chrétien, F., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2006). Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J. Cell Sci.* *119*, 2497–2507.

Steffen, B.T., Lees, S.J., and Booth, F.W. (2008). Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J. Appl. Physiol.* *105*, 1950–1958.

Strassmann, G., Fong, M., Kenney, J.S., and Jacob, C.O. (1992). Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* *89*, 1681–1684.

Summers-DeLuca, L.E., McCarthy, D.D., Cosovic, B., Ward, L.A., Lo, C.C., Scheu, S., Pfeffer, K., and Gommerman, J.L. (2007). Expression of lymphotoxin-alpha on antigen-specific T cells is required for DC function. *J. Exp. Med.* *204*, 1071–1081.

Supinski, G.S., and Callahan, L.A. (2007). Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J. Appl. Physiol.* *102*, 2056–2063.

Suzuki, S., Nishikawa, A., Kuwana, M., Nishimura, H., Watanabe, Y., Nakahara, J., Hayashi, Y.K., Suzuki, N., and Nishino, I. (2015). Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J. Rare Dis.* *10*.

Targoff, I.N., Johnson, A.E., and Miller, F.W. (1990). Antibody to signal recognition particle in polymyositis. *Arthritis Rheum.* *33*, 1361–1370.

Tayek, J.A. (1996). Effects of tumor necrosis factor alpha on skeletal muscle amino acid metabolism studied in-vivo. *J. Am. Coll. Nutr.* *15*, 164–168.

Tisdale, M.J. (1999). Wasting in Cancer. *J. Nutr.* *129*, 243S – 246S.

Tracey, K.J., Wei, H., Manogue, K.R., Fong, Y., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Kuo, G.C., Beutler, B., Cotran, R.S., and Cerami, A. (1988). Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.* *167*, 1211–1227.

Trapani, L., Segatto, M., La Rosa, P., Fanelli, F., Moreno, S., Marino, M., and Pallottini, V. (2012). 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition impairs muscle regeneration. *J. Cell. Biochem.* *113*, 2057–2063.

Tseng, C.-Y., Wang, J.-S., and Chao, M.-W. (2016). Causation by Diesel Exhaust Particles of Endothelial Dysfunctions in Cytotoxicity, Pro-inflammation, Permeability, and Apoptosis Induced by ROS Generation. *Cardiovasc. Toxicol.*

Tüzün, E., and Christadoss, P. (2013). Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 904–911.

Vandenburgh, H.H., Karlisch, P., Shansky, J., and Feldstein, R. (1991). Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *260*, C475–C484.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenaebelle, P. (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* *187*, 1477–1485.

Vernet-der Garabedian, B., Lacokova, M., Eymard, B., Morel, E., Faltin, M., Zajac, J., Sadvovsky, O., Dommergues, M., Tripon, P., and Bach, J.F. (1994). Association of neonatal myasthenia gravis with antibodies against the fetal acetylcholine receptor. *J. Clin. Invest.* *94*, 555–559.

Verschuuren, J.J.G.M., Huijbers, M.G., Plomp, J.J., Niks, E.H., Molenaar, P.C., Martinez-Martinez, P., Gomez, A.M., De Baets, M.H., and Losen, M. (2013). Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun. Rev.* *12*, 918–923.

Vreugdenhil, G., Löwenberg, B., Van Eijk, H.G., and Swaak, A.J. (1992). Tumor necrosis factor alpha is associated with disease activity and the degree of anemia in patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Invest.* *22*, 488–493.

Wallukat, G., and Schimke, I. (2014). Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Semin. Immunopathol.* *36*, 351–363.

Walter, P., and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7112–7116.

Walter, P., and Blobel, G. (1983). Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* *34*, 525–533.

Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic

reticulum. *Cell* 38, 5–8.

- Wang, Y.X., Bentzinger, C.F., and Rudnicki, M.A. (2013). Molecular regulation of determination in asymmetrically dividing muscle stem cells. *Cell Cycle* 12, 3–4.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.
- Watanabe, Y., Uruha, A., Suzuki, S., Nakahara, J., Hamanaka, K., Takayama, K., Suzuki, N., and Nishino, I. (2016). Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*.
- Weigert, C., Düfer, M., Simon, P., Debre, E., Runge, H., Brodbeck, K., Häring, H.U., and Schleicher, E.D. (2007). Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 293, C1139–C1147.
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241–1244.
- Werner, J.L., Christopher-Stine, L., Ghazarian, S.R., Pak, K.S., Kus, J.E., Daya, N.R., Lloyd, T.E., and Mammen, A.L. (2012). Antibody Levels Correlate with Creatine Kinase Levels and Strength in Anti-HMG-CoA Reductase-Associated Autoimmune Myopathy. *Arthritis Rheum.* 64, 4087–4093.
- Westwood, F.R., Bigley, A., Randall, K., Marsden, A.M., and Scott, R.C. (2005). Statin-Induced Muscle Necrosis in the Rat: Distribution, Development, and Fibre Selectivity. *Toxicol. Pathol.* 33, 246–257.
- Williams, A., Wang, J.J., Wang, L., Sun, X., Fischer, J.E., and Hasselgren, P.-O. (1998). Sepsis in mice stimulates muscle proteolysis in the absence of IL-6. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, R1983–R1991.
- Witebsky, E. (1957). An immunologist's vade mecum. *N. Y. State J. Med.* 57, 3615–3622.
- Yanase, K., and Madaio, M.P. (2005). Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. *J. Autoimmun.* 24, 145–151.
- Yang, M., Rui, K., Wang, S., and Lu, L. (2013). Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 122–132.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201, 703–711.
- Zammit, P., and Beauchamp, J. (2001). The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differ. Res. Biol. Divers.* 68, 193–204.
- Zerrahn, J., Held, W., and Raulet, D.H. (1997). The MHC Reactivity of the T Cell Repertoire Prior to Positive and Negative Selection. *Cell* 88, 627–636.
- Zhang, J., Jacobi, A.M., Wang, T., Berlin, R., Volpe, B.T., and Diamond, B. (2009). Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *J. Autoimmun.* 33, 270–274.
- Zhang, Y., Pilon, G., Marette, A., and Baracos, V.E. (2000). Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 279, E196–E205.
- Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metab.* 6, 472–483.
- Zhou, J., Liu, B., Liang, C., Li, Y., and Song, Y.-H. (2016). Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 335–347.

Anti-SRP (signal recognition particle) and anti-HMGCR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase) auto-antibody effects on skeletal muscle

Immune mediated necrotizing myopathy (IMNM) is recognized as a separate entity among inflammatory myopathies. IMNM is a severe disabling muscle disease requiring prolonged combination of corticosteroid and immunosuppressive drugs. IMNM is morphologically defined by predominant muscle fiber necrosis and no or little inflammation, and is associated with important variation of the size of the fiber. However pathogenic mechanisms involved in muscle necrosis and muscle atrophy are largely unknown. IMNM may be associated with either anti-SRP or anti-HMGCR auto-antibodies (aAbs). The titer of these aAbs, targeting ubiquitous cytoplasmic proteins, is correlated with the disease activity suggesting their pathogenic role.

In this thesis, we described the morphology of skeletal muscle alterations occurring in both conditions of anti-SRP⁺ or anti-HMGCR⁺ patients, studied the role of the Abs in (i) the necrosis mechanisms and the associated inflammation; (ii) by analyzing the atrophy and the regeneration mechanisms.

Muscle histological analysis of anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients showed a random distribution of necrotic fibers that was more pronounced in anti-SRP⁺ patients. Creatine Phosphokinase levels; myolysis indicator, and muscle regeneration were correlated with the proportion of necrotic fibers. Inflammation was regularly observed in IMNM muscle patients. Macrophages were the most abundant but T cells densities were in a quarter of cases in the same range as myositis controls. CD68⁺iNOS⁺ macrophages and a Th-1 immune environment were also observed and involved in ongoing myophagocytosis. Of note, macrophages with alternative activation were also detected. Humoral immunity with activation of the classical pathway of the complement cascade was observed in IMNM. Positive membrane staining for SRP and HMGCR proteins, on some muscle fibers, was detected both *in vitro* and in muscle biopsies of IMNM patients. An important proportion of small fibers corresponding to both atrophic and regenerating fibers was observed in anti-SRP⁺ and anti-HMGCR⁺ patients. *In vitro*, anti-SRP and anti-HMGCR aAbs induced muscle fibers atrophy and increased the transcription of *MAFbx* and *Trim63*. In addition, the muscle fiber atrophy was associated with high level of inflammatory cytokines such TNF, IL-6 and ROS. Muscle regeneration *in vitro* was also affected by impairing the myoblasts fusion in presence of anti-SRP and anti-HMGCR Abs. This default was associated with a decrease production of anti-inflammatory cytokines: IL-4 and IL-13. Of note, the addition of IL-4 and/or IL-13 totally rescued the fusion.

Together those data suggest that these aAbs have a pathogenic effect on muscle. Anti-SRP and anti-HMGCR are involved in muscle atrophy and affect the regeneration. The role of these aAbs in muscle damages occurring in IMNM was highlighted and emphasizes the potential interest of targeted therapies.

Key words. anti-SRP antibodies, anti-HMGCR antibodies, cytokines, myoblasts, muscle atrophy, muscle regeneration, myositis, necrotizing auto-immune myopathy.

Résumé

Les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) appartiennent au groupe des myopathies inflammatoires idiopathiques. Les MNAI sont des maladies musculaires sévères pouvant conduire à un déficit musculaire définitif et handicapant. Pour rétablir une force normale et prévenir le handicap, des traitements prolongés associant corticothérapie et immunosuppresseurs sont nécessaires. Les MNAI sont définies histologiquement par la prédominance de fibres musculaires en nécrose qui contraste avec l'absence ou la faible abondance d'inflammation musculaire. Les mécanismes impliqués dans la nécrose comme ceux impliqués dans les séquelles atrophiques sont en revanche inconnus. Les MNAI peuvent être associées à des auto-anticorps (aAc) soit anti-SRP, soit anti-HMGCR. Ces aAc ciblent des protéines cytoplasmiques ubiquitaires. Leurs titres sont corrélés avec l'activité de la maladie, suggérant ainsi le rôle pathogène de ces aAc.

Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que les aAc pouvaient être impliqués dans les lésions musculaires observées aux cours des MNAI anti-SRP⁺ et anti-HMGCR⁺. Durant cette étude, nous avons eu pour objectifs : (i) de caractériser et de quantifier la nécrose musculaire et l'inflammation associée, ainsi que les mécanismes physiopathologiques impliqués (rôle des aAc) ; (ii) d'analyser la régénération et l'atrophie musculaire et l'effet des aAc sur ces phénomènes.

L'analyse histologique des biopsies musculaires des patients MNAI a montré que la proportion des fibres musculaires en nécrose était plus importante chez les patients anti-SRP⁺. Les taux sériques de *créatine phosphokinase* étaient corrélés avec la proportion de fibres nécrotiques, montrant ainsi que ce taux est un bon marqueur de l'activité de la maladie. De façon inattendue, une inflammation musculaire était régulièrement observée. En particulier, la densité lymphocytaire T était dans un quart des cas comparable à celle des autres myopathies inflammatoires. Cette densité cellulaire était de plus corrélée au pourcentage de fibres en nécrose. L'infiltrat inflammatoire était néanmoins composé principalement de macrophages. Des macrophages CD68⁺ iNOS⁺, impliqués dans des phénomènes de myophagocytoses dans un environnement Th-1 étaient régulièrement observés. Des macrophages avec un phénotype suggérant une activation alternative par l'immunité humorale ont aussi été observés. Dans ce sens, la présence de dépôts de complexe d'attaque membranaire à la surface des fibres musculaires, mais aussi des dépôts de C1q et d'IgG montraient l'activation de la voie classique du complément au cours des MNAI. De plus, la détection des protéines SRP et HMGCR sur certaines fibres musculaires immatures (*in vitro* et *in vivo*) suggérait le rôle pathogène des aAc. Concernant les mécanismes de régénération et les phénomènes d'atrophie musculaire, l'analyse des biopsies musculaires a révélé l'importance de l'irrégularité du diamètre des fibres avec une prédominance de petites fibres. Ces petites fibres correspondaient à la fois à des fibres en régénération et à des fibres en nécrose. *In vitro*, les Ac anti-SRP et anti-HMGCR induisent une atrophie musculaire en augmentant la transcription de MAFbx et Trim63. En outre, l'atrophie des fibres musculaires a été associée à un niveau élevé de cytokines inflammatoires comme TNF, IL-6 et ROS. Concernant l'étude de la régénération musculaire, *in vitro*, la présence des aAc réduisait la fusion des myoblastes. Ce défaut était associé à une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13. L'ajout d'IL-4 et/ou d'IL-13 permettait de corriger la fusion des myoblastes.

Dans ce travail, les données recueillies convergent pour suggérer le rôle pathogène des aAc anti-SRP et anti-HMGCR dans les lésions musculaires nécrotiques mais aussi dans la régénération musculaire et l'atrophie. Ces données nouvelles soulignent l'importance de traitements ciblés au cours des MNAI.

Mots clés : anticorps anti-SRP, anticorps anti-HMGCR, cytokines, myoblastes, atrophie musculaire, régénération musculaire, myosites et myopathie nécrosante auto-immune.