HAL
open science

Caractérisation des réponses immunitaires chez les patients atteints de myopathies auto-immunes idiopathiques

Gaëlle Dzangué Tchoupou

To cite this version:

Gaëlle Dzangué Tchoupou. Caractérisation des réponses immunitaires chez les patients atteints de myopathies auto-immunes idiopathiques. Immunologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS171 . tel-02457144

HAL Id: tel-02457144

https://theses.hal.science/tel-02457144v1

Submitted on 27 Jan 2020

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.

DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité : Immunologie

École doctorale Complexité du vivant ED515

Centre de recherche en myologie/ Équipe 08 : Muscle inflammatoire et thérapies innovantes ciblées

CARACTÉRISATION DES RÉPONSES IMMUNITAIRES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MYOPATHIES AUTO-IMMUNES IDIOPATHIQUES

Thèse présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2018

par

Gaëlle DZANGUÉ TCHOUPOU

M. Olivier BENVENISTE	Professeur	Directeur de thèse
Mme. Gisèle BONNE	Directeur de recherche	Présidente
Mme. Sophie CANDON	Professeur	Rapporteur
M. Antonio COSMA	Docteur, PhD	Rapporteur
Mme. Sophie GEORGIN-LAVIALLE	Docteur, MD	Examinateur
M. Alain MEYER	Docteur, MD	Examinateur

To my lovely Dad,

May your soul rest in perfect peace; your memory will never be forgotten.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Olivier Benveniste de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de son équipe. Merci pour son encadrement, sa confiance, sa disponibilité et son soutien.

Je remercie particulièrement le Professeur Olivier Boyer pour sa confiance et ses conseils.

Je remercie le Dr. Gisèle Bonne d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie le Professeur Sophie Candon et le Docteur Antonio Cosma d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de doctorat.

Je remercie également le Docteur Sophie Georgin-Lavialle et le Docteur Alain Meyer d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Merci au Docteur Yves Allenbach pour ses brillantes idées qui ont permis d'enrichir les discussions scientifiques autour de mes travaux de thèse.

Un grand merci au Docteur Catherine Blanc pour son soutien lors de mes expériences en cytométrie de masse et même en dehors.

Je tiens aussi à remercier particulièrement le Docteur Antonio Cosma, Aurélien et Emilie pour leurs conseils et leurs expertises techniques et analytiques qui m'ont été précieux.

Merci à mes équipiers Kuberaka, Damien, Leandro, Akinori, Wladimir, Nadège, Céline, Loïs et Paul pour leur soutien. Merci à Priscilla, Mathilde et à tous le personnel du laboratoire avec qui j'ai passé de bons moments.

Ce travail de thèse a été possible grâce au soutien permanent de ma famille et mes amis. Merci pour tout Es. Lio, thanks for your support. Merci à Patrice et Andrée pour vos corrections. Merci à tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu de loin, maman Clarisse, maman Régine, papa, Ingrid, Randolph, Nicaise et Christian. Merci aussi à mes amis qui ont toujours été disponibles.

Je fini par remercier particulièrement les amours de ma vie pour leur présence et soutien inconditionnelle. Drissa, tu n'as toujours été que de l'énergie positive pour moi. Merci pour ton soutien, ta présence et ta bonne humeur. Fakoly Tchoupou, merci pour tes sourires, tes paroles adorables et ta super bonne ambiance.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION 10
CHAPITRE I : LE SYSTÈME IMMUNITAIRE 11
1. Le soi et le non soi 11
2. La présentation antigénique 11
3. Les mécanismes de tolérance 13
4. La réponse immunitaire non-spécifique 16
5. La réponse immunitaire spécifique 18
6. Les lymphocytes T CD4+ 21
7. Les lymphocytes T CD8+ 24
8. La mémoire immunologique et la sénescence des lymphocytes T 27
9. Les lymphocytes B 30
10. L'auto immunité 32
CHAPITRE II : LE MUSCLE SQUELETTIQUE 35
1. Le muscle squelettique 35
2. La régénération musculaire 35
CHAPITRE III : LES MYOSITES 37
1. Définition 37
2. Classification des myosites 37
3. La myosite à inclusions (MI) 41
4. Le syndrome des anti-synthétases (SAS) 47
5. Les MNAI : les myopathies anti-SRP 50
6. Les MNAI : les myopathies anti-HMGCR 53
CHAPITRE IV : LA CYTOMÉTRIE DE MASSE 55
1. Historique 55
2. Fonctionnement du cytomètre de masse 55
3. Approches analytiques utilisées en cytométrie de masse 57
PROBLÉMATIQUE 68
RÉSULTATS 69
Introduction article 1 70
Introduction Article 2 100
Introduction Article 3 135
DISCUSSION/PERSPECTIVES 146
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 153

Figure 1 : Origine hématopoïétique des différentes cellules mononucléées du sang périphérique

Figure 2 : Présentation antigénique par les molécules du CMH

Figure 3 : La tolérance centrale T

Figure 4 : Mécanismes de tolérance lymphocytaires B en cas de BCR auto réactifs

Figure 5 : Activation des lymphocytes T

Figure 6 : Activation et fonctions des lymphocytes T CD4+

Figure 7 : Mode de sécrétion et d'action de la perforine

Figure 8 : Mode de sécrétion et d'action de la granzyme B

Figure 9 : Différenciation des lymphocytes CD8+

Figure 10 : Étapes de maturation des lymphocytes B

Figure 11 : Les étapes majeures d'une MAI

Figure 12 : Structure du muscle squelettique

Figure 13 : Processus de la régénération musculaire

Figure 14 : Classification des myosites selon les critères cliniques, pathologiques et sérologiques

Figure 15 : Caractéristiques cliniques et pathologiques de la MIs

Figure 16 : Surexpression des molécules du CMH de type I chez les patients atteints de MIs

Figure 17 : Caractéristiques pathologiques des myopathies anti-SRP et anti-HMGCR

Figure 18 : Déroulement d'une expérience en utilisant la cytométrie de masse avec *barcoding*

Figure 19 : Exemple d'un arbre SPADE

Figure 20 : Réduction de dimension par tSNE

Figure 21 : Visualisation des données par viSNE

Figure 22 : Interprétation des résultats obtenus par Citrus

Figure 23 : Construction d'un arbre décisionnel par la CART

Figure 24 : Représentation des outils d'analyses supervisés

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Évaluation des critères diagnostiques des PM et DM par Bohan et Peter

Tableau 2 : Critères de diagnostic des myosites du 119ème congrès de l'ENMC (hors MI)

ACP : Analyse par Composante Principale
AICD : Activation Induced Cell Death
AIRE : Auto-Immune REgulator
ASM : Anticorps Spécifiques des Myosites
BCR : B Cell Receptor
CART : Classification And Regression Trees
CD40L : CD40-Ligand
CD62L : CD62 ligand
CK : Creatinine Kinase
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CN1A : Cytosolic 5' NucleotidAse
COMT : Centres d'Organisations de MicroTubules
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRTH2 : Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein-4
CyTOF : cytometry by time of flight
D_B : Densité de Bruit de fond
D_C : Densité Cible
DISC: Death Inducing Signaling Complex
D_L : Densité Locale
DM : DermatoMyosites
ENMC : European NeuroMuscular Congress
eomes : eomesodermin
FADD : Fas Associated Death Domain
Foxp3 : Forkhead box P3
GM-CSF : Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HAQ : Health Assessment Questionnaire
HLA : Human Leukocyte Antigen
HMGCR : HydroxyMéthylGlutaryl-CoA Réductase
IFNγ : Interféron-gamma
Ig : Immunogloblines
IL : Interleukine
Il-2R : le récepteur à IL-2
IPEX : Immune dysregulation Polyadenopathy Enteropathy x-linked syndrom
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LGL : Large Granular Lymphocytes
LTC : Lymphocytes T CD8+ Cytotoxiques
MAI : Maladie Auto-Immune
MDA5 : Melanoma Differentiaton-Associated protein 5
MI : Myosite à Inclusions
MNAI : Myopathies Nécrosantes Auto-Immunes
NAD : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide
NK : Natural Killer cells

ABREVIATIONS

NKT : Natural Killer T cells
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PD1 : Programmed cell Death 1
PM : PolyMyosites
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRR : Pathogen Recognition Receptors
pTreg : T régulateurs périphériques
RI : Réponse Immunitaire
RORγT: RAR-related Orphan nuclear Receptor gamma T
SAS : Syndrome des Anti-Synthétases
SI : Système Immunitaire
SPADE : Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events
SRP : Signal Recognition Particle
TAP : Tranporter Associated antigen Processing
tARN synthétatses : Aminoacyl ARN synthétase de transfert
T_{CM} : T Centrales Mémoires
TCR : T Cell Receptor
T_{EM} : T Effecteurs Mémoires
Tfh : T folliculaires helpers
TGF-β : Tumor Growth Factor-beta
Th : T helper
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha
TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg: T régulateurs
T_{SCM} : T Stem Cell Memory
t-SNE : t-distributed Stochastic Neighbor Embedding
T_{TEMRA} : T Effecteurs mémoires ré-exprimant CD45RA
T_{TM} : T Transitionnels Mémoires
tTreg : T régulateurs thymiques
viSNE : visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding

Les myosites sont des maladies auto-immunes rares aux caractéristiques phénotypiques et pathologiques variables. Les patients atteints de myosites présentent en plus d'une atteinte musculaire, diverses atteintes extra-musculaires de sévérité variable telles que des atteintes cutanées, cardiaques et pulmonaires. Le regroupement des patients atteints de myosites en différents sous-groupes homogènes permet de mieux étudier, caractériser et traiter chaque sous-groupe. A présent, les taux de rechutes restent élevés au sein des différents sous-groupes de patients. De plus, dans certains cas, aucun traitement n'est efficace sur le long terme. Par ailleurs, les mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de ces maladies sont mal connus.

Le but de ce travail était de caractériser les réponses immunitaires au sein de différents sous-groupes homogènes de patients atteints de myosites. Une meilleure description et compréhension des acteurs de la réponse immunitaire chez les patients peut aider à l'identification de biomarqueurs, de nouvelles cibles thérapeutiques et à l'affinement de l'homogénéité des sous-groupes de patients. Pour cela, nous nous sommes servis de la cytométrie de masse pour caractériser simultanément différents marqueurs phénotypiques et d'activation des cellules du sang périphérique des patients atteints de myosites. Les résultats obtenus ont été comparés aux sujets sains et/ou entre différents sous-groupes de patients atteints de myosites.

Dans ce manuscrit, je vais tout d'abord introduire les mécanismes de réponses immunitaires, les myosites et la cytométrie de masse. Ensuite, je vais présenter les résultats sous forme d'articles et finir par une discussion générale.

INTRODUCTION

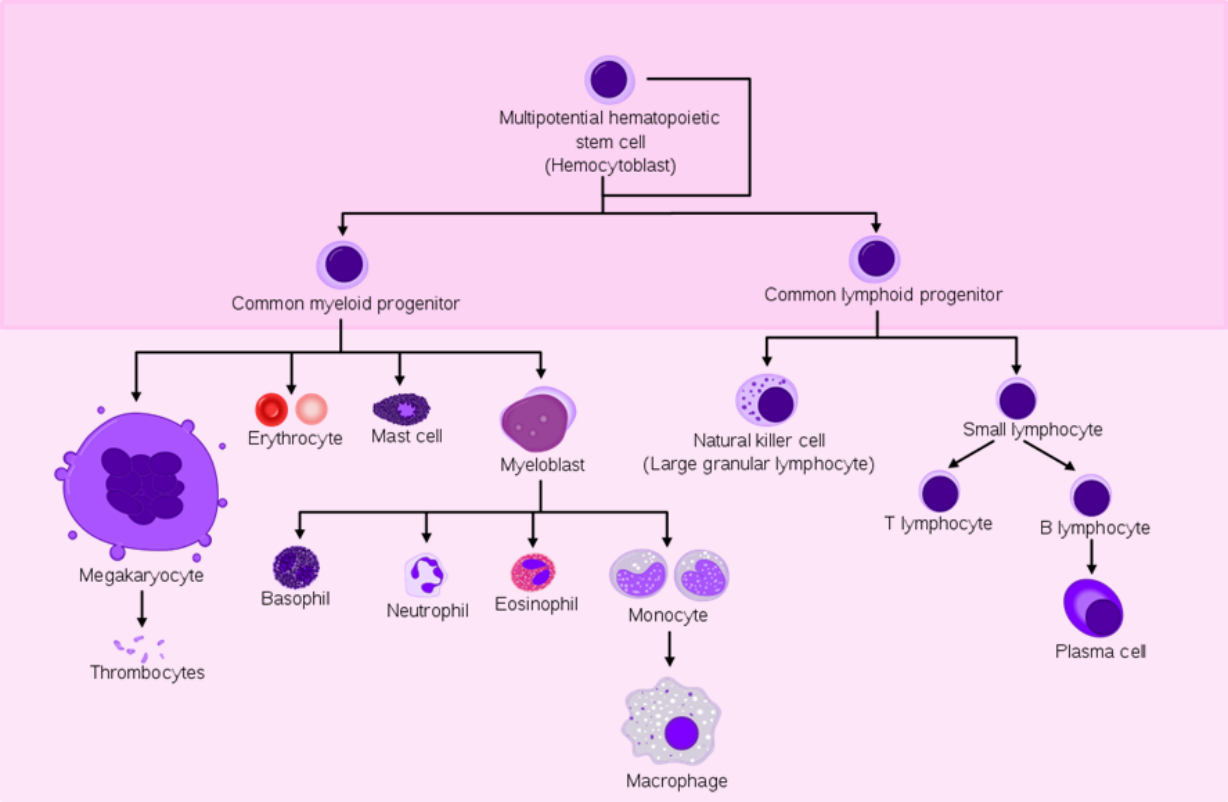


Figure 1 : Origine hématopoïétique des différentes cellules mononucléées du sang périphérique. Adaptée de (Juzenas et al., 2017).

Les cellules impliquées au cours de la RI dérivent d'un progéniteur commun : la cellule souche hématopoïétique. Le progéniteur lymphoïde commun va donner les lymphocytes T, B et NK. Par ailleurs, les monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques proviennent du progéniteur myéloïde commun.

CHAPITRE I : LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

1. Le soi et le non soi

Le système immunitaire (SI) est un ensemble de mécanismes qui regroupe plusieurs processus permettant à un organisme de se protéger. Ces mécanismes sont mis en place au cours de la réponse immunitaire (RI). Chez l'Homme, les cellules impliquées au cours de la RI dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH donnent deux lignées cellulaires précurseurs de cellules effectrices de la RI : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Tandis que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques sont issus de la lignée myéloïde ; les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules *Natural Killer* (NK) sont issus de la lignée lymphoïde (**Figure 1**). On distingue deux compartiments du système immunitaire : le compartiment central qui comprend la moelle osseuse et le thymus, puis le compartiment périphérique qui comprend des organes tels que la rate, les ganglions et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

Le processus de développement des cellules effectrices de la RI s'appelle l'ontogénèse. Il débute dans la moelle osseuse et s'étend jusqu'aux organes effecteurs. Au cours de l'ontogénèse, les cellules impliquées lors de la RI sont éduquées afin de permettre la distinction entre le « soi » (ensemble des molécules propres à l'organisme) et le « non soi » (molécules de provenance externe à l'organisme).

2. La présentation antigénique

L'éducation des lymphocytes nécessite la présentation de l'ensemble des molécules du soi aux lymphocytes durant leur ontogénèse, afin de déterminer l'affinité des récepteurs lymphocytaires avec les molécules du soi. Le but est d'éliminer les lymphocytes qui reconnaissent le soi avec une très forte affinité et ceux qui ne reconnaissent pas du tout le soi. Les récepteurs lymphocytaires ne sont pas capables de détecter les molécules à l'intérieur des cellules, pour cela, un système de présentation antigénique est nécessaire afin d'extérioriser les molécules pour les présenter aux lymphocytes (Riedhammer and Weissert, 2015). Chez la majorité des vertébrés, ce rôle de présentation antigénique est assuré par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

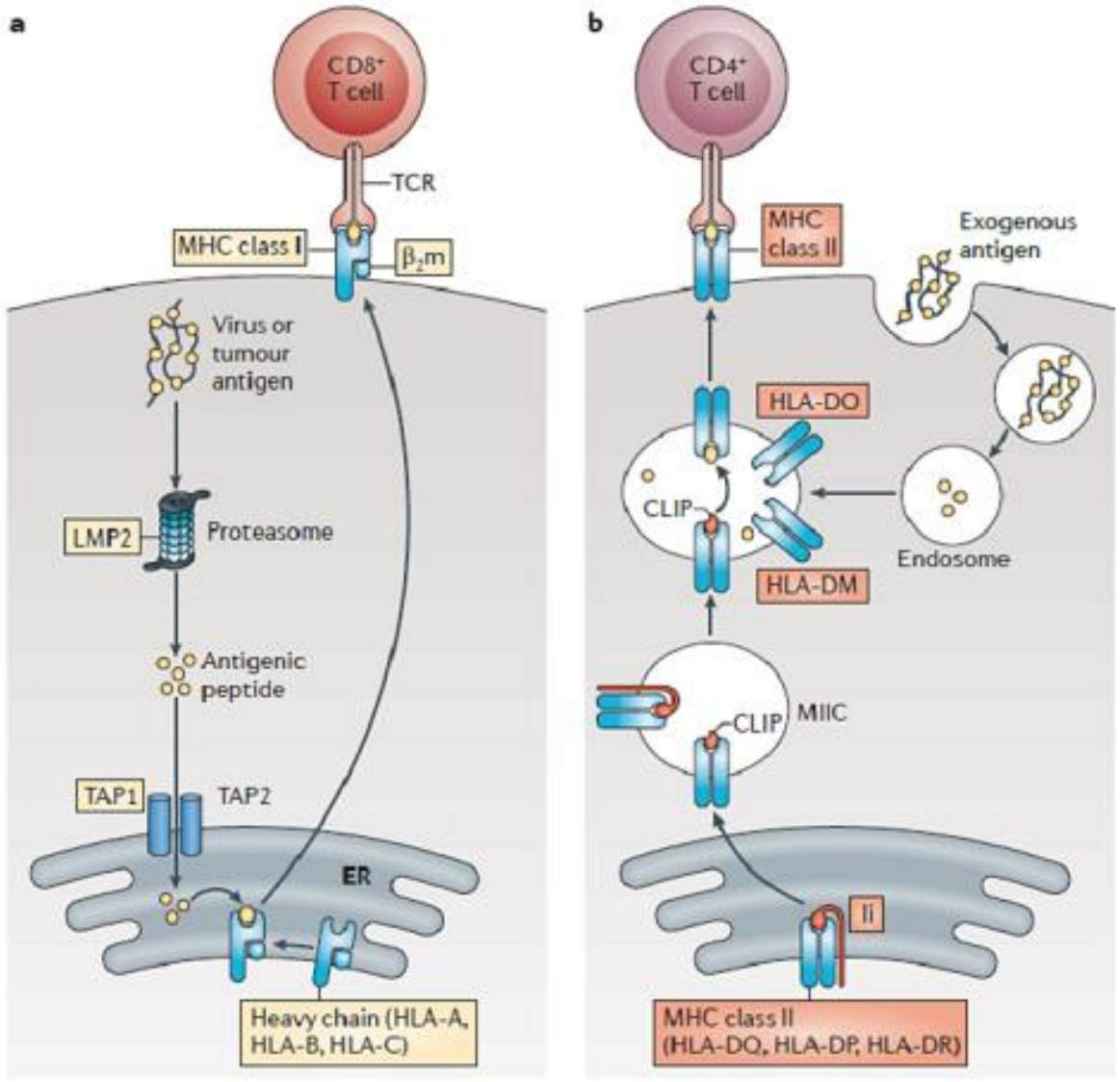


Figure 2 : Présentation antigénique par les molécules du CMH (Kobayashi and Van, 2012).

a) Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent les peptides présentés par le CMH de type I (HLA-A, HLA-B et HLA-C). Les protéines intracellulaires sont dégradées par le protéasome, transportées dans le réticulum endoplasmique où elles sont chargées sur les molécules de CMH et présentées à la surface. **b)** Les lymphocytes T CD4+ reconnaissent les peptides présentés par le CMH de type II (HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DR). Les protéines extracellulaires sont dégradées par les endosomes, chargées sur les molécules de CMH et présentées à la surface des CPA.

Chez l'Homme, les molécules du CMH sont aussi connues sous le nom de HLA (*Human Leucocyte Antigen*) (Rock et al., 2016). Ces derniers sont polymorphiques et permettent de présenter des peptides issus d'antigènes protéiques aux lymphocytes T. Il existe deux classes : le CMH de type I (HLA de type I) et le CMH de type II (HLA de type II).

a. Le CMH de type I

Le HLA de type I a 3 loci : HLA-A, HLA-B et HLA-C. L'expression du CMH de type I est ubiquitaire, néanmoins c'est son expression sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui permet la présentation des protéines du contenu intracellulaire aux lymphocytes T CD8+. Ceci se fait en exploitant le système de dégradation protéique des cellules par le protéasome (Neefjes et al., 2011). En effet, les protéines cytosoliques de chaque cellule sont régulièrement dégradées en fragments peptidiques par le protéasome, qui sont ensuite dégradés davantage par des peptidases cytosoliques. Certains de ces fragments peptidiques échappent à la destruction et se retrouvent dans le réticulum endoplasmique, où ils sont pris en charge par des transporteurs *Transporter associated Antigen Processing* (TAP) et chargés sur le CMH de type I. Ainsi le contenu des cellules normales ou infectées est présenté aux lymphocytes T CD8+ (**Figure 2**).

b. Le CMH de type II

Les 3 loci du CMH de type II sont : HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. L'expression du CMH de type II est limitée spécifiquement aux CPA telles que les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les macrophages et les monocytes. Le CMH de type II est fabriqué par le réticulum endoplasmique et permet de présenter les antigènes extracellulaires aux lymphocytes T CD4+ naïfs, favorisant ainsi leur activation en lymphocytes T CD4+ effecteurs (Neefjes et al., 2011)(**Figure 2**).

c. Le CD1d

Les molécules du CD1d sont des molécules présentatrices d'antigènes présentes à la surface des CPA. Elles permettent aussi la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Contrairement aux molécules du CMH (de type I et II), les molécules du CD1d sont peu polymorphiques et présentent des antigènes lipidiques à des lymphocytes T spécifiques appelés Natural Killer (NKT) (Girardi et al., 2011).

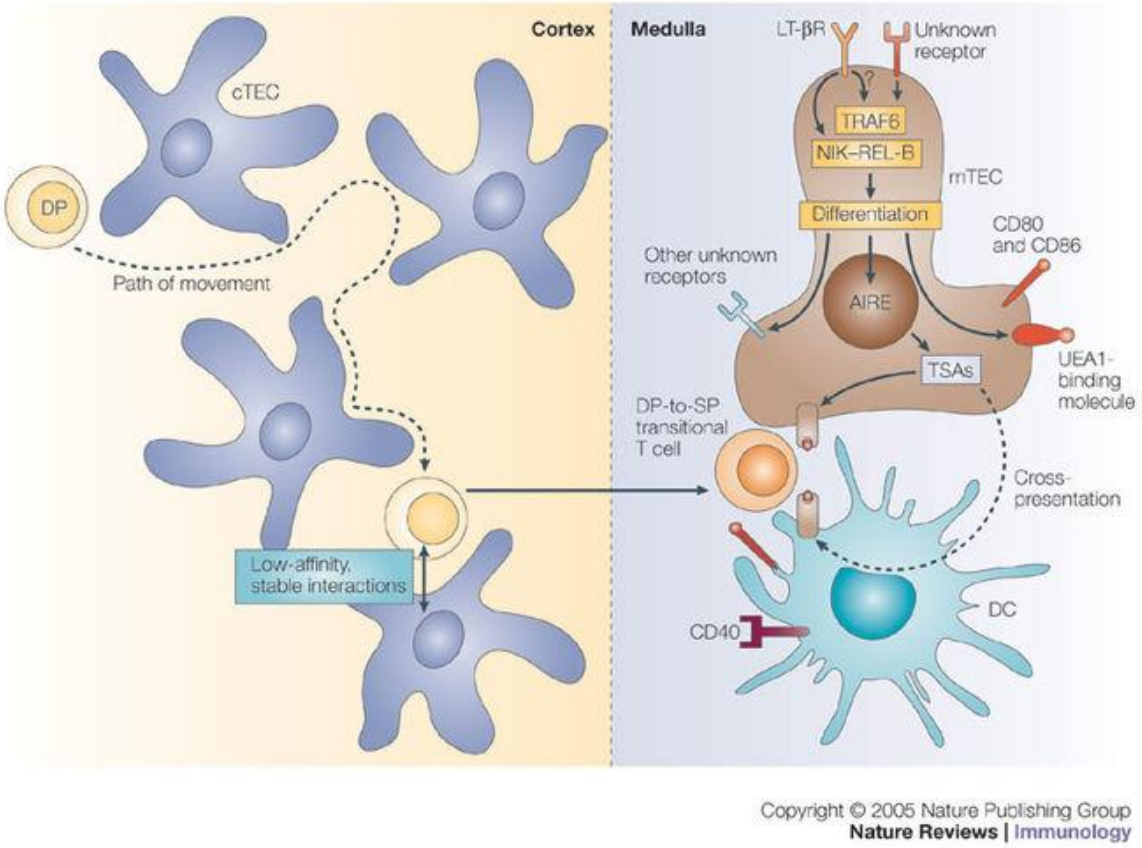


Figure 3 : La tolérance centrale T (Hogquist et al., 2005).

La tolérance centrale T permet de limiter la survenue de lymphocytes T auto-immuns. Elle a lieu dans le cortex et la médulla thymique. Dans le cortex thymique, la sélection positive permet de sélectionner les thymocytes capables de reconnaitre le complexe CMH/peptide et va engendrer des thymocytes simples positifs (CD4+ ou CD8+). Dans la médulla thymique, l'expression du facteur de transcription *auto-immune regulator* (AIRE) contrôle l'expression de milliers d'antigènes tissus spécifiques. Ainsi, les cellules dendritiques et les cellules de la médulla thymiques vont agir comme des CPA et présenter différents antigènes aux lymphocytes T. Les lymphocytes T qui vont reconnaitre le soi avec une forte affinité seront détruits (sélection négative).

3. Les mécanismes de tolérance

La tolérance immunitaire permet au SI de ne pas monter une RI vis-à-vis du soi et des protéines non pathogènes avec lesquelles il a déjà été en contact. Deux mécanismes de tolérance immunitaires sont décrits : la tolérance centrale et la tolérance périphérique (Hogquist et al., 2005). Tandis que la tolérance centrale a lieu au sein des organes lymphoïdes primaires, la tolérance périphérique se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires.

a. La tolérance lymphocytaire T

i. La tolérance centrale

Au cours de l'ontogénèse des lymphocytes T dans le thymus, ces derniers acquièrent l'expression de récepteurs antigéniques appelés TCR (*T Cell Receptor*). L'expression du CD3 par les lymphocytes T permet, en association avec le TCR, la transduction des signaux intra-cytoplasmiques. Le réarrangement des acides désoxyribonucléiques des TCR dans le thymus génère différents TCR avec une grande variabilité de reconnaissance antigénique. La survenue de TCR auto-réactifs étant possible, des mécanismes de sélection sont mis en place afin d'éviter les réponses auto-immunes. Deux étapes successives de sélection ont lieu dans le thymus (**Figure 3**) :

- **La sélection positive :** Dans le cortex thymique, les lymphocytes T immatures se différencient en lymphocytes qui expriment le CD4 et le CD8. Par la suite, les cellules du cortex épithélial thymique vont se comporter en CPA et présenter les peptides du soi par le CMH aux TCR des lymphocytes T. Les lymphocytes capables de reconnaitre le complexe « peptides du soi/CMH » avec une faible affinité vont recevoir des signaux de survie. La reconnaissance du CMH I va engendrer des lymphocytes T CD8+ simples positifs, tandis que celle du CMH II va générer des lymphocytes T CD4+ simples positifs. Les lymphocytes T CD4+ ou T CD8+ caractérisent deux sous populations fonctionnellement distinctes et donc restreintes au CMH. En effet, les lymphocytes incapables de reconnaitre le CMH vont mourir par apoptose (mort programmée) (Xing and Hogquist, 2012).
- **La sélection négative :** Elle a lieu dans la zone médullaire thymique et a pour objectif d'éliminer les lymphocytes T qui portent un TCR auto-réactif. Cette sélection est possible grâce à l'expression des antigènes tissu-spécifiques dans la médulla.

Les lymphocytes T ayant survécu à la sélection positive dans le cortex vont exprimer le récepteur aux chimiokines CCR7 qui va leur permettre de migrer vers la zone médullaire. La zone médullaire thymique exprime fortement les ligands du CCR7 tels que CCL19 et CCL21. Une fois dans la médulla, les antigènes du soi seront présentés par le CMH aux lymphocytes. Le rôle de CPA au cours de la sélection négative est assuré par les cellules de la médulla épithéliale thymique et par les cellules dendritiques. Les clones de lymphocytes T qui vont reconnaitre les peptides du soi avec une très forte affinité seront détruits (délétion clonale) (Takaba and Takayanagi, 2017).

ii. La tolérance périphérique

- **Les lymphocytes T régulateurs :** La sélection négative ne permet pas l'élimination de l'ensemble des lymphocytes T auto-réactifs. Parmi les lymphocytes T ayant échappé à la délétion clonale, certains deviennent des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui ont pour rôle de maintenir une homéostasie immunitaire en périphérie. L'expression du facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) est caractéristique des lymphocytes Treg. En plus de Foxp3, les lymphocytes Treg expriment fortement la chaine alpha du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2), le CD25 et expriment faiblement le récepteur à l'IL-7 (CD127). Il existe deux types de Treg : les Treg issus du thymus (tTreg) et les Treg induits en périphérie (pTreg). Les tTreg exercent une action inhibitrice directe sur les lymphocytes T auto-réactifs en périphérie. Par ailleurs, les pTreg sont générés le plus souvent au cours des états inflammatoires et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires pour revenir à un état d'homéostasie immunitaire (Xing and Hogquist, 2012).
- **L'anergie :** La tolérance périphérique peut aussi être induite par le mécanisme d'anergie clonale. L'anergie décrit un état d'inactivation fonctionnelle d'un lymphocyte suite à son activation en l'absence de signaux de co-stimulation délivrés par les CPA. La co-stimulation peut être médiée par exemple par la liaison de CD80 et CD86 (B7-1 et B7-2) exprimés les CPA avec le CD28 exprimé par les lymphocytes T (Mondino and Mueller, 2007).
- **L'ignorance :** Un autre mécanisme de tolérance immunitaire est l'ignorance. Ce mode de tolérance est le plus souvent dû à l'absence d'expression de certaines protéines dans la zone médullaire thymique. Ceci peut être le cas des antigènes qui sont localisés dans des sites peu accessibles au SI et spécifiques comme le cerveau et l'œil (Miller and Heath, 1993).

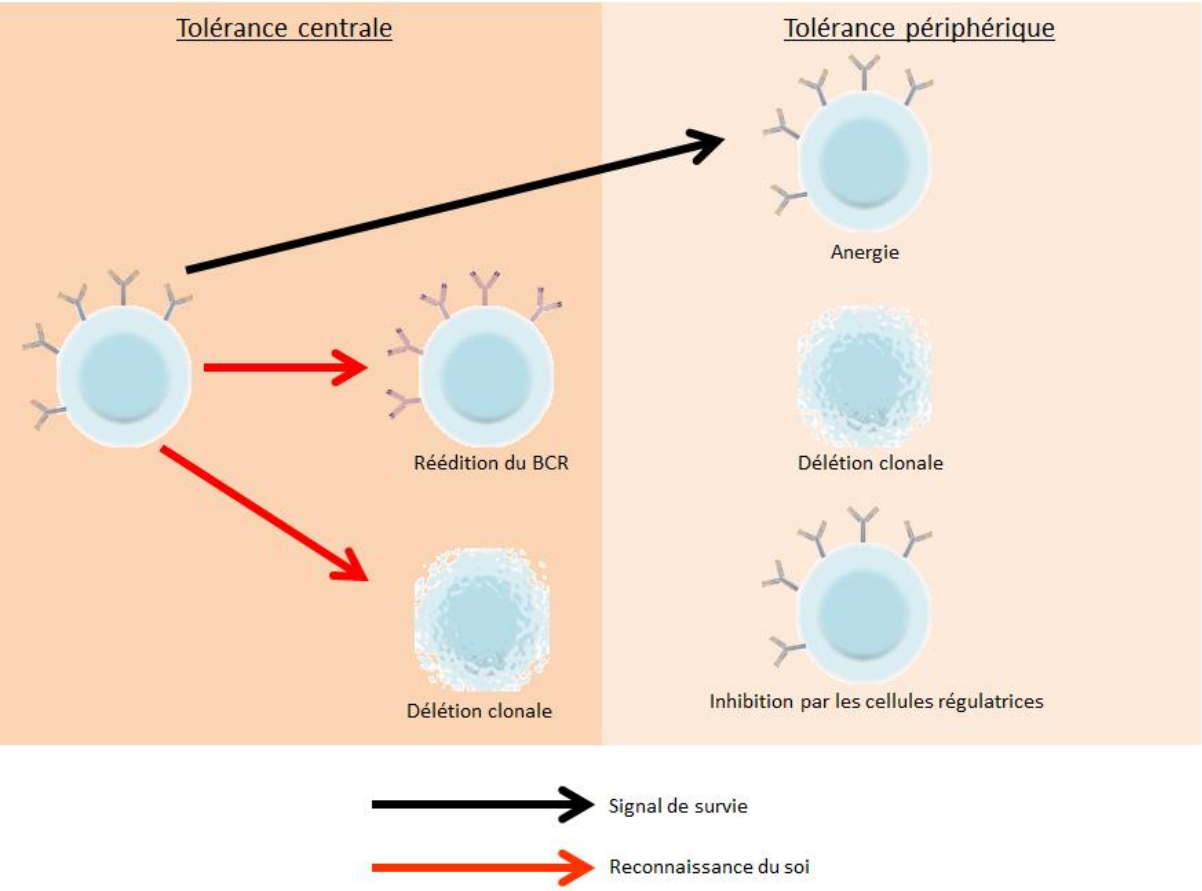


Figure 4 : Mécanismes de tolérance lymphocytaires B en cas de BCR auto-réactifs.

La tolérance centrale lymphocytaire B permet la mort ou la réédition du BCR des clones lymphocytaires portant un BCR auto-réactif. Une fois en périphérie, différents mécanismes permettent de contrôler les lymphocytes B auto-réactifs, tels que l'anergie, la délétion des clones auto-réactifs ou l'action inhibitrice des cellules régulatrices.

b. La tolérance lymphocytaire B

Contrairement aux mécanismes de tolérance des lymphocytes T, les mécanismes de tolérance des lymphocytes B sont moins bien décrits (**Figure 4**) (Basten and Silveira, 2010; Nemazee, 2017).

i. La tolérance centrale

Elle a lieu dans la moelle osseuse au cours de l'ontogénèse des lymphocytes B. Le réarrangement aléatoire des chaines légères et lourdes des immunoglobulines (Ig) et des Ig-α (CD79a) et Ig-β (CD79b) permet de constituer et d'exprimer les récepteurs BCR (*B Cell Receptor*). En plus de ces marqueurs, les lymphocytes B immatures expriment le marqueur CD19. L'édition des BCR étant aléatoire, de nombreux lymphocytes B auto-réactifs immatures sont générés. Comme pour les lymphocytes T, la sélection négative va éliminer les lymphocytes B immatures auto-réactifs par délétion clonale. D'autre part, les lymphocytes B immatures auto-réactifs ont également la possibilité de rééditer leur BCR pour acquérir un nouveau BCR avec une faible affinité de reconnaissance du soi. Les lymphocytes B immatures non auto-réactifs vont poursuivre leur maturation en lymphocytes B transitionnels et pourront migrer vers la rate. Ces derniers expriment des marqueurs tels que l'IgD, le CD24 et le CD38 (IgD+ $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$).

ii. La tolérance périphérique

Il existe différentes étapes de contrôle des lymphocytes B auto-réactifs en périphérie :

- **Au niveau de la rate :** Dans la rate, de nouveaux antigènes non-exprimés dans la moelle osseuse sont présentés aux lymphocytes B. Les lymphocytes B qui vont reconnaitre ces antigènes avec une très forte affinité vont mourir par apoptose.
- **Dans les centres germinatifs :** L'activation d'un lymphocyte B en périphérie nécessite des signaux de co-stimulation en provenance de lymphocytes T. En absence de ces signaux de co-stimulation, le lymphocyte B va mourir.
- **Les lymphocytes régulateurs :** Les lymphocytes T régulateurs sont capables d'inhiber l'action des lymphocytes B auto-réactifs en périphérie. De plus, il existe une population de lymphocytes B régulateurs, caractérisée par le phénotype $CD19^{+}$ $CD27^{-}$ $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$ et capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. Les lymphocytes B régulateurs représentent environ 4% de lymphocytes B circulants (Rosser and Mauri, 2015).

4. La réponse immunitaire non-spécifique

Une RI efficace nécessite l'intervention de différents types cellulaires qui présentent des phénotypes variés. Elle peut être mise en place en réponse aux agressions de façon générale ou vis-à-vis d'un pathogène en particulier. Ainsi, on peut distinguer deux mécanismes de réponses immunitaires : la RI non-spécifique et la RI spécifique. La RI non-spécifique aussi connue sous le nom d'immunité innée est le plus ancien système de défense mis en place au cours de l'évolution des espèces. Elle correspond à la première ligne de défense contre les agents pathogènes, néanmoins elle ne fournit pas une RI ciblée. La notion de RI ciblée mentionnée dans ce contexte concerne une RI dirigée contre les composants spécifiques à un antigène ou à un autre (par exemple des fragments peptidiques). L'immunité innée comprend deux grandes lignes de défenses : les barrières naturelles et l'inflammation.

Parmi les barrières naturelles de défenses, on retrouve différents éléments tels que la peau, les mouvements ciliaires, l'acidité gastrique et le mucus. Il existe aussi des mécanismes physiologiques tels que l'éternuement, la toux et les larmoiements qui permettent d'éliminer les agents pathogènes.

L'inflammation survient en deuxième intention suite à l'inefficacité des barrières naturelles à prévenir l'entrée des pathogènes. L'inflammation peut être médiée par les cellules myéloïdes telles que les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles. Ces cellules expriment des récepteurs appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*), capables de reconnaitre des molécules associées aux pathogènes (PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Les PRR peuvent êtres sécrétés, membranaires ou intra-cytoplasmiques. C'est la liaison entre les PRR et les PAMP qui va enclencher le processus inflammatoire (Brubaker et al., 2015). Les PRR sécrétés ont un rôle clé ; ils vont permettre la phagocytose et la lyse des agents pathogènes par l'intermédiaire du complément. Par ailleurs, l'expression des PRR membranaires et intra-cytoplasmiques par les cellules myéloïdes vont permettre l'activation et l'action lytique de ces dernières. Les cellules myéloïdes expriment le marqueur commun CD11b. Néanmoins, l'expression de CD14 par les monocytes, va permettre de les distinguer des éosinophiles et des neutrophiles qui ne l'expriment pas (Gustafson et al., 2015). Les cellules *Natural Killers* (NK) issues de la lignée lymphoïde ont aussi un rôle déterminant au cours de la RI non-spécifique.

a. Activation et rôle des cellules NK au cours de l'inflammation

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes tueuses, capables de produire des cytokines et des molécules cytotoxiques en l'absence de présentation antigénique préalable (Vivier et al., 2008). Elles sont caractérisées par l'expression du CD56 et peuvent l'exprimer fortement ou plus faiblement ($CD56^{bright}$ et $CD56^{dim}$). Les lymphocytes NK expriment fortement des signaux d'inhibition tels que le récepteur NKG2A (Borrego et al., 2005; Vivier et al., 2008). Les récepteurs NKG2A sont capables de reconnaitre des molécules du CMH de type I exprimées de façon constitutive par chaque cellule. D'autre part, il existe aussi des récepteurs d'activation des lymphocytes NK tels que CD16 et des récepteurs cytotoxiques comme NKp_{30}. En conditions d'homéostasie, il existe un équilibre entre les signaux d'activation et les signaux d'inhibition. En revanche, des conditions pathologiques peuvent induire l'augmentation des signaux d'activation et induire un déséquilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Les signaux d'activation peuvent être stimulés dans les cas suivants :

- En présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-15 et l'IL-2
- Lorsqu'une cellule perd l'expression du CMH de type I. La perte de l'expression du CMH de type I est un mécanisme fréquemment utilisé par les cellules cancéreuses pour échapper aux réponses immunitaires.

L'état d'activation d'un lymphocyte NK peut être évalué par l'expression de marqueurs d'activation et la nature des cytokines sécrétées. En effet, un lymphocyte NK peut exprimer les marqueurs d'activation tels que HLA-DR, CD16, CD69 et CD38 (Hamerman et al., 2005; Vivier et al., 2008). De plus, il peut aussi sécréter spontanément la perforine et la granzyme qui seront à l'origine de la lyse des cibles potentielles.

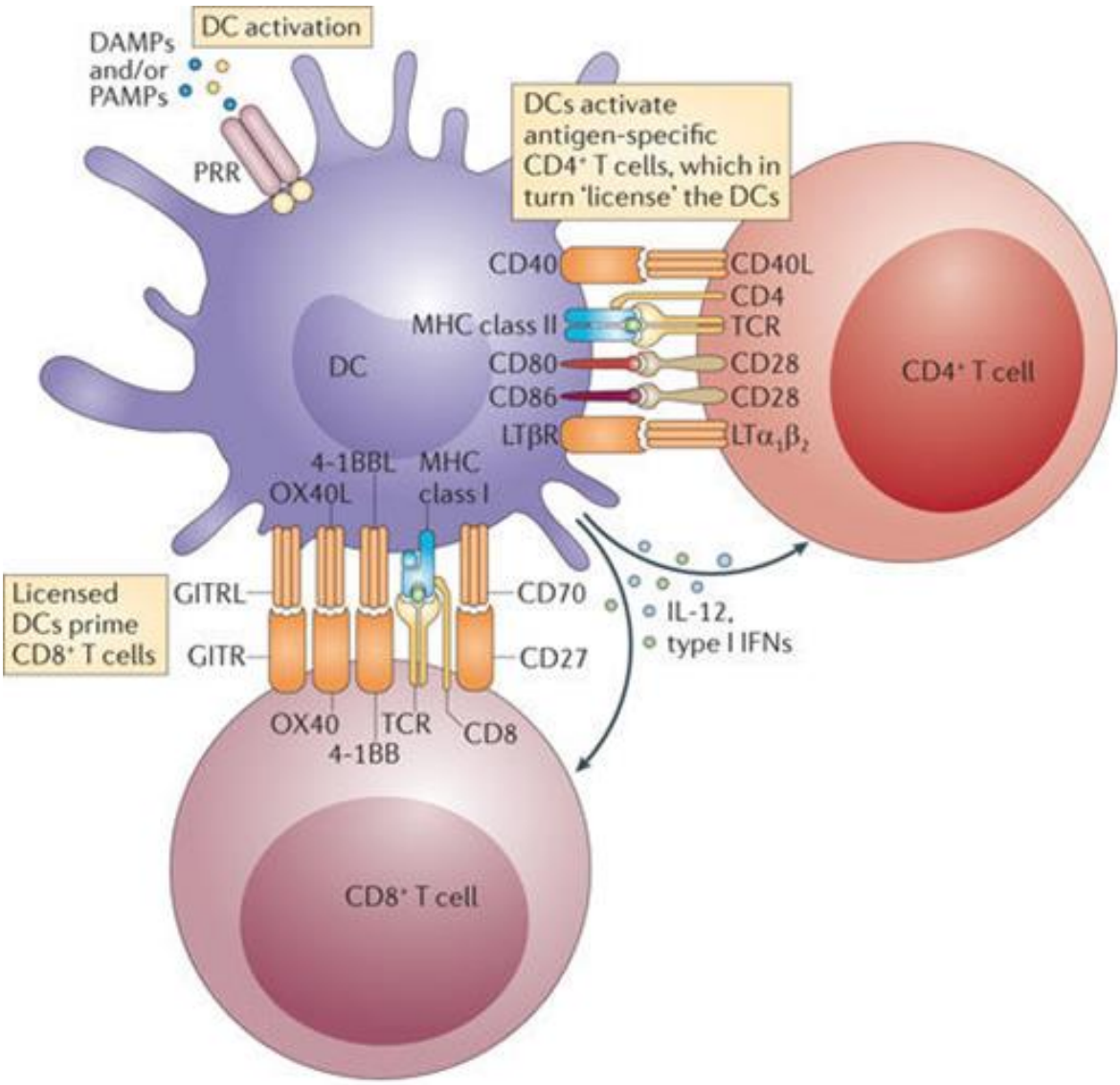


Figure 5 : Activation des lymphocytes T (Adaptée de (deLuca and Gommerman, 2012)).

L'activation d'un lymphocyte T nécessite trois signaux principaux : la liaison CMH-peptide/TCR, les signaux de co-stimulation et la sécrétion de cytokines qui vont orienter la nature de la RI. Les axes de co-stimulation OX40L (liaison avec OX), CD70 (liaison avec CD27), CD80/CD86 (liaison avec CD28) et CD40 (CD40L) peuvent être observés avec les lymphocytes T CD4+ ou CD8+.

5. La réponse immunitaire spécifique

Elle constitue l'ensemble des processus qui permettent de mettre en place une RI ciblée et spécifique à l'encontre d'un agent pathogène (le SI adaptatif). Le SI adaptatif nécessite l'intervention des cellules dendritiques et des lymphocytes (T, B et NK).

a. Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont un rôle fondamental dans l'induction des RI spécifiques médiées par les lymphocytes. Leur capacité à phagocyter, digérer ensuite présenter les antigènes sous formes de complexes peptides-CMH aux lymphocytes T naïfs est unique (Granucci et al., 2008; Howard et al., 2004). Suite aux lésions tissulaires, aux infections ou à la mort cellulaire, les cellules dendritiques vont capter les signaux de danger *via* les PRR et exprimer des molécules de co-stimulation telles que CD80/CD86 et CD70. Les cellules dendritiques peuvent aussi sécréter des cytokines inflammatoires capables d'orienter la nature de la RI qui sera mise en place (RI spécifique et non-spécifique). Il est aussi important de souligner que les cellules dendritiques ont un rôle clé au cours des mécanismes anti-inflammatoires afin de permettre un retour à l'homéostasie immunitaire ou afin de prévenir une RI trop prolongée (Collin et al., 2013).

b. L'activation de la RI médiée par les lymphocytes T

Elle implique les actions effectrices des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ et est médiée par un processus d'orientation fonctionnelle cellulaire. L'activation d'un lymphocyte T naïf a lieu le plus souvent dans les organes lymphoïdes secondaires et nécessite la reconnaissance de peptides présentés par les CPA à leurs TCR en présence de signaux de co-stimulation. Elle peut être résumée en trois étapes successives (**Figure 5**) :

- La reconnaissance du complexe peptide-CMH présenté par les CPA aux TCR spécifiques des lymphocytes T.
- La liaison des molécules de co-stimulation exprimée par les CPA avec leurs ligands présents sur les lymphocytes T. Des exemples de molécules de co-stimulation et leurs ligands sont : CD80/CD86 (liaison avec CD28), CD70 (liaison avec CD27) et CD40 (liaison avec CD40-Ligand, CD40L).
- La sécrétion de cytokines. Elle va permettre l'entrée en cycle cellulaire et la prolifération des lymphocytes T activés. De plus, l'orientation de la nature de la RI et du

phénotype des cellules effectrices se fait en fonction des cytokines présentes dans l'environnement.

Une fois activés, les lymphocytes T vont perdre l'expression membranaire de marqueurs de « *homing* » tels que CD62L (CD62 ligand) et CCR7. La perte des marqueurs de « homing » va permettre aux lymphocytes T activés de sortir des organes lymphoïdes secondaires. Par la suite, les lymphocytes T activés vont exprimer des molécules d'activation et sécréter des cytokines en faveur de leur différenciation en sous-types fonctionnels, la réalisation des fonctions effectrices et le maintien de la mémoire immunologique. Finalement, les lymphocytes T activés vont subir une expansion clonale afin d'accroitre leur nombre pour éliminer efficacement le(s) pathogène(s).

Les molécules d'activation des lymphocytes T

- **CD25 :** La molécule CD25 est la chaîne alpha du récepteur trimérique de l'IL-2. Les chaînes beta et *gamma* du récepteur à l'IL-2 sont de faible affinité et nécessitent une association avec CD25 pour obtenir une forte affinité. CD25 est exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes Treg et T mémoire au repos. Son expression est augmentée dans les 24 heures suivant une stimulation du complexe TCR-CD3 des lymphocytes T. Par ailleurs, l'IL-2 est une cytokine qui a un rôle clé dans l'activation, l'expansion et la survie des lymphocytes T (Reddy et al., 2004). L'IL-2 peut être sécrétée par les CPA et les lymphocytes T activés. La liaison de l'IL-2 avec le CD25 associée aux chaînes *beta* et *γ* favorise l'activation des lymphocytes T et la production supplémentaire d'IL-2. L'expression de CD25 sur les lymphocytes T peut être induite par des cytokines sécrétées par les monocytes, macrophages et lymphocytes activés telles que l'IL-2, l'IL-4 et le *tumor necrosis factor*-alpha (TNF-α) (Hosono et al., 2003; Salgado et al., 2002).
- **HLA-DR :** HLA-DR est le CMH de type II, qui est exprimé constitutivement sur les CPA comme les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages. Son expression est observée au cours des phases tardives de l'activation des lymphocytes T et NK. Ainsi, la molécule HLA-DR est considérée comme un marqueur d'activation tardif (Reddy et al., 2004). Le rôle de présentation antigénique par les lymphocytes T activés qui expriment HLA-DR n'est pas encore élucidé.

- **CD38 :** Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de 45 KDa. Le CD38 est fortement exprimé sur les thymocytes et les cellules immatures B, néanmoins son expression diminue sur les lymphocytes matures en périphérie. L'expression du CD38 est observée de nouveau au cours de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T et B (Hamblin, 2003). CD38 peut aussi être exprimé par les cellules myéloïdes et les lymphocytes NK. De nombreuses fonctions cellulaires de la protéine CD38 ont été mises en évidence (Quarona et al., 2013) :

  - **Adhésion cellulaire :** Afin d'étudier le rôle de la protéine CD38, de nombreuses études ont utilisé des anticorps monoclonaux agonistes du CD38. Ces études ont observé une activation et une adhésion des lymphocytes T activés aux cellules endothéliales. Ce n'est que plus tard que le ligand de CD38, CD31 qui est fortement exprimé par les cellules endothéliales, a été identifié. Ainsi, le rôle de CD38 dans l'adhésion des cellules T, B, NK et myéloïdes a été démontré (Deaglio et al., 2000).

  - **Activité enzymatique et prolifération cellulaire :** Avec son long domaine carboxy-terminal extracellulaire et son court domaine cytoplasmique, le CD38 peut synthétiser et catalyser l'adénosine 5' di-phosphate ribose (ADP-ribose) cyclique à partir de la nicotinamide adénine di-nucléotide (NAD). L'ADP-ribose cyclique sécrété présente une séquence similaire à la protéine transmembranaire CD38. Ainsi, CD38 peut agir comme une ecto-enzyme. L'action synergique de l'ADP-ribose cyclique avec d'autres enzymes cellulaires va entraîner des flux calciques nécessaires à la prolifération cellulaire et à la contraction musculaire (Guse et al., 1999; Kuemmerle and Makhlouf, 1995).

c. L'activation de la RI médiée par les lymphocytes B

Contrairement aux TCR, les BCR peuvent reconnaitre des antigènes sous leur forme native sans aucune digestion ni présentation antigénique préalable. Le lymphocyte B est ainsi capable d'internaliser l'antigène, de le dégrader et ensuite de le présenter à sa surface associée au CMH de type II. La RI médiée par les lymphocytes B est dite « humorale » parce que sa finalité est la production d'anticorps qui vont se fixer aux antigènes spécifiques pour former des complexes immuns afin de détruire les antigènes.

A présent, nous allons présenter les étapes de différenciation et les fonctions des différents phénotypes lymphocytaires T et B.

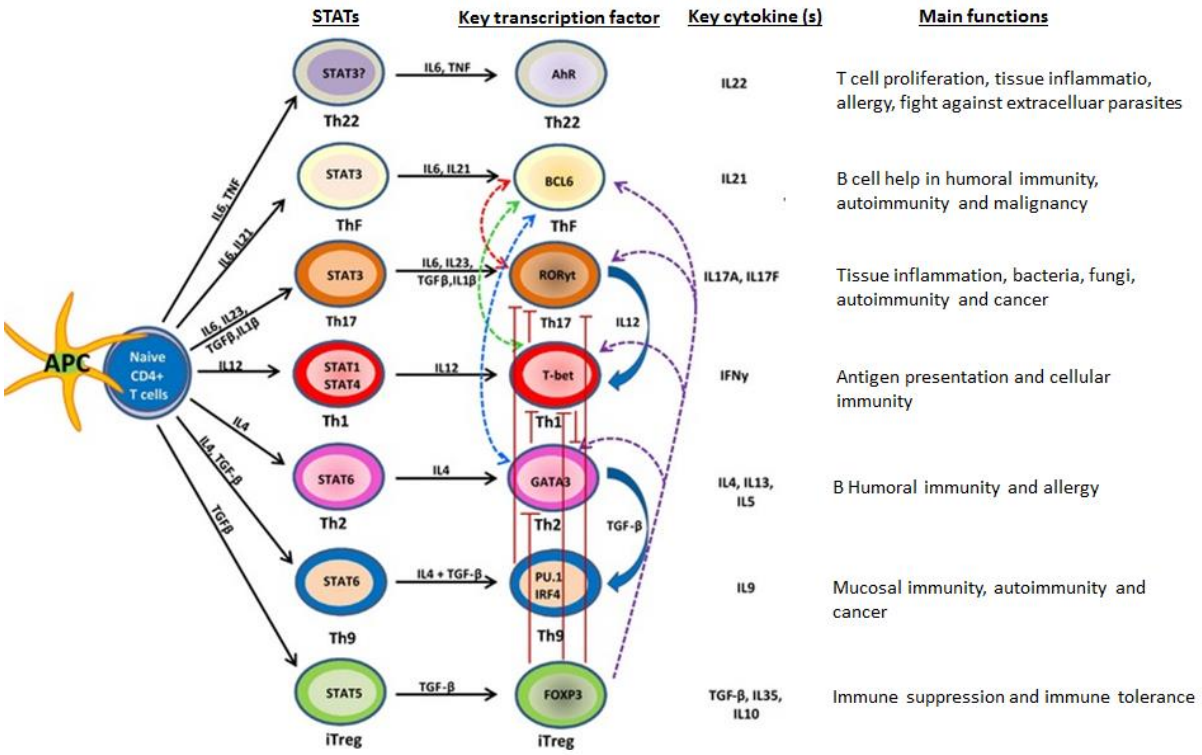


Figure 6 : Activation et fonctions des lymphocytes T CD4+ (Tripathi and Lahesmaa)

Comme l'indique le schéma, différents sous-groupes lymphocytaires T ont été décrits avec des fonctions majeures associées. Différents facteurs de transcription définissent chaque sous-population, associée avec un profil de sécrétion cytokinique qui renforce leur fonction. Néanmoins, ces sous-populations lymphocytaires sont capables de plasticité (changement de phénotype et de fonction) en présence d'un environnement cytokinique particulier.

6. Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ tiennent le rôle de chef d'orchestre de la RI, d'où leur nom *T helper* (Th). En effet, ils collaborent avec les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B et d'autres cellules immunitaires. Suite à leur activation, les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en différents sous-groupes fonctionnellement distincts. Historiquement, seuls deux sous-groupes différenciés de lymphocytes Th étaient décrits : les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th2 (Mosmann et al., 2005). A présent, plusieurs sous-groupes lymphocytaires T CD4+ fonctionnellement distincts sont décrits, entre autres, les lymphocytes Th1, Th2, Th17, Treg et T folliculaires *helpers* (Tfh). Des études montrent que les sous-groupes lymphocytaires Th sont dotés d'une plasticité et peuvent ainsi changer de phénotype et de fonction (**Figure 6**) :

a. Les lymphocytes Th1

Ils sont induits en présence de l'interféron-γ (IFNγ) et l'IL-12. Leur différenciation est régulée par l'expression du facteur de transcription *T-box expressed in T cells* (T-bet). Une fois activés, les lymphocytes Th1 vont sécréter d'avantage l'IFNγ qui va favoriser l'activation des lymphocytes T CD8+, des macrophages et des cellules NK. Les lymphocytes Th1 activés peuvent aussi sécréter de l'IL-2 qui favorise la prolifération cellulaire. Ainsi, une orientation des lymphocytes T CD4+ en Th1 va favoriser une forte RI de type cellulaire et cytotoxique. L'activation excessive de la RI médiée par les lymphocytes Th1 peut être à l'origine de mécanismes auto-immuns. En effet, les lymphocytes Th1 ont été mis en cause au cours de maladies auto-immunes spécifiques d'organes telles que le diabète de type 1 (où les cellules du pancréas sont prises pour cible par le SI) et la sclérose en plaques (la myéline présente dans le système nerveux central est ciblée) (Dardalhon et al., 2008).

b. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 sont induits en présence d'IL-4 et d'IL-13. Ils se distinguent par l'expression du récepteur *Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells* (CRTH2) et leur différenciation est régulée par le facteur de transcription GATA3. Les lymphocytes Th2 activés sécrètent d'avantage IL-4, l'IL-13 et l'IL-5, capables d'induire la sécrétion d'Immunoglobulines E (IgE) par les lymphocytes B, l'activation des éosinophiles et la sécrétion de mucus (Bellanti, 1998). Ainsi, les lymphocytes B sont impliqués au cours des réactions allergiques médiées par les éosinophiles telles que la rhinite allergique et l'asthme

(Deo et al., 2010; Endo et al., 2014). Les cellules Th2 sont connues pour leur efficacité au cours de la RI contre les parasites extracellulaires et leur rôle clé dans l'activation des lymphocytes B au cours de la RI humorale (Zhu and Paul, 2008).

c. Les lymphocytes Th17

Avant l'année 2005, seule la différenciation des lymphocytes Th en Th1 ou en Th2 était connue. L'identification de lymphocytes T CD4+ très inflammatoires inductibles en présence d'IL-23 et capables de sécréter l'IL-17 a permis de décrire les lymphocytes Th17 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). La différenciation des lymphocytes Th en lymphocytes Th17 est régulée par le facteur de transcription RAR-*related orphan nuclear receptor γ T* (RORγT). Les lymphocytes Th17 sont aussi capables de sécréter l'IL-21 qui permet de stimuler d'avantage l'induction des Th17. La réponse lymphocytaire médiée par les cellules Th17 est fréquemment observée en réponse aux bactéries extracellulaires et aux champignons (Tesmer et al., 2008). Le rôle des Th17 seuls ou en association avec les Th1 au cours de maladies auto-immunes a été démontré. Ceci est le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR) qui est une maladie auto-immune (MAI) caractérisée par une inflammation chronique de la membrane synoviale, entraînant la destruction des os et du cartilage. En effet, des études montrent une augmentation des cytokines en faveur d'une différenciation de type Th17 dans le liquide synovial des patients. De plus, le taux d'IL-17 est augmenté chez les patients et entraîne d'autres mécanismes toxiques tels que l'activation des ostéoclastes, l'angiogenèse et l'induction des métalloprotéases (enzymes destructrices) (Tabarkiewicz et al., 2015; Toh and Miossec, 2007).

d. Les lymphocytes T folliculaires *helper* (Tfh)

Les lymphocytes Tfh sont des cellules spécialisées qui fournissent de l'aide aux lymphocytes B. Elles ont été identifiées pour la première fois dans les amygdales, néanmoins elles sont présentes de façon générale au sein des organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques. La différenciation des lymphocytes Th en Tfh est dépendante du facteur de transcription Bcl6. Les cellules Tfh sont caractérisées par l'expression du CXCR5 et de marqueurs d'inhibition tels que PD-1 et ICOS (Moser, 2015). Au sein des organes lymphoïdes secondaires, il existe une zone T et une zone B. Comme l'indique leur nom, la zone T est à prédominance lymphocytaire T et la zone B à prédominance lymphocytaire B. La reconnaissance des antigènes présentés par les cellules

dendritiques folliculaires aux Tfh dans la zone T, va permettre la baisse d'expression de CCR7 par les lymphocytes TfH. Ainsi, les cellules Tfh CXCR5+ CCR7- vont pouvoir pénétrer dans la zone B des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes Tfh ont un rôle clé dans la formation et la maintenance des centres germinatifs, qui sont des structures qui se forment dans la zone B des ganglions lymphatiques et qui permettent la production et la maturation de lymphocytes B mémoires de haute affinité et de plasmocytes. Dans la zone B, les lymphocytes Tfh peuvent fournir des signaux de co-stimulation aux lymphocytes B, par la liaison de CD40 exprimé par les lymphocytes B activées avec CD40-Ligand (CD40L) exprimé par les lymphocytes Tfh. Finalement, les cellules Tfh peuvent aussi sécréter l'IL-21 nécessaire à la prolifération des lymphocytes B (Crotty, 2011).

e. Les pTreg

Comme mentionné précédemment, des lymphocytes T régulateurs peuvent être induits en périphérie (pTreg) en présence ou en l'absence d'inflammation. L'expression du facteur de transcription FoxP3 est spécifique aux Treg et permet la différenciation des Th naïfs en Treg suite à une reconnaissance antigénique. Il a été démontré que les pTreg sont induits à partir de lymphocytes T naïfs en présence de peptides présentés par les CPA. La présence de *tumor growth factor*-β (TGF-β) ou de faibles doses d'IL-2 est capable d'accélérer le processus de génération des pTreg (Kretschmer et al., 2005). Le rôle central des lymphocytes Treg dans le maintien de l'homéostasie immunitaire en périphérie (tolérance périphérique) a été démontré chez l'homme et la souris. En effet, chez l'homme, des mutations dans le gène qui code pour FoxP3 entraînent le syndrome *immune dysregulation polyadenopathy enteropathy, x-linked syndrom* (IPEX) qui se manifeste par une dérégulation de mécanismes immunitaires et la survenue de mécanismes auto-immuns (Bennett et al., 2001). Un phénomène semblable est observé chez la souris « Scurfy » qui présente des mutations sur le gène FoxP3 (Hadaschik et al., 2015). Ainsi, les lymphocytes Treg sont capables de réprimer les RI contre le soi ou le « non soi ». Des déficits quantitatifs et qualitatifs des lymphocytes Treg ont été observés au cours de la sclérose en plaques (Huan et al., 2005; Viglietta et al., 2004).

7. Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont des cellules cytotoxiques qui ont un rôle clé au cours de l'immunité antibactérienne, antivirale et anti-tumorale. L'activation du lymphocyte T CD8+ naïf en présence d'IL-12 va entraîner différents mécanismes d'expansion clonale, de différenciation et de maturation de ce dernier, afin de produire une RI adaptée et de générer les cellules mémoires.

a. La différenciation des lymphocytes T CD8+

La différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (LTC) est guidée principalement par deux facteurs de transcription : T-bet et eomesodermin (eomes). En effet, la délétion de T*bx*21 (le gène qui code pour T-bet) et eomes chez des souris non infectées est associée avec une diminution sélective des lymphocytes T CD8+ (Intlekofer et al., 2005). Dans ce modèle expérimental, une diminution des fonctions effectrices des LTC a aussi été observée, caractérisée par une sécrétion altérée des molécules cytolytiques et une faible action cytolytique. Tandis que T-bet intervient au cours des étapes précoces de la différenciation en LTC, eomes intervient plus tardivement (Cruz-Guilloty et al., 2009).

Au cours d'expériences de cytotoxicité cellulaire, des études ont montré que l'expression de T-bet précède la sécrétion de granzyme B (une sérine protéase) par les LTC (Cruz-Guilloty et al., 2009). Ainsi, les cellules T CD8 + T-bet + ($CD8+_{T\text{-}bet+}$) définissent un sous-ensemble de lymphocytes CD8 mémoires capables de sécréter spontanément la granzyme B, mais elles nécessitent une re-stimulation pour sécréter l'IFNγ. De plus, des études ont montré que les cellules $CD8+_{T\text{-}bet+}$ fournissent une RI effectrice et une mémoire optimale antivirale et antibactérienne (Olson et al., 2013).

Une étude chez des patients atteints de VIH (virus immuno-déficient humain) a montré une augmentation de l'expression de T-bet dans les lymphocytes T CD8+ des patients en phase de progression clinique par rapport aux patients très immunodéficients. Cette augmentation de T-bet était accompagnée d'une sécrétion augmentée de perforine (protéine formant des pores) et de granzyme B capables de détruire les cellules infectées par le virus (Hersperger et al., 2011).

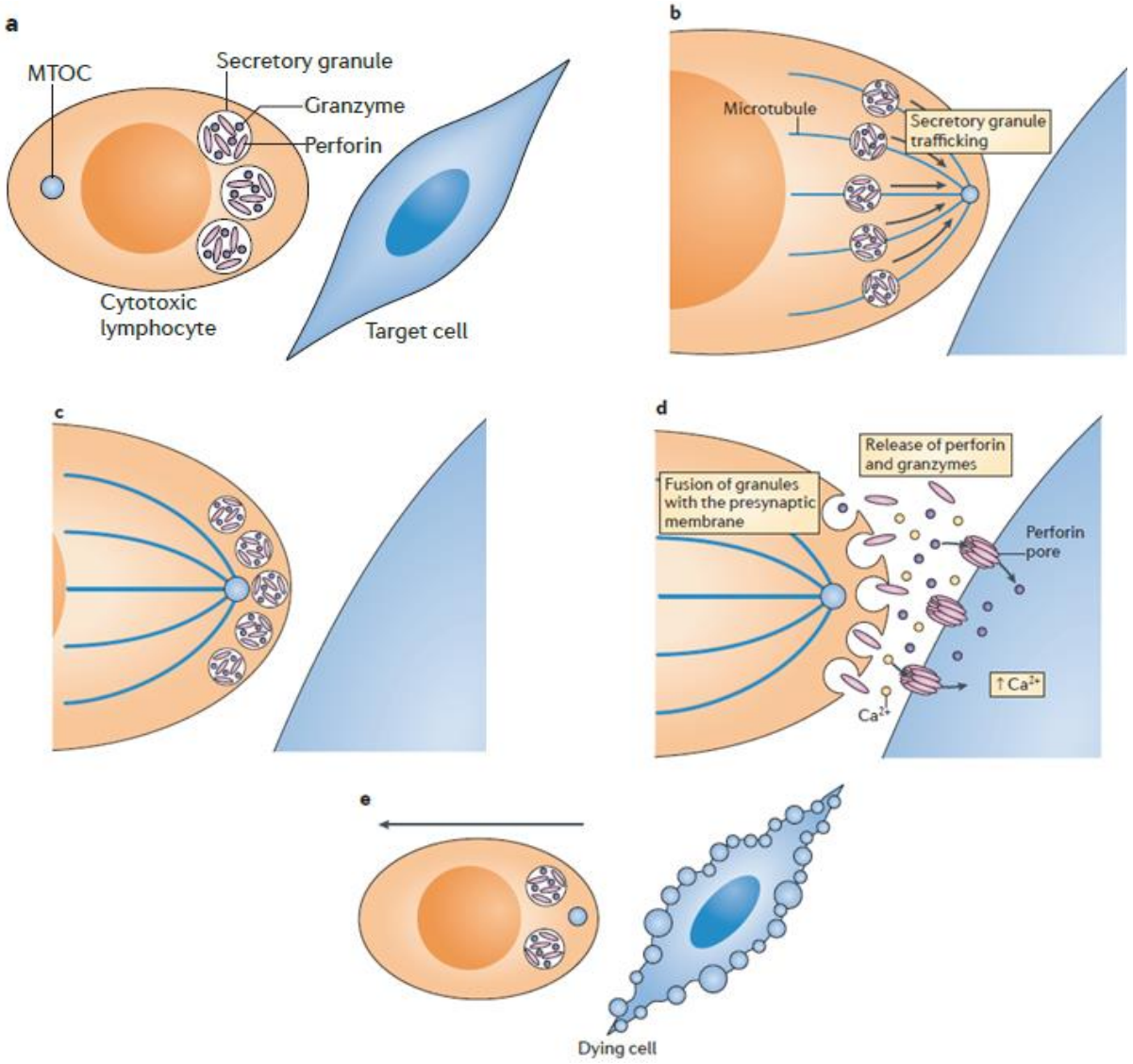


Figure 7 : Mode de sécrétion et d'action de la perforine (Voskoboinik et al., 2015).

a) La reconnaissance d'un lymphocyte cytotoxique avec sa cible va, b) entrainer la migration des centres d'organisation de microtubules (COMT) vers la cible, c) la migration des granules sécrétoires vers la cible, d) la fusion des granules avec la membrane présynaptique qui va entrainer le relargage de leur contenu dans la synapse immunologique et e) la mort de la cible.

Outre les fonctions bénéfiques des lymphocytes $CD8+_{T\text{-}bet+}$, des effets cytotoxiques non souhaités peuvent aussi être observés au cours des transplantations d'organes et des mécanismes auto-immuns (Yap et al., 2014). En effet, dans un modèle murin de diabète auto-immun de type 1, des études ont démontré que l'expression de T-bet contrôle la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Au cours de ce modèle expérimental, l'absence de T-bet entraîne une diminution de lymphocytes CD8+ agressifs et une baisse de sécrétion d'IFNγ en faveur d'une rémission de la maladie (Juedes et al., 2004). D'autre part, une augmentation de l'expression de T-bet a été observée au sein des lymphocytes T CD4+ et CD8+ des patients atteints de la sclérose en plaques en phase de rechute, en comparaison aux patients en rémission et aux sujets sains (Frisullo et al., 2006).

b. Rôle des lymphocytes T CD8+

Les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8+ peuvent être résumées en trois mécanismes :

i. **La sécrétion de granules cytotoxiques**

L'une des caractéristiques majeures des LTC est leur capacité à synthétiser et à sécréter des granules lytiques contenant différentes toxines dans la synapse immunologique. L'activation des LTC va induire rapidement la fabrication de granules cytotoxiques. Parmi les toxines sécrétées, on retrouve principalement la perforine et les molécules de granzyme.

La reconnaissance et la liaison d'un LTC à sa cible vont favoriser la migration des centres d'organisation de microtubules (COMT) du cytoplasme des LTC vers la cellule cible. Ainsi les toxines sécrétées vont migrer à travers les COMT et vont être libérées dans la synapse immunologique (**Figure 7**). Tout d'abord, la perforine va former des pores dans la membrane de la cellule cible. Ces pores vont entraîner un flux de calcium dans la cellule cible. L'augmentation du taux de calcium cytosolique va favoriser l'endocytose des molécules de granzyme et d'autres molécules présentes à la surface (Keefe et al., 2005; Voskoboinik et al., 2015).

Les molécules de granzyme sont des sérines protéases. Cinq types de granzyme sont décrits : granzyme A, B, H, K et M. Parmi ces différentes molécules, l'activité de la granzyme B est la plus étudiée. La granzyme B peut agir directement dans le cytosol de la cellule cible en induisant l'apoptose.

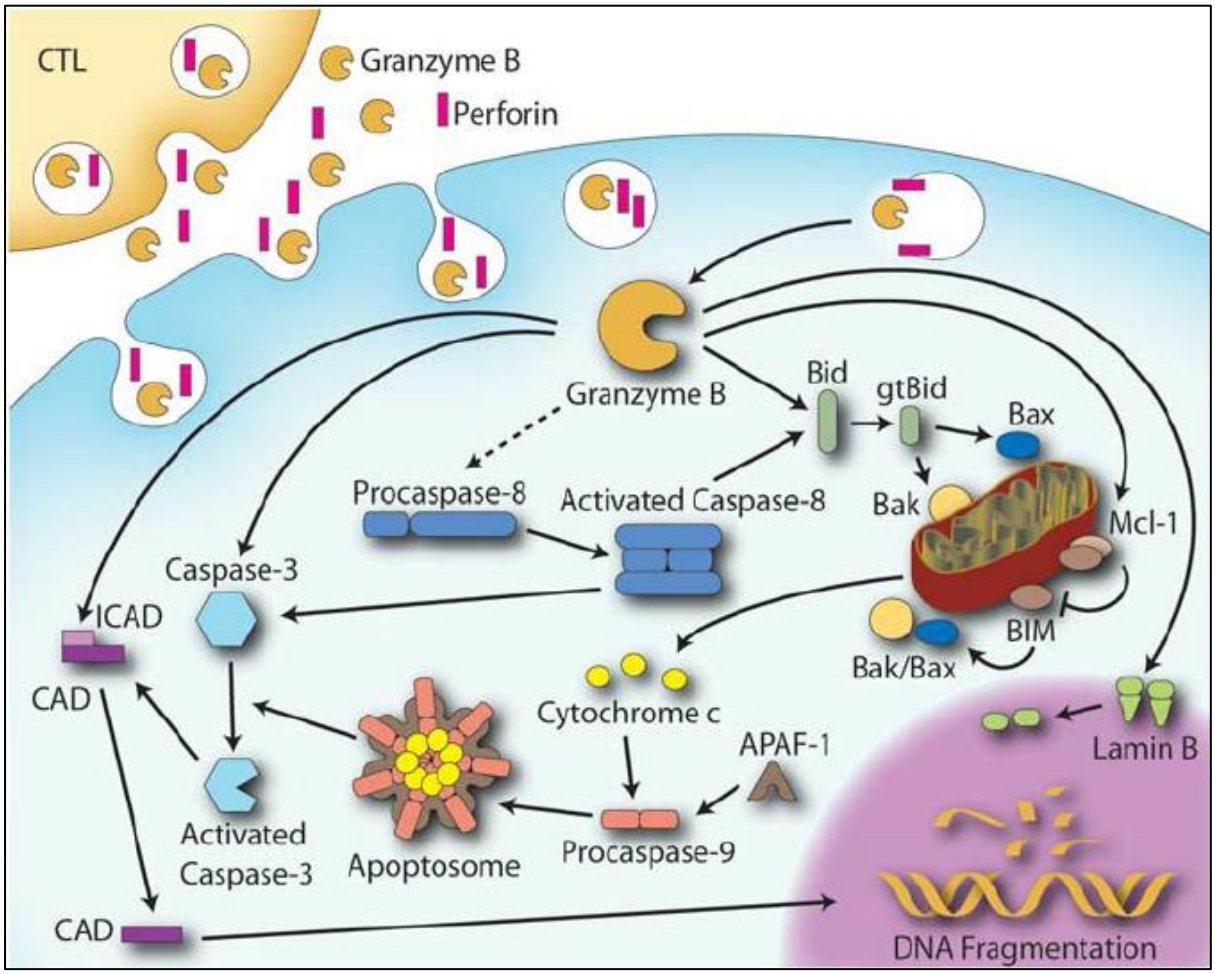


Figure 8 : Mode de sécrétion et d'action de la granzyme B (Wendy AB. et al, 2009).

La sécrétion des granzymes par les cellules cytotoxiques va entrainer l'apoptose de la cellule cible. Ceci peut se faire par la voie mitochondriale impliquant des protéines pro-apoptotiques ou par l'activation des *caspase-activated DNase* (CAD) qui va fragmenter l'ADN et induire la mort cellulaire.

La granzyme B peut aussi agir au niveau de la mitochondrie ou des noyaux afin d'induire l'apoptose par la voie des caspases (**Figure 8**). Ainsi, l'action synergique de la perforine et de granzyme B peut entraîner la mort des cellules cibles (Chowdhury and Lieberman, 2008).

ii. La voie Fas/FasL (CD95/CD95L)

Un autre mécanisme d'action des LTC est l'induction de l'apoptose des cellules cibles par la voie Fas/FasL (Fas/Fas-Ligand). La voie Fas/FasL est un système d'induction d'apoptose initié par la liaison d'une cellule qui exprime Fas avec une autre qui exprime FasL. En plus de son rôle dans la prolifération et la survie des lymphocytes T, l'IL-2 est aussi important dans l'induction de l'apoptose par la voie Fas/FasL (Ayroldi et al., 1998). En effet, une étude a montré une augmentation de lymphocytes T activés accompagnée d'une résistance à l'apoptose chez des souris déficientes en IL-2 ($IL2^{-/-}$) (Refaeli et al., 1998). L'IL-2 est ainsi capable de moduler l'expression de FasL.

Les lymphocytes T activés expriment FasL et peuvent se lier aux cellules cibles qui expriment Fas. Cette liaison va entraîner la formation d'un complexe protéique appelé *death inducing signaling complex* (DISC). Le DISC-CD95 est constitué de protéines telles que CD95, *Fas associated death domain* (FADD), la caspase 8 et 10. Le recrutement des protéines du DISC va entraîner l'apoptose des cellules cibles (Krueger et al., 2003).

iii. **La sécrétion de cytokines**

Les LTC sont aussi capables de sécréter des médiateurs aux rôles divergents tels que l'interféron-*γ*, l'IL-2 et le TNF-α.

L'IL-2 sécrété par les LTC peut avoir une action autocrine sur les LTC ou sur d'autres cellules.

En plus de la capacité d'activation des lymphocytes T CD8+ et des macrophages par l'IFNγ, une surexpression du CMH de type I peut être observée. L'expression du CMH de type I en réponse à l'IFNγ peut survenir à la fois sur les CPA et les cellules cibles. Ce mécanisme est en faveur d'une meilleure présentation antigénique aux cellules effectrices.

Finalement, la sécrétion d'IFNγ et du TNF-α favorise le maintien du processus inflammatoire et l'immunité antimicrobienne (bactérienne et virale) (Harty et al., 2000).

8. La mémoire immunologique et la sénescence des lymphocytes T

a. La mémoire immunologique

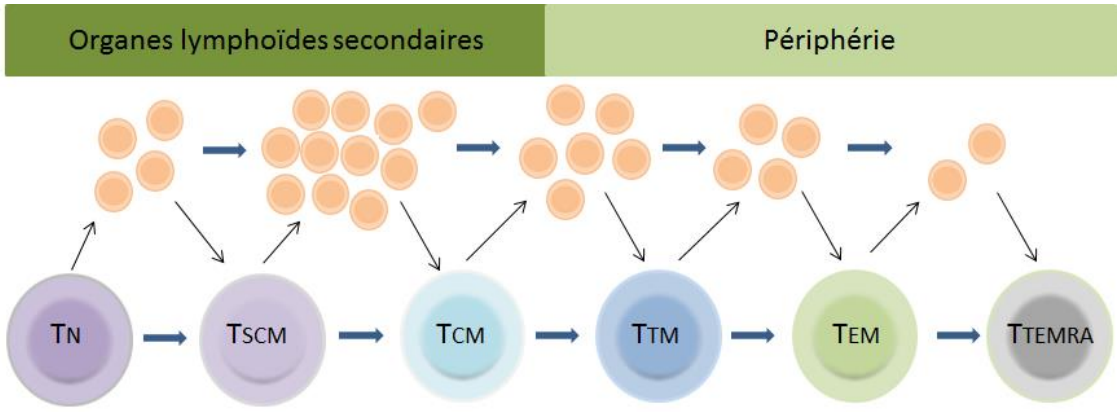
Suite à une RI, un retour à l'homéostasie est nécessaire afin de prévenir une activation prolongée du SI pouvant entraîner des mécanismes auto-immuns. Le maintien de cellules mémoires est aussi nécessaire afin d'être capable de répondre rapidement à une stimulation semblable ultérieure. La mémoire immunologique est aussi importante suite à une vaccination, afin de permettre à l'organisme de réagir rapidement contre le pathogène contre lequel il a été vacciné.

i. La phase de contraction de la RI

Quatre-vingt-dix à quatre-vingt-quinze pourcent des lymphocytes T spécifiques activés vont mourir par apoptose au cours de cette phase. Différents mécanismes de mort par apoptose suite à l'activation des lymphocytes T après une RI sont décrits, parmi lesquels l'*activation induced cell death* (AICD) et la privation en cytokines (Krammer, 2000).

L'AICD est un mécanisme de mort induit lorsque le TCR d'un lymphocyte T préalablement activé est stimulé en absence de signaux de co-stimulation. L'AICD peut être médiée par différents mécanismes tels que la voie Fas/FasL, *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) et d'autres mécanismes. L'expression de Fas par les lymphocytes T activés et ayant déjà subi une phase d'expansion clonale favorise leur mort suite à une nouvelle stimulation en absence de signaux de co-stimulation. Ainsi, ces lymphocytes T peuvent mourir suite à une induction de la voie Fas/FasL dû à une reconnaissance de FasL présent sur une autre cellule ou sur la même cellule (Nguyen and Russell, 2001). Néanmoins, des études ont démontré que l'induction de l'apoptose par la voie Fas/FasL n'est pas le principal mécanisme de régulation des lymphocytes T activés.

En revanche, la mort des lymphocytes T activés suite à une nouvelle stimulation est largement médiée par des cytokines de survie et par la balance entre les molécules anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. En effet, l'IL-2 et l'IL-15 agissent comme des cytokines de survie. Ainsi, la surexpression de l'IL-2R et l'l-15R, en plus des protéines de survie de la famille Bcl-2 vont favoriser la survie des lymphocytes (Bosque et al., 2007). L'absence de ces signaux de survie va favoriser la mort des lymphocytes préalablement activés lors d'une réactivation.



	TN	TSCM	TCM	TTM	TEM	TTEMRA
CD45RA	+	+	-	-	-	+
CD45R0	-	-	+	+	+	-
CCR7	+	+	+	-	-	-
CD28	+	+	+	+	-	-
CD27	+	+	+	+	-	-
CD127	+	+	+	+/-	-	-
CD95	-	+	+	+	+	+
CD57	-	-	-	-	+/-	+

Figure 9 : Différenciation des lymphocytes CD8+

Ce schéma décrit la différenciation des lymphocytes T naïfs (T_N), en lymphocytes T mémoires : les T mémoires précurseurs (T *stem cell memory*, T_{SCM}), les T centrales mémoires (T_{CM}), les T transitionnels mémoires (T_{TM}), les T effecteurs mémoires (T_{EM}) et les T mémoires en phase terminale de différenciation (T terminally effector memory, T_{TEMRA}). En effet, l'expression différentielle de différents marqueurs permet d'affiner un phénotype donné. Suite à l'activation d'un lymphocyte T_N, il prolifère et se multiplie afin de mener efficacement ses fonctions effectrices. En revanche, les cellules mémoires très différenciées ou en phase terminale de différenciation ont une capacité de prolifération réduite et sont peu abondantes chez un individu sain.

ii. Les lymphocytes T mémoires

Il s'agit de 5 à 10% de lymphocytes T spécifiques. Les lymphocytes T mémoires ont une longue durée de vie par rapport aux T naïfs et sont caractérisés par l'expression de CD45RO et l'absence de CD45RA. Selon l'état actuel des connaissances, on peut distinguer différents phénotypes de lymphocytes T mémoires selon leurs caractéristiques et leur localisation en l'absence d'antigène spécifique : les T mémoires précurseurs (T *stem cell memory*, T_{SCM}), T centraux mémoires (T_{CM}), les T transitionnels mémoires (T_{TM}), les T effecteurs mémoires (T_{EM}) et les T mémoires en phase terminale de différenciation (T *terminally effector memory*, T_{TEMRA}) (**Figure 9**) (Mahnke Yolanda D. et al., 2013; Roberto et al., 2015) . Tandis que les lymphocytes T mémoires effecteurs se situent en périphérie et ont une faible capacité de prolifération, les lymphocytes T mémoires centraux circulent au sein des organes lymphoïdes secondaires et ont un fort potentiel de prolifération. Des études ont montré que le phénotype et le maintien des lymphocytes mémoires sont régulés par T-bet et eomes *via* le récepteur à IL-2 (Il-2R) qui est capable de rendre les cellules sensibles à l'IL-2 et l'IL-15. En effet, en l'absence de T-bet et eomes chez la souris, des études ont observé une augmentation accrue de lymphocytes T mémoires centraux au détriment des T mémoires effecteurs (Intlekofer et al., 2005; Joshi et al., 2007).

b. La sénescence et l'épuisement immunologique

La présentation répétée et prolongée d'antigènes aux lymphocytes T aboutit à une stimulation chronique, ceci peut être le cas au cours des infections virales chroniques ou de mécanismes d'inflammation chroniques. La stimulation chronique des lymphocytes T entraîne la perte progressive de l'expression des molécules de co-stimulation telles que CD28 et CD27. Une diminution du l'IL-7R α (CD127) peut aussi être observée (White et al., 2013). Différentes populations lymphocytaires peuvent être décrites :

i. Les lymphocytes sénescents

La sénescence immunologique décrit un état de sénescence réplicative suite à une prolifération excessive, défini par l'expression de CD57. Une étude chez des patients infectés par le VIH a permis d'observer qu'une majorité de lymphocytes T cytotoxiques CD57+ était capable de sécréter des cytokines, néanmoins ils mouraient au bout de de 48

heures de culture *in vitro*. Dans ces conditions expérimentales, l'ajout de l'IL-2 ou de l'IL-15 n'a pas pu empêcher la mort de ces lymphocytes CD57+ (Brenchley et al., 2003).

ii. Les lymphocytes épuisés

L'épuisement décrit un état d'altération et de dégradation des fonctions d'un lymphocyte T. L'épuisement survient au sein des lymphocytes ayant précédemment eu des fonctions effectrices et dont le TCR est continuellement stimulé. Ainsi, les fonctions du lymphocyte seront progressivement altérées. Différents récepteurs d'inhibition sont surexprimés par les lymphocytes T épuisés, tels que : *cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4* (CTLA-4) et *programmed cell death* (PD1). Parmi ces récepteurs, c'est l'expression de PD-1 qui est le marqueur caractéristique des lymphocytes T épuisés. En effet, tandis que CTLA-4 est exprimé lors de l'activation des lymphocytes T naïfs, l'expression de PD-1 est transitoire lors de cette étape et son expression continue témoigne de l'épuisement cellulaire (Catakovic et al., 2017). CTLA-4 agit par compétition en se liant à CD80/CD86, ainsi il empêche la liaison de CD28 et l'activation du lymphocyte T. D'autre part, la liaison de PD-1 à son ligand (PD-L1 ou PD-L2) va entraîner la phosphorylation de son domaine intracellulaire et le recrutement de phosphatases qui vont altérer les voies de signalisation intracellulaire comme les voies PI3K/AKT et Ras. Tandis que PD-L1 est exprimé de façon constitutive par les CPA, PD-L2 est induit sur les macrophages et les cellules dendritiques en présence d'IFNγ, d'IL-4 ou de GM-CSF (*granulocyte monocyte-colony stimulating factor*) (Yamazaki et al., 2002).

iii. Les lymphocytes sénescents capables de prolifération

Au cours d'une stimulation antigénique chronique, des études ont observé que la surexpression de T-bet permettait la répression de récepteurs d'inhibition et définissait une sous-population cellulaire épuisée avec une capacité proliférative et des fonctions effectrices conservées. Ces lymphocytes expriment fortement T-bet et faiblement PD1 ($Tbet^{hi}PD1^{mid}$) (Kao et al., 2011a; Wherry and Kurachi, 2015).

9. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B matures naïfs peuvent rencontrer leur antigène spécifique dans le sang ou dans les organes lymphoïdes secondaires. L'activation des lymphocytes B peut se faire avec l'aide des lymphocytes Th ou sans. Seuls quelques antigènes microbiens sont capables d'activer les lymphocytes B et induire la sécrétion d'anticorps sans nécessiter l'aide des lymphocytes Th. Ce mode d'activation est dit « thymo-indépendant » et permet de produire une RI rapide vis-à-vis des antigènes extracellulaires microbiens. Néanmoins, les anticorps produits suite à une activation thymo-indépendante sont de faible spécificité et de faible affinité antigénique ; il s'agit de l'isotype IgM. Toutefois, une RI efficace nécessite la production d'anticorps de haute affinité.

a. Activation thymo-dépendante des lymphocytes B

Le plus souvent, l'activation des lymphocytes B nécessite l'aide des lymphocytes Th, en particulier les Th2 (activation thymo-dépendante). Cette activation est possible par la présentation du complexe CMH-peptide par les lymphocytes B aux lymphocytes T. Ceci signifie que dans ce contexte, la production d'anticorps dirigés contre un antigène par les lymphocytes B activés va nécessiter au préalable une activation des lymphocytes Th spécifiques de cet antigène. Chez l'homme, moins de 10% des isotypes de type IgM de faible affinité sont retrouvés. Étant donné que l'isotype IgG est très peu sécrété, le plus souvent les anticorps retrouvés ont un isotype commuté de haute affinité suite à l'activation thymo-dépendante. Les anticorps commutés ont un isotype différent.

b. Génération des lymphocytes B de haute affinité

La reconnaissance d'un peptide présenté aux cellules Th par un lymphocyte B va fournir des signaux de prolifération à ce dernier. Parmi ces signaux de prolifération, on retrouve la liaison de CD40 surexprimé par le lymphocyte B activé avec son ligand CD40L exprimé par les Th2 activés et aussi la sécrétion d'IL-4 par les Th2. En périphérie, le développement des lymphocytes B portant des BCR de haute affinité a lieu dans les ganglions lymphatiques et dans la rate. Les lymphocytes B activés vont subir plusieurs phases d'expansion clonale dans les centres germinatifs. Au cours de l'expansion clonale, deux mécanismes majeurs peuvent arriver. Tout d'abord, les lymphocytes B peuvent commuter leur classe isotypique de l'IgM/IgD à l'IgG, l'IgA ou l'IgE.

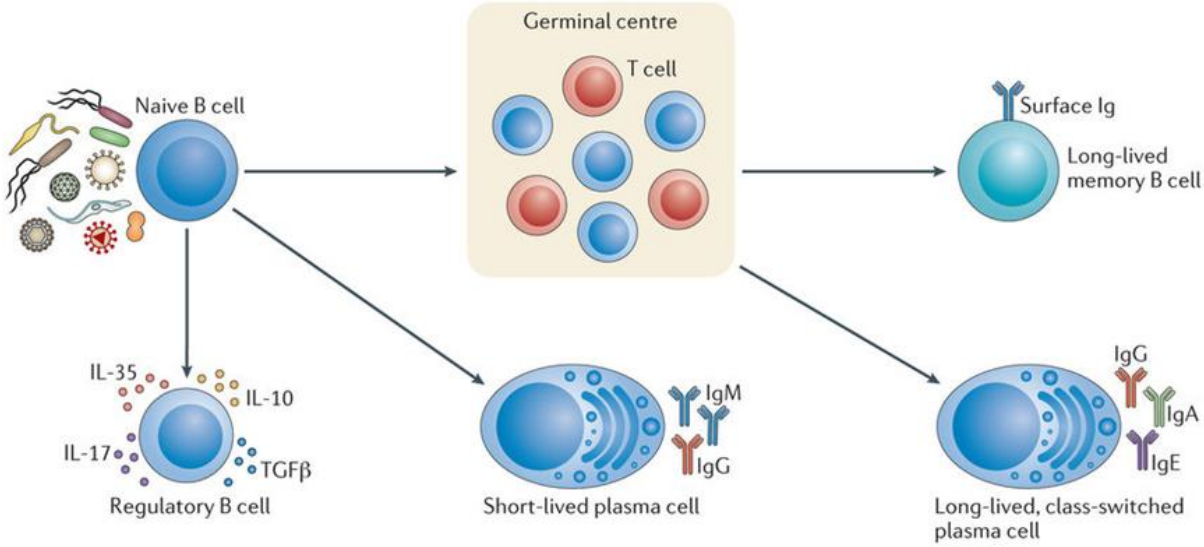


Figure 10 : Étapes de maturation des lymphocytes B (Katarina N. et al, 2015).

Un lymphocyte B naïf peut reconnaitre différents antigènes par son BCR. La rencontre d'un clone lymphocytaire avec son antigène spécifique peut induire deux mécanismes principaux : la production de plasmocytes qui vont sécréter des anticorps de faible affinité ou la migration des lymphocytes B dans les centres germinatifs où ils vont murir leur affinité et se multiplier. Les lymphocytes B ayant subi une maturation d'affinité pour leur antigène dans les centres germinatifs vont pouvoir se différencier par la suite en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité.

D'autre part, le BCR des lymphocytes B peut subir plusieurs hyper-mutations somatiques afin d'augmenter leur affinité pour l'antigène cible. Ces deux mécanismes vont permettre une orientation de spécificité antigène-dépendante et une expansion clonale de lymphocytes B de haute affinité antigénique. Les lymphocytes B sont assistés par les cellules dendritiques et les lymphocytes Tfh. Au cours des hyper-mutations somatiques, la génération de BCR auto-réactifs n'est pas exclue. Ainsi, les lymphocytes T vont sélectionner les clones de lymphocytes B portant des BCR non-auto réactifs et avec une forte affinité antigénique pour poursuivre leur maturation (Carsetti et al., 2004).

c. Maturation des lymphocytes B

Les clones de lymphocytes B sélectionnés pourront poursuivre leur maturation en lymphocytes B mémoires ou devenir des plasmocytes capables de sécréter des anticorps de haute affinité de type IgG, IgA ou IgE. Les lymphocytes B mémoires générés pourront produire une RI humorale rapide et efficace suite à une rencontre ultérieure avec l'antigène. Tandis que l'ensemble des lymphocytes B mémoires sont caractérisés par l'expression de CD27, les plasmocytes le sont par l'expression de CD138. En comparaison aux lymphocytes B naïfs, les lymphocytes B mémoires ont une plus grande taille cellulaire, prolifèrent plus rapidement, sont des meilleures CPA et sont capables de se différencier en plasmocytes sécrétrices d'anticorps (Good et al., 2009). Au cours d'un syndrome d'immunodéficience appelé « Immunodéficience à hyper IgM », les patients ont un taux anormalement élevé d'IgM. Ces patients présentent un défaut d'aide des lymphocytes Th aux lymphocytes B suite à un CD40L non-fonctionnel. Ainsi ces patients souffrent d'une immunodéficience des réponses humorales (Kaminski et al., 2012). La faible sécrétion des IgD explique la prédominance des taux circulants d'IgM (**Figure 10**).

d. Phénotypes mémoires lymphocytaires B

Les différentes populations lymphocytaires B matures et mémoires peuvent être identifiées à l'aide de l'expression de la combinaison du marqueur de lymphocytes B (CD19), du marqueur de B mémoires (CD27) et de l'isotype primitif (IgD). Ainsi, on distingue trois phénotypes majeurs : les lymphocytes B matures naïfs (CD19+ CD27- IgD+), les lymphocytes B mémoires n'ayant pas commuté de classe (CD19+ CD27+ IgD+) et les lymphocytes B mémoires à commutation de classe (CD19+ CD27+ IgD-). Parmi les lymphocytes B mémoires à commutation de classe, l'isotype IgG est le plus abondant (Kaminski et al., 2012).

10. L'auto immunité

L'auto-immunité survient lorsqu'un organisme met en place des RI contre ses propres antigènes. Cet état peut être initié par différents mécanismes génétiques et environnementaux. Néanmoins, le développement et le maintien de mécanismes auto-immuns requièrent une implication des médiateurs de la RI et témoignent d'une défaillance des mécanismes de contrôles immunitaires (PD1, CTLA-4 et les Treg). Ainsi, les MAI ne sont détectables qu'après les phases d'exacerbation des RI contre le soi. Elles peuvent se manifester par des atteintes tissulaires spécifiques (diabète de type 1) ou cibler plusieurs tissus (lupus et myosites). Les thérapies récentes visent majoritairement le renforcement des mécanismes de contrôles immunitaires, en association avec une diminution de l'environnement inflammatoire (Rosenblum et al., 2015).

a. Les mécanismes d'initiation

Étant donné que le plus souvent les MAI se déclenchent bien après la phase d'initiation, il est difficile d'étudier et de préciser la nature des mécanismes d'initiation. Néanmoins, les mécanismes d'initiation de l'auto-immunité sont de plus en plus décrits. L'une des hypothèses est la suivante : suite à des polymorphismes des gènes associés au SI tels que le HLA, les cytokines/récepteurs ou encore des gènes impliqués dans la tolérance immunitaire, le seuil d'activation des lymphocytes T pourrait être réduit. Ainsi, en présence de différents facteurs environnementaux (infectieux, inflammatoires ou autres), le développement de lymphocytes T auto-réactifs ayant échappés aux mécanismes de contrôles immunitaires est possible. Quelques exemples de mécanismes d'initiation seraient :

- **La prédisposition génétique :** L'évaluation de la composante génétique de certaines MAI fréquentes a été possible grâce aux études de concordances sur des jumeaux et aux études de récurrences au sein des fratries. En effet, l'apport de la génétique au cours de MAI telles que la sclérose en plaques, le diabète de type 1 et la PR a été mis en évidence grâce à ces études (Goris and Liston, 2012). Par exemple, des anticorps contre la myéline sont retrouvés dans le liquide cérébrospinal de 19% de frères et sœurs sains de patients atteints de la sclérose en plaques, en comparaison à seulement 4% de sujets sains hors fratrie des patients (Haghighi et al., 2000).

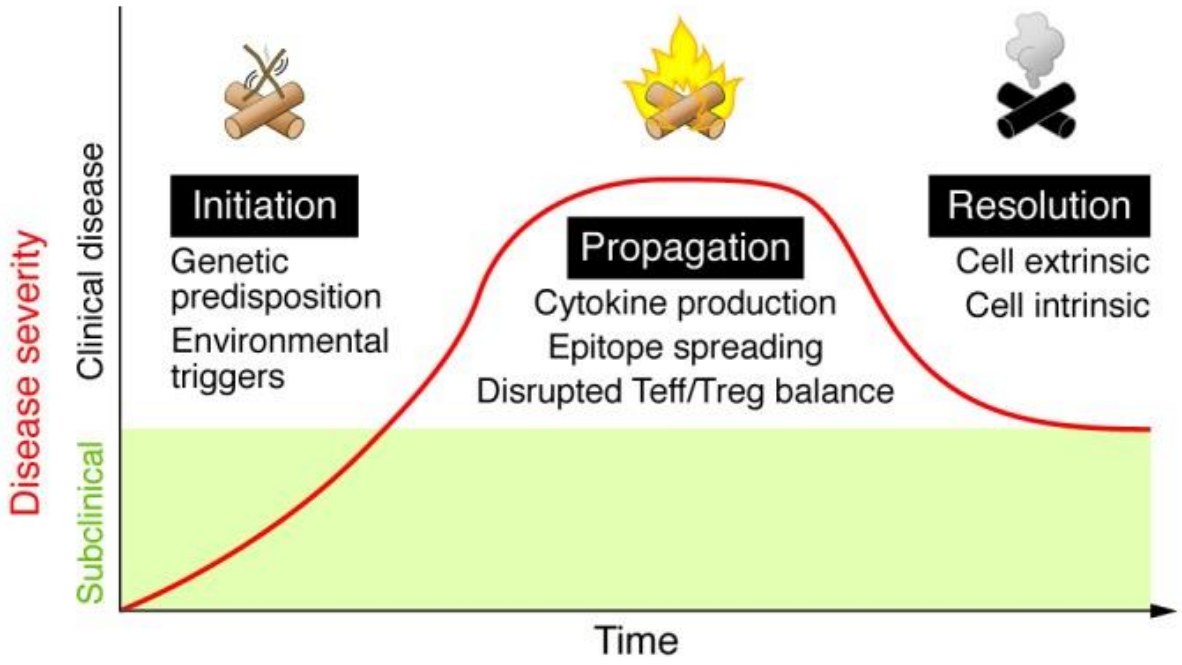


Figure 11 : Les étapes majeures d'une MAI (Rosenblum et al., 2015).

L'apparition d'une MAI nécessite des phases d'initiation et de développement des mécanismes auto-immuns. En présence de mécanismes intrinsèques (mécanismes d'inhibition) et extrinsèques (action des cellules régulatrices), les mécanismes auto-immuns peuvent se résoudre. En absence de ces derniers, la MAI va persister.

De plus, les études pangénomiques d'association ont observées des polymorphismes au sein de différents gènes associés au SI, tels que HLA, CTLA-4 et IL23R, potentiellement en faveur du déclenchement de différentes MAI (Goris and Liston, 2012; Raychaudhuri et al., 2012). En effet, le consortium international de la génétique des myosites a mené une étude de génotypage sur 2566 patients atteints de myosites, incluant 252 patients atteints de la myosite à inclusions (MI). Dans cette étude, 186 *loci* de susceptibilité connus et précédemment identifiés au cours des MAI ont été inclus. Les associations les plus fortes ont été observées avec le HLA, notamment le HLA-DRB1*03 : 01, le HLA-DRB1*01 : 01 et le HLA-DRB1*13 : 01. L'association du HLA-DRB1*03 : 01 avec la dermatomyosite (DM) et la polymyosite (PM) était déjà connue, néanmoins, l'association des deux autres allèles est spécifique aux MI parmi les autres myosites (Rothwell et al., 2016).

D'autres preuves directes du rôle de la génétique dans l'initiation des MAI sont les syndromes IPEX et '*auto-immune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dystrophy*', causés par des mutations au sein des gènes FoxP3 et *auto-immune regulator* respectivement.

- **Les facteurs environnementaux :** Différents facteurs non-génétiques pourraient être impliqués dans l'initiation des mécanismes auto-immuns. Ceci peut être le cas des infections. En effet, une MAI peut apparaitre à la suite d'une infection avec un pathogène qui présente des similarités antigéniques avec des protéines du soi. Ce phénomène est connu sous le nom de mimétisme moléculaire. Ainsi, il est possible que le développement d'anticorps contre le pathogène, entraine aussi une réactivité vis-à-vis des protéines du soi. Ainsi, la protéine du soi concernée va fournir une source permanente d'auto-antigène. Un exemple renforçant cette hypothèse est la mise en évidence de l'existence d'une infection par le virus Epstein-Barr dans le cerveau des patients atteints de la sclérose en plaque après leur mort (Serafini et al., 2007). Outre le mimétisme moléculaire, certains agents infectieux peuvent aussi sécréter des enzymes lytiques à l'origine de modifications protéiques. Ainsi, les protéines modifiées peuvent induire l'activation de lymphocytes T et B auto-réactifs. Au cours de la PR, une infection par la bactérie *Porphyromonas gingivalis* peut induire la glycolyse de l'énolase et la rendre pathogène (Lundberg et al., 2008).

En dehors des causes infectieuses, les modifications structurelles des protéines normalement tolérées par le SI peuvent aussi initier des réponses auto-immunes. Ces modifications peuvent être dû à une dénaturation, à des modifications post-traductionnelles ou encore des mutations (Atassi and Casali, 2008). En effet, au cours de la PR, la consommation de tabac serait en faveur de la citrullination des protéines (modification post-traductionnelle). Il est maintenant bien établit que les peptides citrullinés sont ciblés par des auto-anticorps au cours de la PR. De plus, des études ont observées un risque plus important en faveur du développement de la PR chez les sujets tabagiques (Klareskog et al., 2008).

b. Les mécanismes de développement et de maintien

Seule l'initiation d'un mécanisme auto-immun ne suffit pas à causer une MAI. D'autres mécanismes sont nécessaires pour son développement et son maintien. Ainsi, le concept dit « *epitope spreading* » décrit une diversification de l'épitope initial à l'origine du mécanisme inflammatoire (du soi ou du non soi), vers d'autres épitopes ou d'autres protéines. Cette diversification antigénique serait responsable de l'exacerbation des RI en faveur d'une MAI (Vanderlugt and Miller, 2002). L'observation de diversification antigénique entrainant une réponse lymphocytaire Th1 encéphalogénique a été faite dans des modèles murins de sclérose en plaques (Tuohy et al., 1998). Enfin, la défaillance des mécanismes de tolérance associée à un environnement inflammatoire favorisent le développement de MAI, entrainant ainsi l'activation des lymphocytes T et B auto-réactifs.

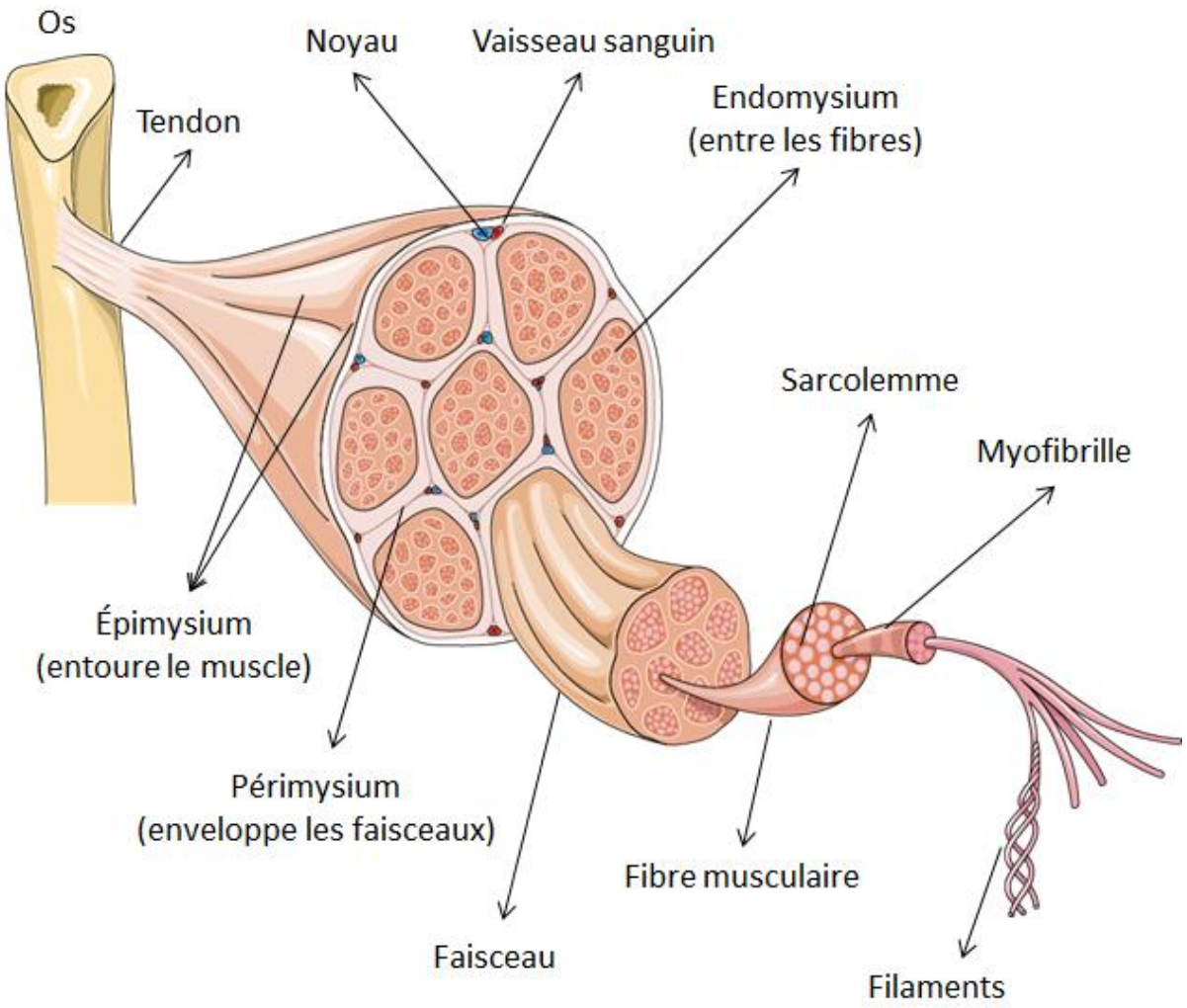


Figure 12 : Structure du muscle squelettique

CHAPITRE II : LE MUSCLE SQUELETTIQUE

1. Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est un muscle strié qui est rattaché aux os par les tendons. Cette configuration permet aux muscles de faire bouger les parties du système osseux auxquelles ils sont rattachés. L'ensemble du muscle est entouré par un tissu conjonctif appelé épimysium. Le muscle est composé de nombreux faisceaux de fibres musculaires, entourés par le périmysium. Chaque faisceau contient des fibres musculaires multi-nucléées, cylindriques, allongées avec des noyaux situés en périphérie des fibres. Chaque fibre musculaire est séparée des autres fibres musculaires par une couche de tissu conjonctif : endomysium. Le contenu cellulaire de chaque fibre est délimité par le sarcolemme qui se situe sous l'endomysium. Le muscle contient aussi quelques adipocytes et des vaisseaux sanguins qui permettent d'alimenter le muscle (**Figure 12**).

2. La régénération musculaire

En cas de lésion tissulaire, le muscle squelettique est capable d'auto-régénérescence. Ce processus requiert l'intervention de différentes cellules myogéniques, principalement les cellules satellites et de cellules réparatrices comme les macrophages. La régénération musculaire peut être décrite en deux étapes :

- **La dégénérescence musculaire :** Cette première étape de dégénérescence correspond à une nécrose des fibres musculaires, accompagnée de la présence des macrophages pro-inflammatoires (de type M1) au sein des fibres musculaires nécrotiques. Ces macrophages pro-inflammatoires ont pour rôle de créer un environnement inflammatoire qui va leur permettre de phagocyter les débris tissulaires (sécrétion d'IFNγ et de TNF-α). Pendant ce temps, les cellules satellites s'activent en réponse à la lésion musculaire et se mettent à proliférer.
- **La régénérescence musculaire :** Des études montrent qu'à partir du 3ème jour après la lésion tissulaire, les macrophages pro-inflammatoires vont changer de phénotype et devenir macrophages anti-inflammatoires (de type M2) avec un fort potentiel de prolifération. Les macrophages de type M2 vont favoriser la régénération musculaire par la sécrétion de cytokines myogéniques telles que l'IL-4 et le TGF-β.

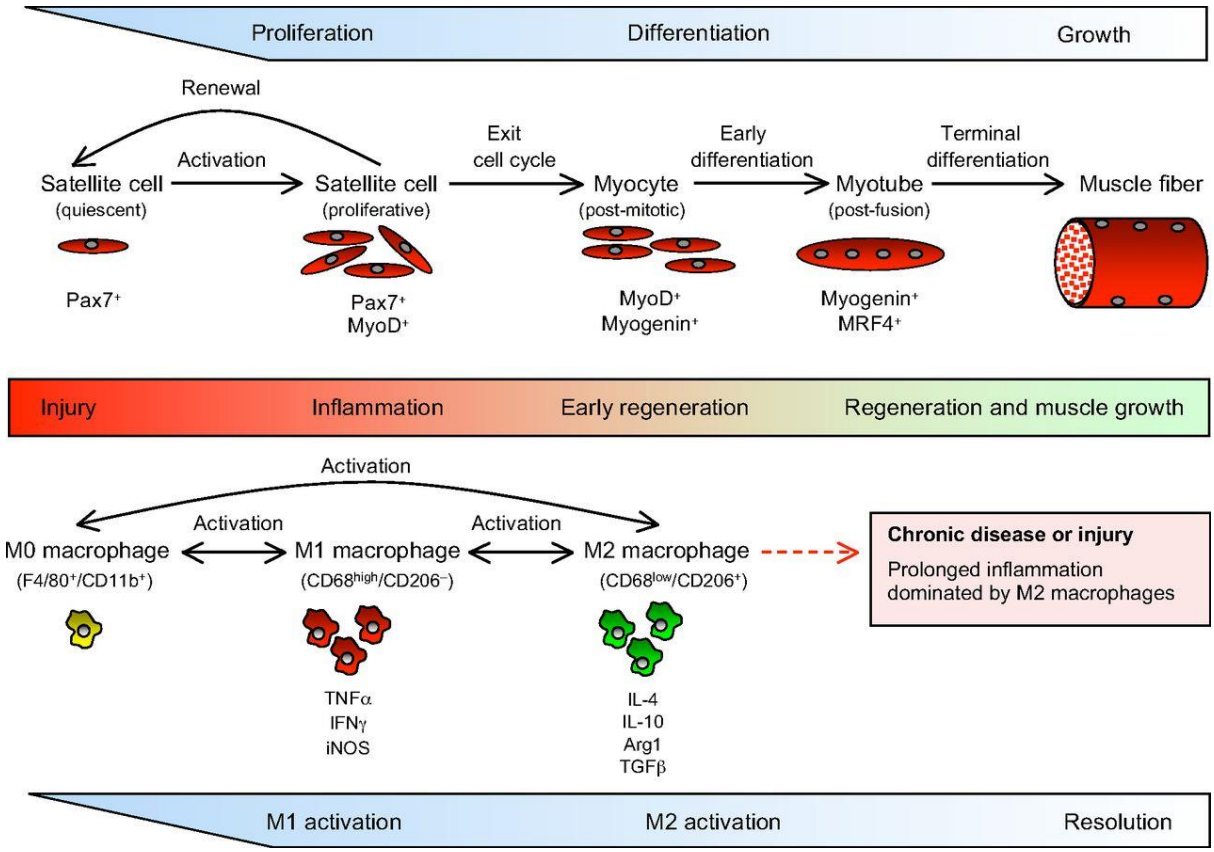


Figure 13 : Processus de la régénération musculaire (Tidball et al., 2014)

Suite à une lésion musculaire, deux acteurs principaux interviennent pour l'élimination des cellules lésées et la réparation du muscle : les cellules satellites et les macrophages. L'environnement inflammatoire crée par la lyse musculaire va favoriser l'activation des cellules satellites quiescentes. Ces derniers vont s'activer, proliférer et fusionner avec les fibres lésées pour les réparer, ou créer de nouvelles fibres pour les remplacer. Par ailleurs, l'environnement inflammatoire va aussi induire des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) qui vont phagocyter les débris tissulaires. Afin de favoriser la réparation musculaire, les macrophages de type M1 vont devenir des macrophages de type M2 (anti-inflammatoire). Ces derniers vont sécréter des cytokines myogéniques en faveur de la prolifération musculaire.

Ces cytokines vont stimuler la croissance et la différenciation des cellules satellites de façon dose-dépendante (Chazaud et al., 2007). Les cellules satellites vont croître, se différencier et fusionner entre elles pour donner de nouvelles fibres musculaires. Les cellules satellites peuvent aussi fusionner avec les fibres musculaires lésées pour les réparer (Tidball et al., 2014) (**Figure 13**).

Tableau 1 : Évaluation des critères diagnostiques des PM et DM par Bohan et Peter	
Faiblesse musculaire symétrique des muscles des membres	Très simple
Augmentation du taux d'enzymes musculaires	Le plus fréquemment utilisé
Détection de myopathie par électromyogramme (EMG)	Très sensible
Mise en évidence d'infiltrats inflammatoires sur biopsie musculaire	Le moins spécifique
Lésions cutanées en cas de DM	Valables uniquement pour les D et PM

La première classification des patients atteints de myosites a été faite en 1975 par Bohan et Peter. Cette classification distingue deux groupes sur la base de différents critères. A présent, de nombreux autres groupes de patients atteints de myosites ont été identifiés. Sur cette base, on peut évaluer les critères diagnostiques de Bohan et Peter.

CHAPITRE III : LES MYOSITES

1. Définition

Les myopathies inflammatoires auto-immunes, communément appelées « myosites », regroupent un ensemble de maladies aux caractéristiques phénotypiques et pathologiques variables. Les myosites sont des maladies rares qui touchent 6 à 7 personnes sur 100,000. Généralement, les myosites sont caractérisées par une atteinte musculaire, une augmentation du taux d'enzymes musculaires (comme la créatine kinase, CK), la présence de composants inflammatoires au sein du muscle et aussi des atteintes extra-musculaires variables. L'hétérogénéité interindividuelle des patients atteints de myosites a nécessité la classification des patients en groupes homogènes afin d'aider au diagnostic et à la prise en charge.

2. Classification des myosites

a. Classifications clinico-pathologiques

La première classification reconnue des myosites est celle faite par Bohan et Peter en 1975 (Bohan and Peter, 1975). Cette première classification prenait en compte les caractéristiques cliniques et pathologiques telles que l'atteinte musculaire, le taux d'enzymes musculaires et la présence d'inflammation au sein des biopsies musculaires (**Tableau 1**). Ainsi, sur la base de ces différents critères clinico-pathologiques, deux groupes de myosites étaient décrits : les dermatomyosites (DM) et les polymyosites (PM). En 1995, Griggs et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois le groupe des myosites à inclusions (MI), qui se distingue des PM et DM par une présentation clinique particulière et des critères histologiques typiques (Griggs et al., 1995).

b. Classifications cliniques, pathologiques et sérologiques

D'autres classifications ont été décrites, jusqu'à la découverte des anticorps spécifiques des myosites (ASM) à partir du début des années 1970. Parmi les ASM, on retrouve des anticorps dirigés contre les aminoacyl ARN synthétase de transfert (tARN synthétases) tels que Jo1, PL7, PL12, EJ, OJ et les anticorps anti-*signal recognition particle* (SRP). La découverte des ASM a suscité de nouvelles tentatives de classification afin d'obtenir des sous-groupes plus homogènes en tenant compte du statut clinique, pathologique et sérologique (Love et al., 1991).

Tableau 2 : Critères de diagnostic des Myosites du 119ème congrès de l'ENMC (hors MI)				
Pathologie	**Critères cliniques**	**Taux de CK sérique**	**Autres critères biologiques**	**Biopsie musculaire**
MI	Défini selon Griggs et al, (Ann Neurol 1995)	na	na	na
PM	Tous les signes cliniques sauf l'éruption	élevé	na	Inclus a et exclu c, d,h,i
DM	Tous les signes cliniques sauf l'éruption	na	EMG normale	inclus c
DM Amyopathique	Éruption sans faiblesse musculaire	normal	na	Si réalisée, n'inclus aucune caractéristique des DM
Myosite de chevauchement	Tous les signes cliniques sauf l'éruption	normal	1 parmi les 3	inclus e ou f et exclu tous les autres
MNAI	Tous les signes cliniques sauf l'éruption	élevé	1 parmi les 3	inclus g et exclu tous les autres

Critères cliniques :
a) Début de la maladie après 18 ans. Elle peut se déclencher dans l'enfance pour les DM et les myosites de chevauchement
b) Début non aigue de la maladie
c) Atteinte musculaire : symétrique proximale>distale, fléchisseurs du cou>extenseurs du cou
d) Éruption typique des DM : violacée, œdème, papules violacées (papules de Gottron)

Biopsie musculaire :
a) Infiltrats inflammatoires endomysiaux (lymphocytes T) qui entourent et envahissent les fibres non-nécrotiques
b) Infiltrats inflammatoires CD8+ endomysiaux qui entourent mais n'envahissent pas les fibres non-nécrotiques ou surexpression du CMH de type I
c) Atrophie péri fasciculaire des fibres musculaires
d) Déposition du complément sur les vaisseaux ou diminution de la densité capillaire ou surexpression du CMH de type I
e) Infiltrats inflammatoires au sein des vaisseaux
f) Infiltration endomysiale dispersée des CD8+, sans envahissement ni infiltration des fibres musculaires
g) Présence caractéristique de nombreux fibres musculaires nécrotiques, avec peu d'infiltrats inflammatoires. Peu ou pas de déposition de complément sur les vaisseaux
h) Vacuoles bordées
i) Déposition du complément sur le sarcolemme des fibres non-nécrotiques et d'autres indications de dystrophies musculaires avec pathologie immunitaire

Autres critères biologiques :
a) Électromyographie anormale
b) Œdème au sein du muscle, révélé par l'imagerie musculaire
c) Présence d'anticorps spécifique des myosites dans le sérum

C'est ainsi qu'en 2004, une nouvelle classification a été validée suite au 119ème congrès du *European Neuromuscular Congress* (ENMC) (Hoogendijk et al., 2004). Cette classification distingue : les PM, les DM myopathiques, les DM amyopathiques, les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) et les myosites de chevauchement. Les caractéristiques immunologiques retenues à l'époque et qui permettaient de distinguer chaque groupe étaient :

- **PM :** Une réponse immunitaire à médiation cellulaire, caractérisée par la surexpression des molécules du CMH de type I par les fibres musculaires et la présence d'infiltrats lymphocytaires à prédominance T CD8+ autour des fibres musculaires non-nécrotiques. Cette RI est commune avec la MI et remet en question le concept de PM.
- **DM :** La présence d'une myopathie vasculaire qui se manifeste par la présence d'inflammation autour des vaisseaux, des lésions des fibres musculaires dues à une diminution de l'apport de sang par les vaisseaux (ischémie) et le dépôt de complément dans la lumière des capillaires endomysiaux entraînant une angiopathie.
- **MNAI :** La présence de nécrose musculaire avec peu ou pas d'inflammation.
- **Myosite de chevauchement :** Ce groupe concerne les myosites n'appartenant à aucun groupe précédemment décrit (hors MI). Ce groupe est caractérisé par la présence de différentes atteintes extra-musculaires avec la présence ou non d'anticorps anti-aminoacyl tARN synthétases.

Il est important de noter que la MI n'était pas prise en compte dans la classification du 119ème congrès de l'ENMC (**Tableau 2**). Néanmoins pour la MI, sur la base des critères de Griggs (Griggs et al., 1995) et de diverses publications consécutives, les critères diagnostiques et de classification ont été revus en 2013 lors du 188ème congrès de l'ENMC dédié aux MI ((Rose and ENMC IBM Working Group, 2013). Cette dernière classification a été validée par Lloyd en 2014. (Lloyd et al., 2014).

Par la suite, la découverte progressive et continuelle de différents ASM tels que les anti-*Melanoma differentiation-associated protein 5* (*MDA5*), les anti-hydroxyméthylglutaryl-coA Réductase (HMGCR), d'autres anticorps anti-aminoacyl tARN synthétase et des anticorps associés aux myosites comme le *cytosolic 5' nucleotidase* (CN1A) a suscité de nouvelles tentatives de classification plus spécifiques.

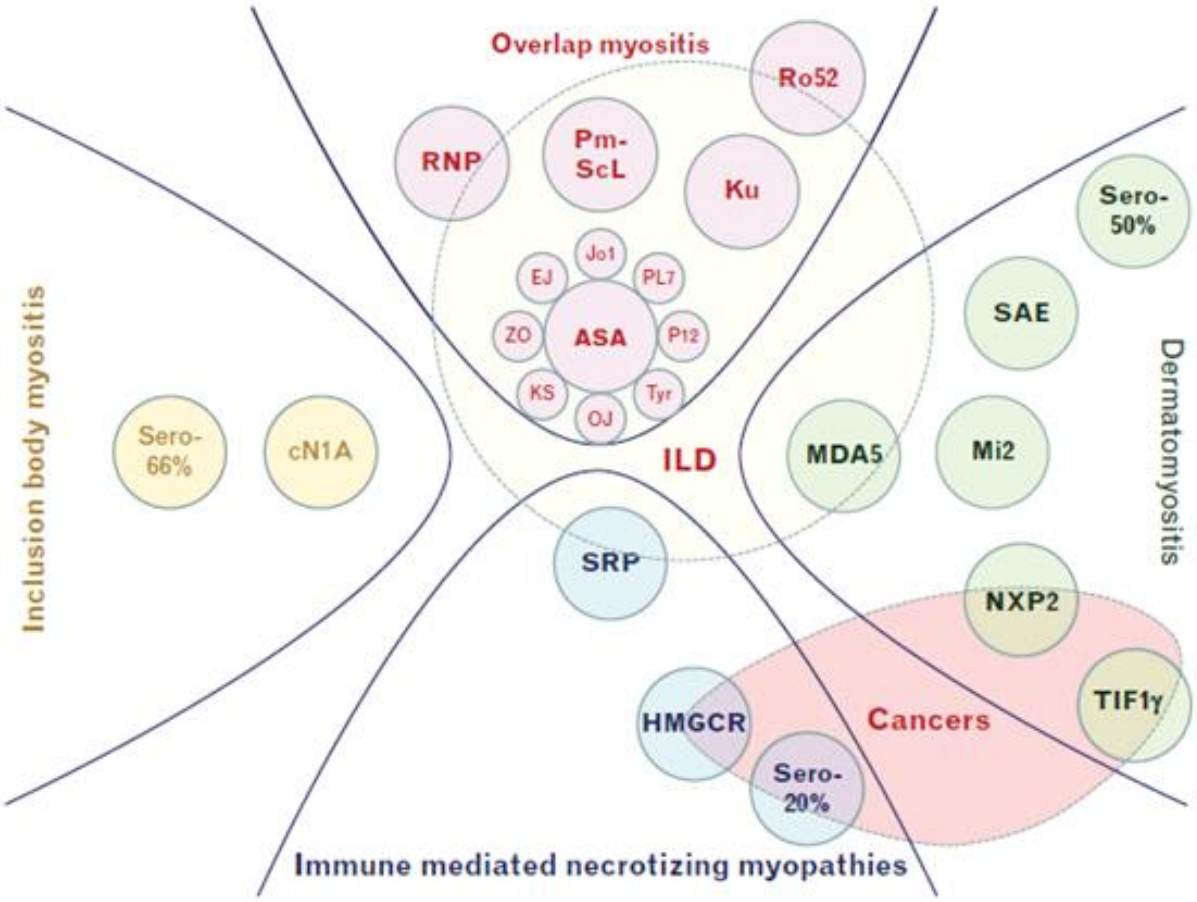


Figure 14 : Classification des myosites selon les critères cliniques, pathologiques et sérologiques (Benveniste et al., 2016).

Cette proposition de classification des patients atteints de myosites prend en compte non seulement les caractéristiques cliniques, mais aussi le statut sérologique (présence d'autoanticorps). Ainsi, l'on distingue 4 groupes principaux de patients : MI, MNAI, myosites de chevauchement et DM. Il est important de souligner le fait qu'un sous-groupe se distingue au sein du groupe de « myosites de chevauchement », par la présence d'anticorps dirigés contre les synthétases : le syndrome des anti-synthétases (SAS).

Étant donné que le groupe de PM présente peu de caractéristiques propres (groupe hétérogène), ces nouvelles propositions de classification suggèrent qu'il ne constitue plus désormais un sous-groupe de patients en soi car trop hétérogène. Ainsi, une proposition de classification récente des patients atteints de myosites distingue 4 groupes sur la base des caractéristiques cliniques, pathologiques et sérologiques : la MI, les myosites de chevauchement, les MNAI et les DM (Benveniste et al., 2016). Cette classification proposée exclue donc le groupe de PM (**Figure 14**).

Suite à la publication du 119ème groupe de travail de l'ENMC, les MNAI ont été définies comme un groupe de patients qui présentent peu de manifestations extra-musculaires et une biopsie musculaire caractérisée par la présence de fibres musculaires en nécrose avec peu ou pas d'inflammation. La particularité du groupe des MNAI est la présence des anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR qui lui sont spécifiques. Néanmoins, l'observation d'infiltrats inflammatoires dans les biopsies musculaires et la présence de signes extra-musculaires a permis de revoir la définition et la classification des patients précédemment classés comme des MNAI. En effet en 2017, suite à plusieurs consensus sur la définition ainsi que sur le diagnostic clinique et pathologique des MNAI, il a été décidé que les MNAI sont hétérogènes. Trois sous-groupes distincts sont ainsi décrits : les myopathies anti-HMGCR, les myopathies anti-SRP et les MNAI sans anticorps (Allenbach et al., 2018).

Il est important de noter que tandis que les MI, les myopathies anti-HMGCR, les myopathies anti-SRP, les MNAI sans anticorps et les DM constituent des groupes globalement homogènes de patients, le groupe des myosites de chevauchement reste hétérogène. En effet, les myosites de chevauchement regroupent un ensemble de maladies qui présentent des atteintes extra-musculaires telles que l'arthrite, le syndrome de Raynaud, des lésions cutanées plus ou moins spécifiques (mains de mécanicien), des atteintes interstitielles pulmonaires et/ou des signes généraux (fièvre, syndrome inflammatoire). Ainsi, au sein du groupe de myosites de chevauchement, on peut retrouver des patients qui présentent en plus d'une myosite, d'autres maladies répondant aux critères diagnostic de l'ACR/EULAR, telles que la PR, le lupus systémique (LS), la sclérodermie et/ou le syndrome de Sjögren (SS) (Balbir-Gurman and Braun-Moscovici, 2011; Váncsa et al., 2010). Néanmoins, un sous-groupe de patients se distingue par des caractéristiques clinico-

sérologiques plutôt homogènes au sein du groupe des myosites de chevauchement ; il s'agit du syndrome des anti-synthétases (SAS).

Pour la suite de notre rapport, nous allons nous focaliser sur la MI, le SAS, les myopathies anti-HMGCR et les myopathies anti-SRP qui constituent des sous-ensembles relativement homogènes de patients atteints de myosites.

.

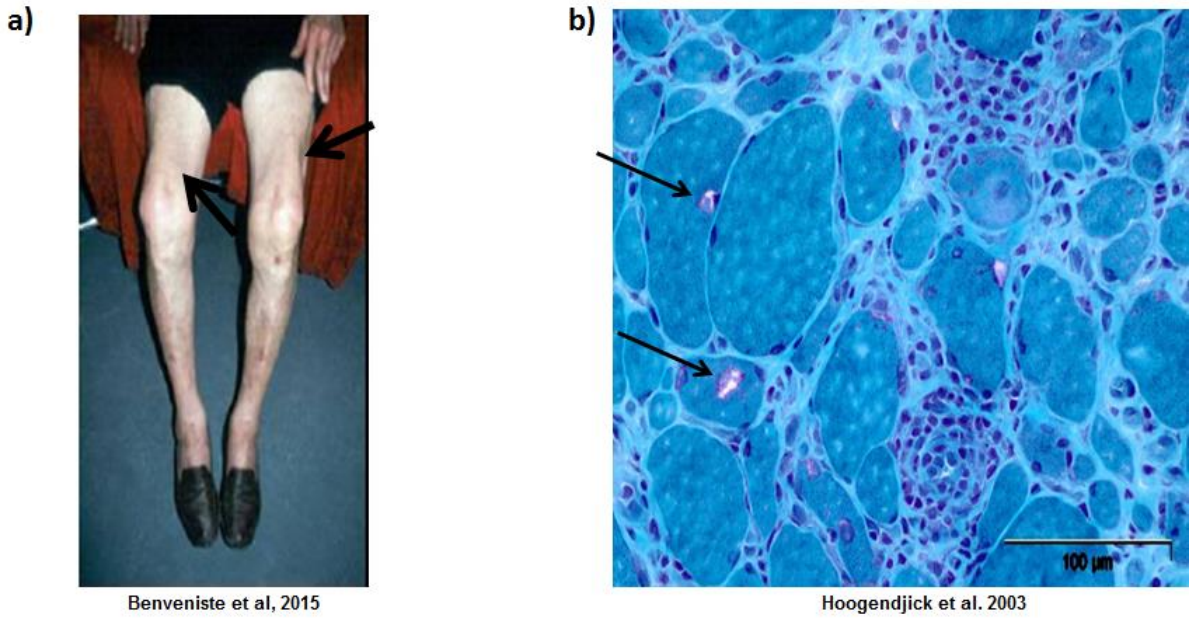


Figure 15 : Caractéristiques cliniques et pathologiques de la MIs

a) Atteinte symétrique des membres inférieurs d'un patient de 75 ans atteint de la MIs. Les flèches indiquent l'atrophie des quadriceps. **b)** Biopsie musculaire d'un patient atteint de MIs. On observe la présence d'infiltrats de cellules mononuclées entourant les fibres musculaires. Les flèches indiquent la coprésence de vacuoles bordées contenant des agrégats protéiques. Coloration d'hématoxyline éosine et Trichrome gomori.

3. La myosite à inclusions (MI)

La MI est une maladie auto-immune et dégénérative rare. Il existe deux formes : la forme héréditaire et la forme sporadique. La forme héréditaire de la MI étant très rare et généralement non-inflammatoire, nous l'excluons. Dans le cadre de ce rapport, nous allons donc discuter uniquement de la forme sporadique de la MI (MIs). La MIs est la plus fréquente des myosites au-delà de l'âge de 50 ans. Des études ont rapporté une prévalence pouvant aller de 4,3 à 9,3 personnes sur 1 million de personnes dans la population générale. Cette prévalence de la MIs peut atteindre 51,3 sur 1 million chez les individus de plus de 50 ans (Benveniste et al., 2011a; Needham et al., 2008). La MIs a une prédominance masculine avec un ratio homme-femme de 3 : 1 (Lotz et al., 1989).

a. Caractéristiques cliniques de la MIs

L'évolution de la maladie est lente et progressive, ainsi elle entraîne une perte progressive de la qualité de vie des patients pouvant conduire, à long terme, à l'utilisation du fauteuil roulant. D'un point de vue clinique, la MIs se distingue par un déficit musculaire proximal et distal, pouvant être symétrique ou non (**Figure 15a**). La maladie touche le plus souvent les fléchisseurs de l'avant-bras, les quadriceps voire les tibiaux antérieurs, avec une perte progressive de la masse musculaire (atrophie) en regard. C'est la raison pour laquelle de nombreux patients auront du mal à utiliser leurs clés, à monter des escaliers et feront des chutes fréquentes. En dehors des limitations cliniques à la marche et à l'utilisation des doigts et des bras, on note aussi des atteintes plus sévères pouvant mettre en danger la vie des patients comme la dysphagie et les troubles respiratoires (Sekul and Dalakas, 1993). La dysphagie concerne environs 60% de patients atteints de MIs (Cox et al., 2009; Dalakas, 2006).

b. Caractéristiques histopathologiques de la MIs

Les biopsies musculaires de patients atteints de MIs sont caractérisées par la co-implication de mécanismes inflammatoires et dégénératifs. D'un point de vue inflammatoire, la présence de cellules mononucléées infiltrant les fibres musculaires non-nécrotiques est observée. Par ailleurs, il existe aussi une coprésence de dépôts intracellulaires de protéines de la dégénérescence telle que l'amyloïde-β et des vacuoles bordées (**Figure 15b**).

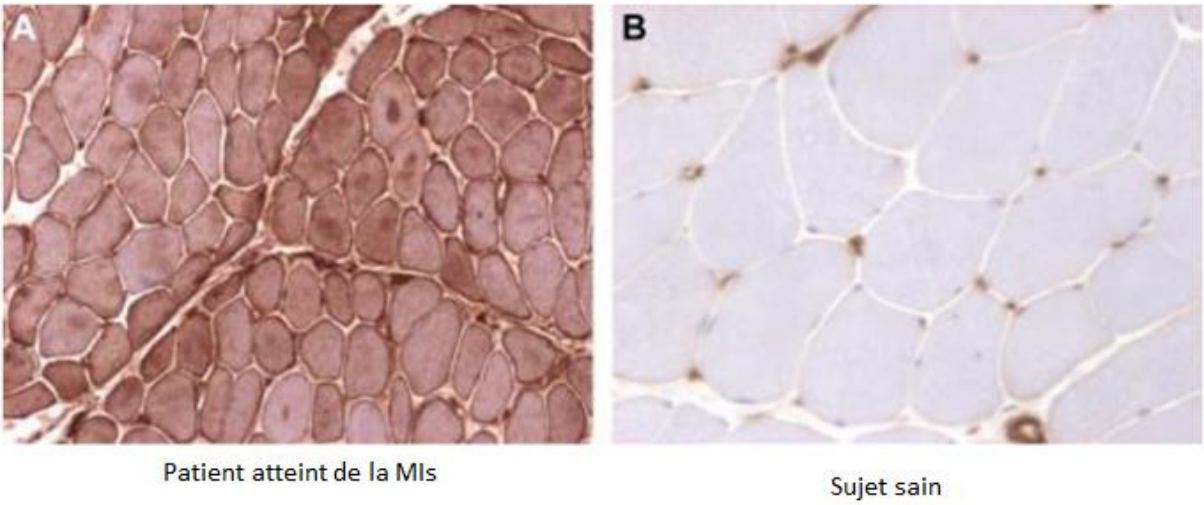


Figure 16 : Surexpression des molécules du CMH de type I chez les patients atteints de MIs (Benveniste, 2014).

Ainsi, sur la base de 3 critères cliniques et histopathologiques typiques, le diagnostic d'un patient atteint de MI peut être retenu devant (Lloyd et al., 2014) :

- Une faiblesse musculaire des fléchisseurs des doigts ou des quadriceps.
- La présence de cellules inflammatoires qui infiltrent les fibres musculaires non-nécrotiques.
- La présence d'agrégats protéiques et/ou de vacuoles bordées dans les fibres musculaires non-infiltrées.

c. Physiopathologie de la MIs

La MIs est caractérisée par la co-implication de mécanismes auto-immuns et dégénératifs, néanmoins le mécanisme pathologique à l'origine de la maladie n'est pas connu. De nombreux arguments sont en faveur d'un développement de la maladie à partir de mécanismes auto-immuns. L'hypothèse serait la suivant : suite à une inflammation au sein du muscle, l'environnement inflammatoire enrichi en chimiokines et en cytokines va favoriser le recrutement de lymphocytes, de macrophages et la surexpression des molécules du CMH de type I par les fibres musculaires. L'ensemble de ces mécanismes va entraîner une agression des fibres musculaire par les cellules inflammatoires et une perte de la masse musculaire. L'accumulation d'agrégats protéiques au sein des fibres musculaires serait secondaire à ce phénomène inflammatoire, néanmoins il peut aussi l'aggraver (Benveniste et al., 2015). Cette accumulation protéique peut être due à un dysfonctionnement des systèmes de dégradation protéique, pouvant être liée à l'âge ou à une prédisposition génétique. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une étude a observé que la présence de vacuoles contenant des agrégats protéiques était plus fréquente chez les patients MIs âgés (74 ans VS 66 ans, p=0,04). De plus, la progression de la maladie n'était pas différente entre les patients présentant des agrégats protéiques ou non (Brady et al., 2013).

i. Rôle des lymphocytes T CD8+ au cours de la MIs

Au cours de la MIs les fibres musculaires des patients sur-expriment anormalement les molécules du CMH de type I par rapport aux conditions physiologiques (**Figure 16**). Cette surexpression des molécules du CMH de type I est accompagnée d'un infiltrat inflammatoire de cellules mononucléées riche en lymphocytes T CD8+ et macrophages au sein du muscle squelettique strié (Bandura et al., 2009; Dalakas, 2012). De nombreuses études ont mis en évidence la sécrétion de perforine et de granzyme par les lymphocytes T CD8+ infiltrant le

muscle des patients (Mastaglia, 2008). Suite à cela, la recherche sur la compréhension des mécanismes pathologiques impliqués au cours de la MIs s'est orientée vers le rôle des lymphocytes T CD8+ au cours de la maladie. Tout d'abord, des études de séquençage des TCR des lymphocytes T infiltrant le muscle ont permis de mettre en évidence une expansion clonale et une diversité restreinte de leur répertoire (Müntzing et al., 2003). La question posée par la suite était de savoir si la diversité des TCR des lymphocytes T infiltrant le muscle pouvait être observée en périphérie dans le sang des patients. C'est ainsi que des études de clonage et de séquençage des TCR des lymphocytes T ont identifié une perturbation similaire du répertoire lymphocytaire T CD8+ circulant et infiltrant le muscle chez les patients atteints de MIs en comparaison aux patients atteints de DM et de sclérodermie systémique (Dimitri et al., 2006). Cette perturbation se traduit par une diversité non-gaussienne des TCR, témoignant d'une expansion oligoclonale et d'une activation des lymphocytes T CD8+ chez les patients atteints de MIs. Ces observations suggèrent la présence d'un ou seulement de quelques auto-antigènes d'origine musculaires, à l'origine des phénomènes auto-immuns observés chez les patients. Dans cette étude, la DM avait servi de contrôle parce qu'une étude précédente avait démontré l'absence de perturbation au sein du répertoire TCR chez les patients atteints de DM (Benveniste et al., 2011a). Par conséquent, il est possible que la surexpression du CMH de type I par les fibres musculaires des patients atteints de MIs leur confère la capacité d'agir comme des CPA et de présenter de manière aberrante des auto-antigènes musculaires aux lymphocytes T CD8+ infiltrant le muscle et retrouvés ensuite dans la circulation périphérique.

Par ailleurs, des travaux réalisés au sein de notre équipe de recherche ont mis en évidence une augmentation des phénotypes T_{TEMRA} CD8+ chez les patients atteint de MIs en comparaison aux sujets sains. En plus de cela, cette étude a mis en évidence une augmentation d'un phénotype lymphocytaire T CD8+ CD28- capable de sécréter de fortes doses d'IFNγ après re-stimulation in vitro (Allenbach et al., 2014a). Plus tard, une autre équipe de recherche a observé une fréquence augmentée de lymphocytes granulocytaires larges (*large granular lymphocytes*, LGL) de type CD8+ exprimant fortement le CD57 chez les patients atteints de MIs en comparaison aux sujets sains. Ce phénotype lymphocytaire LGL CD8+ CD57+ était aussi présent dans le muscle des patients et absent chez les sujets sains (Greenberg et al., 2016).

ii. Rôle de la RI humorale au cours de la MIs

Récemment, deux équipes ont découvert la présence d'anticorps anti-CN1A chez les patients atteints de MIs (Larman et al., 2013; Pluk et al., 2013). La découverte des anticorps anti-CN1A était la première preuve d'une possible implication des lymphocytes B dans la physiopathologie de la MIs. Ainsi de nombreuses études ont cherché à valider la présence de ces anticorps dans leur cohorte de patients MIs en comparaison à d'autres maladies auto-immunes. Cependant, en moyenne les anticorps anti-CN1A sont présents uniquement chez ~ 35% des patients atteints de MIs. De plus, on retrouve aussi les anticorps anti-CN1A dans d'autres pathologies auto-immunes telles que le lupus systémique (20%) et le syndrome de Sjögren (36%) (Herbert et al., 2016). Récemment, une étude a mis en évidence la présence d'agrégats de protéines de la dégénérescence telle que p62 dans le muscle de souris à qui on avait préalablement injecté des IgG anti-CN1A de patient sIBM (Tawara et al., 2017). Néanmoins, cette étude présente deux limites : tout d'abord la présence de LTC qui sont majoritairement observés au cours de la MIs n'a pas été mise en évidence, ensuite les anticorps anti-CN1A ne concerne que 35% de patients atteints de MIs. On pourrait donc penser que la surexpression de p62 peut être due au stress subi par les souris en réponse aux IgG humains anti-CN1A. En conclusion, les anticorps anti-CN1A ne sont pas des ASM, mais des anticorps associés aux myosites et leur implication directe au cours de la MIs reste à démontrer.

d. Prise en charge des patients atteint de MIs

L'évaluation d'un traitement efficace chez les patients atteints de MIs peut se faire selon les paramètres suivants, sans qu'aucun ne fasse totalement consensus à ce jour :

- Une mesure de la force musculaire par myométrie afin de déceler une éventuelle augmentation de la force musculaire.
- L'utilisation d'échelles fonctionnelles, par exemple le *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) qui évalue le fonctionnement de 9 activités quotidiennes (Rider et al., 2011).
- Une mesure du pourcentage de remplacement de la masse musculaire par du tissu adipeux peut être évaluée par imagerie à résonance magnétique (IRM).
- Une mesure de la distance de marche pendant une durée déterminée (par exemple 6 minutes).

- Une évaluation de la capacité du patient à monter l'escalier (effort fourni, temps, nécessité ou pas d'une aide).
- Finalement, une biopsie musculaire peut aussi permettre d'évaluer la présence d'inflammation ou de vacuoles contenant des agrégats protéiques.

Considérant l'activation du SI chez les patients atteints de myosites, de nombreuses études cliniques ont testé l'efficacité de différents immunosuppresseurs conventionnellement utilisés au cours des maladies auto-immunes. Au cours d'une étude randomisée en double aveugle sur une cohorte de 44 patients atteints de MIs (traités *versus* placebo), le méthotrexate, qui est un puissant IS, a eu un premier échec pour des doses allant de 5 à 20 mg/semaine pour une durée de traitement supérieure à 48 semaines (Badrising et al., 2002). La résistance des patients atteints MIs aux corticoïdes a aussi été démontrée (Rutkove et al., 2002). En 2011, une étude incluant une large cohorte de 136 patients atteints de MIs a démontré que les patients sous corticoïdes (prednisone) en association ou non avec le méthotrexate pour une durée médiane de 40,8 mois présentaient une faiblesse musculaire plus importante (Benveniste et al., 2011a).

Des traitements par immunothérapie ont aussi été testés chez les patients atteints de MIs. Néanmoins ces derniers ont eu peu de succès suite au manque d'amélioration clinique ou parfois une faible amélioration à court terme chez certains (Zschüntzsch et al., 2012). En effet au bout de 12 mois de traitement de patients atteints de MIs avec l'Étanercept (anticorps monoclonal anti-TNF α), une faible amélioration de la force des fléchisseurs des doigts a été observée (Barohn et al., 2006). En revanche aucune amélioration n'a été observée avec l'Anakinra (antagoniste de l'Il1R) (Kosmidis et al., 2013). Compte tenu de l'avancée de la compréhension des mécanismes pathologiques impliqués au cours de la MIs, d'autres études cliniques sont en cours (Needham and Mastaglia, 2016a).

L'efficacité d'une molécule immuno-modulatrice appelé Rapamycine a été testée dans un modèle murin de myosite induite par une injection d'homogénat musculaire enrichi en myosine. Dans ce modèle expérimental, les souris injectées présentaient des infiltrats inflammatoires au sein du muscle avec une faiblesse musculaire. Le traitement avec la Rapamycine a permis de réduire sélectivement les lymphocytes T non-Treg et d'améliorer la force musculaire (Prevel et al., 2013). C'est ainsi qu'en 2017, une étude clinique prospective,

mono-centrique et en double aveugle « RAPAMI » a testé pour la première fois l'effet de la Rapamycine sur une cohorte de 44 patients atteints de MIs (traités *versus* placebo). Une amélioration des paramètres cliniques des patients a été démontrée douze mois après le début du traitement, par exemple l'amélioration de la distance de marche pendant 6 minutes et une diminution du remplacement de la masse musculaire par du tissus adipeux (Benveniste O et al, résultats préliminaires).

.

4. Le syndrome des anti-synthétases (SAS)

Les ASM permettent non seulement de mieux classifier les patients, mais servent aussi de marqueur pronostique de traitement pour les sous-groupes homogènes de patients. Le SAS est caractérisé entre autre par la présence d'une myosite, d'une atteinte pulmonaire pouvant concerner environ 80% des patients et d'anticorps de haute affinité de type IgG dirigés contre les aminoacyl tARN synthétases (Jordan Greco et al., 2007; Malik et al., 2016). Tandis que la sévérité de la myopathie peut être très variable, l'atteinte pulmonaire est la première cause de décès chez les patients atteints de SAS (Patel and Lauder, 2011). D'autres manifestations telles que le phénomène de Raynaud (60%), la polyarthrite (60%), des lésions cutanées de la main typiques appelés main de mécanicien (60%) et la fièvre sont également fréquentes. Le SAS est 2 à 3 fois plus fréquent chez la femme que chez l'homme, avec un âge moyen de début de la maladie entre 43 et 60 ans (Legout et al., 2002). Le SAS représente un groupe plus ou moins homogène de patients, néanmoins le phénotype clinique peut varier selon l'anticorps présent. Au total 8 anticorps dirigés contre les aminoacyl tARN synthétases ont été identifiés, entre autre les anti-Jo1, les anti-PL7 et les anti-PL12 (Cojocaru et al., 2016). Généralement, le sérum de chaque patient contient un seul anticorps anti-synthétases, néanmoins cinq anticorps ont déjà été retrouvés dans le même sérum (Climent-Albaladejo et al., 2002). Les anticorps anti-Jo1 sont les plus connus du sous-groupe et sont présents chez 20-30% des patients avec un SAS.

La protéine Jo1 est une histidyl tRNA sythétase. L'anticorps anti-Jo1 tient son nom d'après un patient nommé John P qui a été diagnostiqué d'une PM avec une atteinte pulmonaire en 1980. Chez les patients avec des anticorps anti-Jo1, l'apparition du phénomène de Raynaud est le plus souvent précoce et peut être un signe annonciateur de la maladie. Une étude multicentrique incluant 233 patients atteints du SAS a été menée en France en 2012, afin de distinguer des sous-groupes de patients en fonction de différents critères cliniques et biologiques. Cette étude a inclus les patients qui présentaient les anticorps suivants : anti-Jo1, n=160, anti-PL7, n=25 et anti-PL12, n=48 (Hervier et al., 2012). Une analyse par composante principale (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des patients afin de distinguer des sous-groupes homogènes sur la base de différents caractéristiques cliniques et biologiques telles que : le sexe, l'âge, l'atteinte musculaire (douleurs), la faiblesse musculaire, l'atteinte pulmonaire, les difficultés respiratoires, le phénomène de Raynaud, les mains de mécanicien, le taux sérique de CK et la présence des anticorps anti-

synthétases. Trois « clusters » de patients ont été identifiés. Tandis que le *cluster* 1 regroupait 86% des patients avec les anticorps anti-Jo1, le *cluster* 2 réunissait 96% des patients avec les anticorps anti-PL12 et anti-PL7 et seulement 4% des anti-Jo1. Le cluster 3 quant à lui avait un faible pourcentage des 3 catégories de patients. La faiblesse musculaire, le taux sérique de CK et l'atteinte musculaire était plus important au sein du *cluster* 1. En revanche, l'atteinte pulmonaire était plus fréquente au sein des *clusters* 2 et 3 (88% et 80% respectivement, vs 67% pour le cluster 1). Cette étude multicentrique a démontré que les patients présentant les anticorps anti-PL7 et anti-PL12 étaient plus proches entre eux, par rapport aux patients présentant les anticorps anti-Jo1. Elle a aussi confirmé sur la base d'une large cohorte, le fait que les patients avec des anticorps anti-Jo1 présentent non seulement une myosite importante, mais aussi une atteinte pulmonaire sévère (Hervier et al., 2012).

a. Physiopathologie du SAS associé aux anticorps anti-Jo1

Les mécanismes pathologiques impliqués au cours du SAS associé aux anticorps anti-Jo1 ne sont pas encore bien décrits. Néanmoins, des études montrent une corrélation entre la quantité d'anticorps et l'activité de la maladie (Hervier et al., 2012; Stone et al.). L'implication de nombreuses cellules du SI au cours du SAS associé aux anticorps anti-Jo1 a été montrée.

i. Rôle des lymphocytes T

Une augmentation de la fréquence de lymphocytes T CD8+ dans les biopsies de patients atteints du SAS anti-Jo1 a été mise en évidence en comparaison aux dermatomyosites. Cette observation était associée à une expression des molécules HLA-DR par les fibres musculaire des patients anti-Jo1 (~82%) en comparaison à 23.5 % chez les DM (Aouizerate et al., 2014).

ii. Rôle des cellules NK

Le rôle des lymphocytes NK au cours du SAS anti-Jo1 a été démontré pour la première fois en 2016. Les auteurs ont tout d'abord observé un profil lymphocytaire NK activé et différencié spécifiquement chez les patients anti-Jo1 qui présentaient une maladie cliniquement active. Ce profil de lymphocytes NK était caractérisé par une surexpression de CD57 et la diminution de NKp30. Des études fonctionnelles ont observé une baisse de la poly-fonctionnalité des lymphocytes NK associée à une diminution de l'expression de

NKp30, se traduisant par une diminution de sécrétion d'IFNγ (Hervier et al., 2016). Ces résultats étaient surprenants étant donné que NKp30 est un marqueur d'activation de lymphocytes NK. Néanmoins, l'infiltration massive des poumons de patients par les lymphocytes NK suggère que ces derniers étaient en phase terminale de différenciation ou qu'ils ont un effet d'inhibition au cours du SAS anti-Jo1.

Ces observations montrent une co-implication des mécanismes de RI innées et adaptatives au cours du SAS anti-Jo-1.

b. Prise en charge des patients atteints du SAS-anti Jo1

Le plus souvent, la corticothérapie est administrée aux patients qui ont un diagnostic confirmé du SAS anti-Jo1. La corticothérapie est généralement associée avec un agent immunosuppresseur (Needham and Mastaglia, 2016b). L'atteinte pulmonaire chez les patients atteints du SAS anti-Jo1 peut engager le pronostic vital. Le plus souvent, l'évolution de l'atteinte pulmonaire est irréversible.

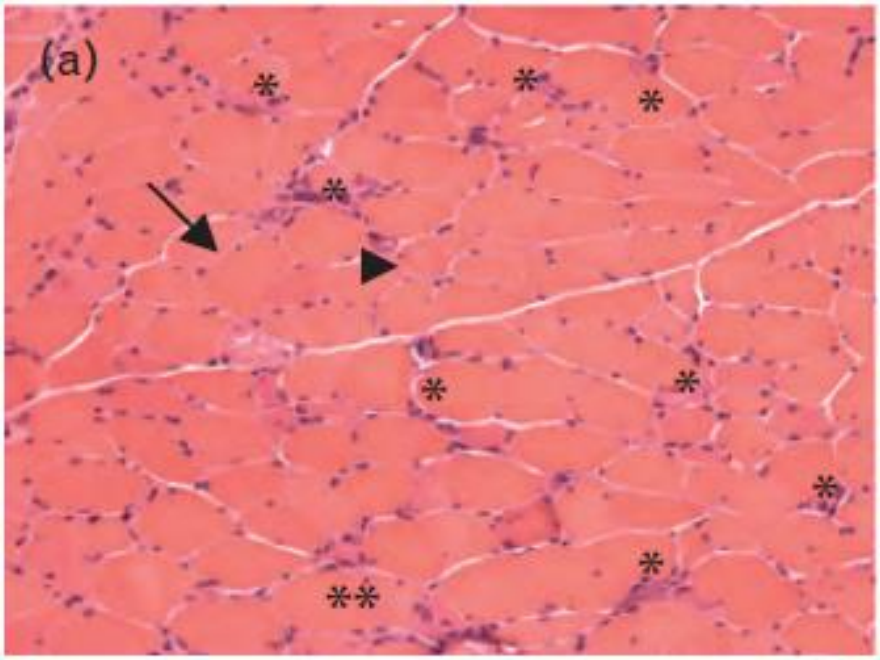


Figure 17 : Caractéristiques pathologiques des myopathies anti-SRP et anti-HMGCR (Allenbach and Benveniste, 2013).

Biopsie musculaire typique de patients atteints de Myopathie anti-SRP ou de Myopathie anti-HMGCR. La coloration avec l'Hématoxyline-éosine met en évidence des anomalies des diamètres des fibres musculaires : une augmentation du diamètre (flèche) ou une diminution du diamètre (tête de flèche). Ces anomalies de diamètres sont associées à la présence d'une nécrose musculaire (*) et d'une régénération musculaire (**).

5. Les MNAI : les myopathies anti-SRP

Les patients atteints de la myopathie anti-SRP présentent une faiblesse musculaire proximale sévère, plus rarement des atteintes cardiaques et pulmonaires (généralement asymptomatique), une résistance aux corticoïdes et la présence d'anticorps anti-SRP. La protéine SRP est un complexe ribonucléoprotéique ubiquitaire, composé de 6 polypeptides de tailles variables (9KDa, 14KDa, 19KDa, 54KDa, 68KDa et 72KDa) et d'une molécule d'ARN 7S (Walter and Blobel, 1983). La sous-unité de 54KDa (SRP_{54}) reconnait et interagit avec la séquence signalétique des protéines nouvellement synthétisées dès leur sortie du ribosome et facilite leur transport vers le réticulum endoplasmique (Pool et al., 2002). La détection d'anticorps dirigés contre la protéine SRP chez les patients atteints de myosite a été faite pour la première fois en 1986 (Reeves et al., 1986). Les anticorps anti-SRP les plus fréquemment identifiés chez les patients sont dirigés contre la SRP_{54} et elles sont majoritairement d'isotype IgG (Benveniste et al., 2011b; Pinal-Fernandez et al., 2017). Les myopathies anti-SRP débutent le plus souvent chez des sujets de plus de 40 ans, avec une prédominance féminine.

a. Caractéristiques cliniques, histopathologiques et sérologiques des myopathies anti-SRP

i. Caractéristiques cliniques

L'une des caractéristiques typiques sur le plan clinique des myopathies anti-SRP est la survenue brusque de la maladie associée à une faiblesse musculaire. En effet, plus de 50% des patients présentent une déficience sévère des membres proximaux et des membres inférieurs en particulier. En comparaison à d'autres myosites, la faiblesse musculaire liée au remplacement de la masse musculaire par le tissu adipeux est plus important au cours de MNAI (Allenbach and Benveniste, 2013). De plus, des troubles de la déglutition (dysphagie) sont fréquents et concerne 52.1%±30 de patients. Des atteintes extra-musculaires peuvent être observées, telles que respiratoires ou pulmonaires. Néanmoins les atteintes pulmonaires ne sont pas sévères et n'augmentent pas le risque de développement de cancer du poumon (Allenbach and Benveniste, 2013).

ii. Caractéristiques histopathologiques

Les caractéristiques anatomo-pathologiques nécessaires au diagnostic des MNAI (myopathies anti-SRP, anti-HMGCR et sans anticorps) sont :

- La présence de fibres nécrotiques dispersées.
- La nécrose, la phagocytose des fibres musculaires par des macrophages (myophagocytose) et la régénération (présence de nécrose et de régénération) (**Figure 17**).
- L'absence fréquente d'infiltrats inflammatoires qui, s'ils existent, sont composés de macrophages, accompagnés de lymphocytes (CD4+ ou CD8+).

D'autres éléments caractéristiques peuvent être observés tels que la fibrose et plus rarement l'expression du CMH de type I par les fibres musculaires non-nécrotiques et non en régénérescence (Allenbach et al., 2018).

iii. **Caractéristiques sérologiques**

La présence d'anticorps anti-SRP dans le sérum des patients qui présentent les caractéristiques cliniques et pathologiques mentionnées précédemment confirme le diagnostic d'une myopathie anti-SRP. Chez les patients atteints de myopathie anti-SRP, le taux de CK sérique est très élevé en comparaison aux autres groupes de myosites. De plus, le taux de CK corrèle avec l'activité de la maladie (Benveniste et al., 2011b).

b. Physiopathologie

La corrélation entre le titre des anticorps anti-SRP et l'activité de la maladie (taux de CK et faiblesse musculaire) évoque un rôle pathogène de ces anticorps au cours de la maladie (Benveniste et al., 2011b). Le rôle pathogénique des anticorps anti-SRP a été mis en évidence par des expériences de culture *in vitro* de fibres musculaires de donneurs sains en présence d'anticorps anti-SRP purifiés de patients. Cette étude a montré deux effets pathogènes des anticorps anti-SRP sur le muscle *in vitro* : tout d'abord, l'ajout de sérum de patients présentant des anticorps anti-HMGCR ou anti-SRP a entraîné une diminution de la capacité de fusion des myoblastes en myotubes. Ces anticorps agissent aussi plus tardivement en induisant une atrophie des myotubes préalablement différenciés. Ces effets pathogènes étaient associés à une diminution des cytokines myogéniques telles que l'IL-4 et l'IL-13. L'ajout de l'IL-4 et de l'IL-13 sur les myoblastes en phase de fusion et en présence du sérum des patients a permis d'empêcher l'inhibition de leur fusion. De plus, l'ajout de ces cytokines myogéniques sur les myotubes différenciés en présence du sérum de patients a

inhibé l'atrophie. Des expériences de transfert passif d'anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR chez la souris sont en cours.

c. Prise en charge des patients

Le pronostic de la maladie n'est pas très favorable, étant donné qu'après 4 ans, seule la moitié des patients récupère leur force musculaire normale (Pinal-Fernandez et al., 2017). Par ailleurs, les rechutes sont fréquentes, notamment observées avec les monothérapies de corticoïdes, nécessitant d'autres approches thérapeutiques (Watanabe et al., 2016). Le plus souvent, le traitement initial des patients comprend une association de corticoïdes et de méthotrexate. En cas de rechute ou de sévérité aggravante, les patients sont traités avec des anticorps monoclonaux qui éliminent les lymphocytes B (anti-CD20, Rituximab).

6. Les MNAI : les myopathies anti-HMGCR

La protéine HMGCR est une enzyme ubiquitaire qui permet la catalyse du cholestérol durant sa biosynthèse. L'HMGCR est localisée dans le réticulum endoplasmique. Les statines sont des médicaments qui ont pour but de réduire le taux de cholestérol et qui ont pour cible l'enzyme HMGCR. Les anticorps dirigés contre l'enzyme HMGCR ont été identifiés pour la première fois chez des patients traités par des statines en 2011 (Mammen et al., 2011). Cette étude avait détecté la présence d'anticorps anti-HMGCR chez 45 patients sur 750 en consultation dans leur centre. Ainsi, de nombreuses études suggèrent une association entre le traitement par les statines et l'acquisition d'une myopathie anti-HMGCR, néanmoins, cette observation est variable d'une cohorte à une autre (Needham et al., 2007). Tout d'abord, l'étude princeps sur une cohorte américaine a observé que 30 patients sur les 45 (66.6%) atteints de myopathies anti-HMGCR ont été exposés aux statines avant l'apparition des anticorps anti-HMGCR (Mammen et al., 2011). D'autre part, une cohorte européenne de 45 patients atteints de myopathies anti-HMGCR a observé que 44% des patients étaient préalablement exposés aux statines (Allenbach et al., 2014b). Finalement, uniquement 5.4% des patients dans une cohorte chinoise de 22 patients atteints de myopathies anti-HMGCR étaient préalablement exposés aux statines (Ge et al., 2015). Les myopathies anti-HMGCR acquises suite à une exposition aux statines persistent après l'arrêt de traitement et ont une sensibilité variable aux IS. Les myopathies anti-HMGCR acquises sans exposition aux statines surviennent chez des patients plus jeunes (parfois l'enfant) et sont plus résistantes aux IS que celles des sujets plus âgés exposés aux statines (Tiniakou et al., 2017).

a. Caractéristiques cliniques, histopathologiques et sérologiques des myopathies anti-HMGCR

i. Caractéristiques cliniques et pathologiques

Les signes cliniques et anatomo-pathologiques des patients atteints de myopathies anti-HMGCR sont similaires à ceux des patients atteints de myopathies anti-SRP. Néanmoins, chez les patients de plus de 50 ans, 90% ont été exposés aux statines avant l'apparition des anticorps.

ii. Caractéristiques sérologiques

La présence d'anticorps anti-HMGCR associée aux signes cliniques et pathologiques mentionnés confirme le diagnostic d'une myopathie anti-HMGCR.

b. Physiopathologie

On retrouve également une corrélation entre le titre d'anticorps et le taux de CK et la force musculaire chez les patients atteints de myopathies anti-HMGCR (Werner et al., 2012). Ainsi, comme pour les anticorps anti-SRP, le rôle pathogénique des anticorps anti-HMGCR a aussi été démontré *in vitro* au cours des expériences de co-culture d'IgG purifiés de patients avec des muscles en différenciation (Arouche-Delaperche et al., 2017).

c. Prise en charge des patients

Le traitement initial des patients atteints de myopathies anti-HMGCR comprend des stéroïdes associés avec des agents immunosuppresseurs comme le méthotrexate. En de l'inefficacité de la première ligne de traitement, les immunoglobulines polyvalentes intraveineuses peuvent être administrées aux patients.

CHAPITRE IV : LA CYTOMÉTRIE DE MASSE

1. Historique

La cytométrie de masse (*Cytometry by time of Flight*, CyTOF) est une technique de phénotypage cellulaire innovante qui permet de détecter simultanément plusieurs marqueurs cellulaires à l'aide d'anticorps couplés aux métaux. Elle a été décrite pour la première fois en 2009 par Bandura, avec un potentiel théorique d'analyse simultanée de 100 marqueurs (Bandura et al., 2009). Avant l'arrivée de la cytométrie de masse, la cytométrie de flux pouvait permettre une analyse maximale de 12 à 17 marqueurs cellulaires (Chattopadhyay et al., 2008). Utilisée pour la première fois en 2011 pour analyser l'expression simultanée de 37 marqueurs à partir d'échantillons issus de la moelle osseuse, la cytométrie de masse a permis de révolutionner les domaines de l'hématologie, l'immunologie et la découverte de nouvelles populations cellulaires (Bendall et al., 2011; Brodin et al., 2015). En effet, l'ensemble d'une combinaison de 37 marqueurs n'étant pas possible en cytométrie de flux, la cytométrie de masse a permis la mise en évidence de la diversification des phénotypes cellulaires précédemment peu ou mal décrits (Amir et al., 2013; Corneau et al., 2017; Han et al., 2015; Palgen et al., 2018). De plus, la possibilité d'inclure différents marqueurs d'activation et de fonction dans un panel en cytométrie de masse a permis une meilleure compréhension de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques précédemment peu ou mal décrits. A présent, l'utilité de la cytométrie de masse dans la recherche médicale est bien établie (Cosma et al., 2017).

2. Fonctionnement du cytomètre de masse

Préalablement à l'analyse des cellules par le cytomètre de masse, elles doivent être marquées par des anticorps couplés aux métaux. Étant donné le nombre important de marqueurs possibles en cytométrie de masse, un panel peut inclure des anticorps ciblant des antigènes membranaires, intracytoplasmiques ou intranucléaires. Cette multiplicité de cibles antigéniques va nécessiter l'utilisation de différents tampons de perméabilisation pour mettre la liaison des anticorps aux cibles.

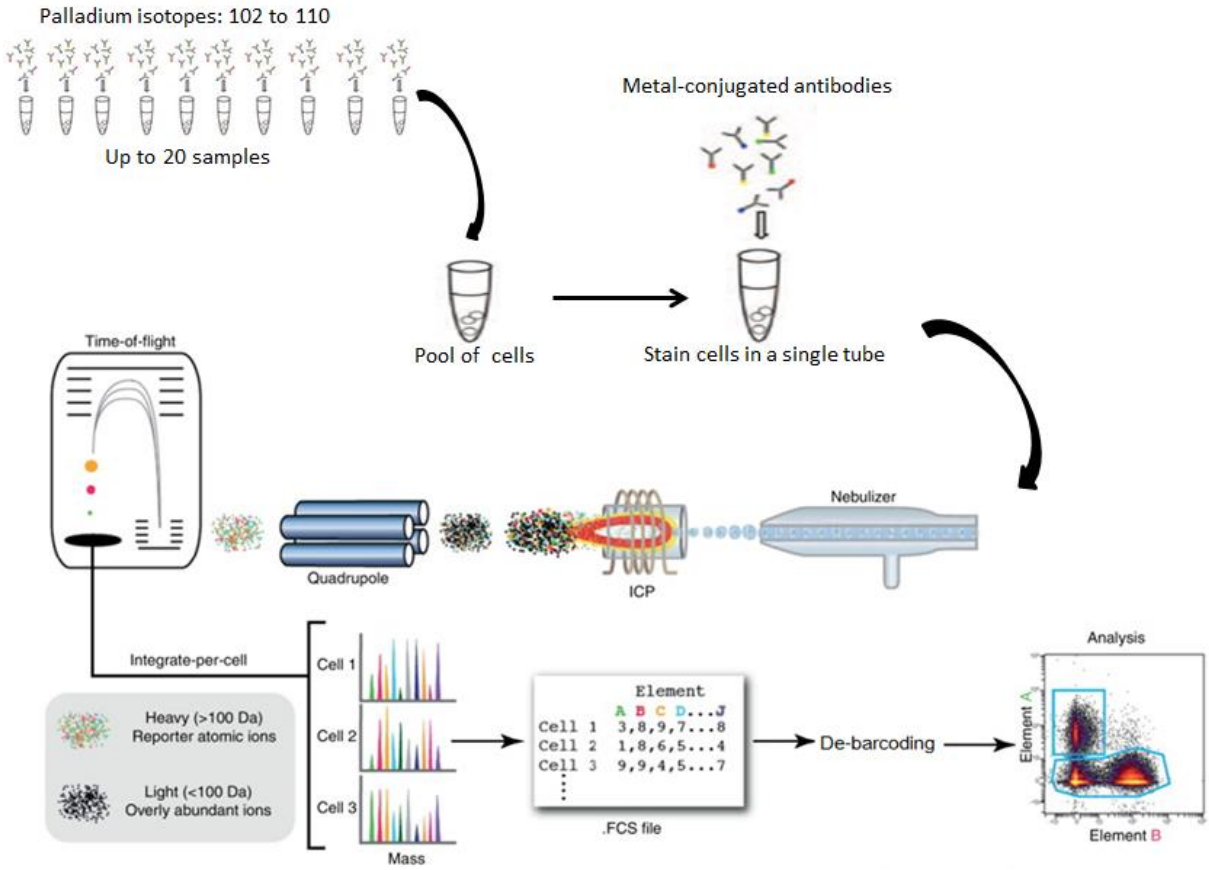


Figure 18 : Déroulement d'une expérience en utilisant la cytométrie de masse avec *barcoding*. Adaptée de (Atkuri et al., 2015).

Il est très important de noter que selon le tampon de perméabilisation utilisé, les marqueurs intranucléaires peuvent être faiblement détectables (tampon trop doux) ou les marqueurs de surface peuvent être abîmés (tampon trop fort). D'où la nécessité préalable de mettre au point un protocole de marquage qui va permettre de répondre aux questions soulevées (Dzangué-Tchoupou et al., 2018).

D'un point de vue technique, l'analyse d'un échantillon en cytométrie de masse se déroule de la manière suivante : premièrement, les cellules marquées sont aspirées par le cytomètre de masse où elles vont passer une à une dans une tubulure appelée Nebulizer. Le Nebulizer va permettre l'accélération des cellules (vitesse pouvant atteindre 1000 cellules/seconde), la formation d'aérosols et l'orientation des cellules vers le plasma d'argon (argon ionisé). Dans le flux d'argon, les cellules seront vaporisées et ionisées, ensuite dirigées vers un détecteur d'ions. Une fois que les cellules sont ionisées, chaque cellule sera sous la forme d'un nuage d'ions. A cette étape on ne parle plus de cellules mais d'évènements. Avant l'arrivée au détecteur, des quadripôles vont retenir les métaux ayant une très faible masse (correspondant à un signal non-spécifique). Par la suite, le nuage d'ions correspondant à chaque cellule sera dirigé vers le détecteur où chaque métal sera détecté selon son temps de vol (un métal correspond à un anticorps ayant reconnu sa cible cellulaire au cours de marquage). Finalement, pour chaque évènement, différentes intensités de signaux seront détectées et générés selon l'expression ou non des marqueurs recherchés (**Figure 18**).

3. Approches analytiques utilisées en cytométrie de masse

La combinaison de l'ensemble des marqueurs générés par la cytométrie de masse étant très importante, il est difficile de savoir comment analyser les données générées et par quoi commencer. Historiquement, l'analyse des données générées par la cytométrie de flux était faite à travers des fenêtres (*gating*) bidimensionnelles qui permettent de choisir des phénotypes cellulaires pour une analyse en aval. Ainsi, le choix des fenêtres à utiliser était très subjectif et nécessitait une très bonne connaissance du domaine étudié. Un inconvénient de cette approche analytique bidimensionnelle est le fait que les populations d'intérêts sont choisies *a priori* et uniquement sur la base de 2 marqueurs. De plus, le choix des fenêtres est supervisé, long et fastidieux. Finalement, l'analyse supervisée est l'analyse non exhaustive de l'ensemble des informations que l'on peut obtenir sur la fréquence et l'intensité des marqueurs étudiés. L'intérêt d'une approche phénotypique à grande échelle comme le CyTOF sera largement sous-estimé en utilisant des approches supervisées basées sur des populations cellulaires connues. Il était donc nécessaire de mettre au point de nouvelles approches analytiques pour étudier la combinaison des 37 marqueurs, au niveau d'une cellule par individu et aussi la possibilité d'effectuer des comparaisons entre différents groupes expérimentaux (Newell and Cheng, 2016). De nombreux outils d'analyse ont ainsi été développés qui permettent de réaliser des analyses non supervisées ou sans *a priori*. Les approches non supervisées prennent en compte largement plus de deux marqueurs dans les choix de la classification des populations à étudier.

a. Approches analytiques non-supervisées

L'intérêt des approches analytiques non supervisées est de pouvoir identifier « rapidement » les populations phénotypiques et les marqueurs qui varient significativement entre les groupes étudiés. Il existe de nombreuses approches analytiques pour étudier les *big data* (données importantes). Ces approches sont rendues possible par l'intermédiaire de plateformes qui regroupent différents outils analytiques adaptés aux utilisateurs (biologistes) ou en utilisant différents langages informatiques tels que R, R-studio et Java adaptés aux informaticiens. Dans le contexte de la cytométrie de masse, l'interface Cytobank propose différents outils analytiques non supervisés. Il est aussi possible d'analyser les données issues de la cytométrie de masse sur R/R-studio. Dans le cadre de notre projet, nous avons utilisé principalement l'interface Cytobank qui propose différents outils

d'analyse non-supervisés tels que *Spanning-tree progression Analysis of Density-normalized Events* (**SPADE**), *cluster identification and characterization* (**Citrus**) et *visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding* (**viSNE**). En collaboration avec des biostatisticiens, nous avons aussi utilisé les arbres décisionnels de classification sur R : *classification and regression trees* (CART). Il est néanmoins important de rappeler que les approches analytiques non supervisées sont complémentaires des approches analytiques supervisées qui restent à faire *in fine*.

i. ***Spanning progression tree of Density-normalized Events* (SPADE)**

La crainte que l'on puisse avoir quand on utilise des approches non supervisées pour analyser une combinaison importante de marqueurs est de perdre les populations les plus rares. Ainsi, SPADE est un algorithme qui permet d'organiser des données complexes en créant une hiérarchie cellulaire de groupes phénotypiquement proches, tout en conservant les populations rares. SPADE organise les données selon une approche non supervisée, de manière à faire ressortir l'hétérogénéité cellulaire au niveau d'une cellule (Qiu et al., 2011). Le fonctionnement de SPADE passe par 4 étapes :

1) Sous-échantillonnage des données en fonction de leur densité (*downsampling*) : La première étape pour la classification hiérarchique des données par SPADE a pour but d'éliminer l'influence des populations très fréquentes sur celles des populations les plus rares. La notion de populations dans ce contexte fait référence à un ensemble d'évènements qui exprime des marqueurs semblables et qui reflète potentiellement un phénotype fonctionnel distinct. Pour cela, SPADE regroupe premièrement l'ensemble des données en un seul nuage de points, où chaque point correspond à un évènement. La dimension de chaque point est définie par le nombre de marqueurs exprimé par ce dernier. Sur le nuage de points, les régions les plus denses correspondent aux populations cellulaires les plus abondantes tandis que les régions de plus faible densité correspondent aux populations les plus rares. Le but est de sous échantillonner les données en fonction de leur densité, pour réduire l'effet de la densité sur l'échantillonnage. Ainsi, SPADE va calculer la densité locale (D_L) de chaque évènement ; elle correspond au nombre d'évènements autour de cet évènement. Ensuite, une densité de bruit de fond (D_B) sera aussi définie. En-dessous de la D_B, tout évènement sera considéré comme ne faisant pas partie d'une population

phénotypique distincte. Finalement, une densité cible (D_C) sera définie. Ainsi, les évènements avec une D_L inférieure à la D_B seront éliminés, tandis que les évènements avec une D_L comprise entre la D_B et la D_C ne seront pas sous échantillonnés. En revanche, les évènements avec une D_L supérieure à la D_C seront sous échantillonnés de façon à ramener leur densité proche de la D_C. Au final, la taille des échantillons sera très réduite par rapport à la taille initiale, néanmoins la fréquence des populations les plus rares sera préservée.

2) Regroupements des évènements avec un phénotype proche (*Clustering*) : SPADE utilise une classification hiérarchique pour regrouper les évènements phénotypiquement proches afin d'obtenir des *clusters*. Pour cela, SPADE procède de la manière suivante :

- Premièrement, chaque évènement du nuage de point est considéré comme étant un cluster.
- Par la suite, un évènement sera choisi au hasard et regroupé avec son voisin le plus proche (*single linkage*). Ensuite, un évènement de l'ensemble des autres évènements non choisis sera choisi et regroupé avec son voisin le plus proche (à condition que ce dernier n'ait pas encore été regroupé avec un autre). Consécutivement, l'ensemble des évènements non choisis sera regroupé de la même manière. La première itération sera terminée lorsque l'ensemble des évènements aura été traité (choisis ou regroupés avec d'autres). Au terme de la première itération, le nombre de *clusters* est presque réduit de moitié.
- Pour la seconde itération, la même procédure de classification que la précédente est répétée.
- Étant donné que le nombre de *clusters* est défini par l'utilisateur, la même procédure de classification sera répétée jusqu'à l'obtention du nombre de *clusters* prédéfini.

3) Liaison des clusters : La prochaine étape est de relier l'ensemble des *clusters* afin de créer un arbre qui reflète la hiérarchie de différenciation cellulaire du jeu de données. Dans cet arbre, chaque nœud va correspondre à un *cluster*, ensuite chaque *cluster* est caractérisé par l'expression médiane de ses marqueurs. Tout d'abord, un sous-groupe de nœuds est sélectionné d'une manière aléatoire. La première itération va consister à calculer parmi l'ensemble des nœuds non-sélectionnés, les nœuds avec une plus faible distance des nœuds présents dans le premier sous-groupe sélectionné. Ainsi, les premières connections de l'arbre seront faites.

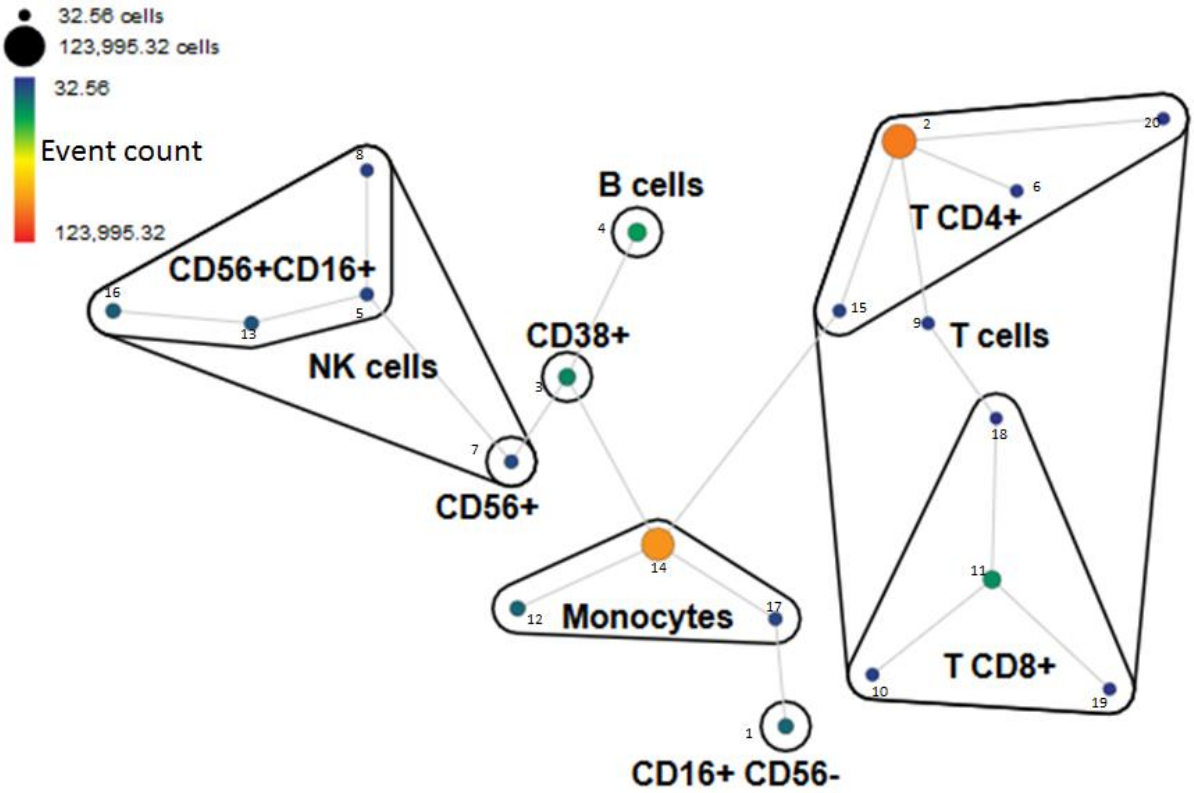


Figure 19 : Exemple d'un arbre SPADE réalisé sur l'ensemble des cellules CD45+ avec 20 nœuds et un *downsampling* de 10%. La taille des nœuds est proportionnelle au nombre d'évènements contenus dans le nœud. La coloration représentative de cette image est en fonction du nombre d'évènements dans chaque nœud.

Successivement, d'autres itérations seront réalisées suivant la même approche afin de connecter les nœuds jusqu'à ce que l'ensemble des nœuds soient connectés.

4) *Upsampling* des données : L'intérêt de cette dernière étape est d'inclure l'ensemble des évènements initiaux aux résultats finaux afin de permettre la réalisation de tests statistiques. Ainsi, pour chaque évènement du jeu de données initial, SPADE va calculer leur distance la plus proche avec l'ensemble des évènements utilisés pour le sous-échantillonnage du nuage de points. Chaque évènement sera affecté au cluster auquel correspond son plus proche voisin parmi les évènements sous-échantillonnés.

SPADE peut ainsi permettre la comparaison des marqueurs d'activation et des marqueurs fonctionnels sur les différents groupes phénotypiques identifiés (*clusters*) entre les différentes conditions expérimentales. La visualisation de l'information générée par SPADE est sous la forme d'un arbre avec plusieurs nœuds, où chaque nœud correspond à un groupe homogène d'évènements. La taille de chaque nœud est proportionnelle au nombre d'évènements présents dans le nœud. L'utilisateur peut vérifier le phénotype de chaque nœud sur des axes bidimensionnels directement sur cytobank. Il est aussi possible de colorer l'ensemble des nœuds avec un marqueur à la fois, afin d'annoter un ou plusieurs nœuds d'après les populations connues et de découvrir de nouvelles populations (**Figure 19**).

<u>Avantages de l'utilisation de SPADE</u>

L'intérêt premier lié à l'utilisation de SPADE est que c'est un outil de classification non supervisé, ainsi l'information générée n'est pas prédéfinie par l'utilisateur. SPADE a aussi l'avantage particulier de permettre l'identification de phénotypes rares grâce au sous échantillonnage (*downsampling*). De plus, SPADE permet de visualiser la hiérarchie de différenciation cellulaire à travers l'arbre qui est généré ; cette orientation dépend fortement des marqueurs inclus dans l'étude. Finalement, il est possible d'exporter un ensemble de nœuds au choix ou des valeurs correspondants à l'expression de différents marqueurs dans des nœuds pour réaliser des analyses approfondies avec d'autres outils analytiques.

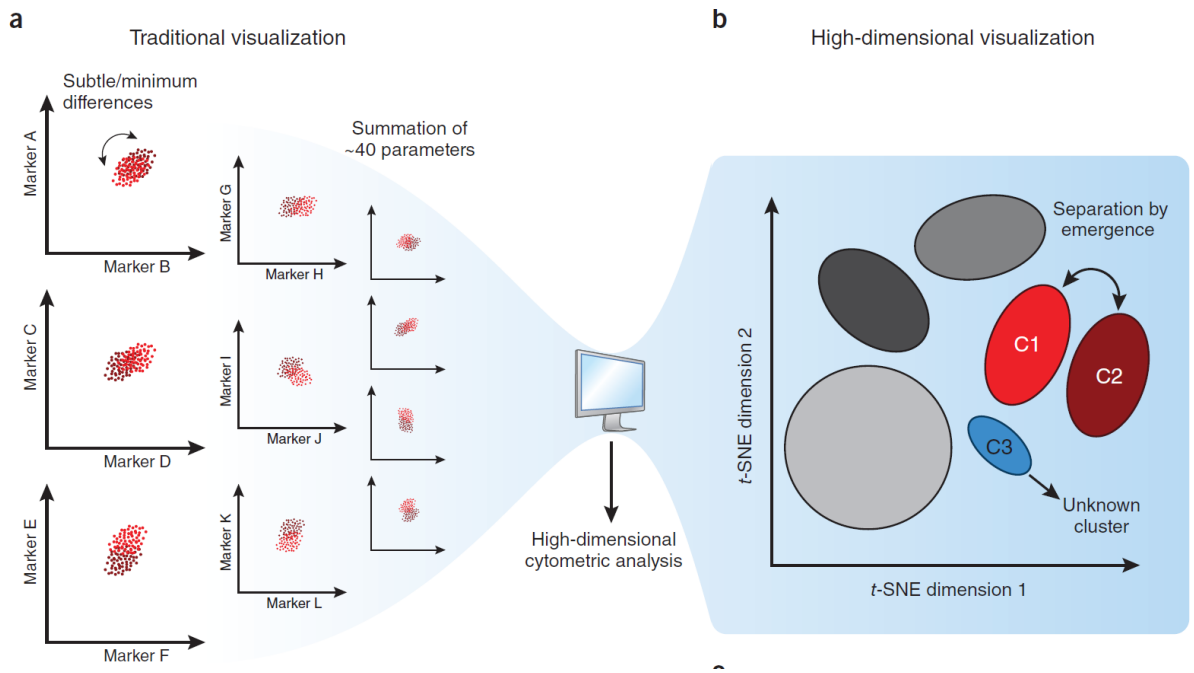


Figure 20 : Réduction de dimension par tSNE (Newell and Cheng, 2016).

Historiquement les données issues de la cytométrie étaient analysées le plus souvent sur des courbes bidimensionnelles. t-SNE permet une analyse multidimensionnelle de données et permet ainsi la détection de différences faibles.

Inconvénients de l'utilisation de SPADE

Tout d'abord, il est important de noter que SPADE est un outil d'organisation et de visualisation de données. SPADE ne permet donc pas de réaliser des comparaisons statistiques de l'expression de différents marqueurs sur les nœuds identifiés. Néanmoins, SPADE génère des tableaux correspondant au nombre d'évènements dans chaque nœud et à l'expression de l'ensemble des marqueurs étudiés sur chaque nœud. Le deuxième inconvénient de SPADE est le risque d'identification de populations inexistantes suite à un sous échantillonnage très important. Pour contourner ce risque, le phénotype des plus petits nœuds doit être vérifié en utilisant les axes bidimensionnels afin de confirmer si ces nœuds correspondent à des populations réelles. En cas de doute, il peut être utile de réaliser une première analyse avec SPADE avec un pourcentage de sous échantillonnage plus élevé, d'identifier les populations (nœuds avec un phénotype proche) et finalement de réaliser d'autres analyses SPADE sur les populations identifiées.

ii. Visualization of t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (viSNE)

viSNE est un outil de visualisation des données multidimensionnelles sur un axe bi ou tri dimensionnel avec une résolution au niveau de la cellule. Par exemple, l'analyse de l'expression de 37 marqueurs sur une cellule chez un individu peut générer une combinaison importante d'informations difficilement analysables simultanément en deux ou trois dimensions (**Figure 20**). Ainsi, viSNE permet de préserver l'ensemble des informations non linéaires sur un jeu de données, tout en réduisant le nombre de dimensions de visualisation. viSNE fonctionne sur la base de l'algorithme t-SNE (t-*Distributed Stochastic Neighbor Embedding*), qui est capable de transformer des données multidimensionnelles en des données avec une plus faible dimension (Amir et al., 2013). Le logiciel t-SNE travaille de la manière suivante :

1) Calcul de la similarité entre l'ensemble des points du jeu de données : Tout d'abord, chaque évènement est représenté par un point et la position du point tient compte de l'intensité des marqueurs qu'il exprime. Ainsi, l'ensemble des informations est regroupé en un seul jeu de données. La première étape consiste à calculer la distance entre tous les points du jeu de données (deux par deux). Ce calcul tient compte de la densité locale entre les évènements et de la distance euclidienne.

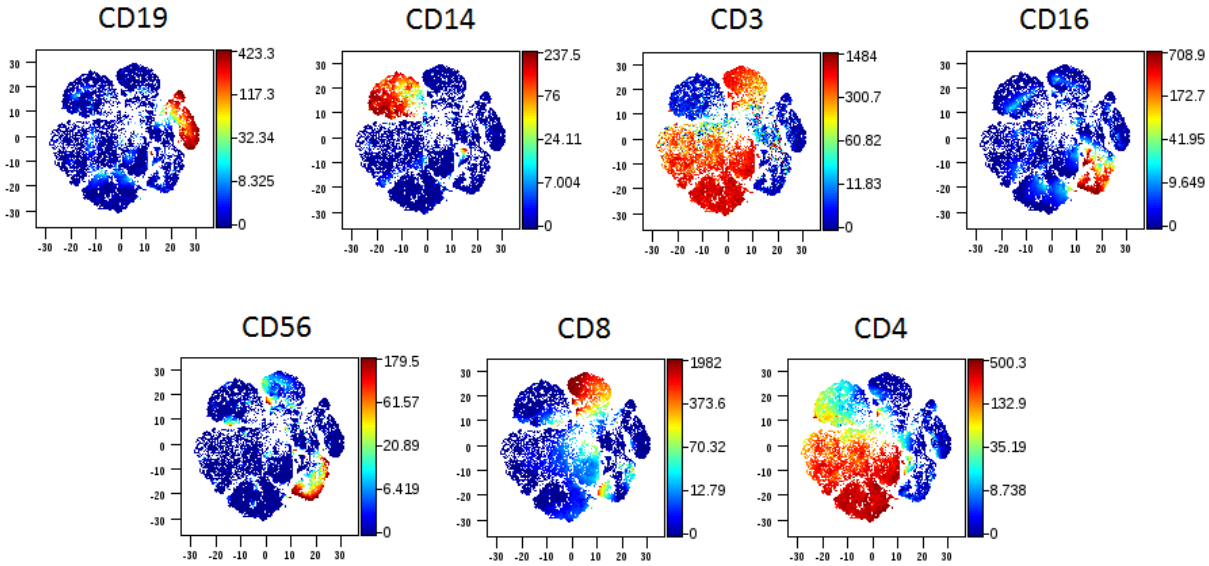


Figure 21 : Visualisation des données par viSNE

Chaque point correspond à un évènement. Les évènements peuvent être colorés selon les marqueurs d'intérêts et permettre aussi de sélectionner des populations pour des analyses en aval.

L'information sur l'ensemble des distances qui relient chaque point va former la « matrice de distance ». Ainsi, selon la matrice de distance, la similarité entre chaque point du jeu de données sera calculée. Par exemple, la similarité entre un point x et un point y va tenir compte de la distance qui les relie et va représenter la probabilité que x choisit y comme son plus proche voisin ou vice versa.

2) Réduction de dimension aléatoire : Par la suite, l'ensemble des points seront distribués de façon aléatoire sur un axe bidimensionnel. Cette étape permet de réduire la dimension, néanmoins l'emplacement des points ne tient pas encore compte de leur similarité.

3) Calcul des similarités sur les données dans la dimension réduite : Finalement, la similarité de chaque point sur l'axe bidimensionnel sera évaluée une à une en utilisant une distribution *t-student*. Au cours de ce processus, chaque point sera évalué de façon à ce que les points les plus similaires vont s'attirer mutuellement et se regrouper, tout en s'éloignant des points les plus dissimilaires.

A la fin de cette dernière étape par t-SNE, viSNE va générer une cartographie qui permet de visualiser l'ensemble des points sur un axe bidimensionnel. La possibilité d'avoir une visualisation des données sur un axe tridimensionnel provient du fait qu'il est possible de colorer les points avec un paramètre au choix (**Figure 21**).

<u>Avantages de l'utilisation de viSNE</u>

Étant donné que la fréquence des populations issues du jeu de données initial est préservée, viSNE est sensible aux populations rares. Il est aussi important de noter que viSNE calcule la similarité entre l'ensemble des évènements, ainsi il délivre l'information sur les évènements phénotypiquement proches et phénotypiquement éloignés. Finalement, l'avantage principal de viSNE est sa haute résolution de visualisation des données au niveau de la cellule.

<u>Inconvénients de l'utilisation de viSNE</u>

L'inconvénient fréquemment rencontré avec les outils de réduction de dimension est la perte d'informations très rares. Il est donc possible que certains paramètres de la haute dimension ne soient pas représentés sur l'axe bidimensionnel. Pour améliorer cela, il peut être nécessaire de réaliser différentes analyses avec viSNE sur différentes populations

cellulaires d'intérêt (et non sur l'ensemble des données). Un autre inconvénient majeur de l'utilisation de viSNE est lié au temps d'analyse et à la capacité des ordinateurs. Étant donné que viSNE analyse les évènements un à un et calcule chaque distance, plus il y a des évènements dans une analyse, plus le temps d'analyse sera long et plus il faudra de la place pour stocker ces informations sur l'ordinateur.

iii. *Cluster identification and characterization* (Citrus) :

Citrus est un outil qui permet d'identifier des évènements avec un phénotype proche, de les regrouper (*clusters*) et de les caractériser. De plus, lors de la comparaison de deux ou plusieurs groupes expérimentaux (par exemple patients et témoins), Citrus peut permettre l'identification de modèles de prédictions d'appartenance à un groupe ou à un autre (Bruggner et al., 2014). De façon générale, Citrus fonctionne en se basant sur trois grandes étapes :

1) La construction des *clusters* : Les *clusters* générés avec citrus sont basés suivant une approche non supervisée et selon une stratification. Le choix du nombre d'évènements à utiliser par échantillon pour l'analyse citrus revient à l'utilisateur. Ce choix doit tenir compte du rapport de proportionnalité qui existe entre le nombre total d'évènements et le temps d'analyse par le logiciel. En plus de cela, l'utilisateur doit aussi choisir le pourcentage minimal d'évènements à inclure dans chaque *cluster*. Par défaut, cette valeur est fixée à 5%, néanmoins selon le contexte expérimental et la fréquence des populations potentiellement intéressantes, cette valeur peut être changée. Pour construire les clusters, deux grandes étapes sont utilisées :

- **Le regroupement aléatoire en un seul jeu de données de l'ensemble des évènements à prendre en compte au cours de l'analyse.** Ici, Citrus va considérer l'ensemble des échantillons comme un seul échantillon. Cette étape permet une classification non biaisée des évènements qui ont un phénotype proche.
- **La classification hiérarchique des évènements contenus dans le jeu de données en fonction de la similarité d'expression des marqueurs.** Au cours de cette étape, Citrus tient compte du nombre minimal d'évènements par *cluster*. La différence entre deux évènements sera calculée par la distance euclidienne, ainsi différents *clusters* sont formés progressivement sur la base de la similarité et la dissemblance des marqueurs exprimés. Il

est important de noter que Citrus n'interrompt pas le dendrogramme de classification, ainsi les *clusters* précédents sont fusionnés avec les *clusters* suivants. Tous les *clusters* seront en effet des fusions de *clusters*. Les clusters sont reliés par la liaison de Ward (*Ward's linkage*). Seuls les phénotypes semblables avec une fréquence supérieure ou égale à celle de la fréquence minimale définie seront gardés pour la suite de l'analyse. Pour finir, Citrus répartit les évènements du jeu de données dans chaque échantillon d'origine afin de caractériser les *clusters* selon leur appartenance à un groupe ou à un autre (patients ou témoins).

2) L'identification et la caractérisation des *clusters* : Après la génération de *clusters* homogènes et stratifiés, Citrus peut calculer différents paramètres sur chaque cluster en tenant compte du groupe d'appartenance de l'échantillon (patients ou témoins). Citrus compare chaque *cluster* appartenant à un ou plusieurs groupes soit sur la base du pourcentage des évènements présents dans chaque *cluster* (fréquence), soit sur la base de l'intensité d'expression des marqueurs fonctionnels ou d'activation (médiane). A la fin de l'analyse, on obtient des tableaux qui contiennent la fréquence et la médiane calculées pour chaque *cluster*. En plus des tableaux, on obtient aussi des figures correspondant à l'expression différentielle de la médiane ou de la fréquence entre les groupes comparés.

3) L'identification de modèles prédictifs : Un intérêt particulier de Citrus, est sa capacité à construire et à identifier un ou plusieurs modèles prédictifs de classification. Ainsi, quand on définit le groupe de patients et le groupe de témoins, Citrus se sert de cette information prédéfinie pour apprendre à prédire l'appartenance à ces groupes expérimentaux. Le but étant d'identifier un *cluster* ou un ensemble de *clusters* (modèles) capable(s) de prédire l'appartenance à un groupe ou à un autre (patients ou témoins). La construction et la validation de modèles par Citrus passe par différentes étapes :

- **Construction du modèle :** Après la caractérisation des clusters en tenant compte de leur appartenance, il peut exister de nombreuses différences par *cluster* observées entre les groupes comparés (patients ou témoins). Tout compte fait, seule une partie de ces différences observées « paramètres ou régresseurs », aura un pouvoir discriminant et prédictif entre les groupes étudiés. Pour cela, Citrus va utiliser des modèles de prédictions dits régularisés qui vont permettre de réduire le nombre de régresseurs en utilisant un facteur de régularisation λ. Le but est d'identifier un modèle optimal de prédiction parmi l'ensemble des combinaisons possibles (un ou plusieurs régresseurs). Le modèle final peut contenir un ou plusieurs régresseurs.

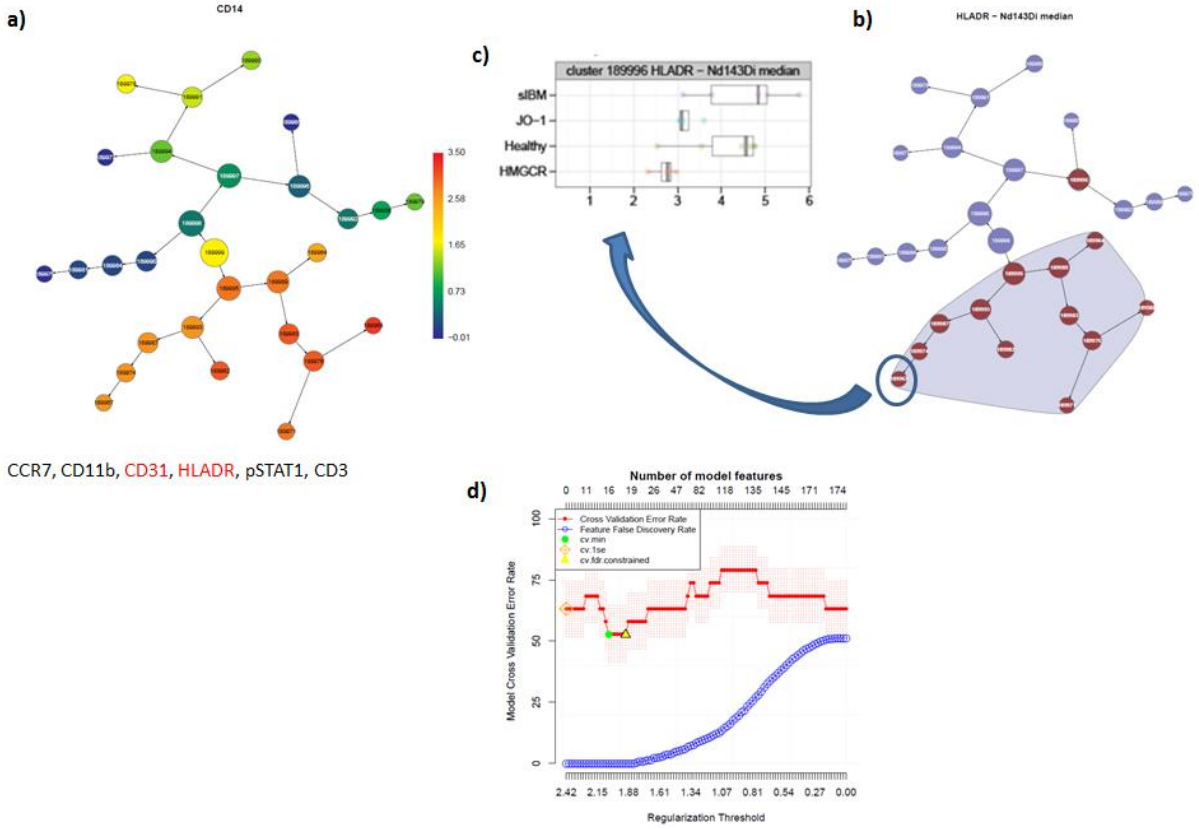


Figure 22 : Interprétation des résultats obtenus par Citrus

L'analyse de données par l'algorithme Citrus génère différents résultats. Dans cet exemple l'arbre a été construit sur la base des marqueurs phénotypiques CD14, CD16 et CD56. L'expression différentielle des marqueurs CCR7, CD11b, CD31, HLA-DR, pSTAT1 et CD3 ont été vérifiées parmi 4 groupes d'individus. **a)** L'arbre construit par Citrus qui montre la hiérarchie de regroupement de chaque *cluster*. L'expression de chaque marqueur utilisé pour la construction de cet arbre peut être visualisée. Dans cet exemple, l'arbre est coloré selon l'expression du CD14. **b)** Les *clusters* avec une expression différentielle significative entre les groupes comparés sont entourés. Dans cet exemple, il s'agit de l'expression différentielle du HLA-DR. **c)** Pour chaque nœud entouré en (b), l'on peut vérifier l'expression médiane du marqueur en question au sein des groupes comparés. **d)** La courbe de qualité de l'ensemble des résultats générés par Citrus pour cette analyse. L'on peut vérifier le taux de fausse découverte et la validité du modèle généré.

Pour générer les modèles, Citrus utilise la régression logistique régularisée Lasso et la classification nearest shrunken centroid. Tout d'abord, Citrus va créer une gamme fixe de seuils de régularisation λ allant de λ_1 à λ_i. Par la suite, plusieurs modèles (n=i) seront générés en utilisant la gamme prédéfinie par le facteur de régularisation (λ_1-λ_i). A noter que la valeur des seuils de régularisation est inversement proportionnelle au nombre de modèles vérifiés.

- **Choix du modèle optimal :** Pour obtenir le modèle optimal et simple capable de prédire l'appartenance aux groupes expérimentaux, Citrus passe par des étapes de validation (*cross-validation*). Ainsi la précision des modèles générés est vérifiée par la méthode de validation K-fold. Premièrement, l'ensemble des échantillons est réparti de façon aléatoire en K groupes. Ensuite, les échantillons de l'ensemble des groupes sauf un groupe (K-1) sont utilisés pour construire différents modèles en utilisant les différents seuils de régularisation prédéfinis λ_i. Finalement, les échantillons du groupe exclu de l'apprentissage seront prédits en utilisant les différents modèles générés pour chaque seuil de régularisation. Cette approche sera répétée pour l'ensemble des K groupes aléatoires. Pour attribuer un taux d'erreur estimé pour chaque modèle à chaque point de régularisation, le groupe prédit sera comparé au groupe réel. La sélection d'un modèle optimal sera faite en prenant en compte le taux d'erreur estimé lors de la validation. A l'issu de l'analyse de prédiction, Citrus peut proposer 3 différents modèles : un modèle optimal forcé (cv.*fdr.constrained*, ensemble de tous les modèles avec tous les régresseurs possibles en dessous du seuil fixé pour le taux de fausse découverte), un modèle minimal (*cv.min*, modèle contenant le plus petit nombre de régresseurs ayant le taux le plus bas d'erreur de validation) et un modèle pour validation (cv.1se, modèle avec le nombre de régresseurs moindre avec un taux d'erreur de validation d'un écart type supérieur au *cv.min*, ce modèle est idéal pour une validation sur une cohorte indépendante).
- **Validation du modèle :** La précision des modèles obtenus peut être évaluée par des courbes de qualité qui sont générées. Ainsi, il est possible de vérifier le taux d'erreur de validation et le taux de fausse découverte correspondant aux modèles *cv.fdr.contrained*, *cv.min* et *cv.1se*. Les seuils de régularisation peuvent aussi être vérifiés (**Figure 22**). De manière générale, plus le taux d'erreur de validation est élevé, moins le(s) modèle(s) identifié(s) sont valables.

Avantages de l'utilisation de Citrus

L'intérêt spécifique de l'utilisation de Citrus est la possibilité d'obtenir des modèles prédictifs de classification entre différents groupes expérimentaux : patients/témoins, traités/non traités ou actifs/non actifs par exemple. Néanmoins, il peut arriver que selon notre protocole expérimental (choix des marqueurs et groupes étudiés), Citrus ne puisse pas identifier un modèle prédictif avec un taux d'erreur de classification moindre.

Inconvénients de l'utilisation de Citrus

Citrus ne permet pas de visualiser directement le contenu de chaque *cluster* sur un plan bidimensionnel. Il est donc important d'exporter les événements correspondants aux clusters d'intérêts afin de confirmer leur phénotype par une visualisation bidimensionnelle des marqueurs d'intérêts. D'autre part, il existe toujours un risque d'erreur lié aux statistiques multiples malgré le taux de fausse découverte calculé par Citrus. Pour confirmer un résultat statistiquement significatif avec Citrus, il faut, soit réaliser plusieurs analyses sur le même jeu de données avec les mêmes paramètres, soit exporter les valeurs générées et confirmer les statistiques en utilisant d'autres tests statistiques.

iv. ***Classification and regression trees* (CART)**

L'algorithme CART est un outil qui permet de créer des arbres décisionnels de classification sur la base de différents critères. Le but de CART est de permettre la prédiction de classification d'appartenance de nouveaux individus à un groupe donné. L'algorithme CART comprend deux étapes principales :

1) Tout d'abord, parmi l'ensemble des sujets fournis pour l'analyse, CART va sélectionner de manière aléatoire une cohorte d'apprentissage dite cohorte « test ». CART va étudier et générer de manière aléatoire un arbre de classification des individus de la cohorte test. Ainsi, CART va générer un ensemble de critères qui va permettre la classification des sujets de la cohorte test en groupes homogènes.

2) Par la suite, les sujets non sélectionnés dans la cohorte test seront utilisés pour la validation de l'arbre de classification générée : c'est la cohorte de validation. Les sujets inclus dans la cohorte de validation seront répartis dans les groupes de classification obtenus à partir de la cohorte test selon les critères préétablis. Finalement, CART va calculer le taux de prédiction et le taux d'erreur de classification de la cohorte de validation.

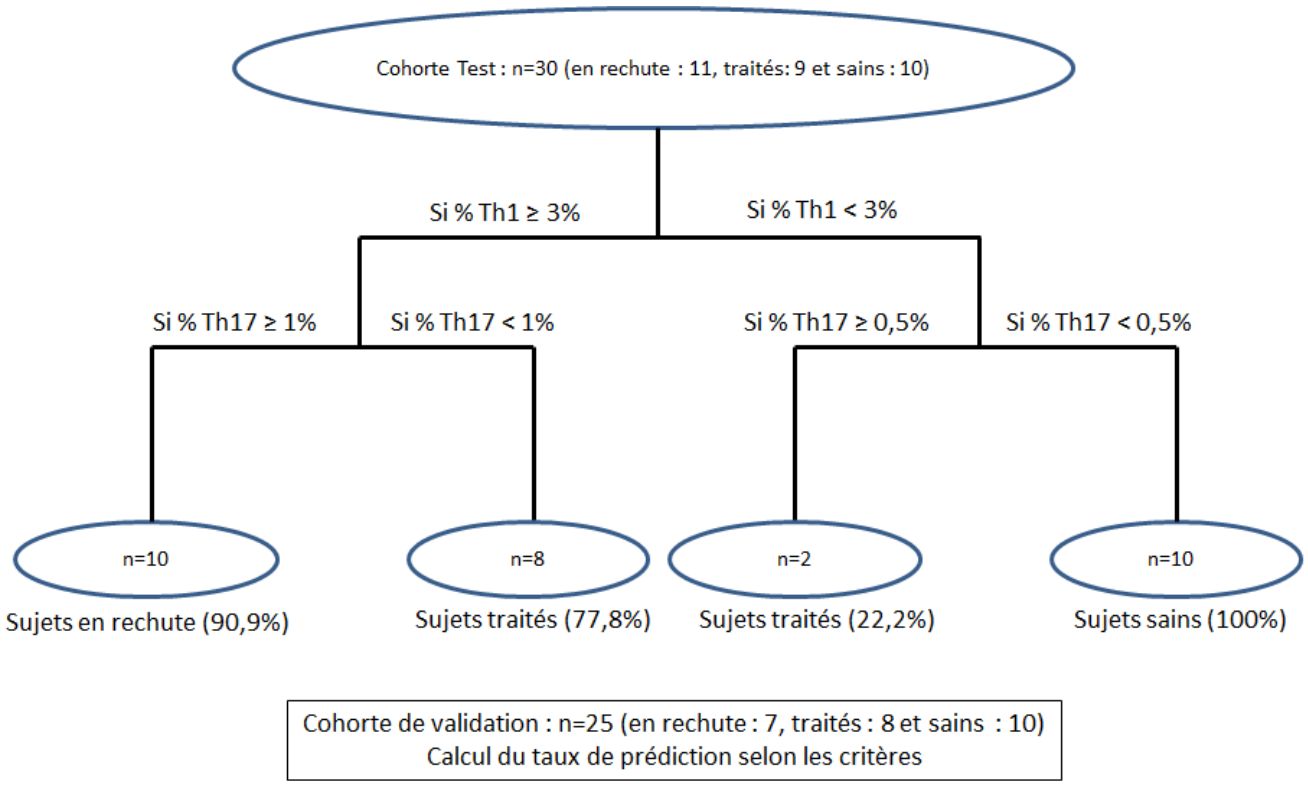


Figure 23 : Construction d'un arbre décisionnel par la CART

Les arbres CART permettent de créer un outil décisionnel. Ainsi, CART peut servir à identifier parmi un ensemble de variables, la plus petite combinaison qui permet de distinguer les sujets d'intérêts. Tout d'abord, une cohorte test sert à construire différents modèles aléatoires de classification des individus en groupes (en utilisant les variables les plus discriminantes parmi l'ensemble). Par la suite, une cohorte de validation est utilisée pour vérifier la validité et calculer le taux de prédiction du meilleur modèle.

Ce processus de validation d'un modèle prédictif par l'estimation du taux d'erreur au sein d'un même jeu de donnée s'appelle la validation croisée. Finalement, de nouveaux sujets pourront être prédits en utilisant l'algorithme décisionnel généré.

L'algorithme CART a un mode de fonctionnement proche de Citrus. La différence principale entre les deux algorithmes est que, tandis que Citrus identifie un ou plusieurs biomarqueurs de prédiction, CART identifie des biomarqueurs et crée un arbre décisionnel. Par exemple, on peut obtenir une « augmentation du pourcentage » de la fréquence de lymphocytes Th1 et Th17 comme étant des biomarqueurs spécifique d'une maladie auto-immune en comparaison aux sujets sains avec Citrus. L'inconvénient est que la notion « d'augmentation de pourcentage » n'est pas très spécifique et il s'agit de deux population cellulaires (Th1 et Th17). Ainsi, avec l'aide de CART, on peut inclure différentes valeurs correspondant aux pourcentages de lymphocytes Th1 et/ou Th17, afin d'obtenir « une valeur seuil » de prédiction d'appartenance à un groupe ou à un autre. On obtient ainsi un arbre décisionnel (**Figure 23**).

b. Approches analytiques supervisées

Il existe de nombreux outils d'analyse de données au travers des représentations bidimensionnelles. Ces méthodes sont pour la majorité supervisées et orientées selon la recherche d'une information précise. On retrouve en outre les dots plots (représentation de chaque évènement par un point sur la base de deux paramètres), les contours plots (représentation des évènements selon leur densité en fonction de deux paramètres sur un axe bidimensionnel) et les histogrammes (représentation de la fréquence de l'ensemble des évènements en fonction de leur intensité d'expression d'un paramètre donné) (**Figure 24**). Les analyses supervisées permettent de préciser un phénotype ou de valider une observation.

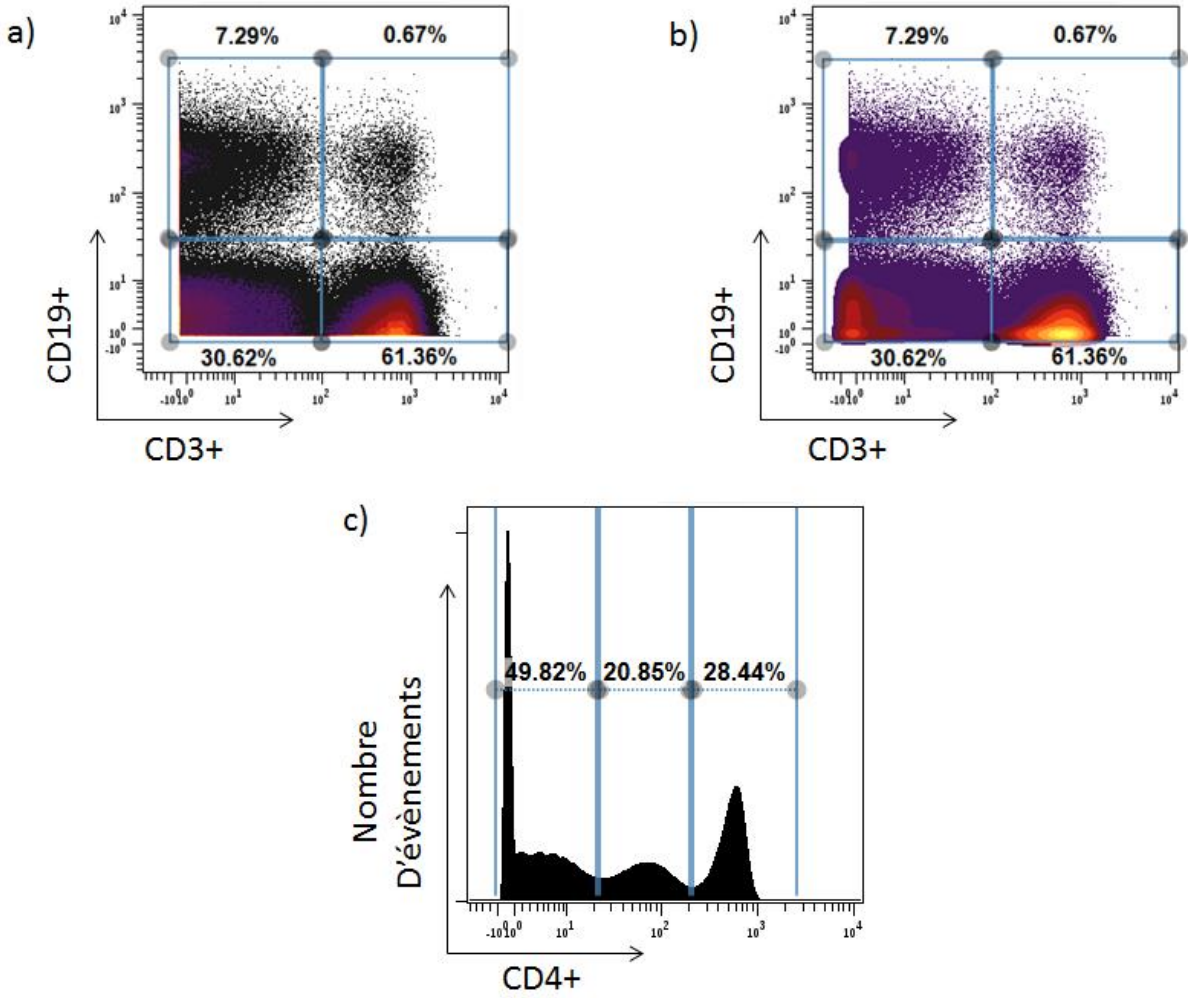


Figure 24 : Représentation d'outils d'analyses supervisés

Les outils d'analyses supervisés peuvent permettre la visualisation de données d'intérêts sous forme de **a)** dot plots : chaque point représente un évènement, **b)** contour plot : les évènements sont représentés selon leur densité et **c)** histogrammes : la fréquence des évènements est représentée en fonction de la densité. Des fenêtres peuvent être réalisées afin de vérifier la fréquence des évènements d'intérêt et de les sélectionner pour visualiser d'autres paramètres.

PROBLÉMATIQUE

Les myosites sont des maladies rares, néanmoins elles peuvent être handicapantes et peuvent engager un pronostic vital en cas de complication (troubles de la déglutition, cancers). La prise en charge des patients atteints de myosites est en continuelle amélioration, étant donné que des rechutes fréquentes sont observées et qu'aucun traitement n'a fait preuve d'efficacité sur le long terme chez les patients atteint de MIs. A ce jour, l'étiologie des myosites n'est pas connue, de plus les mécanismes pathogéniques impliqués au cours de la maladie restent encore mal décrits (ceci est le cas par exemple pour la MIs et le SAS). En plus, la classification des myosites ne cesse d'évoluer afin de permettre l'identification de sous-groupes homogènes de patients. Ceci permettra une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques spécifiques à chaque sous-groupe et une meilleure prise en charge des patients. Ainsi, mes travaux de thèse avaient les principaux objectifs suivants :

- Caractériser les cellules sanguines périphériques des patients atteints de myosites, dans le but de mieux comprendre les mécanismes pathologiques impliqués au cours de la maladie.
- Identifier des biomarqueurs spécifiques de groupes de patients pouvant renforcer ou améliorer le diagnostic et/ou aider à la classification des patients.
- Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

RÉSULTATS

Introduction article 1

La cytométrie de masse est une technique de phénotypage cellulaire innovante, qui permet l'analyse simultanée de plus de 37 marqueurs à la surface d'une cellule. Cette possibilité d'analyser un nombre important de marqueurs fait du CyTOF un outil particulièrement important pour la caractérisation cellulaire, les essais cliniques, la découverte de nouvelles populations et l'identification de biomarqueurs.

Le large choix d'anticorps pouvant être inclus dans un panel de cytométrie de masse nécessite la mise au point d'un protocole technique adapté qui va permettre leur détection. Ce protocole doit tenir compte de la fréquence des évènements les plus rares que l'on souhaite analyser, de la localisation cellulaire des cibles antigéniques d'intérêts (extracellulaire, intra cytoplasmique ou intranucléaire) et de la nature des échantillons à analyser. Parmi ces critères, le choix des cibles antigénique peut être freiné par l'effet des tampons de perméabilisation sur les épitopes antigéniques les plus sensibles. Cette observation est très bien connue de la cytométrie de flux (Krutzik et al., 2005). Néanmoins, il serait dommage de limiter tout le potentiel et l'intérêt du CyTOF à cause de soucis d'instabilité d'épitope antigénique suite à une perméabilisation.

Nous avons été parmi les premiers à appliquer la cytométrie de masse dans une étude au sein de la plateforme de cytométrie de la Pitié-Salpêtrière « CyPS » de la Pitié-Salpêtrière. Nous nous sommes heurtés à différents obstacles tant au niveau du cytomètre de masse, qu'au niveau de la mise au point et de l'optimisation d'un protocole technique pour le marquage simultané de 37 cibles sur des cellules mononucléées sanguines. Dans un premier temps, nous avons dû surmonter les obstacles liés au cytomètre de masse (du type perte d'échantillons lors du passage en plaques et perte d'échantillons lors de l'ionisation des cellules). Par la suite, nous avons mis au point et optimisé un protocole technique pour permettre la détection simultanée de marqueurs extracellulaires et intranucléaires (y compris les cibles extracellulaires préalablement décrits comme étant sensibles). Cette dernière étape nous a permis de publier un article scientifique qui témoigne des effets de différents tampons de perméabilisation sur la détection de 27 marqueurs (extracellulaires et intranucléaires) par la cytométrie de masse.

Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human pbmc using mass cytometry

(Publié par le journal Plos One)

http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194593

Gaëlle Dzangué-Tchoupou[1]*, Aurélien Corneau[2], Catherine Blanc[2], Olivier Benveniste[1, 3,] Yves Allenbach1[, 3]

Short title: Detection of a broad variety of surface and intranuclear antigens

[1] Centre of research in Myology, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 974, Pitié-Salpêtrière University hospital, Paris, France.

[2] Plateforme de Cytométrie (CyPS), Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 1135, Paris, France.

[3] Department of Internal medicine and clinical immunology, Pitié-Salpêtrière University hospital, DHU I2B, AP-HP, INSERM, UMR 974, Paris, France.

***Corresponding author:**

E-mail: gaelle.dzangue@gmail.com (GD)

Conflicts of interest disclosure: The authors have no conflicts of interest to disclose. We also have no conflicts of interest with any commercial company to disclose.

Abstract

Mass cytometry is a powerful tool that allows simultaneous analysis of more than 37 markers at the single cell level. Mass cytometry is of particular interest in the identification of a wide variety of cell phenotypes in autoimmune diseases. Moreover, cells can be labelled with palladium isotopes and pooled before staining (barcoding). Nevertheless, immunologists often face an important problem concerning the choice of markers to be included in a panel. This problem arises due to the incompatibility of different buffers used for the fixation and permeabilization of cells with various cell surface epitopes.

In this study, we used a panel of 27 markers (19 surface markers and 8 intranuclear markers) to demonstrate disparities in the detection of cell surface antigens when comparing different buffers to stain unstimulated peripheral blood mononuclear cells. These disparities range from mild differences to very important differences in population frequencies depending on the buffers. Finally, we demonstrate the harmful effects of permeabilization prior to barcoding on the detection of some cell surface antigens. Here, we optimize a protocol that is suitable to use when targeting a large panel including both cell surface and intranuclear markers on unstimulated human peripheral blood mononuclear cells.

Introduction

Mass cytometry is a powerful innovative cell profiling tool that is based on antigen detection using metal-conjugated antibodies. This approach allows for simultaneous detection of up to 40 markers at the single cell level [1-2]. Moreover, cells can be tagged with palladium isotopes and pooled before staining, thus reducing intra assay variability during the staining of cells and the acquisition of events [3]. The broad detection capacity of cellular targets using mass cytometry is of particular interest to clinical trials, deep phenotyping studies and cell population discovery in various cancers and auto-immune diseases [4]. One of the major challenges encountered when using cytometry is the simultaneous detection of cell surface markers and intranuclear markers. This trouble often arises due to the partial loss of signal intensity of cell surface markers after permeabilization [5]. Consequently, some authors use panels comprised solely of cell surface markers and secreted cytokines [6–8]. Other researchers use permeabilization buffers for the detection of intranuclear markers, but very often this permeabilization is detrimental to cell surface epitopes [9-10]. Either approach ultimately leads to the loss of the complexity and innovative approaches of mass cytometry.

Barcoding samples using palladium isotopes require a quick fixation and permeabilization step. This step can also alter the detection of cell surface markers.

At present, a systematic comparison of the effect of different permeabilization protocols on the visualization of cell surface markers in mass cytometry has never been described. Our aim was to optimize a protocol which allows the detection of a broad panel of cell surface and intranuclear markers on human PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Here, we used four permeabilization conditions to compare the effects of permeabilization on the detection of a broad panel comprised of cell surface and intranuclear markers using mass cytometry: an adapted BD cytofix/cytoperm protocol, eBioscience permeabilization buffer, MaxPar Nuclear Antigen Staining Buffer (NASB) and Methanol/Paraformaldehyde (PFA). Altogether, cells were labelled with 27 antibodies: 19 antibodies targeting cell surface markers and 8 antibodies targeting intranuclear markers.

Material and methods

Clinical samples and storage: Approval for this study was obtained from the Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de la Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) France. Citrated blood donated by healthy adults was obtained from the Etablissement Français du sang (EFS) at the Pitié Salpêtrière University Hospital. Written informed consent was signed by all donors according to the declaration of Helsinki. Upon reception of blood samples, PBMC were isolated and stored at -80°C in Foetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalog # 10270106) supplemented with 10% Dimethyl Sulfoxide. Twenty-four hours later, the cells were transferred to liquid nitrogen until time of use.

Antibodies and reagents: Twenty-four metal-conjugated antibodies were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France). Four purified monoclonal antibodies targeting CD28, CD8, RORγT and Bcl6 were obtained from BD Bioscience (Le pont-de-Claix, France) and conjugated to their respective metal tags as previously described [11]. Briefly, primary antibody transition metal-conjugates were prepared in 200 µg lots with the MaxPAR antibody conjugation kit (Fluidigm, Les Ulis, France) following the manufacturer's recommendations. After conjugation, antibodies were diluted to a working concentration of 100X in Candor PBS Antibody Stabilization solution (Candor Bioscience GmbH, Le pont Claix, France) and stored at 4°C. The list of antibodies used and their corresponding concentrations are found in S1 Table.

Viability and Iododeoxyuridine (IdU) staining: Cisplatin, IdU, PBS and staining buffer (SB) were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France). All centrifugations were performed during 5 minutes at 300x g before permeabilization and at 800x g after permeabilization.

PBMC were rapidly thawed at 37°C in a water bath then washed twice with 10 ml of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France, Catalog # R8758) supplemented with 10% FBS in 50 ml polypropylene conical tubes (Dominique DUTSCHER, Issy-les-Moulineaux, France, Catalog # 352070). Next, the cells were washed in RPMI-1640 alone and stained with IdU (Catalog # 201127) and Cisplatin (Catalog # 201064) as previously described [11]. Briefly, 13 million PBMC were incubated at 37°C for 25 minutes in PBS (Catalog # 201058) containing a

final concentration of 50 µM IdU. The cells were washed once with PBS and stained with 5 µM of Cisplatin for 5 minutes at room temperature (RT). Cisplatin was quenched in SB (volume > 5 times the initial volume). Finally, the cells were centrifuged, suspended in 500 ml of SB (Catalog # 201068) and transferred to a 5-ml polypropylene conical tube (Dominique DUTSCHER, Issy-les-Moulineaux, France, Catalog # 2005457).

Cell surface staining: Five microliters of CCR7 and 7.5 µl of CXCR5 were added to PBMC in a final volume of 75 µl of SB for 15 minutes at RT. Next, 175 µl of a mix containing the other cell surface antibodies were added to the cells for 30 minutes at RT (5 µl of each antibody as well as 7.5 µl of HLADR, IgD, and CD38). Finally, the cells were washed twice with 2 ml of SB and separated into 5 groups for the following protocols:

Fixation and permeabilization protocols

1. Cell surface staining only: No fixation or permeabilization step was performed. In this manuscript, this experimental condition is termed “CS” in the figure legends.

2. Fixation and permeabilization using BD Cytofix/Cytoperm buffer (BD, France, Catalog # 554715): Cells were incubated at RT for 1 hour with BD Cytofix/Cytoperm buffer, then washed twice with BD wash/perm solution diluted 10X in distilled water. Antibodies targeting intranuclear markers were prepared at a final volume of 50 µl in a BD wash/perm solution (1 µl of each antibody, except 1.5 µl of FoxP3) and added to cells for 1 hour at RT. Finally, cells were washed once with 500 µl of the wash/perm solution BD and once with 500 µl of SB. In this manuscript, this experimental condition is termed “ICSb” for intracellular cytokine staining buffer in the figure legends.

3. Fixation and permeabilization using eBioscience Fixation/Permeabilization buffer: Fixation/permeabilization buffer concentrate (Catalog #00-5123-43), Fixation/permeabilization buffer diluent (Catalog # 00-5223-56) and permeabilization buffer (Catalog # 00-8333-56) were obtained from eBioscience, Paris, France. The Fixation/permeabilization buffer concentrate was diluted 1:4 with the diluent, and 250 µl was added to cells for 45 minutes at RT. Cells were washed twice with permeabilization buffer diluted 10X in distilled water. Fifty microliters of the mix of antibodies targeting intranuclear nuclear antigens were prepared in permeabilization buffer (1 µl of each

antibody, except 1.5 µl of FoxP3) and added to cells for 45 minutes at RT. Finally, the cells were washed twice with SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 1" for intranuclear staining buffer 1 in the figure legends.

4. Fixation and permeabilization using Maxpar Nuclear Antigen Staining Buffer set (NASB) (Fluidigm, les Ulis, France Catalog # 201063): The cells were treated and stained according to the manufacturer's instructions. Briefly, Nuclear antigen staining buffer concentrate was diluted 4X in Nuclear antigen staining buffer diluent, and 1 ml was added to cells for 30 minutes at RT. The mix of antibodies targeting intranuclear antigens was prepared in "nuclear antigen staining perm" at a final volume of 50 µl (1 µl of each antibody, except 1.5 µl of FoxP3) and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, the cells were washed twice with SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 2" for intranuclear staining buffer 2 in the figure legends.

5. Fixation using Paraformaldehyde (PFA) (Sigma Aldrich, Saint Quentin, France) and permeabilization using and methanol (Sigma Aldrich, Saint Quentin-France): Two hundred and fifty microliters of 2% PFA were added to cells for 15 minutes at RT. The cells were washed in 1.5 ml of SB and placed on ice for 10 minutes. One millilitre of pre-cooled methanol was added to cells on ice for an additional 10 minutes. The cells were washed in 500 µl of SB, followed by the addition of a mix of 50 µl of antibodies targeting intranuclear markers in SB for 1 hour at RT (1 µl of each antibody, except for 1.5 µl of FoxP3). Two final washes were performed in SB. In this manuscript, this experimental condition is termed "INSb 3" for intranuclear staining buffer 3 in the figure legends.

Barcoding of samples: Cells from a healthy donor were thawed and stained with Cisplatin as described above. Next, the cells were split into 3 tubes containing 2 million cells each for the following conditions: no barcoding, barcoding before cell surface staining and barcoding after cell surface staining. The samples were labelled with antibodies targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25.

1. No barcoding: Antibodies targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 were added to cells at a final volume of 50 µl in SB for 30 minutes at RT as described above.

2. Barcoding before cell surface staining: Cells were incubated in 1 ml of BD cytofix/cytoperm buffer for 10 minutes at RT. Next, cells were washed 2X with 1 ml of BD wash/perm buffer and suspended in 800 µl of BD wash/perm buffer. Palladium isotopes were suspended in 100 µl of each buffer BD wash/perm buffer and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, the cells were washed 2X with SB and incubated in a mix of antibodies containing 1 µl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above.

3. Barcoding after cell surface staining: Cells were incubated in 50 µl of SB containing 1 µl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above. Next, the cells were incubated with either 1 ml of BD cytofix/cytoperm buffer for 10 minutes at RT. Next, the cells were washed 2X with 1 ml of BD wash/perm buffer and suspended in 800 µl of BD wash/perm buffer. Palladium isotopes were suspended in 100 µl of BD wash/perm buffer and added to cells for 30 minutes at RT. Finally, cells were washed 2X with SB.

Assessment of the loss of signal intensity of surface markers after barcoding: Cells from a healthy donor were thawed and incubated for 5 minutes in 5 µM Cisplatin as described above. Next, the cells were divided into 3 tubes containing 1 million cells each for no barcode/no permeabilization, permeabilization only/no barcode and permeabilization/barcode groups. Samples were incubated in a final volume of 50 µl SB containing 1 µl of each antibody targeting CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for 30 minutes at RT as described above.

DNA staining: After the end of each experimental condition described above, DNA was labelled with Cell-ID Intercalator-Ir-125 µM (Fluidigm, les Ulis, France, Catalog # 201192A) diluted 1:1000 in Maxpar Fix and perm Buffer (Fluidigm, les Ulis, France, Catalog # 201067) overnight at 4°C. Nevertheless, Cell-ID Intercalator-Ir-125 µM was diluted in 2% PFA for the Methanol/PFA permebilization conditions. The following day, the cells were washed once with staining buffer and once with PBS. Immediately before acquisition, cells were washed once with water, filtered and diluted with 4 element EQ beads (Fluidigm, les Ulis, France).

Mass cytometric data acquisition and analysis: Cellular events were acquired on the Helios, which is available at the "Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière". Cells were acquired at a speed of 300 events per second, with a cell length threshold between 10 and 150 pushes. The 4 elements EQ beads were used to normalize files using the Matlab compiler software cell normalizer. Data files were obtained in the FCS file format and analysed using FlowJo software version 10 and Cytobank cloud based platform. Beads were gated out using the following gates: 140/142Ce, 151/153Eu, 165Ho and 175/176 Lu. CD45+ events were selected for the analysis of different cell populations. Cisplatin+ dead cells were gated out and we performed a viSNE (Stochastic Neighbor Embedding) analysis on CD45+ cells for auniform and non-biased separation of events. The settings used for the viSNE run were as follow: equal event sampling (20.000 events each), channels (CD19, CD4, IgD, CD16, CD14, CD8, CD56 and CD3), iterations (1000), perplexity (50) and theta (0.3).

Statistics: All the experiments were performed at least 3 times independently. Different individuals were used for independent experiments. For the comparison of frequencies including cell surface markers, the "surface staining only" condition was used as the control. On the other hand, the "eBioscience permeabilization buffer" condition was used as the control for the comparison of intranuclear markers. Statistics were performed using the GraphPad Prism version 6 software. For multiple comparisons, we used one-way ANOVA with Bonferroni's multiple correction test (* if $p<0.05$, ** if $p<0.001$, *** if $p<0.0001$).

Results

Effects of different buffers on the detection of cell surface antigens

Our first aim was to compare the effects of different buffers on the detection of cell surface markers. We performed viSNE analyses to avoid bias issues with gating strategy. Strikingly, viSNE plots show variable intensities of surface markers such as CD19, CD56 and CD16 when the "cell surface staining only" conditions were compared to Maxpar NASB and eBioscience Permeabilization buffers (**Fig 1**). Additional viSNE plots showing the intensities of CD45, CD3, CD4, CD8 and IgD are available in **S1 Fig**. Interestingly, BD cytofix/cytoperm buffer and PFA/methanol allowed for detection of population frequencies very close to the "surface staining only" conditions. Greater variations of percentages were observed with eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB. For example, the median percentages of CD19+ events, CD16+ events and CD56+ events for all experiments (n=3-5) is as follows: respectively 9%, 29% and 25% for the control condition, respectively 12%, 26% and 24% for BD cytofix/cytoperm buffer, respectively 8%, 17% and 14% for eBioscience permeabilization buffer, respectively 3%, 7% and 6% for MaxPar NASB and respectively 8%, 29% and 27% for methanol/PFA (**Fig 2**). We performed antibody titration assays, to rule out the possibility that antibodies were not used at saturating conditions **S2 Fig**.

Furthermore, variations in the frequencies of rare CD4+ populations, such as regulatory T cells (Treg)(CD3+CD4+CD25hiCD127low) and primed T cells (CD3+CD4+CXCR5+CCR7+) were observed with eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB (**Fig 3**). We also observed a particular distribution of CXCR5/CCR7 events in the PFA/methanol conditions. Finally, we compared the frequencies of rare B cell populations, such as transitional B cells (CD19+CD24hiCD38hi) and un-switched memory B cells (CD19+IgD+CD27+) among the different conditions (**Fig 3**). The most striking observation was the variation of transitional B cells within the various conditions tested. While the "surface staining only condition" , BD Cytofix/Cytoperm buffer and methanol/PFA conditions displayed a median percentage of 3%, 3% and 1.5% of transitional B cells, respectively, eBioscience Permeabilization buffer and Maxpar NASB displayed only 0.5% and 0.2% respectively (**Fig 3**). A comparison of the median percentages of naïve B cells (CD19+IgD+CD27-), switched memory B cells

(CD19+IgD-CD27+) and other CD4+ T cell populations are available in **S3 Fig**. Histograms of all surface markers are available in **S4 Fig**.

Detection of intranuclear antigens using different buffers:

Our next aim was to compare the effects of the different buffers on the quantification of intranuclear markers. Here, we used different intranuclear markers to define T CD4+ lineages: regulatory T cells (Tregs) (CD3+CD4+CD25hiFoxP3+), Th17 cells (CD3+CD4+RorγT+), follicular helper T cells (Tfh)(CD3+CD4+Bcl6+) and also CD8+Tbet+ cells. The most striking observation was the detection of intranuclear markers using the adapted BD cytofix/cytoperm protocol. We observed median percentages of 2.7%, 0.2%, 0.1% and 38% respectively for Tregs, Th17 cells, Tfh cells and CD8+Tbet+ cells with eBioscience Permeabilization buffer versus 2.2%, 0.2%, 0.05% and 30% respectively for BD cytofix/cytoperm buffer (**Fig 4**). In addition, the median percentages of Tregs, Th17 cells, Tfh cells and CD8+Tbet+ cells for the Maxpar NASB conditions were: respectively 2.1%, 0.1%, 0.2% and 29% versus 2.2%, 0.05%, 0.03% and 13% respectively for the PFA/Methanol conditions. The adapted protocol using BD cytofix/cytoperm buffer also allowed the detection of cell cycle markers **S4 Fig**.

Effects of permeabilization prior to barcoding on the detection of cell surface antigens:

Finally, we assessed the effects of the fixation and permeabilization step prior to barcoding on the signal intensity of 5 surface antigens (CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25). We observed a very weak signal intensity of CD127 and a loss of the CD4intermediate populations when barcoding was performed prior to cell surface staining. What remained unclear was whether the barcode or the permeabilization step was responsible for this weaker expression. Surprisingly, the weaker signal intensity of CD4 and CD127 was observed when BD permeabilization buffer was used alone without any barcode (**Fig 5**). Increase concentrations of CD127 and CD4 antibodies were not sufficient to prevent the loss observed (**S6 Fig**).

Discussion

Mass cytometry is an innovative tool that allows for simultaneous detection of up to 40 markers at the single cell level. The broad detection capacity of mass cytometry is of particular interest when a wide range of cellular markers can be identified at the same time, which makes this tool a precious asset in clinical trials, deep phenotyping and cell population discovery [12-13]. Nevertheless, it is important to choose appropriate fixation and permeabilization conditions to clearly detect cell surface and intranuclear antigens. In this study, we assessed the effects of 4 permeabilization conditions on the detection of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC: “BD cytofix/cytoperm buffer”, “eBioScience permeabilization buffer”, “Maxpar NASB” and “PFA/Methanol”. We used a panel of 27 antibodies including 19 antibodies targeting cells surface antigens and 8 antibodies targeting intranuclear antigens.

The frequencies of the populations described in the control conditions are in accordance with those observed in the literature [14-17]. As expected, permeabilization was associated with lower frequencies of populations gated using surface markers. The variations observed were dependent on the buffer used. Variations in antibody concentrations are ruled out, since all cells were stained together before being split into the different permeabilization conditions. Considering that antibodies are efficiently coupled to surface antigens before the fixation/permeabilization step, we believe that the variations observed are due to the partial destruction of epitopes by the buffers.

Epitope instability upon permeabilization is well known in flow cytometry [5]; which explains our observations. Nevertheless, mass cytometry offers a broader range of antigen detection compared to flow cytometry. Therefore, the setting of a suitable protocol to limit epitope instability is necessary to optimize the potential of mass cytometry.

For permeabilization protocols, we choose as reference eBioscience buffer, since the results we obtained (intranuclear T CD4+ cells markers) were similar with those previously reported [18-20]. It is important to remind that BD cytofix/cytoperm is a buffer for intracellular cytokines detection, whereas MaxPar NASB and Methanol/PFA are dedicated to intranuclear staining. In this study, the optimization we made of BD cytofix/cytoperm

protocol permits the detection of intranuclear targets with the same efficacy as intranuclear permeabilization buffers (eBioscience Permeabilzation buffer, MaxPar NASB and PFA/Methanol). In addition, this optimized protocol does not alter the detection of surface markers.

Here, we also assessed the effects of the recommended quick permeabilization step prior to barcoding on the detection of 5 surface markers. We observed weaker signal intensities of CD4 and especially CD127 when cells were barcoded before cell surface staining. Accordingly, the poor performance of CD127 upon barcoding was previously described [7]. To overcome such issues, Zunder and colleagues described various troubleshooting approaches when barcoding cells [3]. They described the detection of lower antibody staining intensity as a result of high mass-cell tag barcoding. In this study, we demonstrated that the lower staining intensity of CD127 and CD4 is not due to the mass-cell barcoding tag, but rather to the permeabilization step performed. Recently, a different barcoding approach based on CD45 coupled to different metal tags was described [21-22]. This novel barcoding approach does require any permeabilization step; however its application is limited to cells that uniformly express CD45.

Conclusion

In conclusion, here we compared different permeabilization protocols and showed that our adapted protocol allows the detection of intranuclear markers without altering the detection of a large panel of cell surface markers. Finally, we also confirmed the poor performance of CD127 upon barcoding. We show that this poor performance is due to the permeabilization step, and not due to the palladium isotopes. We suggest performing barcoding after cell surface staining or after the staining of sensitive epitopes, thereby protecting sensitive epitopes while preserving a uniform intra-assay staining and acquisition of events.

References

1. Bjornson ZB, Nolan GP, Fantl WJ. Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states. Curr Opin Immunol. 2013 Aug;25(4):484–94.

2. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el-A, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science. 2011 May;332(6030):687–96.

3. Zunder ER, Finck R, Behbehani GK, Amir E-AD, Krishnaswamy S, Gonzalez VD, et al. Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm. Nat Protoc. 2015 Feb;10(2):316–33.

4. Baumgart S, Peddinghaus A, Schulte-Wrede U, Mei HE, Grützkau A. OMIP-034: Comprehensive immune phenotyping of human peripheral leukocytes by mass cytometry for monitoring immunomodulatory therapies. Cytom A. 2017 Jan;91(1):34–8.

5. Krutzik PO, Clutter MR, Nolan GP. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Aug 15;175(4):2357–65.

6. Yao Y, Liu R, Shin MS, Trentalange M, Allore H, Nassar A, et al. CyTOF supports efficient detection of immune cell subsets from small samples. J Immunol Methods. 2014 Dec 15;415:1–5.

7. Nassar AF, Wisnewski AV, Raddassi K. Automation of sample preparation for mass cytometry barcoding in support of clinical research: protocol optimization. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2017 Jan; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124752

8. Behbehani GK, Thom C, Zunder ER, Finck R, Gaudilliere B, Fragiadakis GK, et al. Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2014 Dec;85(12):1011–9.

9. Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, Chen TJ, Savig ES, Bruggner RV, et al. Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. Nat Biotechnol. 2012 Sep;30(9):858–67.

10. Han L, Qiu P, Zeng Z, Jorgensen JL, Mak DH, Burks JK, et al. Single-cell mass cytometry reveals intracellular survival/proliferative signaling in FLT3-ITD-mutated AML stem/progenitor cells. Cytom A. 2015 Apr;87(4):346–56.

11. Corneau A, Cosma A, Even S, Katlama C, Le Grand R, Frachet V, et al. Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. Cytom B Clin Cytom. 2017 Jan;92(1):21–32.

12. Nassar AF, Wisnewski AV, Raddassi K. Mass cytometry moving forward in support of clinical research: advantages and considerations. Bioanalysis. 2016 Feb;8(4):255–7.

13. Nassar AF, Ogura H, Wisnewski AV. Impact of recent innovations in the use of mass cytometry in support of drug development. Drug Discov Today. 2015 Oct;20(10):1169–75.

14. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Oct 1;175(7):4180–3.

15. Lin W, Jin L, Chen H, Wu Q, Fei Y, Zheng W, et al. B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences. Arthritis Res Ther. 2014 May 29;16(3):R118.

16. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. J Exp Med. 2000 Dec 4;192(11):1553–62.

17. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. Clin Exp Immunol. 2010 Nov;162(2):271–9.

18. Ateba-Ngoa U, Mombo-Ngoma G, Zettlmeissl E, van der Vlugt LEPM, de Jong SE, de Jong S, et al. CD4+CD25hiFOXP3+ cells in cord blood of neonates born from filaria infected

mother are negatively associated with CD4+Tbet+ and CD4+RORγt+ T cells. PloS One. 2014;9(12):e114630.

19. Saygılı T, Akıncılar SC, Akgül B, Nalbant A. Aggregatibacter actinomycetemcomitans GroEL protein promotes conversion of human CD4+ T cells into IFNγ IL10 producing Tbet+ Th1 cells. PloS One. 2012;7(11):e49252.

20. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2009 Jun;60(6):1647–56.

21. Mei HE, Leipold MD, Schulz AR, Chester C, Maecker HT. Barcoding of live human peripheral blood mononuclear cells for multiplexed mass cytometry. J Immunol Baltim Md 1950. 2015 Feb 15;194(4):2022–31.

22. Lai L, Ong R, Li J, Albani S. A CD45-based barcoding approach to multiplex mass-cytometry (CyTOF). Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2015 Apr;87(4):369–74.

Supporting information

S1 Table. List of antibodies.

S1 Fig. Distribution of CD45, CD3, CD4, CD8 and IgD on viSNE plots.

S2 Fig. Saturating conditions of CD19, CD3, CD16 and CD56.

S3 Fig. Median percentages of B and T cell populations.

S4 Fig. Histograms of all surface markers.

S5 Fig. Visualization of cell cycle markers.

S6 Fig. Saturating conditions of antibodies for barcoding conditions.

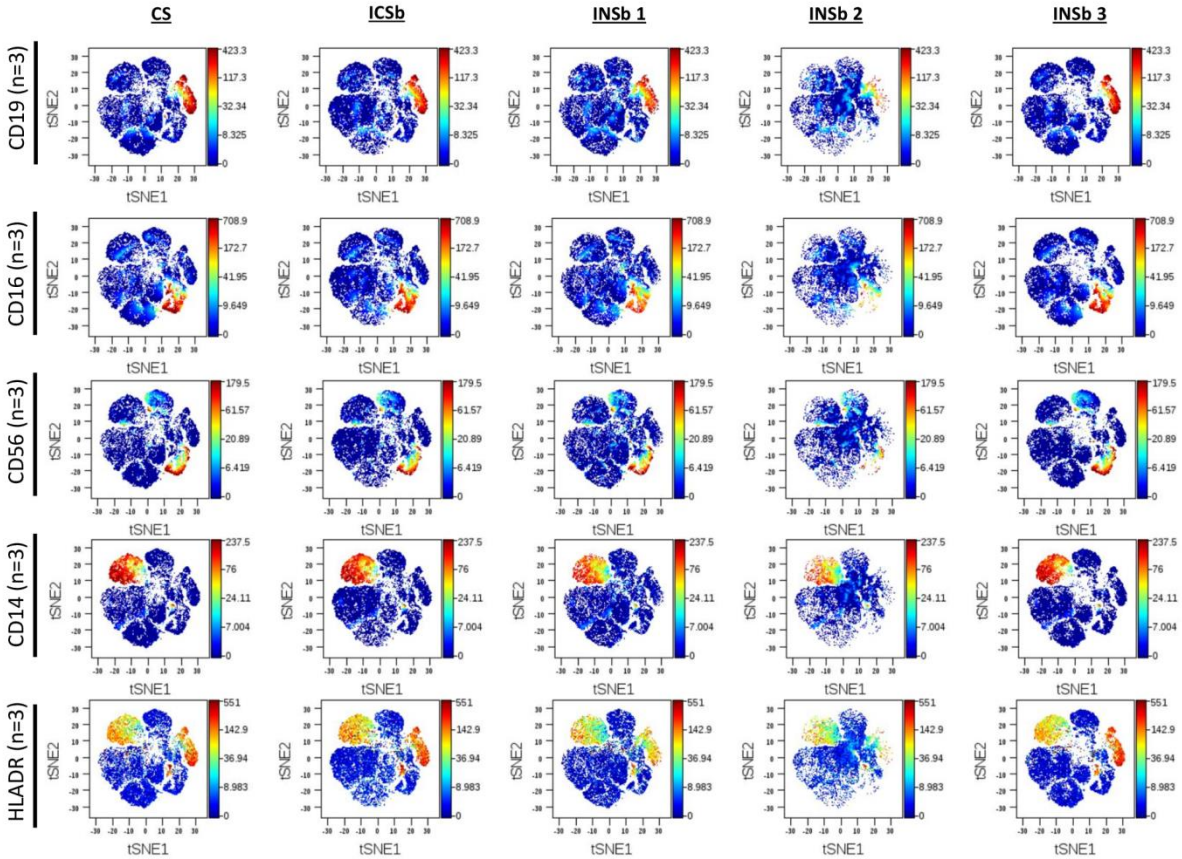


Fig 1. Visualization of the effects of different buffers on the intensity of cell surface markers.

Cells from healthy donors were labeled with antibodies targeting both cell surface antigens and intranuclear antigens. Data show the distribution of CD45+ live cells on viSNE plots with the "cell surface staining" only condition (CS) and the different permeabilization conditions: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). The intensity of CD19+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR+ events are shown. The concentrations of antibodies used for the detection of these markers are as follows: CD19 (0.5 mg/ml), CD16 (0.2 mg/ml), CD56 (0.1 mg/ml), CD14 (0.3 mg/ml) and HLADR (0.3 mg/ml). viSNE was performed using 1000 iterations, with a perplexity of 30 and theta=0.3. The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. Different healthy individuals were used for each independent experiment.

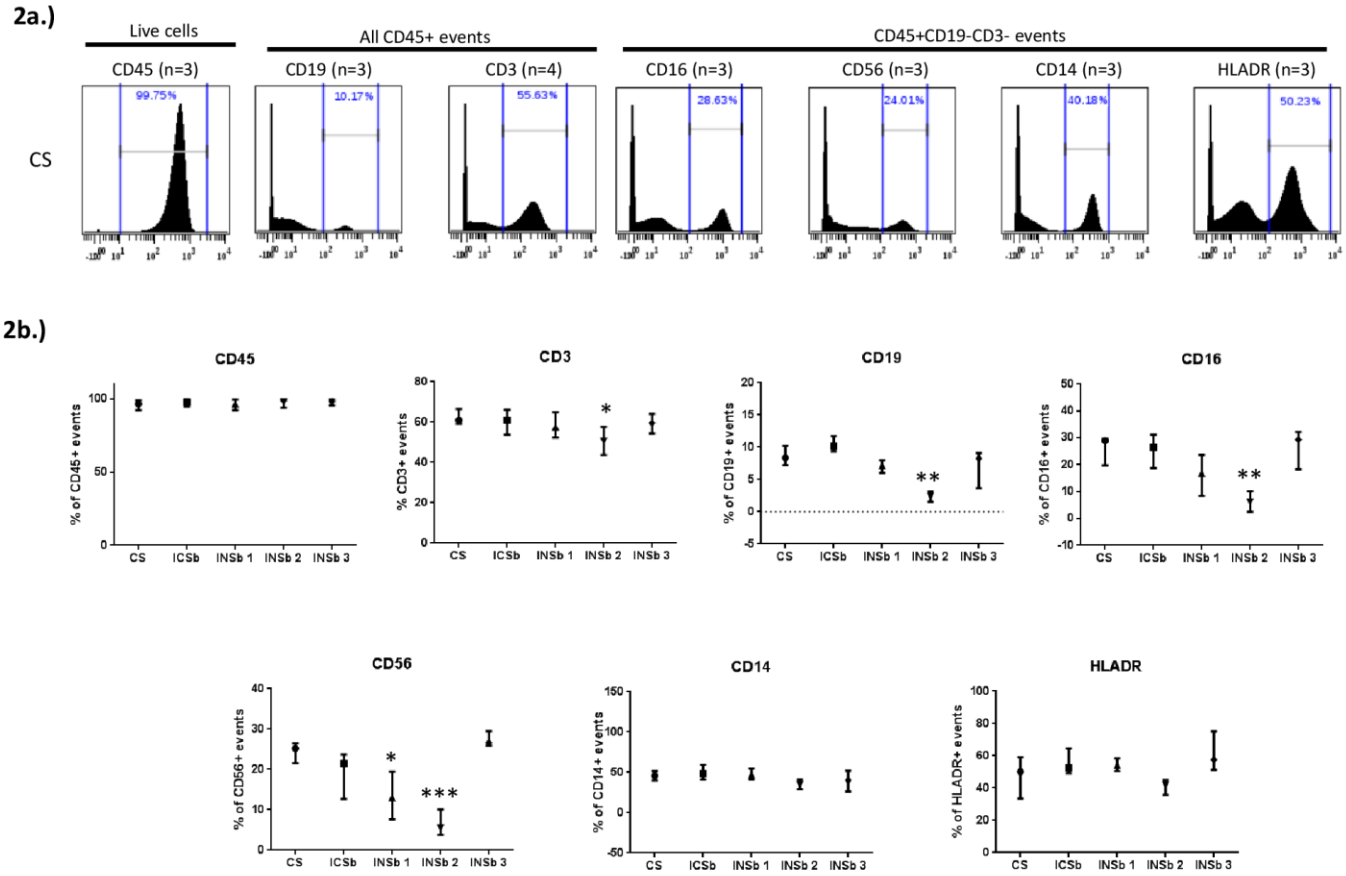


Fig 2. Effects of different buffers on the detection of cell surface markers.

Cells from healthy donors were labelled with antibodies targeting both cell surface and intranuclear antigens. Different permeabilization conditions are compared to the cell surface staining only" (CS) condition: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). Here, we show the effects of different permeabilization conditions on the frequency of various cell surface markers. a.) Histograms showing the frequency and distribution of CD45+, CD19+, CD3+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR+ events in the CS condition. The concentrations of antibodies used were: CD45 (0.5 mg/ml), CD19 (0.5 mg/ml), CD3 (0.08 mg/ml), CD16 (0.2 mg/ml), CD56 (0.1 mg/ml), CD14 (0.3 mg/ml) and HLADR (0.3 mg/ml). b.) Comparison of the frequency of CD45+, CD19+, CD3+, CD16+, CD56+, CD14+ and HLADR+ events between the CS condition and the different permeabilization conditions. Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction (*$p<0.05$, **$p<0.001$, ***$p<0.0001$). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. Different healthy individuals were used for each independent experiment.

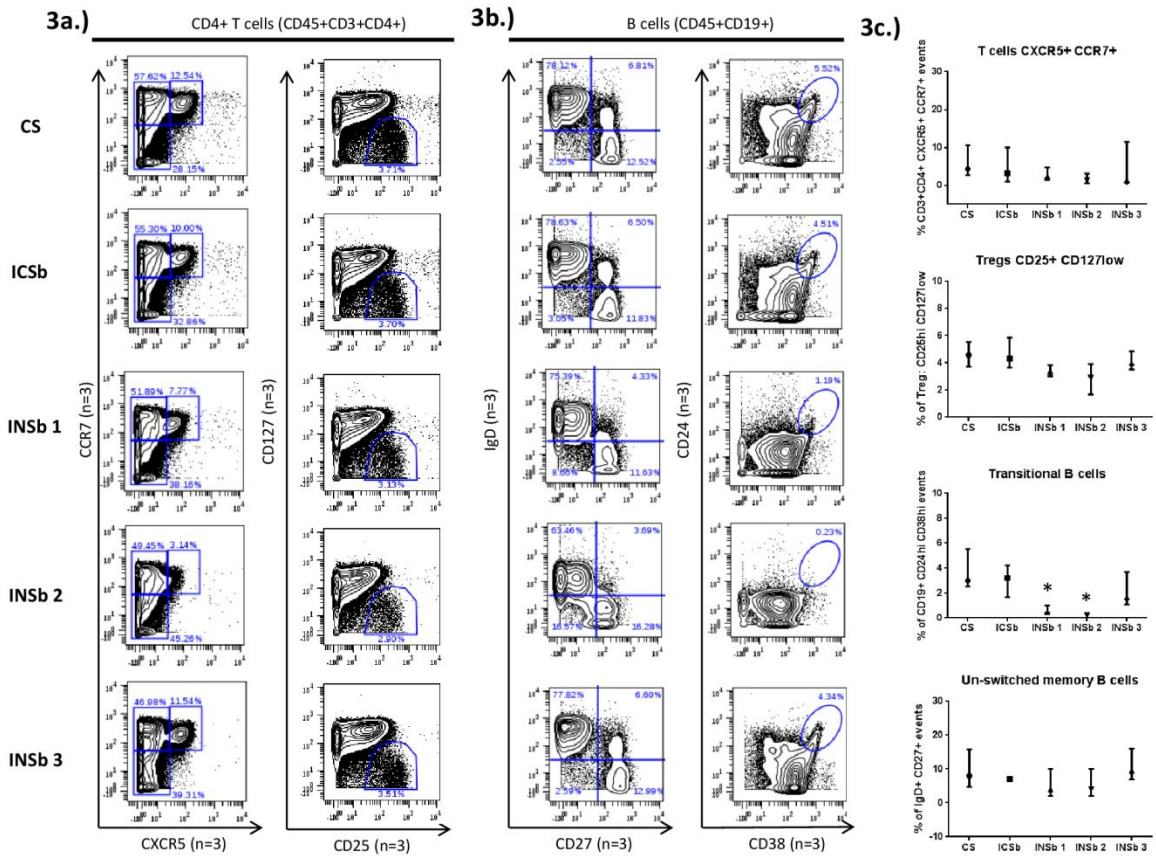


Fig 3. Effects of different buffers on the detection of rare populations.

Cells from healthy donors were labelled with antibodies targeting both cell surface and intranuclear antigens. Different permeabilization conditions are compared to the cell surface staining only" (CS) condition: ICSb (BD cytofix/cytoperm buffer), INSb 1 (eBioscience permeabilization buffer), INSb 2 (Maxpar NASB) and INSb 3 (Methanol/PFA). This data compare the frequency of various CD45+ populations between the CS condition and the different permeabilization conditions. a.) Frequencies of rare CD4+ T cell populations: primed T cells (CXCR5+ CCR7+) and Treg cells ($CD25^{hi}$ $CD127^{low}$). b.) Frequencies of rare B cell populations such as transitional B cells ($CD24^{hi}CD38^{hi}$) and un-switched memory B cells (CD19+IgD+CD27+). c.) Statistics showing the comparison of the frequency of rare T and B cell populations within the different experimental conditions. The concentrations of antibodies used were: CXCR5 (0.04 mg/ml), CCR7 (0.5 mg/ml), CD25 (0.5 mg/ml), CD127 (0.5 mg/ml), CD24 (0.3 mg/ml), CD38 (0.3 mg/ml), IgD (0.25 mg/ml) and CD27 (0.1 mg/ml). Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

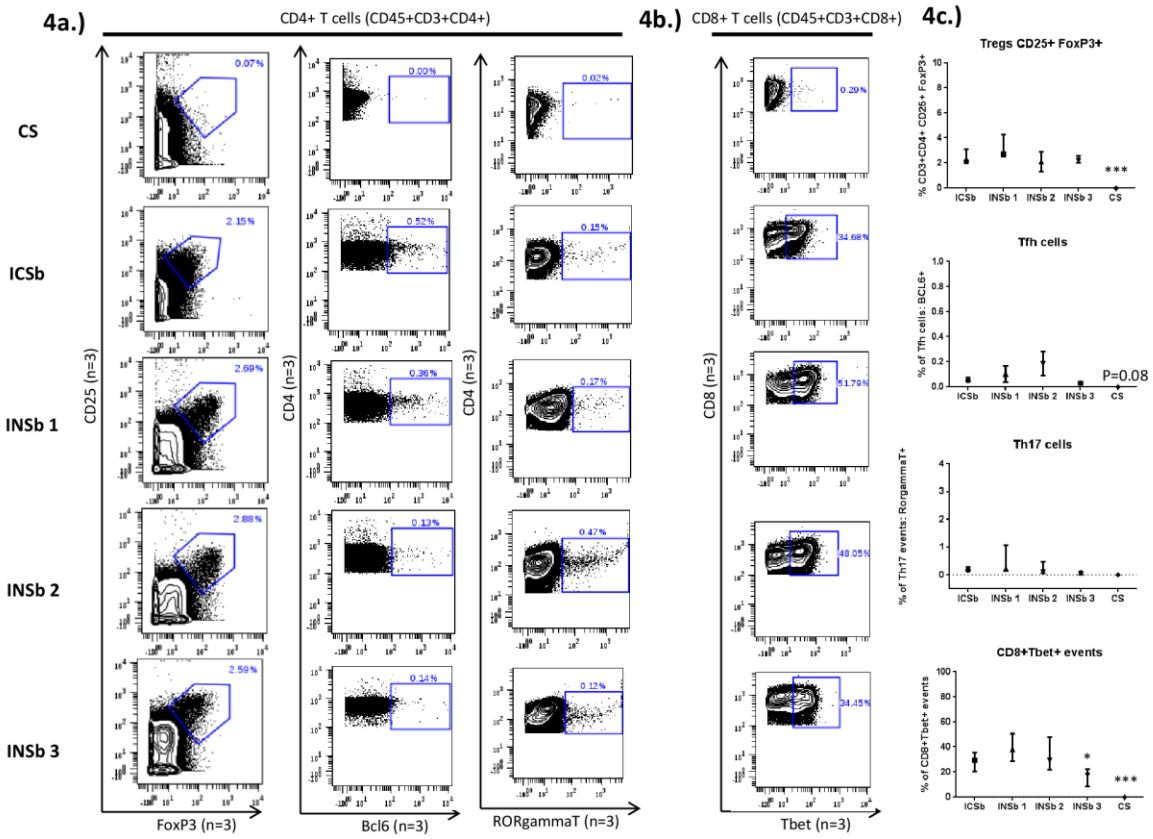


Fig 4. Detection of intranuclear markers using the adapted BD cytofix/cytoperm protocol. Cells from healthy donors were incubated with antibodies targeting cell surface antigens and then split into 5 for the following conditions: the "surface staining only" conditions (CS), and fixation and permeabilization using either BD cytofix/cytoperm buffer (ICSb), eBioscience fixation and permeabilization buffer (INSb 1), Maxpar NASB (INSb 2) and PFA/methanol (INSb 3). Next cells were labelled with a mix of antibodies targeting intranuclear markers. Data compare the frequencies of Treg cells (CD25hiFoxP3+), Tfh cells (CD4+BCL6+), Th17 cells (CD4+RoryT+) and CD8+Tbet+ cells between the various permeabilization conditions. The concentrations of antibodies used are as follow: FoxP3 (0.3 mg/ml), BCL6 (0.8 mg/ml), RoryT (0.6 mg/ml) and Tbet (0.3 mg/ml). Statistics was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple test correction (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001). Data obtained from all the other permeabilization conditions were compared to INSb 1 condition. The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

Fig 5a and b: Partial loss of the signal intensity of CD4 and CD127 after barcoding

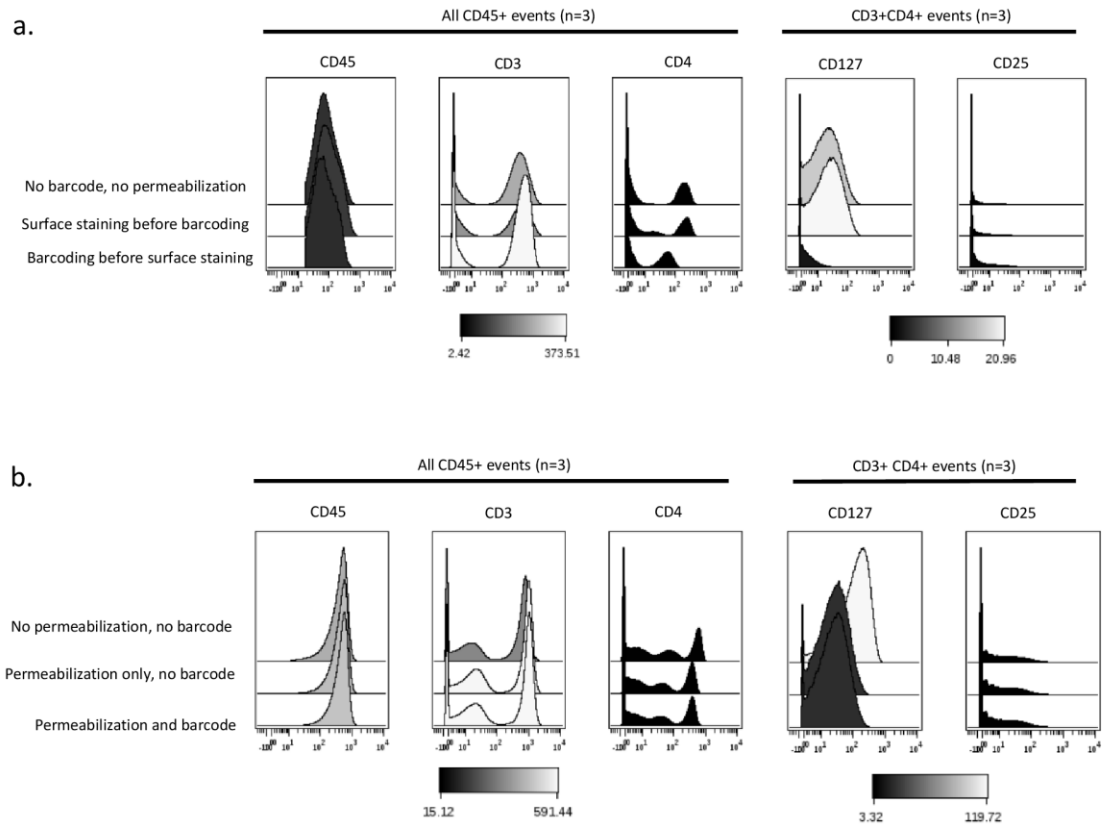
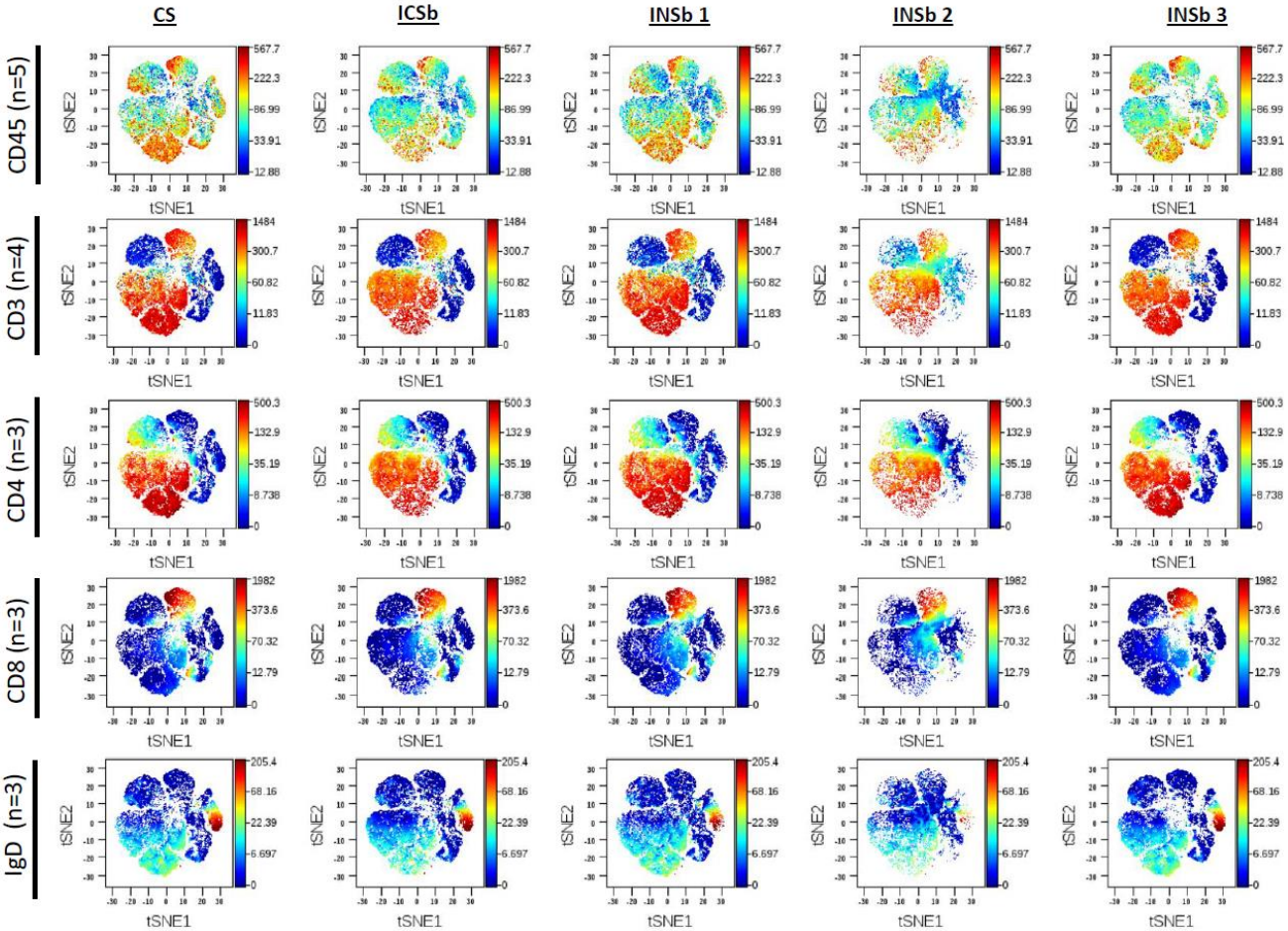


Fig 5. Partial loss of the signal intensity of CD4 and CD127 after barcoding.

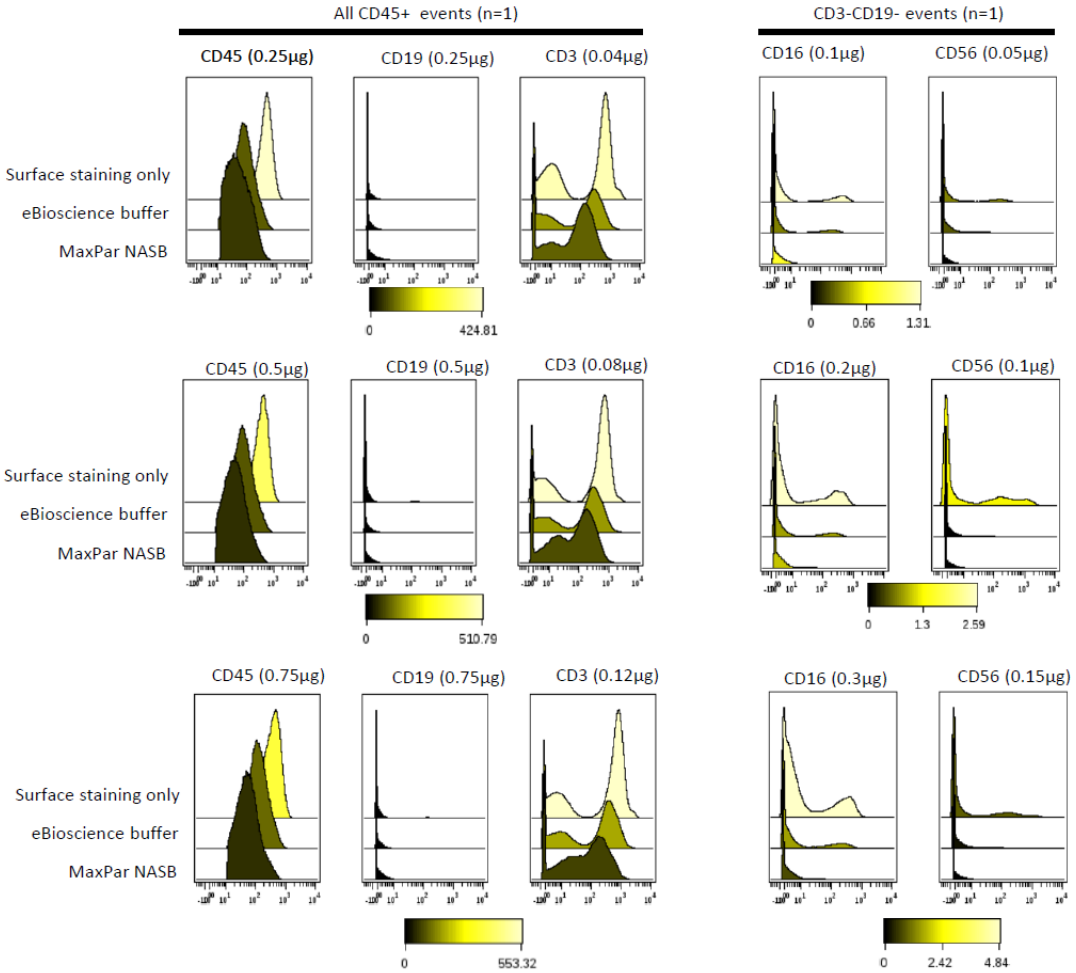
Cells were thawed as described above and used for the following purposes: a) assessment of the effects of barcoding on the expression of surface markers. Three experimental conditions were performed: no barcode/no permeabilization, surface staining before barcoding and finally barcoding before surface staining. Data show histogram overlays of CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for the different conditions. The concentrations of antibodies used are as follow: CD45 (0.5 mg/ml), CD3 (0.08 mg/ml), CD4 (0.25 mg/ml), CD127 (0.5 mg/ml) and CD25 (0.5 mg/ml). b) Assessment of the cause of the lower signal intensity of CD4 and CD127 when PBMC are barcoded before cell surface staining. 3 conditions were evaluated: no barcode/no permeabilization, permeabilization only/no barcoding and permeabilization followed by barcoding. Data show histogram overlays of CD45, CD3, CD4, CD127 and CD25 for the different conditions. The data shown are representative of an independent experiment. Experiments were performed 3 times independently. PBMC from different individuals were used for each independent experiment.

S1 Fig. Distribution of CD45, CD3, CD4, CD8 and IgD on viSNE plots.

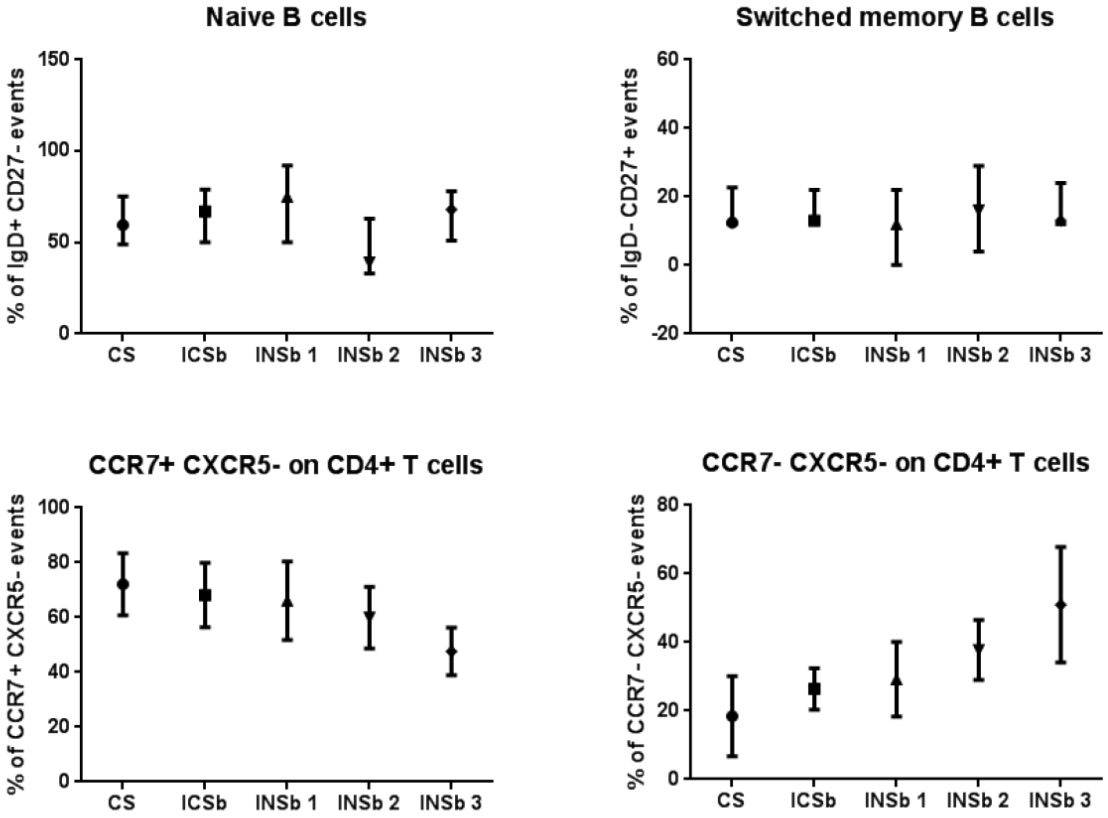


Antigen	Metal tag	Manufacturer	Catalog #	Lot #	Clone	Concentration (mg/ml)
			Cell surface markers			
CD45	89	Fluidigm	3089003B	2991609	HI30	0,5
CD19	142	Fluidigm	3142001B	0331503	HIB19	0,5
HLADR	143	Fluidigm	3143013B	1631407	L243	0,3
CD4	145	Fluidigm	3145001B	2171601	RPA-T4	0,25
IgD	146	Fluidigm	3146005B	0621515	IA6-2	0,25
CD16	148	Fluidigm	3148004B	0871423	3G8	0,2
CD14	151	Fluidigm	3151009B	2101406	M5E2	0,3
CD28	154	BD Pharmingen	555725	4311676	CD28.2	0,59
CD27	158	Fluidigm	3158010B	0421404	L128	0,1
CCR7	159	Fluidigm	3159003A	1891504	G043H7	0,5
CD8	161	BD Pharmingen	555363	89931	PURIFIED NA/LE MOUSE	0,63
CD56	163	Fluidigm	3163007B	0131506	NCAM16.2	0,1
CD24	166	Fluidigm	3166007B	1431401	ML5	0,3
CD138	168	Fluidigm	3168009B	0031406	DL101	0,5
CD25	169	Fluidigm	3169003B	1071401	2A3	0,5
CD3	170	Fluidigm	3170001B	1921405	UCHT1	0,075
CXCR5	171	Fluidigm	3171006B	1141316	51505	0,04
CD38	172	Fluidigm	3172007B	0191505	HIT2	0,3
CD127	176	Fluidigm	3176004B	1071409	A019D5	0,5
			Intranuclear markers			
IdU	127	Fluidigm	201127			50mM
phosphoRb	150	Fluidigm	3150013A	0911407	J112-906	0,25
Tbet	160	Fluidigm	3160010B	0141528	4B10	0,3
FOXP3	162	Fluidigm	3162024A	1591502	259D/C7	0,3
CyclinB1	164	Fluidigm	3164010A	3031309	GNS-1	0,25
RORγT	173	BD Pharmingen	562197	13889	028-835	0,56
phosphoH3	175	Fluidigm	3175012A	0871420	HTA28	0,3
			DNA markers			
DNA1	191	Fluidigm	201192A	0891001		
DNA2	193	Fluidigm	201192A	0891001		

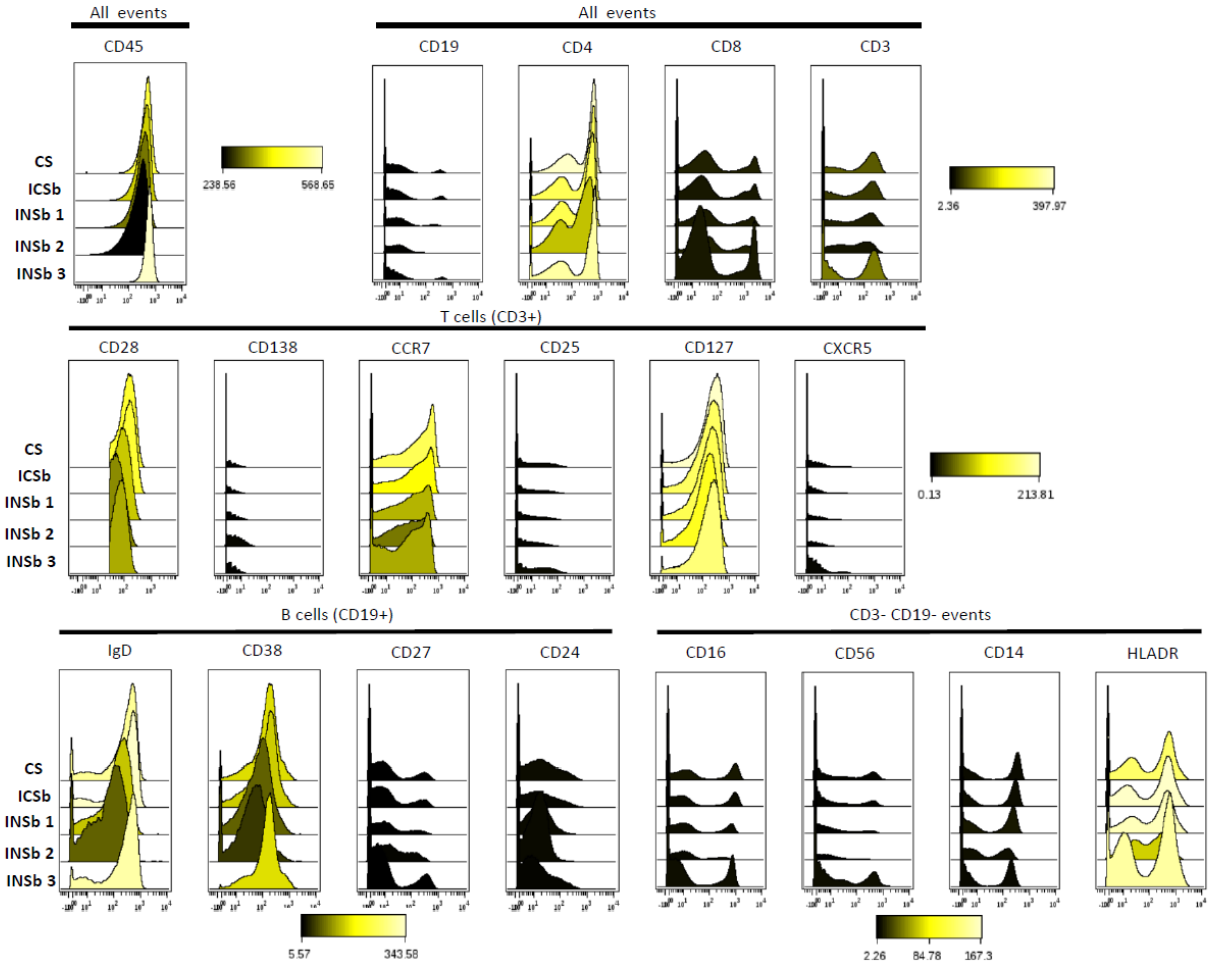
S2 Fig. Saturating conditions of CD19, CD3, CD16 and CD56.



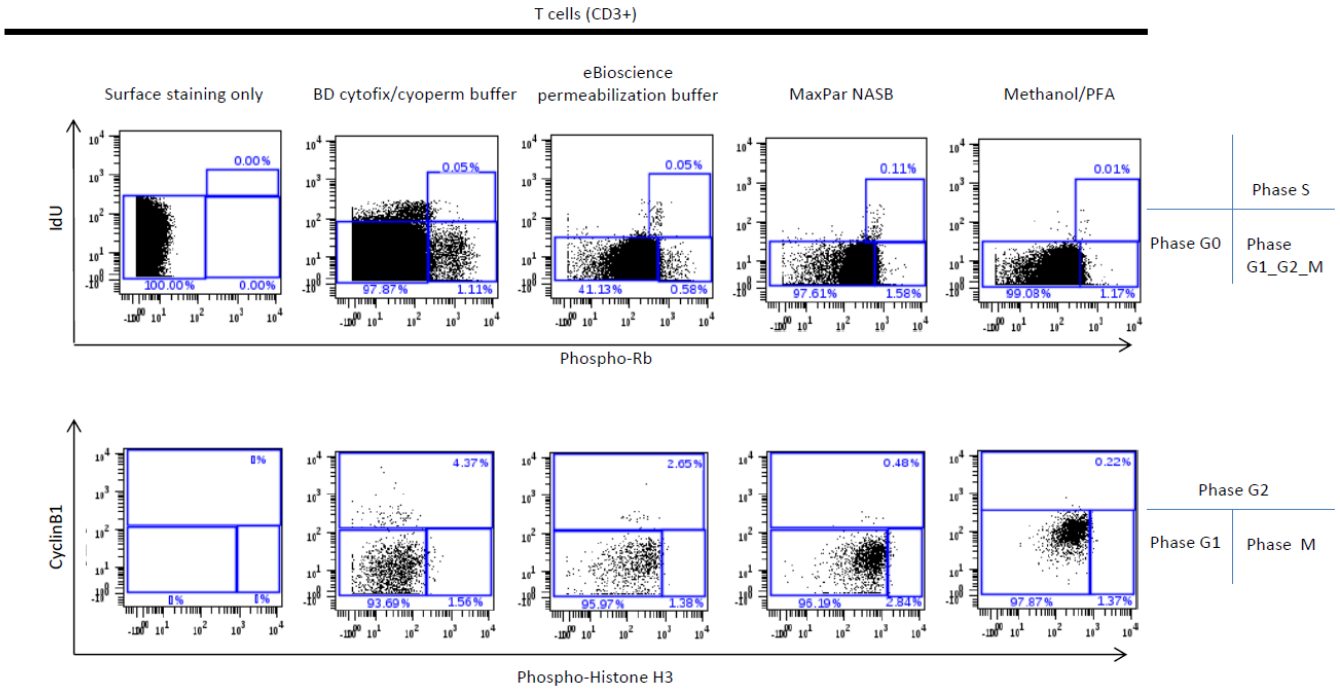
S3 Fig. Median percentages of B and T cell populations.



S4 Fig. Histograms of all surface markers.

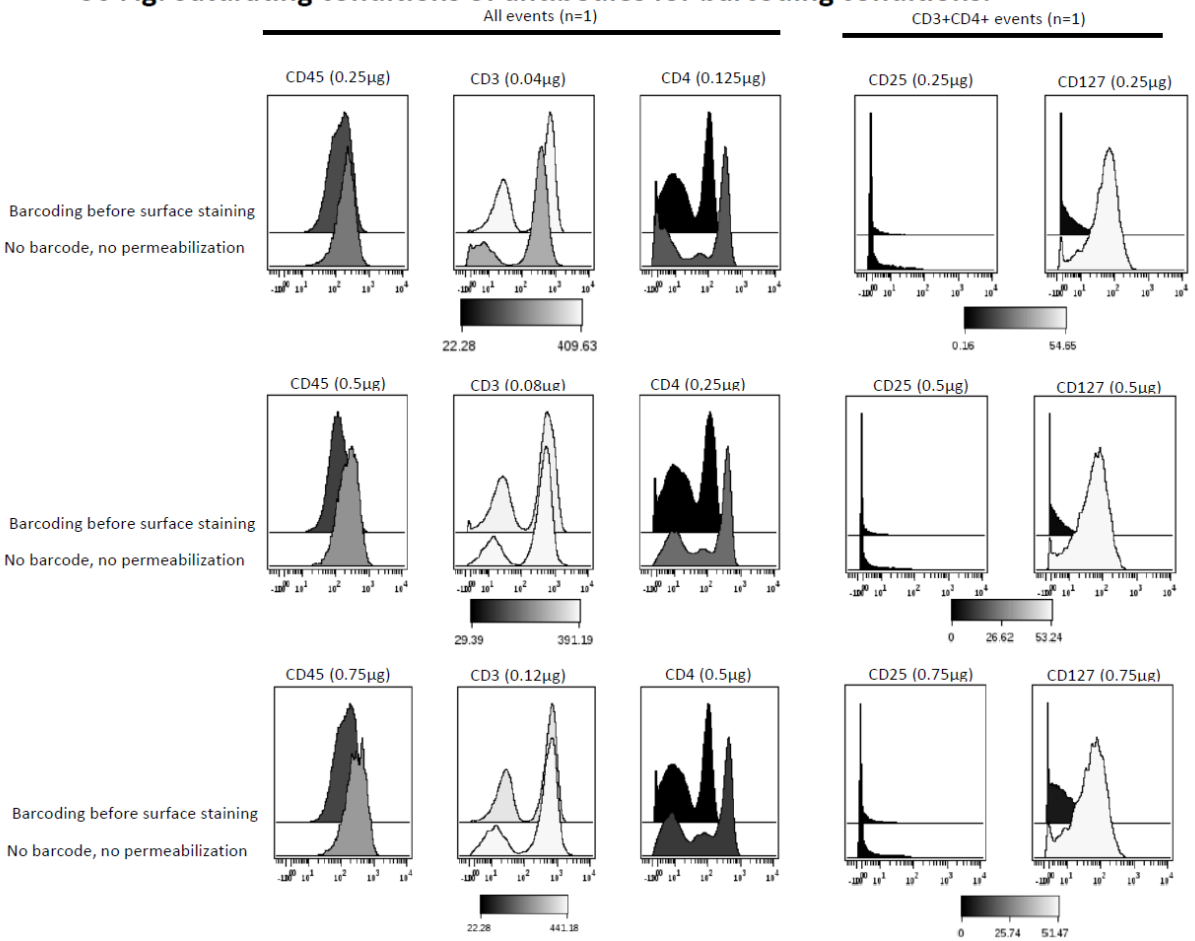


S5 Fig. Visualization of cell cycle markers.



n=3 for all markers

S6 Fig. Saturating conditions of antibodies for barcoding conditions.



Introduction Article 2

La MIs est la myosite la plus fréquente après 50 ans. Elle est caractérisée par la présence de mécanismes inflammatoires et dégénératifs au sein du muscle squelettique des patients. Le diagnostic de la MIs nécessite une expertise et peut être confondu avec d'autres myosites aux stades précoces de la maladie (Benveniste et al., 2011a). En cas d'erreur de diagnostic, un patient atteint de MIs peut être traité par des immunosuppresseurs qui seront inefficaces voire nocifs.

Les mécanismes pathologiques impliqués au cours de la maladie sont peu décrits. L'implication des lymphocytes T CD8+ au cours de la MIs a été mise en évidence par la présence de lymphocytes T CD8+ activés dans le muscle des patients : les lymphocytes T CD8+ sécrétant la perforine et les granzymes, les lymphocytes T CD8+ avec un TCR oligoclonal non-gaussien et les lymphocytes CD8+ de type LGL (Dimitri et al., 2006; Greenberg et al., 2016). Dans le sang périphérique des patients, la présence de lymphocytes CD8+ avec un phénotype CD8+ CD28- et LGL CD8+ CD57+ ont été décrits (Allenbach et al., 2014a; Greenberg et al., 2016; Pandya et al., 2016). L'implication des lymphocytes B dans la pathogénicité de la maladie est aussi suggérée suite à la découverte d'anticorps anti-CN1A chez ~30% de patients atteints de MIs et à la présence de plasmocytes dans les biopsies musculaires des patients (Greenberg et al., 2005; Larman et al., 2013; Pluk et al., 2013). La présence de macrophages infiltrant les fibres musculaires non nécrotiques a aussi été observée dans les biopsies musculaires de patients atteints de MIs (Rygiel et al., 2015).

Des biomarqueurs diagnostiques de la MIs sont nécessaires afin d'améliorer les critères actuels. En plus, une meilleure description du phénotype cellulaire des patients atteints de la MIs permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués au cours de la maladie. A ce jour, aucune étude n'a relié les différents phénotypes CD8+ décrits précédemment dans la MIs. En plus, le phénotype cellulaire des autres cellules potentiellement impliquées au cours de la maladie n'est pas encore bien défini.

Le but de cette étude était donc de mieux décrire les RI chez les patients atteints de MIs et d'identifier des biomarqueurs utiles pour le diagnostic de la MIs.

Pour cela, nous avons utilisé un panel de 37 marqueurs par cytométrie de masse pour caractériser les cellules obtenus de 10 patients atteints de MIs en comparaison à 8 sujets sains appariés sur l'âge. Les résultats significatifs ont été validés sur une deuxième cohorte de 9 patients atteints de MIs *versus* 8 autres sujets sains. Au final, les biomarqueurs d'intérêts chez les patients atteints de la Mis (n=18) ont été identifiés et validé en comparaison à un groupe contrôle de myosite de 26 patients (10 SAS anti-Jo1, 9 myopathies anti-HMGCR et 7 myopathies anti-SRP).

Deep immune profiling identifies CD8+T-bet+ cells as a predominant biomarker for sIBM

(En revue dans « Annals of the rheumatic disease »)

Gaëlle Dzangué-Tchoupou PhD[1]*, Kuberaka Mariampillai PhD[2], Damien Amelin MSc[1], Wladimir Mauhin MD MSc[1], Aurélien Corneau MSc[3], Catherine Blanc PhD[3], Yves Allenbach MD PhD[1], [2]¶ Olivier Benveniste MD PhD[1, 2]

[1] Centre of research in Myology, Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, UMRS 974, 75013, Paris, France.

[2] Department of Internal medicine and clinical immunology, Pitié-Salpêtrière University hospital, DHU I2B, AP-HP, INSERM, UMR 974, 75103, Paris, France.

[3] Plateforme de Cytométrie (CyPS), Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR 1135, 75013, Paris, France.

***Corresponding author:** Gaëlle Dzangué-Tchoupou

Address: 105 Boulevard de l'Hôpital, 3rd floor, Room 318, 75013, Paris, France.

Phone number: (33) 1 40 77 96 84

E-mail: gaelle.dzangue@gmail.com

Funding source: Centre of research in Myology

Conflicts of interest disclosure: All the authors have no conflicts of interest to disclose.

Abstract

Background: Myositis is a heterogeneous group of muscular auto-immune diseases with clinical and pathological criteria that allow the classification of patients into different sub-groups. Inclusion body myositis (IBM) is the most frequent myositis above fifty years of age. Diagnosing IBM requires expertise and is challenging. Little is known concerning IBM's pathogenic mechanisms, and conventional suppressive-immune therapies are inefficacious.

Objectives: Our aim was to deepen our understanding of the immune mechanisms involved in IBM and identify specific biomarkers for IBM.

Methods: Using a panel of thirty-seven markers and mass cytometry, we performed deep immune profiling of peripheral blood cells from IBM patients. Biomarkers of interest were compared to healthy subjects and myositis controls (anti-Jo1-, anti-HMGCR-, and anti-SRP-positive patients).

Results: Unsupervised analyses revealed substantial changes only within CD8+ cells. We observed an increase in the frequency of CD8+ cells that expressed high levels of T-bet and the senescent marker CD57 in IBM patients. Expectedly, senescent CD8+T-bet+ CD57+ cells of both patients and healthy donors were CD28nullCD27nullCD127null. Surprisingly, activated exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- cells were more frequent in IBM patients and expressed lower levels of CD28, CD27, and CD127 than healthy donors. We identified and validated that a frequency of CD8+T-bet+ cells > 51.5% is a diagnostic biomarker specific to IBM, compared to other myositis controls, with a sensitivity of 94.7%, a specificity of 88.5%, and an area under the curve of 0.97.

Conclusion: We show that CD8+T-bet+ cells, which should play a role in the pathogenesis of IBM, are a biomarker for IBM.

Key words: Inclusion body myositis, deep immune profiling, CD8 T-bet+ cells, biomarkers, myositis

Clinical implication/key message: The diagnosis of IBM could be misleading in comparison to other myositis and requires expertise; here we highlight a biomarker which can aid in the diagnosis of IBM from 3 other myositis sub-groups.

Capsule summary: A wrong diagnosis of IBM could lead to the administration of immune suppressors which will have only harmful effects. Here, we identify a biomarker which can be complementary to the actual diagnostic criteria for IBM.

Abbreviations:

CART: classification and regression trees

CI: confidence interval

CTL: cytotoxic T lymphocytes

CyTOF: cytometry by time of flight (mass cytometry)

HD: healthy donors

HLADR: human leukocyte antigen-DR

HMGCR: 3-Hydroxyl-3-MethylGlutaryl CoA Reductase

IdU: iododeoxyuridine

IFN-γ: interferon-γ

IMNM: immune mediated necrotizing myopathies

MMI: median mass intensity

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

ROC: receiver operating characteristics

sIBM: sporadic Inclusion body myositis

SPADE: spanning-tree progression analysis of density-normalized events

SRP: signal recognition particle

T-bet: T-box expressed in T cells

TEMRA: terminally differentiated memory cells

viSNE: stochastic neighbour embedding

INTRODUCTION:

Myositis comprises a heterogeneous group of diseases with variable clinical, pathological and serological features, involving both muscular and extra-muscular tissues. At present, sporadic inclusion body myositis (sIBM) is the only group bereft of treatment options since there is no evidence of efficacy for corticosteroids and/or immunosuppressive therapies (1–3). sIBM is the most common myositis subtype after age 50. Disease onset is slow and progressive, gradually leading to muscle atrophy and a reduced quality of life. Diagnosis at sIBM onset could be misleading, potentially involving administration of a treatment that causes detrimental effects (4).

CD8+ T cells have been implicated in the physiopathology of sIBM because of their aggressive and infiltrative presence within muscle fibres overexpressing major histocompatibility type 1 molecules (5–7). Various studies have observed a diverse repertoire of CD8+ T cells in the peripheral blood of sIBM patients, suggesting the presence of antigen-driven CD8+ T cell responses (8–10).

Two major T-box transcription factors drive differentiation of naïve CD8+ T cells into cytolytic T lymphocytes (CTL): T-bet (T-box expressed in T cells) and eomesodermin (eomes) (11,12). High levels of T-bet expression in CD8+ T cells are required for antigen-specific CD8+ response, cytotoxic function and maintenance of memory subsets (13–16).

Repeated and prolonged stimulation of T cells leads to progressive loss of co-stimulatory markers, such as CD28 and CD27. In addition to this immune profile, expression of CD57 defines a state of replicative senescence (17–20). In addition, downregulation of the interleukin-7 α receptor (CD127) is also observed following chronic antigen stimulation (21,22).

B cell implication in the pathogenicity of sIBM has been suggested by the identification of anti-cytosolic 5’-nucleotidase 1A antibodies present in ~ 30% of patients (23–25). Plasma cells are also observed in muscle inflammatory infiltrates of sIBM (26). Finally, muscle biopsies from sIBM patients also reveal the presence of macrophages infiltrating non-necrotic muscle fibres (27), suggesting the involvement of innate immune defence mechanisms that are still poorly investigated.

Cytometry by time of flight (CyTOF), also known as mass cytometry, is an innovative cell profiling tool based on antigen detection using metal-conjugated antibodies. CyTOF allows simultaneous screening of more than 38 markers at the single cell level (28,29). CyTOF is of particular interest in applications of deep immune profiling and biomarker discovery. When using CyTOF, intra-assay variations can be reduced by barcoding cells prior to staining for markers (30–32).

Considering the detrimental effects of immunosuppressants prescribed due to misdiagnosis, there is a need to identify novel diagnostic biomarkers for this disorder. The aim of this study was to better characterize the phenotype of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from sIBM patients to identify a biomarker that can aid in differentiating sIBM from other types of myositis and to identify potential therapeutic targets for sIBM.

MATERIAL AND METHODS:

Patients and samples:

Approval for this study was obtained from the Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de la Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS), France. Written informed consent was signed by all patients and healthy donors (HD) according to the declaration of Helsinki. Untreated sIBM patients (cohort 1, n=10 and cohort 2, n=9) were defined based on the Lloyd diagnosis criteria (33). Control groups of myositis patients included untreated myositis patients suffering from anti-synthetase syndrome with anti-Jo1 positive antibodies (anti-Jo1, n=10), anti-3-hydroxyl-3-methylglutaryl CoA reductase positive immune mediated necrotizing myopathy (anti-HMGCR IMNM, n=9) and anti-signal recognition particle positive IMNM (anti-SRP IMNM, n=7) defined based on published ENMC criteria (34,35). Detection of these myositis-specific antibodies was performed by immunoassays as previously described (36). Healthy control blood samples were obtained from the Etablissement Français du sang (EFS, Pitié-Salpêtrière-France) donated by healthy adults older than 50 years (cohort 1, n=8 and cohort 2, n=8).

Upon reception of blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and stored at -80°C in foetal bovine serum (Life Technologies, Saint-Aubin, France, Catalogue # 10270106) supplemented with 10% dimethyl sulfoxide. Twenty-four hours later, the cells were transferred to liquid nitrogen until use.

Mass cytometry experiments:

Thirty-six metal-conjugated antibodies, viability staining, and Iododeoxyuridine (IdU) were obtained from Fluidigm (Les Ulis, France) (**Supplementary Table 1**). Immunostaining and data acquisition were performed as previously described in a technical research article (31). Briefly, PBMCs were incubated with IdU and then stained with cisplatin. Next, cells were incubated with CCR7 and CXCR5, followed by incubation with a mix containing all other cell surface markers. Next, samples were barcoded using BD CyTOFix/Cytoperm and BD wash/perm buffer (BD, France, Catalogue # 554715). All cells from different samples were washed and pooled together in a single tube. Fixation of pooled cells was performed using BD CyTOFix/Cytoperm buffer followed by incubation with antibodies targeting

intranuclear markers in BD wash/perm buffer. Finally, DNA within cells was labelled using Cell ID Intercalator-Ir (Fluidigm, les Ulis, France, Catalogue # 201192A). Images were acquired the following day on the Helios available at the “Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière”.

Data files were obtained in the FCS file format and analysed using different algorithms available on the Cytobank cloud based platform, R software version 3.4.0 and GraphPad Prism version 6.

Data analysis with cytobank:

Beads were gated out using the following: 140/142Ce, 151/153Eu, 165Ho and 175/176 Lu. Cisplatin-positive dead cells were gated out, and an unsupervised model of clustering and classification of events using the Citrus algorithm was implemented to identify differences between sIBM patients and healthy donors.

First, we performed Citrus analyses using the median mass intensities (MMI) of various markers. The settings used for Citrus were as follows: population (all CD45+ cells), groups (Healthy donors and sIBM patients), clustering channels (CD19, CD56, CD11b, CD14, CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CCR7), statistics channels (HLA-DR, IgD, CD28, CD127, CD27, T-bet, FoxP3, CD38, CD57), equal event sampling (20000 each), minimum cluster size (5%), cross validation fold (5) and false discovery rate (1%).

Next, a spanning-tree progression analysis of density-normalized events (SPADE) analysis was performed on CD45+ events to enable a non-biased and uniform gating strategy for the main cell populations in our study. The following SPADE tree was generated: CD3, CD4, CD8, CD14, CD11b, CD56, CD16 and CD19, with 20 nodes and a down-sampling of 10 percent. Nodes corresponding to homogenous cell populations were each exported to a new experiment.

Next, we performed a stochastic neighbour embedding (viSNE) analysis on populations of interest for improved unsupervised clustering, visualization and detailed analysis. The settings used for the viSNE run on CD8+ T cells are as follows: equal event sampling (3615 each), channels (CD28, CD127, CD27, T-bet and CD57), iterations (1000),

perplexity (50) and theta (0.3). Furthermore, we analysed the frequency of various cell populations and the MMI of various markers on the subsets obtained from the viSNE run.

Finally, we performed runs using Citrus on CD8+ T cells to obtain predictive models of classification differentiating between sIBM patients and healthy donors. Settings used for the Citrus runs on CD8+ T cells were as follows: population (CD8+ T cells), groups (Healthy donors and sIBM patients), clustering channels (T-bet and CD57), statistics channels (HLA-DR, CD28, CD127, pSTAT1, CD45RA, CD27, CCR7, IFN-γ, CD95 and CD38), equal event sampling (3612 each), minimum cluster size (5%), cross validation fold (5) and false discovery rate (1%).

Histograms and dot plots were used to confirm all results obtained from unsupervised analyses.

Data analysis using R software:

For identification of biomarkers specific to sIBM patients (cohort 1 and 2, n=19) compared to control myositis patients (anti-Jo1, anti-SRP and anti-HMGCR), we constructed a decisional tree using classification and regression trees (CART). As a result, new subjects from different subgroups can be predicted using a ranking algorithm. We included in the CART "potential predictors" based on our previous observations: frequencies of CD8+ T-bet+ T cells, CD8+ T-bet+ CD57+ T cells, CD8+ T-bet+ CD27+ T cells, CD8+ T-bet+ CD57+ CD27+ T cells and CD8+ T-bet+ CD57- CD27+ T cells. The validity of our classification tree model and the predictors (biomarkers) were validated by cross validation on a test set.

Statistics using GraphPad Prism:

We used receiver operating characteristic (ROC) curves to aid in choosing the best prediction value (frequency) for cell populations identified using CART. Altogether, we chose a prediction value associated with the best cross-validation prediction rate on the test set using CART and with the best sensitivity, specificity, confidence interval (CI), and area under the curve (AUC) and a p-value < 0.0001 with ROC curves.

For comparison of two groups, when comparing frequencies of populations, we used the Mann-Whitney test, and when comparing MMI of expression for a marker within a

population, we used the t-test. For multiple comparisons, we used the Kruskal-Wallis test using the Geisser-Greenhouse correction. We describe in-text data values using mean ± SD.

RESULTS:

Increased frequency of CD8+ T cells in sIBM patients expressing high levels of T-bet and a senescent immune profile (CD8T-bet+ CD57+):

To identify biomarkers specific to sIBM, we performed unsupervised analysis comparing the MMI of various differentiation and activation markers among all CD45+ events using the Citrus algorithm. This analysis aimed to identify markers that vary significantly between sIBM patients (cohort 1) and healthy donors within different populations. Citrus did not identify any significant differences in activation or differentiation markers within B cells, CD16±CD56bright NK cells, CD16+CD56dim NK cells, monocytes, CD4+ T cells or CD38+ cells (**Supplementary Figure 1**). These observations were confirmed by classical gating of individual populations. Interestingly, significant differences were observed only within CD8+ T cell populations with respect to expression of CD27, CD57, CD127, CD28, T-bet and CD38 on different clusters of CD8+ T cells. We next decided to characterize in detail CD8+ T cells in sIBM patients.

CD3+ CD8+ events corresponding to CD8+ T cells from the SPADE run among all CD45+ events were exported for further analysis (**Supplementary Figure 2**). First, we observed a remarkable increase in the frequency of CD8+ terminally differentiated memory T cells (TEMRA): CD8+ CD45RA+ CCR7- in sIBM patients compared to healthy donors [sIBM=51.9%±13.6, HD=19.1%±9.9, $p<0.0001$]. Further analysis revealed a significant increase in the frequency of CD8+ T-bet+ T cells (CD8T-bet+) in patients [sIBM=75.5%±13.2, HD=57.4%±15.2, $p=0.02$]. Interestingly, almost all CD8+ TEMRA T cells were T-bet+ (**Figure 1**). Next, we compared the expression of the senescence marker CD57 within CD8T-bet+ cells and CD8+ T-bet- events (CD8T-bet- cells) in patients. We observed a marked increase in the expression of CD57 within CD8T-bet+ cells in sIBM patients [MMI in CD8T-bet+ cells =188 vs MMI in CD8T-bet- cells =6, $p=0.01$], while healthy donors had very low expression of CD57 in both CD8T-bet+ cells and CD8T-bet- cells (**Supplementary Figure 3**).

Selective loss of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8+ T cells (CD8T-bet+ CD57-) in sIBM patients compared to healthy donors:

Next, we focused on three main subsets of CD8+ T cells of interest: senescent CD8T-bet+ CD57+ cells, exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells and CD8T-bet- cells. We compared expression of the co-stimulatory markers CD28 and CD27 and the functional marker CD127 within these three subsets. As expected, senescent CD8T-bet+ CD57+ cells are CD28null CD27null CD127null in both patients and healthy donors (**Supplementary Figure 4**). Unexpectedly, we observed a decrease in expression of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells, specifically in sIBM patients compared to healthy donors. Loss of CD28, CD27 and CD127 was not observed in CD8T-bet- cells of either patients or healthy donors (**Figure 2**).

Exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells in sIBM patients are activated but do not spontaneously secrete increased IFN-γ:

Observation of this particular memory immune profile in exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells in sIBM patients prompted us to explore their activation states in comparison to other subsets we had examined. We compared the frequency of our populations of interest expressing activation markers CD38, HLA-DR (Human Leucocyte Antigen-DR) and Interferon-γ (IFN-γ). Interestingly, we observed higher frequencies of exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells expressing CD38 and HLADR in sIBM patients compared to healthy donors [HLADR: sIBM=9.9%±6.2, HD=4.6%±2.2, p=0.04 and CD38: sIBM=24.5%±17.3, HD=9%±5, p=0.02]. An increase in the frequency of senescent CD8T-bet+ CD57+ cells expressing CD38 was also observed in patients. We did not observe changes in IFN-γ secretion between sIBM patients and healthy donors (**Figure 3**). Low percentages of CD8T-bet- cells expressing CD8 and HLADR were similarly observed in both patients and healthy donors (**Supplementary Figure 5**).

Confirmation of observed characteristics in a second independent cohort of sIBM patients:

In an attempt to validate the immune profiles we observed in the first cohort of sIBM patients, we stained PBMCs from a second independent cohort with a minimal set of markers using an independent experiment (cohort 2: sIBM=9 and healthy donors=8). We confirmed increased frequencies of TEMRA CD8+ T cells, CD8T-bet+ cells and activated exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells in sIBM patients from cohort 2 in comparison to healthy donors. A non-significant tendency towards higher frequencies of CD38+ senescent

CD8T-bet+ CD57+ cells was observed. We also confirmed lower expression of CD27, CD127 and CD28 by exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells in sIBM patients (**Figure 4**). Values between sIBM patients of cohort 1 and 2 were not significantly different with respect to immune profile (**Supplementary Figure 6**).

Taken together, these observations describe a novel increase in the frequency of senescent CD8T-bet+ CD57+ cells in sIBM patients compared to healthy donors. Further, sIBM patients exhibit an activated exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- cell population characterized by lower expression of CD28, CD27 and CD127, and higher expression of CD38 and HLADR compared to healthy donors.

Identification of biomarkers specific to sIBM patients:

Next, we aimed to identify a minimal set of biomarkers that can be used as diagnostic criteria for sIBM patients (cohort 1 and 2). Other myositis patients presenting either anti-Jo1 auto-antibodies, anti-SRP auto-antibodies or anti-HMGCR auto-antibodies were used as controls. After multiple CART runs using different predictors, such as the frequency of CD8T-bet+, senescent CD8T-bet+ CD57+ and CD8T-bet+ CD27+ cells, the best predictor of classification was always the frequency of CD8T-bet+ cells. Given that the cut-off prediction frequency of CD8T-bet+ cells could vary between different CART runs, we used ROC curves to help choose the best predictive value. Altogether, using CART and ROC curves, we identified and validated a frequency of CD8T-bet+ cells > 51.51% as the best predictor to distinguish sIBM patients from other myositis patients, with a sensitivity of 94.7%, a specificity of 88.5%, a confidence interval of [73.97-99.87%], an area under the curve of 0.97 and a p-value < 0.0001 (**Figure 5**).

DISCUSSION:

Using CyTOF, we simultaneously analysed thirty-six markers on non-stimulated PBMCs from sIBM patients and healthy donors. Unsupervised analysis revealed significant changes only within CD8+ T cells. CD8+ T cells from sIBM patients overexpress T-bet. Loss of CD28, CD27 and CD127 in senescent CD8T-bet+ CD57+ cells in both sIBM patients and healthy donors was expected. Unexpectedly, we observed specific loss of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells from sIBM patients but not from healthy subjects.

Previous studies have demonstrated that during chronic antigen stimulation, overexpression of T-bet on CD8+ T cells represses expression of inhibitory receptors, defining a subset of exhausted CD8+ T cells with proliferative capacity and effector function (16). Considering in this study we identified a subset of CD8+ T cells expressing low levels of CD57 and higher levels of T-bet, CD38 and HLADR in sIBM patients, we called them exhausted-like CD8T-bet+ CD57- cells. This activated and exhausted-like immune profile suggests continuous proliferative capacity and cytotoxic function of activated CD8T-bet+ CD57- cells in sIBM patients, which could explain the progressive and destructive nature of this disease.

Our results are in line with previous studies that observed increased frequencies of CD8+ CD28null T cells in PBMCs from sIBM patients compared to healthy individuals (10). More recently, CD8+ CD57+ large granular lymphocytes were observed in blood and muscle of sIBM patients (9). Here, we present a more detailed and precise phenotype of peripheral blood CD8+ T cells in sIBM patients, thus enhancing understanding of this disease.

In this study, we did not observe an increase in spontaneous IFN-γ secretion by CD8T-bet+ cells from sIBM patients. This could be because cells were not stimulated, since our aim was to gain insight into the immune profile of PBMCs from sIBM patients without stimulation. Previous studies showed an increase in IFN-γ secretion in sIBM patients after PBMC stimulation (8).

In this study, we were also able to identify a novel diagnostic biomarker for IBM. Various diagnostic criteria for sIBM have been described, with sensitivities ranging from 11%

to 90% and specificities above 96% (33). Compared to other myositis subtypes (anti-Jo1 positive antibodies, IMNM with anti-HMGCR positive and anti-SRP positive antibodies), we obtained the highest sensitivity described thus far (sensitivity of 94.7%), at 88.46%. All previous diagnostic criteria combined clinical and pathological analyses, both of which require specific expertise. The biomarker we present herein could be complementary to the actual diagnostic approaches used for sIBM patients and could aid in categorizing patients for clinical trials and research, especially when diagnosis remains uncertain. Further prospective analyses are needed to compare this novel biological biomarker to pathological criteria in patients with IBM suspicion.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We acknowledge our funding source: The Centre of research in myology.

REFERENCES:

1. Dalakas MC. Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. Nat Clin Pract Neurol. 2006 Aug;2(8):437–47.

2. Needham M, Mastaglia FL. Sporadic inclusion body myositis: A review of recent clinical advances and current approaches to diagnosis and treatment. Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol. 2016 Mar;127(3):1764–73.

3. Keller CW, Schmidt J, Lünemann JD. Immune and myodegenerative pathomechanisms in inclusion body myositis. Ann Clin Transl Neurol. 2017 Jun;4(6):422–45.

4. Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, Dubourg O, Squier W, Maisonobe T, et al. Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. Brain J Neurol. 2011 Nov;134(Pt 11):3176–84.

5. Benveniste O, Stenzel W, Hilton-Jones D, Sandri M, Boyer O, van Engelen BGM. Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. Acta Neuropathol (Berl). 2015 May;129(5):611–24.

6. Müntzing K, Lindberg C, Moslemi A-R, Oldfors A. Inclusion body myositis: clonal expansions of muscle-infiltrating T cells persist over time. Scand J Immunol. 2003 Aug;58(2):195–200.

7. Salajegheh M, Rakocevic G, Raju R, Shatunov A, Goldfarb LG, Dalakas MC. T cell receptor profiling in muscle and blood lymphocytes in sporadic inclusion body myositis. Neurology. 2007 Oct 23;69(17):1672–9.

8. Allenbach Y, Chaara W, Rosenzwajg M, Six A, Prevel N, Mingozzi F, et al. Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis. PloS One. 2014;9(3):e88788.

9. Greenberg SA, Pinkus JL, Amato AA, Kristensen T, Dorfman DM. Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia. Brain J Neurol. 2016;139(Pt 5):1348–60.

10. Pandya JM, Fasth AER, Zong M, Arnardottir S, Dani L, Lindroos E, et al. Expanded T cell receptor Vβ-restricted T cells from patients with sporadic inclusion body myositis are proinflammatory and cytotoxic CD28null T cells. Arthritis Rheum. 2010 Nov;62(11):3457–66.

11. McLane LM, Banerjee PP, Cosma GL, Makedonas G, Wherry EJ, Orange JS, et al. Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations. J Immunol Baltim Md 1950. 2013 Apr 1;190(7):3207–15.

12. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-Bet and Eomes in Peripheral Human Immune Cells. Front Immunol [Internet]. 2014 May 14 [cited 2017 Mar 3];5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030168/

13. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol. 2015 Aug;15(8):486–99.

14. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. Science. 2012 Nov 30;338(6111):1220–5.

15. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by αPD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 30;105(39):15016–21.

16. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, Crawford A, Angelosanto JM, Ali M-AA, et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. Nat Immunol. 2011 May 29;12(7):663–71.

17. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. Blood. 2003 Apr 1;101(7):2711–20.

18. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med. 2002 Apr;8(4):379–85.

19. Olson JA, McDonald-Hyman C, Jameson SC, Hamilton SE. Effector-like CD8+ T cells in the memory population mediate potent protective immunity. Immunity. 2013 Jun 27;38(6):1250–60.

20. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. J Exp Med. 2003 Nov 3;198(9):1369–80.

21. Xu W, Li J, Wu Y, Zhou J, Zhong J, Lv Q, et al. CD127 Expression in Naive and Memory T Cells in HIV Patients Who Have Undergone Long-Term HAART. Lab Med. 2017 Feb 1;48(1):57–64.

22. Kared H, Saeed S, Klein MB, Shoukry NH. CD127 expression, exhaustion status and antigen specific proliferation predict sustained virologic response to IFN in HCV/HIV co-infected individuals. PloS One. 2014;9(7):e101441.

23. Pluk H, van Hoeve BJA, van Dooren SHJ, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, et al. Autoantibodies to cytosolic 5’-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013 Mar;73(3):397–407.

24. Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, et al. Cytosolic 5’-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013 Mar;73(3):408–18.

25. Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y. Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. Curr Opin Neurol. 2016;29(5):662–73.

26. Greenberg SA, Bradshaw EM, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Due B, et al. Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. Neurology. 2005 Dec 13;65(11):1782–7.

27. Rygiel KA, Miller J, Grady JP, Rocha MC, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial and inflammatory changes in sporadic inclusion body myositis. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015 Apr;41(3):288–303.

28. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el-A, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science. 2011 May;332(6030):687–96.

29. Behbehani GK, Samusik N, Bjornson ZB, Fantl WJ, Medeiros BC, Nolan GP. Mass Cytometric Functional Profiling of Acute Myeloid Leukemia Defines Cell-Cycle and Immunophenotypic Properties That Correlate with Known Responses to Therapy. Cancer Discov. 2015 Sep;5(9):988–1003.

30. Zunder ER, Finck R, Behbehani GK, Amir E-AD, Krishnaswamy S, Gonzalez VD, et al. Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm. Nat Protoc. 2015 Feb;10(2):316–33.

31. Dzangué-Tchoupou G, Corneau A, Blanc C, Benveniste O, Allenbach Y. Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. PloS One. 2018;13(3):e0194593.

32. Behbehani GK, Thom C, Zunder ER, Finck R, Gaudilliere B, Fragiadakis GK, et al. Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2014 Dec;85(12):1011–9.

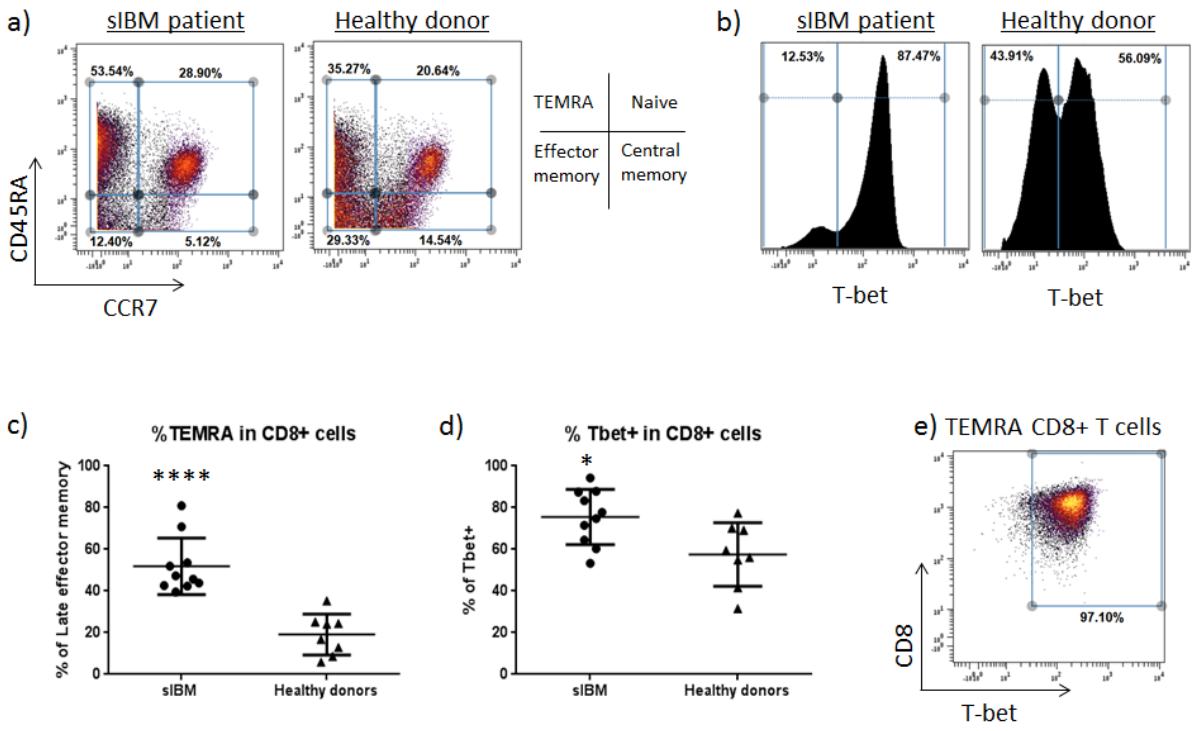
33. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. Neurology. 2014 Jul 29;83(5):426–33.

34. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, 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 NMD. 2004 May;14(5):337–45.

35. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. Neuromuscul Disord NMD. 2018 Jan;28(1):87–99.

36. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, Preusse C, Mouly V, Mauhin W, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. Ann Neurol. 2017 Apr;81(4):538–48.

Figure 1: Increase frequency of CD8+ T cells in sIBM patients expressing high levels of T-bet and presenting a senescent immune profile (T-bet+ CD57+)



Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE : **a)** dot plots showing the gating strategy used to distinguish TEMRA CD8+ T cells on all CD8+ T cells, **b)** histograms showing an example of the frequency of CD8+ T cells expressing T-bet in a patient and a healthy individual, **c and d)** comparison of the frequency of TEMRA cells and T-bet+ cells in CD8+ T cells of both patients and healthy donors and **e)** dot plot showing the expression of CD8 and T-bet on TEMRA CD8+ T cells.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using Mann-Whitney test (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

Figure 2: Selective loss of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8+ T cells ($CD8_{T\text{-}bet+\ CD57\text{-}}$) in sIBM patients compared to healthy donors:

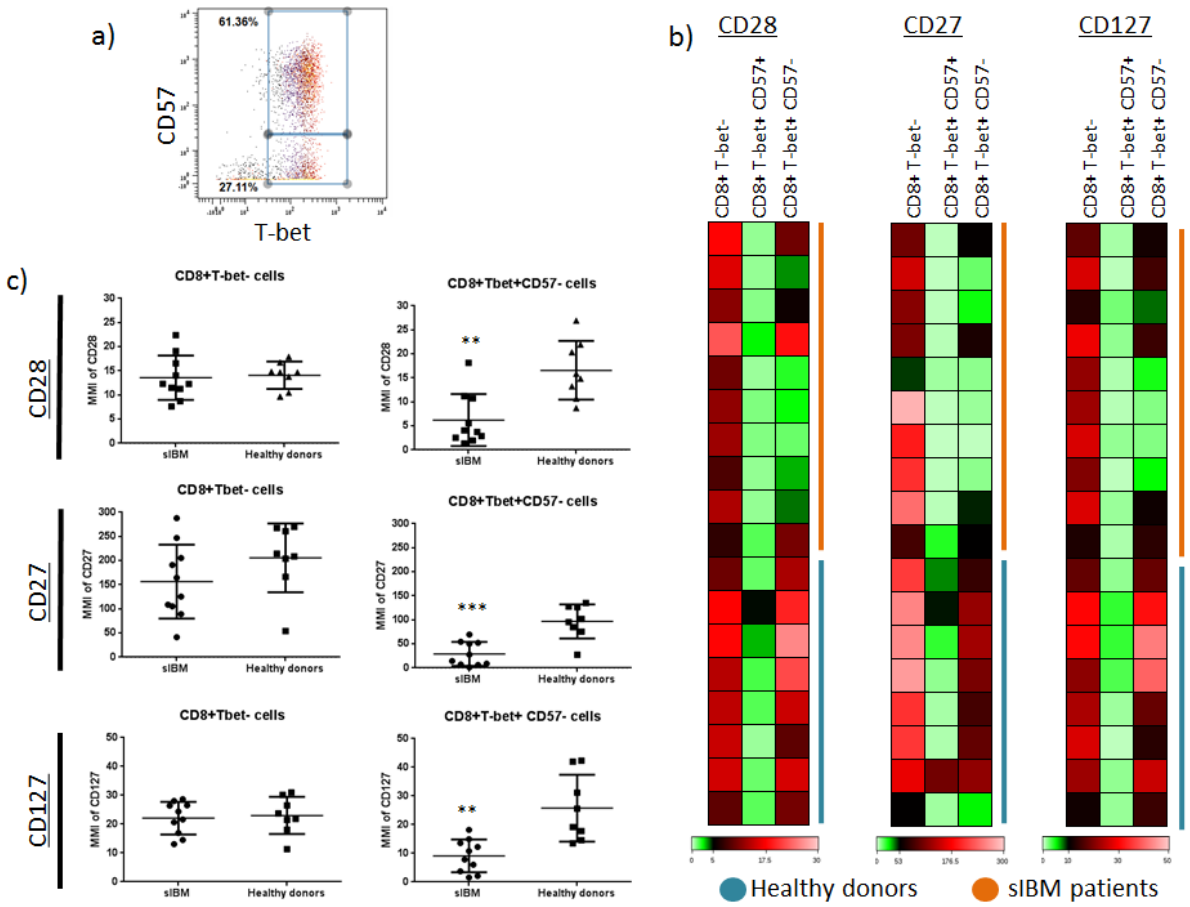
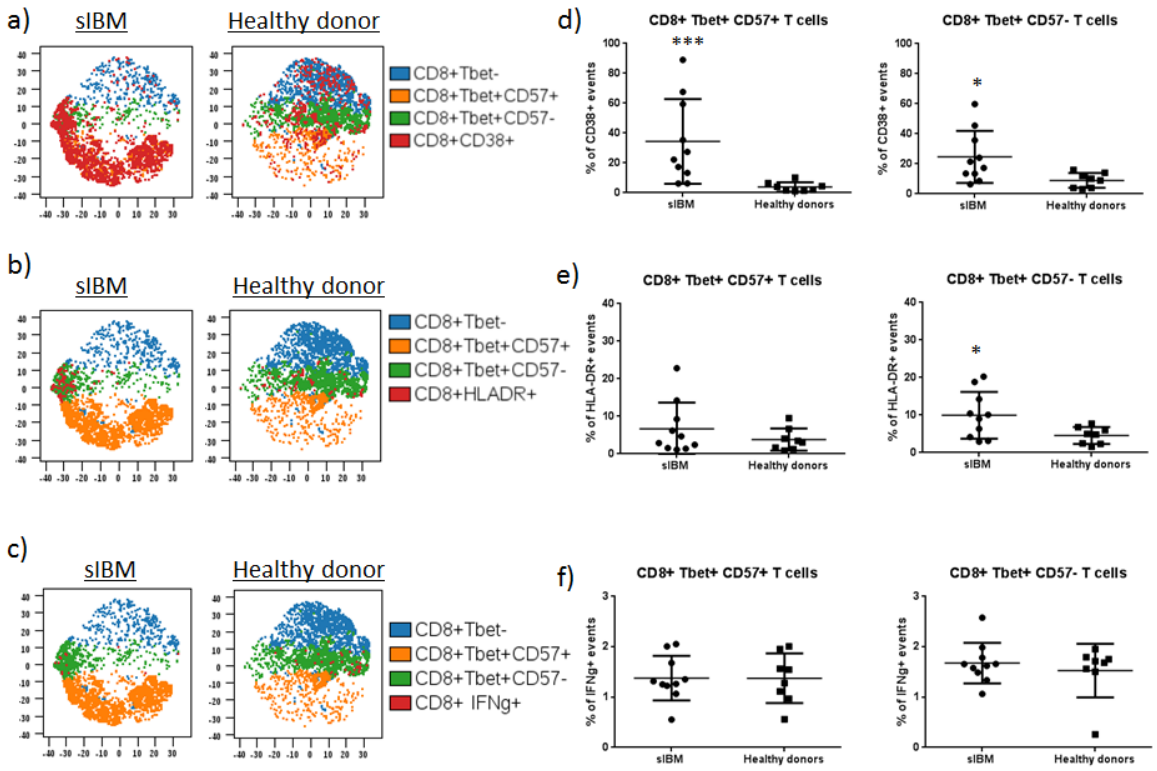


Figure 2: Selective loss of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8+ T cells ($CD8_{T\text{-}bet+\ CD57\text{-}}$) in sIBM patients compared to healthy donors:

Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE : **a)** dot plots showing the gating strategy used to distinguish CD8+ T-bet+ CD57+ or CD8+ T-bet+ CD57- T cells on all CD8+ T cells, **b)** heat maps showing the MMI (median mass intensity) of CD28, CD27 and CD127 on different CD8+ T cell populations in both sIBM patients and HD and **c)** comparison of the MMI of CD28, CD27 and CD127 in different cell populations between sIBM patients and HD.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using t-test (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

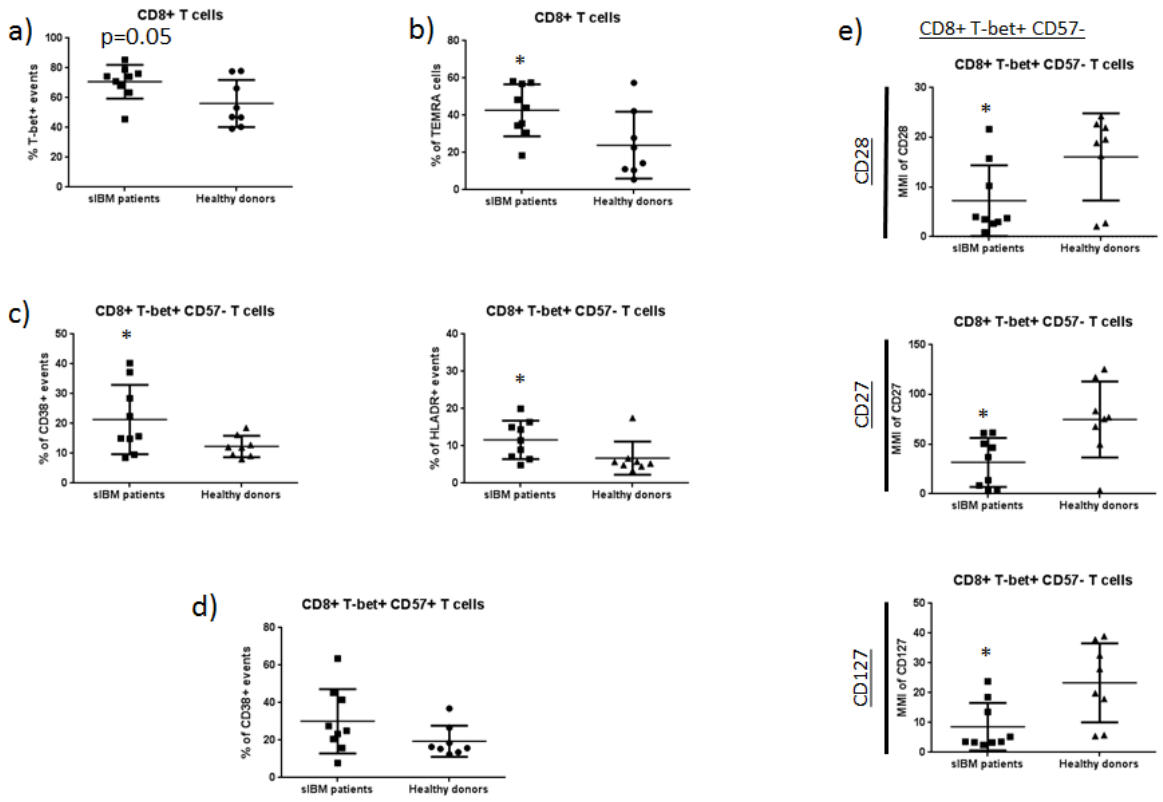
Figure 3: Exhausted-like CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ cells in sIBM patients are activated; nevertheless they do not spontaneously secrete greater amounts of IFN-γ



Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE. viSNE settings were as follow: equal event sampling (3615 events each), channels (CD28, CD127, CD27, T-bet and CD57), iterations (1000), perplexity (50) and theta (0.3). Here, we show the distribution of different CD8+ T cell populations expressing **a)** CD38, **b)** HLADR and **c)** IFNγ. Next, we compared the frequencies of cells expressing activation markers in different populations between sIBM patients and HD: **d)** comparison of the frequency of CD38+ events, **e)** comparison of the frequency of CD38+ events and **f)** comparison of the frequency of CD38+ events.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using Mann-Whitney test (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

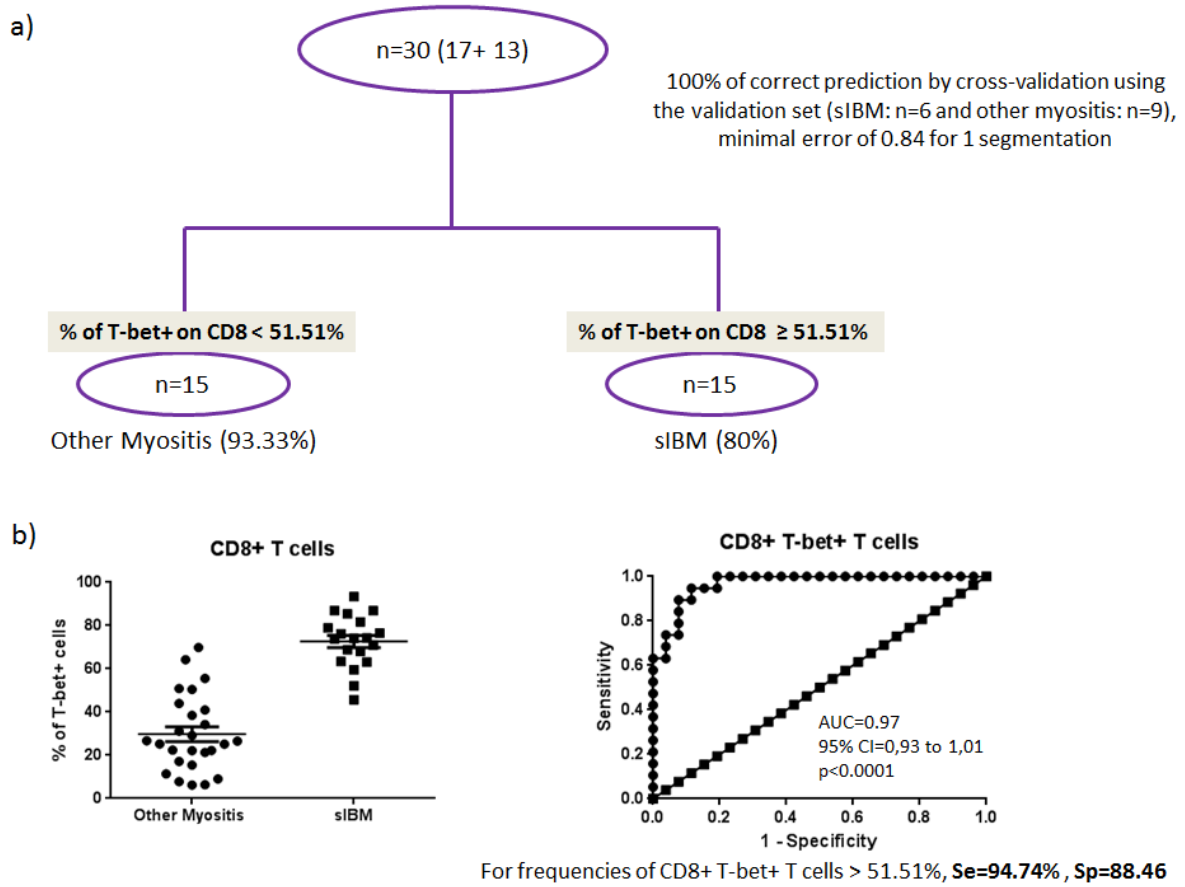
Figure 4: Confirmation of the characteristics observed in a second independent cohort of sIBM patients in comparison to healthy donors



In order to confirm the pathogenic mechanisms involved in sIBM, cells from sIBM patients (cohort 2, n=9) and different age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Using SPADE trees, events corresponding to CD8+ T cells were exported for downstream analyses. Here, we compare the frequency of various markers on different populations between sIBM patients of cohort 2 and age-matched HD for cohort 2: **a)** frequency of T-bet+ events on total CD8+ T cells, **b)** frequency of TEMRA cells on total CD8+ T cells, **c)** frequency of CD38 and HLADR in exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- T cells, **d)** frequency of CD38 in senescent CD8+T-bet+ CD57+ T cells T cells and **e**) MMI of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- T cells.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using Mann-Whitney test to compare frequencies and t-test to compare MMI (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

Figure 5: Identification of biomarkers specific to sIBM patients in comparison to control myositis patients



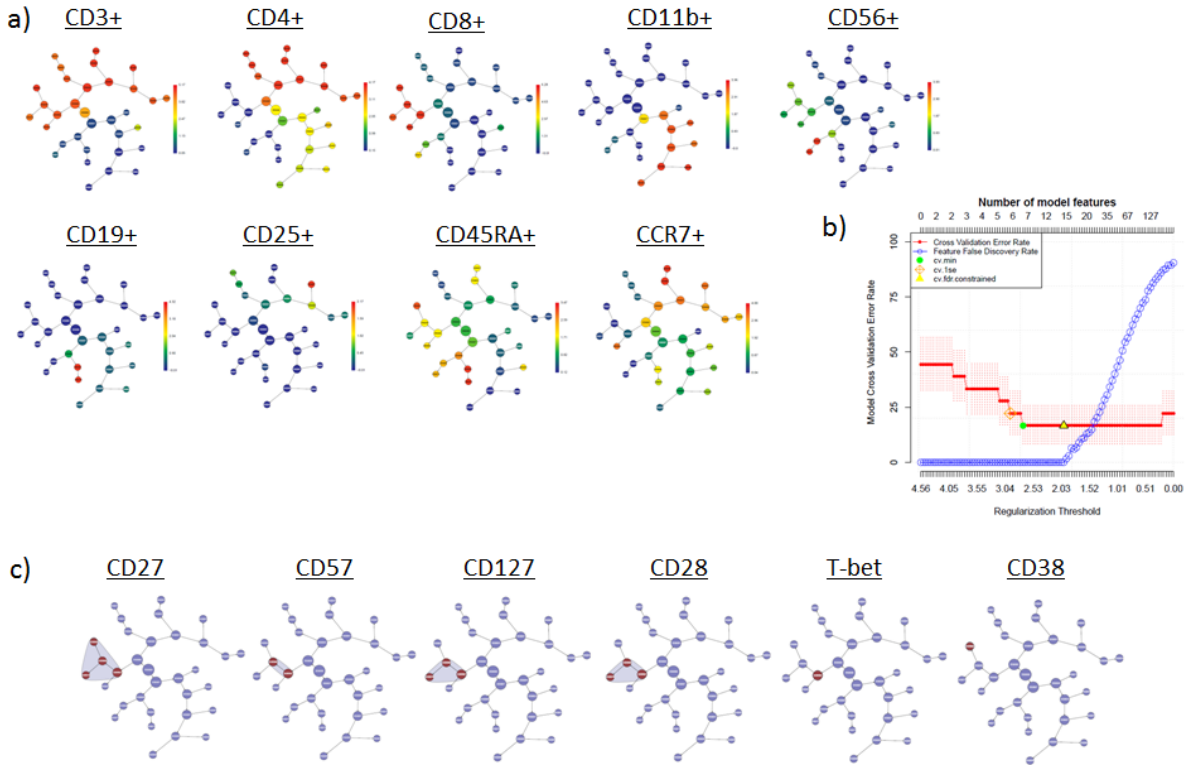
In order to identify biomarkers specific to sIBM patients (cohort 1 and 2, n=19) compared to other sub-groups of myositis (anti-Jo1: n=10, anti-SRP: n=7 and anti-HMGCR: n=9), we built and validated a decisional algorithm tree using the following cell frequencies: CD8+ T-bet+ T cells, CD8+ T-bet+ CD57+ T cells, CD8+ T-bet+ CD27+ T cells, CD8+ T-bet+ CD57+ CD27+ T cells and CD8+ T-bet+ CD57- CD27+ T cells.

a) Decisional tree. CV was performed by dividing the data set into 10 parts. We randomly selected 80% of the data for the training set (n=30 patients), with the remainder assigned to the test set (n=15 patients). We built the tree using the training set and evaluated its performance on the test set. We have chosen the smallest cross-validated prediction error on the training set (0.84) associated with the highest proportion of correct classification on the test set (100%). **b)** Considering that each run resulted to different cut-off values for CD8+ T-bet+ T cells, we used ROC curves to help in the identification of the best predictive value for CD8+ T-bet+ T cells. Having obtained the best cross-validation prediction for frequencies > 51.51% for CD8+ T-bet+ T cells with various CART runs, this predictive value was validated by ROC curves with a sensitivity (Se) of 94.74%, a specificity (Sp) of 88.46%, a CI of [73.97-99.87%], an area under the curve (AUC) of 0.97 and a p value < 0.0001.

Supplementary Table 1: List of antibodies

Antigen	Metal tag	Manufacturer
CD45	89	Fluidigm
HLADR	141	Fluidigm
CD19	142	Fluidigm
CD5	143	Fluidigm
CD4	145	Fluidigm
IgD	146	Fluidigm
CD28	147	Fluidigm
CD16	148	Fluidigm
CD127	149	Fluidigm
pRb	150	Fluidigm
CD14	151	Fluidigm
pAkt	152	Fluidigm
pStat1	153	Fluidigm
CD3	154	Fluidigm
CD45RA	155	Fluidigm
CD1d	156	Fluidigm
CD27	158	Fluidigm
CCR7	159	Fluidigm
T-bet	160	Fluidigm
CD8	161	Fluidigm
FoxP3	162	Fluidigm
CD56	163	Fluidigm
CyclinB1	164	Fluidigm
IFN-γ	165	Fluidigm
CD24	166	Fluidigm
CD95	167	Fluidigm
CD138	168	Fluidigm
CD25	169	Fluidigm
iNKT	170	Fluidigm
CXCR5	171	Fluidigm
CD38	172	Fluidigm
RORγT	173	Fluidigm
CRTh2	174	Fluidigm
pHistone 3	175	Fluidigm
CD57	176	Fluidigm
CD11b	209	Fluidigm
IdU	127	Fluidigm
ADN1	191	Fluidigm
ADN2	193	Fluidigm
Viability stain	Cisplatin	Fluidigm

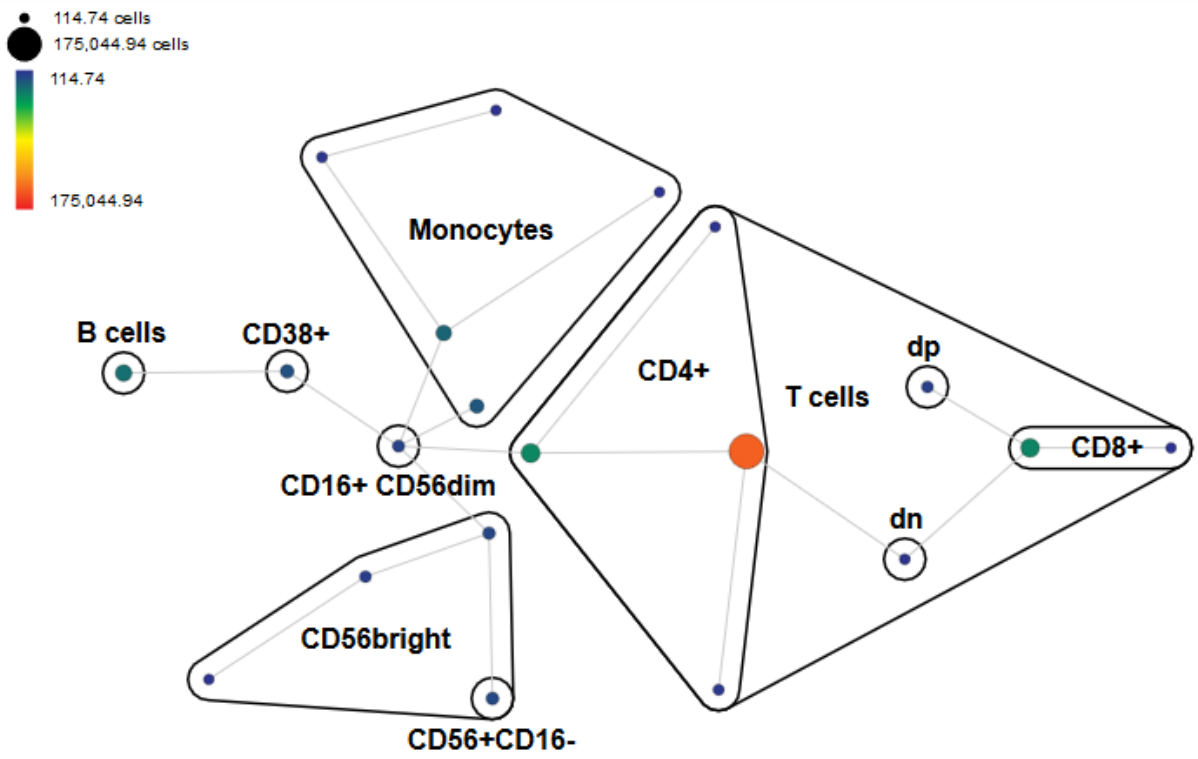
Supplementary Figure 1: Unsupervised Citrus analysis for the identification of significant differences between patients and healthy donors (use of median mass intensities)



Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Beads and dead cells were gated out. Next, we performed Citrus analysis on total CD45+ events for the identification of markers which vary within different cell population between sIBM patients and HD. The settings used for the Citrus runs on total cells were as follow: population (all cells), groups (Healthy donors and sIBM patients), clustering channels (CD3, CD4, CD8, CD11b, CD56, CD19, CD25, CD45RA and CCR7), statistics channels (HLA-DR, IgD, CD28, CD127, FoxP3, CD27, CD38, T-bet and CD57), equal event sampling (20.000 events each), minimum cluster size (5%), cross validation fold (5) and false discovery rate (1%).

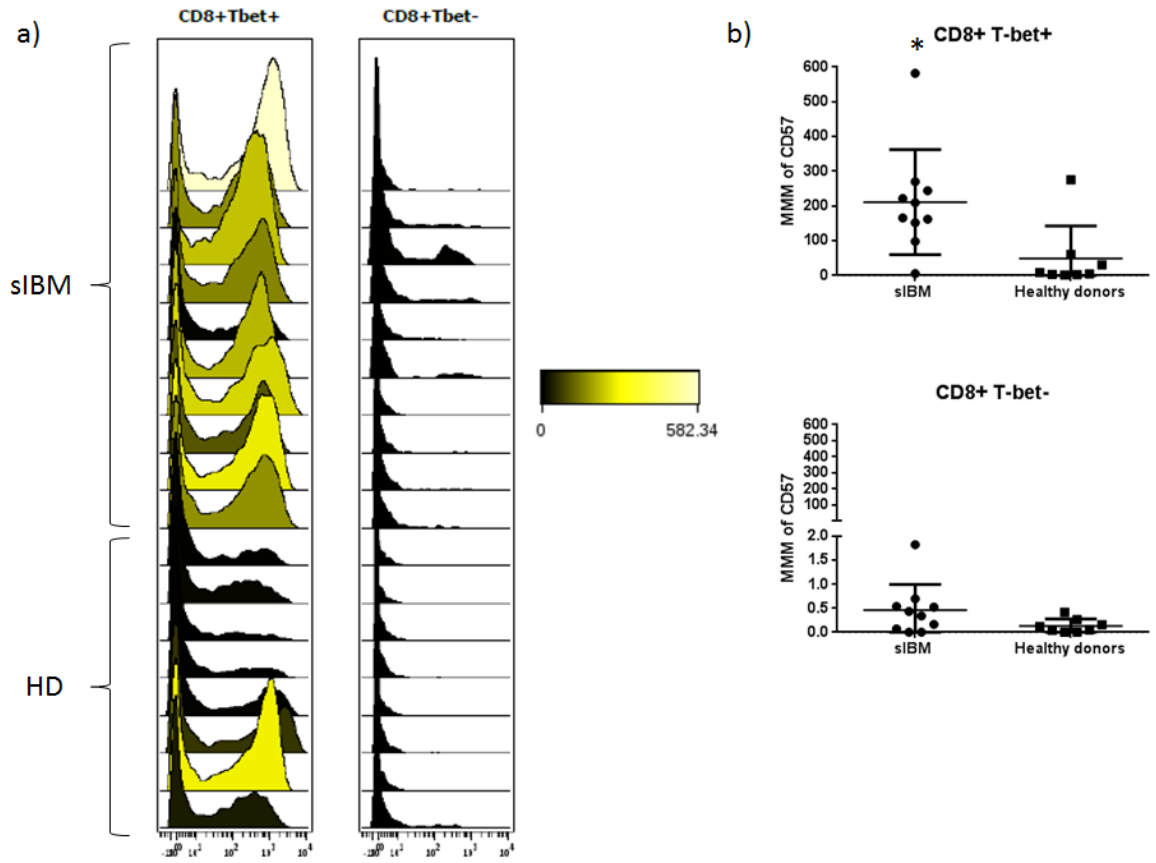
a) Clustering channels, **b)** shows the model error rate of the output classification models between patients and HD and **c)** shows the clusters containing the events which vary significantly between sIBM patients and HD.

Supplementary Figure 2: Automated gating of cells using SPADE



Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Beads and dead cells were gated out and unsupervised clustering of homogenous cell populations was performed using the SPADE algorithm available on cytobank. The maximum number of nodes was set at 20, with a down sampling of 10%. Clustering was performed using the following markers: CD19, CD3, CD4, CD16, CD56, CD8 and CD11b. Data shows the SPADE tree generated with cytobank and the annotated bubbles based on the expression of different markers. The color scale represents event count.

Supplementary Fig 3: Expression of CD57 in CD8+ T cells

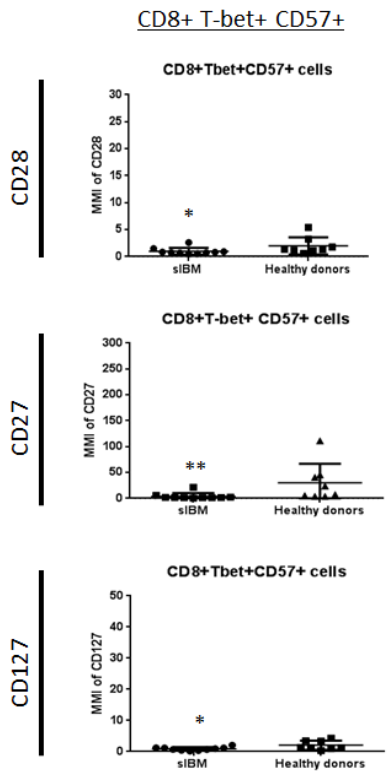


Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE. Here, we describe the expression of CD57 in CD8+ T cells.

a) Histogram overlays showing the expression of CD57 in CD8+ T cell populations. **b)** Comparison of the MMI of CD57 in different CD8+ T cells of between sIBM patients and healthy donors.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using t-test (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

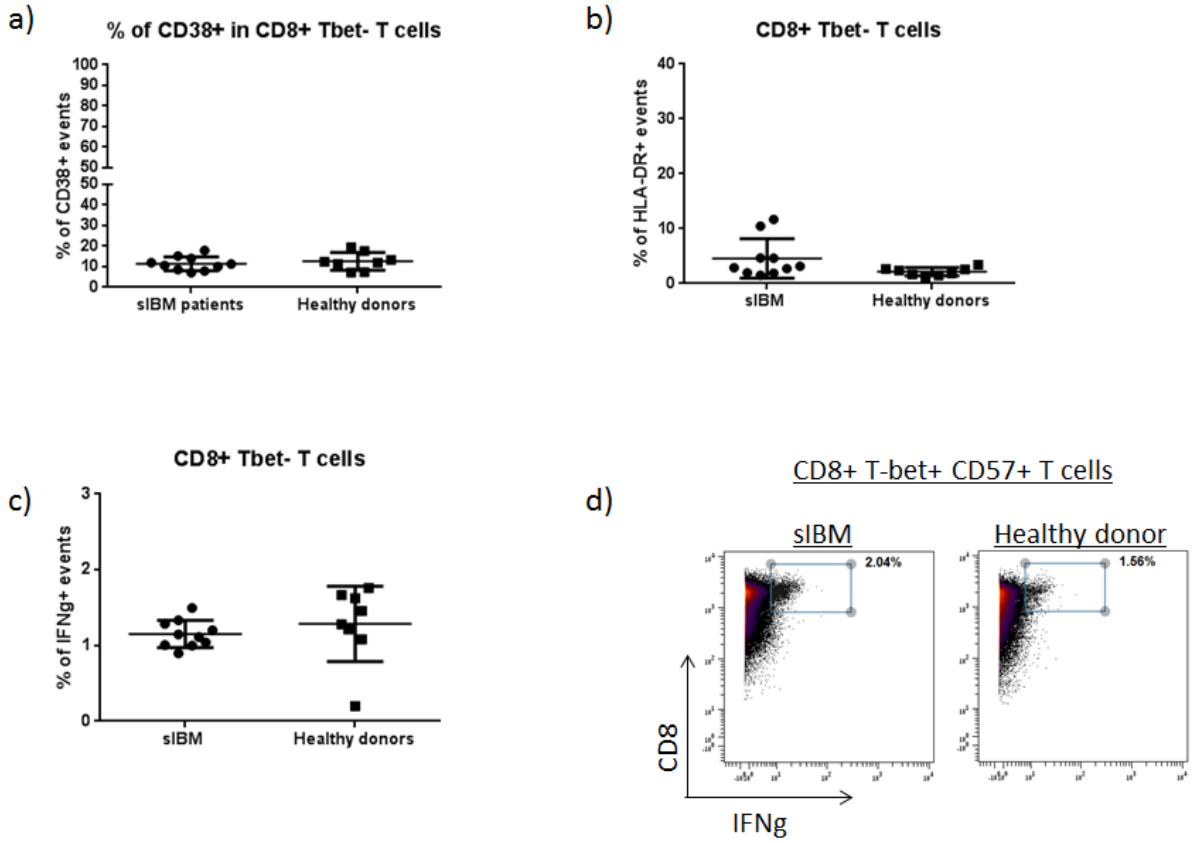
Supplementary Fig 4: Expression of CD28, CD27 and CD127 in CD8+ T-bet+ CD57+ T cells



Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE. Here, we show dot plots corresponding to the MMI of CD28, CD27 and CD127 in senescent CD8+T-bet+ CD57+T cells.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using t-test (*$p<0.05$, **$p<0.001$, ***$p<0.0001$ and ****$p<0.00001$). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

Supplementary Fig 5: Frequency of cells expressing activation markers

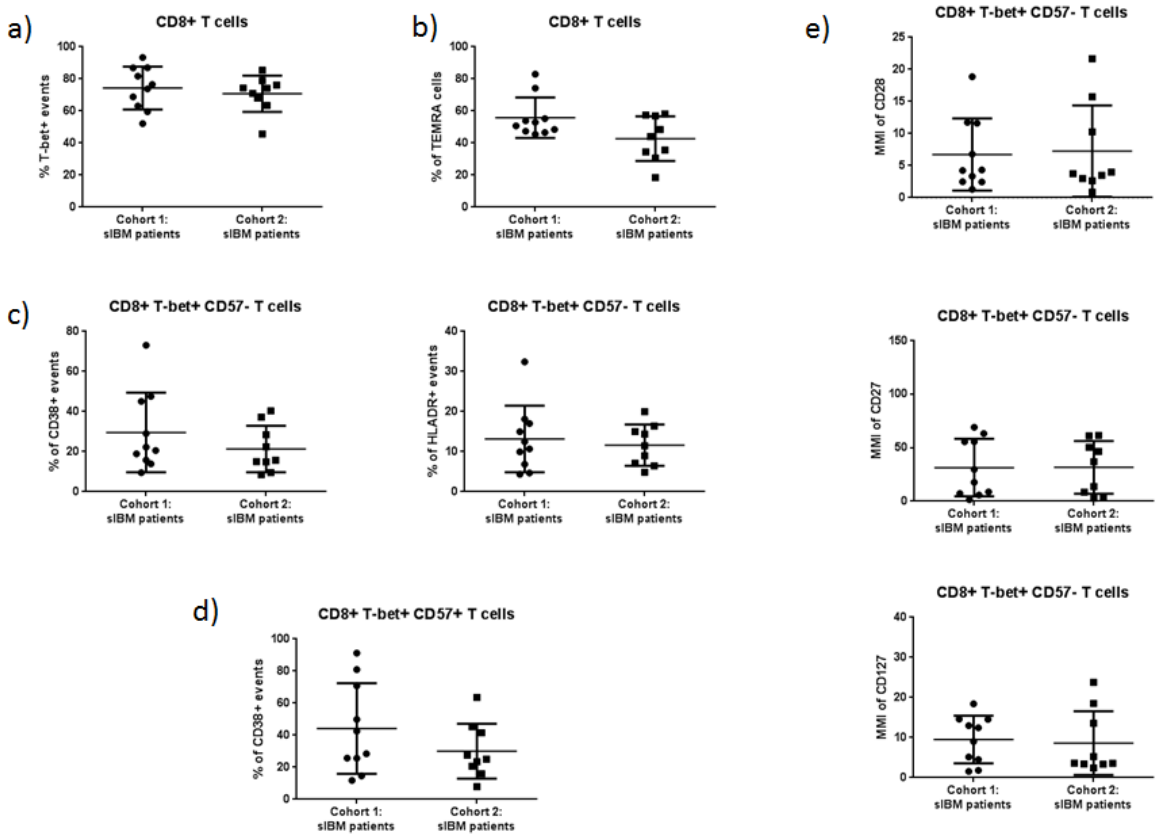


Cells from sIBM patients (cohort 1, n=10) and age-matched healthy donors (n=8) were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Data analysis was performed using SPADE followed by viSNE. The settings used for the viSNE run on CD8+ T cells were as follow: equal event sampling (3615 events each), channels (CD28, CD127, CD27, T-bet and CD57), iterations (1000), perplexity (50) and theta (0.3). Furthermore, we analyzed the frequency of various cell populations and the median mass intensity of various markers on the subsets obtained from the viSNE run.

a) Frequency of CD38+ events in CD8+ T-bet- events, **b)** frequency of HLADR+ events in CD8+ T-bet- events, **c)** frequency if IFNγ+ events in CD8+ T-bet+ events, and **d)** dot plots showing the frequency of IFNγ+ exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- T cells cells in one sIBM patient and one healthy donor.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using Mann-Whitney test (two-tailed: *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

Sup Fig 6: Close values for the immune profiles of sIBM patients from cohort 1 and cohort 2



In order to rule out any significant differences in the values of the biomarkers identified between sIBM patients from cohort 1 and cohort 2, we performed t-test for each biomarker of interest among patients from both cohorts (sIBM patients cohort 1, n=10 vs sIBM patients cohort 2, n=9). **a)** frequency of T-bet+ events on total CD8+ T cells, **b)** frequency of TEMRA cells on total CD8+ T cells, **c)** frequency of CD38+ and HLADR+ in exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- T cells, **d)** frequency of CD38+ senescent CD8+T-bet+ CD57- T cells and **e**) MMI of CD28, CD27 and CD127 in exhausted-like CD8+T-bet+ CD57- T cells.

Data analysis was performed in cytobank. Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using Mann-Whitney test to compare frequencies and t-test to compare MMI (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001). The data shown are representative of an independent experiment and represent median with interquartile.

Introduction Article 3

Différents ASM qui aident à la classification des patients ont été décrits, tels que les anticorps dirigés contre les protéines SRP, HMGCR et Jo1. Malgré la présence d'ASM au sein de différents sous-groupes de myosites, le rôle des lymphocytes B est peu connu.

Dans le but de mieux décrire l'implication des différentes cellules sanguines (en particulier des lymphocytes B) au cours du SAS anti-Jo1, nous avons utilisé notre panel de 37 marqueurs en cytométrie de masse. Pour cette étude, nous avons inclus les patients actifs et non traités suivants : SAS anti-jo1 (n=10), myopathie anti-HMGCR (n=9), myopathies anti-SRP (n=7) et MIs (n=18). Les résultats ont été comparés à ceux de 10 sujets sains appariés au niveau de l'âge.

Suite aux résultats obtenus grâce au CyTOF, des marquages par immunohistochimie sur les biopsies musculaires de patients SAS anti-Jo1 ont été réalisés par nos collaborateurs en Allemagne (équipe de Werner Stenzel).

Single cell mass cytometry reveals an impairment of B cell homeostasis in the anti-synthetase syndrome

(à soumettre en tant que « lettre à l'éditeur »)

Gaëlle Dzangué-Tchoupou[1*], Yves Allenbach[1, 2], Corinna Preußе[3], Werner Stenzel[3], Olivier Benveniste[1, 2]

[1] Centre of research in Myology, Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, UMRS 974, 75013, Paris, France.

[2] Department of Internal medicine and clinical immunology, Pitié-Salpêtrière University hospital, DHU I2B, AP-HP, INSERM, UMR 974, 75103, Paris, France.

[3]Department of Neuropathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 10117, Berlin, Germany.

Contact Information:

Gaëlle Dzangué-Tchoupou

Mail: gaelle.dzangue@gmail.com

Phone number: 00 (33) 01 40 77 96 84 Fax: 00 (33) 01 40 77 81 29

Key words: anti-Jo1, anti-synthetase syndrome, myositis, single-cell mass cytometry, B cell homeostasis.

Disclosure: All the authors have no financial conflicts of interest to disclose.

Abstract:

Myositis is a heterogeneous group of auto-immune disease including muscle specific auto-immune disease as well as associated extra-muscular manifestations. Well-defined homogenous groups of myositis have been described e.g: inclusion body myositis (IBM), anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coA reductase (HMGCR) myopathy, anti-signal recognition particle (SRP) myopathy and the anti-synthetase syndrome (ASyS). Patients with the ASyS present antibodies directed against amino-acyl-t-RNA synthetases, amongst which histidyl t-RNA synthetases (Jo1) antibodies are the most frequent. In ASyS patients presenting anti-Jo1 antibodies, failure to immune suppressors and relapse are frequently encountered. The role of B cells in the pathology of this disease is poorly described.

In an attempt to better describe the implication different cells in the pathogenesis of anti-Jo1 ASyS, we performed a deep immune-profiling using 37 markers by mass cytometry on peripheral blood cells from 14 active untreated anti-Jo1 patients. Results were compared to those of 23 healthy donors and a pool of 26 other myositis patients (IBM, anti-HMGCR and anti-SRP myopathies).

We observed a decrease in the frequency of memory B cells in anti-Jo1 patients (mean±SEM: anti-Jo1 = 15±3%, HD = 38±3% and other myositis = 32±3), counterbalanced by an increase in the frequency of naïve B cells (mean±SEM: anti-Jo1 = 84±3%, HD = 61±3% and other myositis = 66±3). Interestingly, immunostainings of muscle biopsies from anti-Jo1 patients show perifascicular infiltrations of memory B cells, suggesting that they niche within the muscle and escape from immune therapies.

Here, we show an impairment of B cell homeostasis in anti-Jo1 ASyS patients in comparison to other myositis patients and healthy subjects.

Main text:

Myositis is a heterogeneous group of rare muscular auto-immune diseases, with variable clinical, pathological and immunological phenotypes that allow the classification of patients into different sub-groups (1). Myositis patients present both muscular and extra muscular manifestations which affect the quality of life of patients (2). Well-defied groups of myositis have been described, such as inclusion body myositis (IBM), anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl coA reductase (HMGCR) myopathy, anti-signal recognition particle (SRP) and the anti-synthetase syndrome (ASyS) (3–6). The ASyS is characterized by the presence of myositis, antibodies directed against amino-acyl-t-RNA synthetases, interstitial lung disease, Raynaud's phenomenon, skin disorders and arthritis (7). The progressive pulmonary disease observed in ASyS patients leads to poor prognosis (3). Thirty to forty percent of ASyS patients present antibodies directed against the histidyl t-RNA synthetase (Jo1) (4). In patients presenting anti-Jo1 antibodies, high antibody titers have been associated with disease severity, nevertheless little is known concerning the specific role of the humoral immune system during the disease process (8,9). Majority of anti-Jo1 patients are steroid-refractory, and relapse is frequently observed with second line immune suppressive treatments (10).

Recent studies identified increased frequencies of activated CD57+ NK cells with a reduced polyfunctionality in the peripheral blood of active anti-Jo1 patients in comparison to healthy donors and non-active patients. The presence of NK cells within the lung of anti-Jo1 patients was also shown (11). These observations suggest the implication of NK cells in the pathogenesis of anti-Jo1 myositis; nevertheless the implication of other cell types is poorly described.

Cytometry by time-of-flight (CyTOF) is a powerful single-cell immune profiling tool which allows the simultaneous analysis of more than 37 markers using metal-conjugated antibodies (12). This tool is of particular interest in population discovery and biomarker identification. Associated with barcoding using palladium isotopes, CyTOF allows the identification of little differences within populations and different experimental groups (13).

In an attempt to fetch populations which could be implicated in the pathology of anti-Jo1 ASyS, we screened their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using 37

markers by CyTOF barcoding (n=14). Data obtained was compared to two control groups: 23 age-matched healthy donors (HD) and 26 myositis control patients including 10 IBM, 9 anti-HMGCR and 7 anti-SRP myopathies patients.

All the patients and healthy donors involved in this study signed a written informed consent and ethical approvement was obtained. Anti-Jo1 patients and other myositis patients were untreated and responded to well described diagnosis criteria for their respective disease (5,6,14). Barcoding, mass cytometric staining, data acquisition and data pre-processing (gating out of beads and dead cells) were performed as previously described in a technical research article (13). Unsupervised data analysis with was performed using the Cytobank cloud-based platform, and statistics was performed using Graphpad prism version 6 software. For the unsupervised clustering and identification of significant changes within our experimental groups, we used the Citrus algorithm. Next, for the unsupervised gating of frequent populations for downstream analyses, we used spanning-progression trees of density-normalized events (SPADE). Further analyses were performed using supervised gating approaches such as dot plots and histograms.

Mean ages of anti-Jo1 patients, healthy donors and control myositis patients were respectively, 47.2, 53.1 and 52.2 years. Unsupervised citrus analyses revealed significant differences within two main clusters: one corresponding to B and NK lymphocytes, and the other to monocytes (**Figure 1**). We observed an increase in the frequency of activated CD57+ NK cells in anti-Jo1 patients as previously described compared to the control groups (data not shown) (11). Considering that one of the two main significant clusters precede clusters defining B cells, we decided to verify changes within B cell populations using supervised approaches. Unsupervised clustering of events was performed using SPADE, and nodes corresponding to B cells were exported for downstream analyses. We observed a decrease in the frequency of memory B cells (CD19+ CD27+) in anti-Jo1 patients (mean±SEM: anti-Jo1 = 15±3%, HD = 38±3% and other myositis = 32±3), counterbalanced by an increase in the frequency of naïve B cells (CD19+ CD27-) (mean±SEM: anti-Jo1 = 84±3%, HD = 61±5% and other myositis = 66±3) (**Figure 2**). Finally, immunostainings performed on muscle biopsies from anti-Jo1 patients revealed the presence of perifascicular infiltrates of CD20+ CD27+ memory B cells, probably providing an explanation for their decreased frequency in peripheral blood (**Figure 3**).

Despite the presence of specific antibodies in anti-Jo1 ASyS patients, the role of B cells in the course of the disease is poorly described. Using mass cytometry, we show that within a homogenous group of patients presenting anti-Jo1 antibodies alongside an active myositis, there is an impairment of the B cell compartment in comparison to healthy donors. The dysregulation of B cell homeostasis in anti-Jo1 patients is unexpected, since neither other myositis patients (IBM, anti-HMGCR and anti-SRP myopathies) nor healthy donors present this impairment. In addition, Sato et al. previously observed an expansion of naïve B cells and a decrease of memory B cells expressing activation markers such as CD95, CD80 and CD86 in patients with systemic sclerosis (15). In this study, we did not observe an increase in the frequency of memory B cells expressing CD95 or the activation marker HLA-DR in anti-Jo1 patients in comparison to the control groups.

We also show the presence of memory B cells within the muscle of patients which is one of the organs targeted during the anti-Jo1 ASyS. This observation suggests that memory B cells niche in the muscle and probably hides from immune-suppressive therapies. Gating strategy for B cell populations was performed as described in the literature (16).

Relapse is frequently encountered with patients presenting anti-Jo1 antibodies under conventional immune therapies. Based on our results, we believe that memory B cells present within the muscle of patients presenting anti-Jo1 antibodies escape immune therapies, probably allowing the survival of auto-immune B cell clones. This observation could provide an explanation for the frequent relapse observed in patients.

1. Benveniste O, Squier W, Boyer O, Hilton-Jones D, Herson S. [Pathogenesis of primary inflammatory myopathies]. Presse Medicale Paris Fr 1983. 2004 Nov 20;33(20):1444–50.

2. Rayavarapu S, Coley W, Kinder TB, Nagaraju K. Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. Skelet Muscle. 2013 Jun 7;3(1):13.

3. Cojocaru M, Cojocaru IM, Chicos B. New Insights into Antisynthetase Syndrome. Mædica. 2016 Jun;11(2):130–5.

4. Benveniste O, Dubourg O, Herson S. [New classifications and pathophysiology of the inflammatory myopathies]. Rev Med Interne. 2007 Sep;28(9):603–12.

5. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. Neurology. 2014 Jul 29;83(5):426–33.

6. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. Neuromuscul Disord NMD. 2018 Jan;28(1):87–99.

7. Solomon J, Swigris JJ, Brown KK. Myositis-related interstitial lung disease and antisynthetase syndrome. J Bras Pneumol Publicacao Of Soc Bras Pneumol E Tisilogia. 2011 Feb;37(1):100–9.

8. Stone KB, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M, et al. Anti–Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. Arthritis Rheum. 56(9):3125–31.

9. Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, et al. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. Autoimmun Rev. 2012 Dec;12(2):210–7.

10. Marie I, Hatron P-Y, Cherin P, Hachulla E, Diot E, Vittecoq O, et al. Functional outcome and prognostic factors in anti-Jo1 patients with antisynthetase syndrome. Arthritis Res Ther. 2013 Oct 8;15(5):R149.

11. Hervier B, Perez M, Allenbach Y, Hervé D, Cohen F, Uzunhan Y, et al. Involvement of NK Cells and NKp30 Pathway in Antisynthetase Syndrome. J Immunol Baltim Md 1950. 2016 Aug 10;197.

12. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el-A, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science. 2011 May;332(6030):687–96.

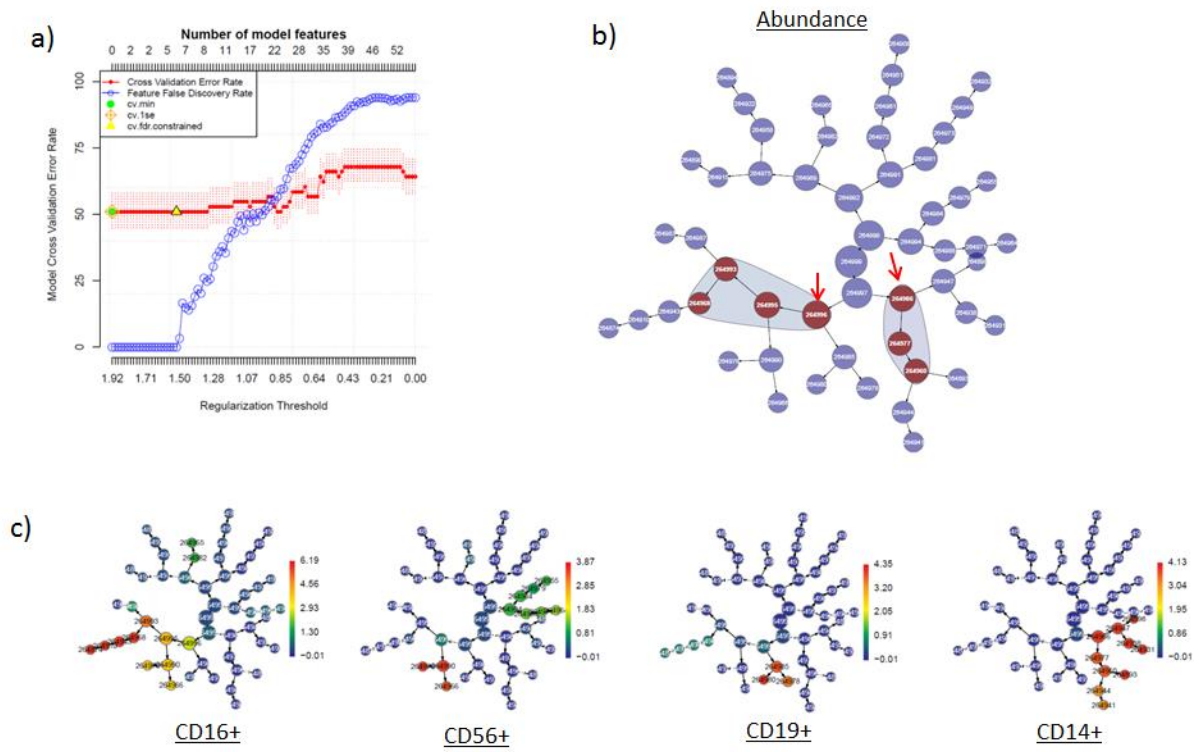
13. Dzangué-Tchoupou G, Corneau A, Blanc C, Benveniste O, Allenbach Y. Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. PloS One. 2018;13(3):e0194593.

14. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, 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 NMD. 2004 May;14(5):337–45.

15. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. Arthritis Rheum. 2004 Jun;50(6):1918–27.

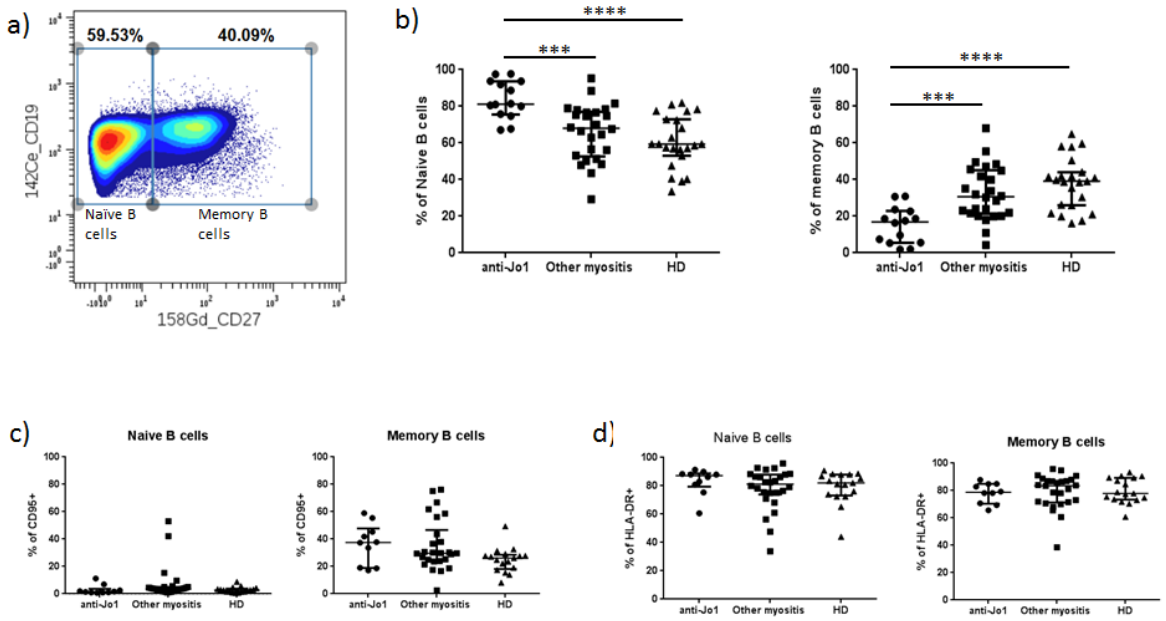
16. Thompson WS, Pekalski ML, Simons HZ, Smyth DJ, Castro-Dopico X, Guo H, et al. Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes. Clin Exp Immunol. 2014 Sep;177(3):571–85.

Figure 1: Unsupervised Citrus analysis for the detection of significant differences between anti-Jo1 patients and control groups



Cells from patients and age-matched healthy subjects were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Beads and dead cells were gated out. Next, we performed Citrus analysis on total CD45+ events for the identification of markers which vary within different cell population between anti-Jo1 patients, HD and control myositis patients. The settings used for the Citrus runs on total cells were as follow: population (all cells), groups (anti-Jo1 patients, other myositis patients and healthy donors), clustering channels (CD3, CD4, CD8, CRTh2, CD19, CXCR5, IgD, CD24, CD16, CD56, CD14, CD1d, CD11b, CD45RA, CCR7, CD27, CD28, CD127, CD138, CD25, CD38, CD57 and HLA-DR), statistics performed (abundance of populations amongst groups), equal event sampling (5.000 events each), minimum cluster size (3%), cross validation fold (5) and false discovery rate (1%). **a)** Model cross validation error rate, **b)** clusters whose abundance vary significantly between groups, red arrows show the two main clusters of interest with significant differences amongst groups **c)** main phenotypic markers which characterize the two main clusters of interest and their subsequent clusters.

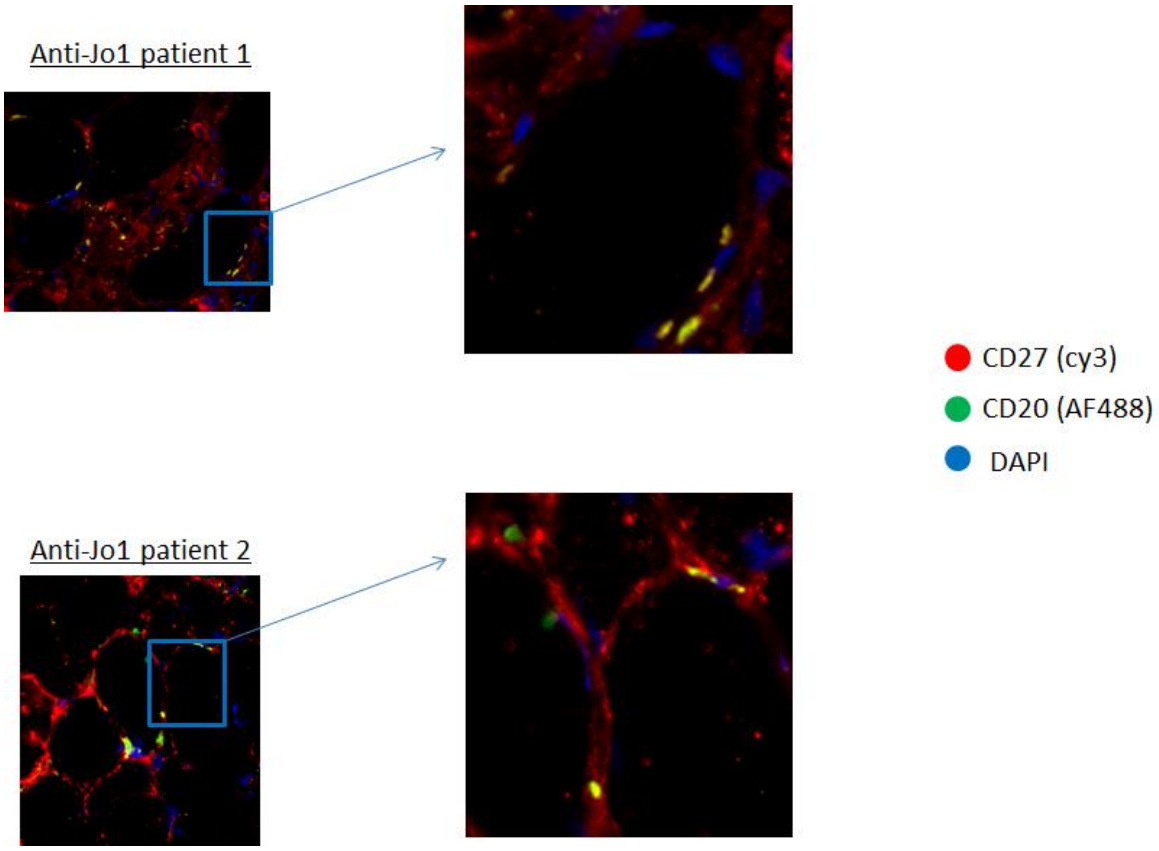
Figure 2: Impairment of the peripheral B cell compartment in anti-Jo1 patients



Cells from patients and age-matched healthy subjects were labeled individually with antibodies targeting cell surface antigens. Next, the cells were barcoded, pooled and labelled with antibodies targeting intranuclear antigens. Unsupervised clustering of homogenous cell populations were performed using the SPADE algorithm available on cytobank, next nodes corresponding to total B cells were exported for downstream analyses. Here, we describe the frequencies of B cell populations amongst patients presenting anti-Jo1 antibodies (n=14), other myositis patients [n=26: IBM (n=10), anti-SRP myopathy (n=7) and anti-HMGCR myopathy (n=9)] and age-matched healthy donors (n=23). **a)** dot plots showing the gating strategy used for naïve and memory B cells, **b)** comparison of the frequency of naïve and memory B cells between the three groups, **c)** frequency of CD95+ cells **d)** frequency of HLA-DR+ cells.

Statistics was performed with Graphpad Prism version 6, using one-way ANOVA test with Bonferroni correction (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 and ****p<0.00001).

Figure 3: Memory B cells are present within the muscle of patients presenting anti-Jo1 antibodies



Muscle biopsies from two patients presenting anti-Jo1 antibodies were stained with antibodies targeting CD20 (AF488), CD27 (Cy3) and nucleic acid (DAPI).

DISCUSSION/PERSPECTIVES

Les myosites sont des maladies auto-immunes hétérogènes, qui nécessitent le regroupement des patients en groupes relativement homogènes pour une meilleure prise en charge. La classification des patients atteints de myosites en groupes homogènes permet aussi de mieux étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de ces maladies dont les causes restent inconnues. Mes travaux de thèse se sont orientés vers la caractérisation des RI par la cytométrie de masse au sein de différents groupes de patients atteints de myosites, afin d'identifier des biomarqueurs propres à chaque groupe. L'identification de biomarqueurs peut permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués au cours de la maladie, l'identification de biomarqueurs diagnostiques et l'ouverture vers de nouvelles cibles thérapeutiques. Les objectifs secondaires de mes travaux de thèse étaient de confirmer et/ou de préciser la classification des patients atteints de myosites en fonction de l'homogénéité de leurs phénotypes cellulaires. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur des patients naïfs de traitement immunosuppresseur ou en phase de rechute. Notre équipe dispose d'une bio-banque de plus de 500 patients atteints de myosites, néanmoins, peu d'entre eux sont non-traités. En effet, les myosites restent des maladies rares dont l'incidence est estimée à 6 à 7 personnes sur 100,000. Ainsi, le choix des groupes de patients atteints de myosites et leur nombre a été déterminé par les échantillons en notre possession au moment de l'étude.

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point la technologie CyTOF et optimiser un protocole technique pour son application afin de permettre la détection d'un panel large de cibles antigéniques extracellulaires et intranucléaires. La technologie étant nouvelle en France et au sein même de notre laboratoire, nous nous sommes heurtés à des difficultés qui n'étaient pas parfois de notre ressort (par exemple la perte importante de plus de 30% d'échantillons lors du passage en plaques, l'altération d'épitopes sensibles suite à l'utilisation des tampons recommandés par les fournisseurs selon les cibles antigéniques d'intérêts et l'effet néfaste de la perméabilisation avant le *barcoding* sur les épitopes sensibles). Outres ces difficultés, il était nécessaire de tester différents protocoles techniques depuis la décongélation des échantillons jusqu'au « dé-barcoding » des évènements acquis au cytomètre de masse. L'ensemble de ces étapes a été long et laborieux, néanmoins, cela a permis la publication d'un article de recherche technique. Par la suite, notre protocole technique a été optimisé pour la détection d'un panel de 37

marqueurs. Ce panel défini de 37 marqueurs a été utilisé pour nos différents projets. Le protocole technique que nous avons mis au point a servi par la suite à différents projets nécessitant l'utilisation du cytomètre de masse au sein de notre laboratoire :

–Etude clinique RAPAMI : évaluation de l'effet de la rapamycine après 12 mois de traitement chez les patients atteints de MIs en comparaison au groupe placebo.

–Caractérisation des réponses immunitaires chez les patients atteints de la maladie de Fabry, qui est une maladie lié à l'X causé par un défaut de l'α-galactosidase A et l'accumulation de glycospingolipides : caractérisation de la cohorte Française de patients atteints de la maladie de Fabry sous enzymo-thérapie de remplacement.

–Caractérisation des réponses immunitaires chez les patients atteints de myosites : MIs *vs* SAS anti-Jo1 *vs* myopathies anti-SRP *vs* myopathies anti-HMGCR.

Concernant le projet ayant pour objectif de mieux décrire les variations immunologiques chez les patients atteints de MIs afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutique, nos travaux ont permis tout d'abord de relier les différents phénotypes de lymphocytes CD8+ décrits chez les patients (les CD8 TEMRA, CD8+ CD28null et LGL CD57+). En plus, nous avons observé un phénotype cellulaire CD8+ $_{\text{T-bet+ CD57-}}$ qui exprime différents marqueurs d'activation tels que le CD38 et HLA-DR. Ce phénotype correspondant à des cellules CD8+ activées et non-sénescentes est d'autant plus intriguant par ce qu'il présente une perte de l'expression des marqueurs CD28, CD27 et CD127 spécifiquement chez les patients atteints de MIs en comparaison aux sujets sains. Nous rappelons que le pourcentage médian de ces cellules CD8+ $_{\text{T-bet+ CD57-}}$ est de 32% chez les patients *vs* 58% chez les sujets sains. Au vu de ces observations, nous pensons que bien qu'elles soient moins fréquentes que les cellules sénescentes, les cellules non-sénescentes activés CD8+$_{\text{T-bet+ CD57-}}$ CD28^{low} CD27^{low} CD127^{low} HLA-DR+ CD38+ ont un rôle clé dans le maintien des mécanismes auto-immuns au cours de la MIs. Notre hypothèse est renforcée par une étude qui montre qu'au cours des infections chroniques par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV, capable d'induire 2 à 3 mois de virémie avec persistance au sein des tissus), l'expression de T-bet réprime les marqueurs d'inhibition tel que PD-1 et permet la survie d'un phénotype cellulaire CD8+ T-bet^{hi} CD127^{low} PD-1^{low} (Kao et al., 2011b). De plus, ces auteurs ont montré que T-bet réprime directement *Pdcd1* qui est le gène qui code pour PD-1. Etant donné que nous n'avons pas vérifié l'expression de PD-1 au sein de notre étude,

nous avons nommé notre population CD8+$_{T\text{-}bet+}$ CD28^{low} CD27^{low} CD127^{low} HLA-DR+ CD38+, « *exhausted-like* CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ *cells* ». Ainsi, nous pensons que la population cellulaire *exhausted-like* CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ serait responsable du maintien des mécanismes auto-immuns chez les patients atteints de MIs. De plus, dans notre étude nous avons observé que toutes les cellules CD8+ T-bet+ expriment fortement le marqueur apoptotique CD95 (Fas), qui devrait entraîner leur apoptose après activation afin de permettre un retour à l'homéostasie. En considérant le pourcentage important de lymphocytes CD8+ T-bet+ circulants, nous pensons que soit ces cellules sont résistantes à l'apoptose par la voie Fas/ FasL, soit la voie Fas/FasL est déficiente ou soit la stimulation antigénique est trop importante chez les patients atteints de MIs et ne permets un retour à l'homéostasie immunitaire. L'ensemble de nos données suggèrent ainsi une stimulation antigénique chronique chez les patients atteints de MIs associée à un défaut de retour à l'homéostasie et l'existence d'une population cellulaire activés *exhausted-like* CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ potentiellement capable de prolifération et de maintien des clones CD8+ auto-immuns. Ces suggestions peuvent expliquer la résistance rencontrée face aux immunosuppresseurs. L'ensemble de ces hypothèses sont à vérifier. Tout d'abord, il est nécessaire de vérifier l'expression de PD-1 et d'autres marqueurs d'inhibition au sein de la population *exhausted-like* CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$. Par la suite, des expériences fonctionnelles devront être réalisées afin de vérifier dans un premier temps la capacité de prolifération des lymphocytes *exhausted-like* CD8$_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ suite à une stimulation *ex-vivo*, en comparaison aux lymphocytes T CD8 sénescents ou naïfs. Ensuite, leur fonction effectrice devra aussi être testée.

Ce projet nous a aussi permis dans un second temps d'identifier un biomarqueur spécifique des MIs par rapport à 3 autres groupes de myosites (SAS anti-Jo1 et les myopathies anti-SRP et anti-HMGCR), avec de bonnes valeurs de sensibilité et de spécificité. Ce biomarqueur pourra être utilisé pour confirmer le diagnostic de la MIs qui requiert de l'expertise. Outre sa bonne sensibilité et spécificité, les autres avantages liés à notre biomarqueur est le fait qu'il repose sur 2 marqueurs (CD8 et T-bet) et peut être évalué à partir de PBMC et non de muscle. Ainsi, il peut être utilisé en routine. En revanche, un inconvénient de ce biomarqueur est le fait qu'il requiert un marquage intranucléaire qui prolonge le temps de marquage des échantillons, néanmoins il peut être réalisé au cours d'une demi-journée.

Concernant le projet qui avait pour but de caractériser les RI chez les patients atteints du syndrome des anti-synthétases (SAS) anti-Jo1, nous avons obtenus des résultats encourageants, qui permettent de préciser l'homogénéité de ce groupe et qui ouvre une voie vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués au cours de la maladie. Pour ce projet, nous avons constitué deux groupes témoins : des sujets sains et des myosites contrôles (MIs et les myopathies anti-SRP et anti-HMGCR). Les analyses non-supervisées et supervisées nous ont orientée vers 3 populations majeures : les monocytes et les lymphocytes B et NK. Concernant les lymphocytes NK ; nous avons observé un phénotype NK activé, caractérisé par une augmentation des lymphocytes exprimant le CD57 et le CD38. Etant donné qu'un travail décrivant l'augmentation de lymphocytes NK CD57+ dans le sang des patients atteints du SAS anti-Jo1 accompagnée de la présence des lymphocytes NK dans les poumons avait été précédemment publié lors d'un travail collaboratif de l'équipe (Hervier et al., 2016), nous n'avons pas décrit de nouveau cette observation parmi nos résultats. Concernant les lymphocytes B, nous avons observé un déséquilibre entre les phénotypes B mémoires et B naïfs chez les patients atteints du SAS anti-Jo1 en comparaison aux groupes témoins. En effet, la diminution de la fréquence des lymphocytes B mémoires dans le sang des patients accompagné de la mise en évidence de lymphocytes B mémoires dans le muscle des patients suggèrent que ces derniers sont capables de migrer dans le muscle des patients. Le muscle étant l'un des organes effecteurs du SAS anti-Jo1, nous pensons que les B mémoires présents dans le muscle peuvent non seulement échapper aux immunosuppresseurs, mais aussi participer à la création d'un environnement inflammatoire au sein du muscle. En effet, des travaux ont montré que le muscle des patients atteints du SAS-anti Jo1 sur-expriment spécifiquement le HLA-DR en comparaison au HLA-ABC (de type I) en comparaison aux patients atteints de dermatomyosite (Aouizerate et al., 2014). Ainsi, il est possible que la sur-expression des molécules du HLA-DR par les myofibres des patients soit favorisée par l'environnement inflammatoire. Le recrutement des cellules inflammatoires au sein du muscle peut entraîner une toxicité des fibres musculaires et le maintien de l'environnement inflammatoire. Chez les patients atteints de sclérodermie systémique qui est une maladie auto-immune impliquant la présence d'auto-anticorps, une dérégulation de l'homéostasie des lymphocytes B a déjà été décrite (Sato et al., 2004). En effet, les auteurs ont observé une diminution des lymphocytes B mémoires en faveur des lymphocytes B naïfs. Dans cette étude, les lymphocytes B mémoires étaient caractérisés par

une surexpression du CD95 (Fas) et des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86. Notons que les molécules HLA-DR participent à la présentation antigénique par les lymphocytes B lorsqu'elles sont exprimées tout comme CD80 et CD86. Dans notre étude, nous n'avons pas observé une augmentation significative de lymphocytes B mémoires CD95+ (Fas+) ou HLA-DR+. Par ailluers, une dérégulation de l'homéostasie des lymphocytes B circulants a aussi précédemment été observée chez les patients atteints de lupus systémique disséminé (Odendahl et al., 2000). Mais contrairement à notre obsevation chez les patients atteints du SAS anti-Jo1, cette pertubation se traduisait par une diminution des lymphocytes B naïfs (CD19+ CD27-), une augmentation des B mémoires (CD19+ CD27+) et une augmentation des plasmocytes (CD19^{dim} CD27^{hi} CD38+ CD138+ CD20- Ig de surface ^{low}). Le suivi des patients sous traitrement immunosuppresseurs a permis de mettre en évidence une diminution des après traitement des lymphocytes B naïfs et des plasmocytes, mais pas des lymphocytes B mémoires CD27+. Ces observations suggèrent que les lymphocytes B mémoires seraient résistants aux immunosuppresseurs au cours du lupus, ce qui expliquerait leur dominance dans le sang des patients. Dans notre étude, nous n'avons pas fait de phénotypage avant et après traitement pour évaluer cet effet. Concernant les monocytes, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence significative de l'expression ou de la fréquence d'une population entre les différents groupes étudiés. Au vu de nos observations concernant ce projet, nous pensons que tout comme les lymphocytes NK, les lymphocytes B ont un rôle important au cours du SAS anti-Jo1. Ainsi, outre leur rôle de sécrétion d'autoanticorps, les lymphocytes B mémoires peuvent participer à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au sein du muscle qui va favoriser la cytotoxicité musculaire. Leur présence dans le muscle peut aussi leur permettre d'échapper aux immunosuppresseurs, ce qui serait en faveur des rechutes fréquentes après traitement. Pour la suite de ce projet, il est nécessaire de vérifier la présence de lymphocytes B mémoires dans le tissu pulmonaire des patients. Cette étude nous montre aussi une implication de différents types cellulaires chez les patients atteints du SAS anti-Jo1 qui présentent en plus de leur myosite diverses atteintes extra-musculaires, contrairement aux patients atteints de MIs et de myopathies anti-SRP et anti-HMGCR qui ont une maladie qui cible principalement le muscle avec peu d'atteintes extra-musculaires.

L'application de notre panel de 37 marqueurs sur les cellules sanguines de patients atteints de myopathies anti-SRP et anti-HMGCR n'a pas permis l'identification de phénotypes discriminants.

Au cours de mon doctorat, j'ai aussi participé à une étude clinique sur l'évaluation d'un traitement (Rapamycine) chez les patients atteints de la MIs. Cette étude a sollicité l'utilisation de la technologie CyTOF. Ainsi, j'ai analysé les données obtenues grâce à la cytométrie de masse. Etant donné que ces données sont confidentielles, je ne les présente pas dans ce rapport de thèse.

En conclusion, mes travaux de thèse m'ont permis tout d'abord de mettre au point un panel de 37 marqueurs en cytométrie de masse. Ce panel a été utilisé dans le cadre de l'ensemble des projets nécessitant le CyTOF au sein de l'équipe, parmi lesquels une étude clinique. Mes travaux de thèse ont permis l'identification de différents phénotypes et biomarqueurs potentiellement impliqués au cours des myosites. Ces travaux ouvrent aussi de nouvelles pistes vers l'optimisation du diagnostic et la prise en charge des patients atteints de myosites. Des tests fonctionnels seront nécessaires afin de préciser le rôle des différents phénotypes identifiés et de confirmer leur implication au cours de la maladie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allenbach, Y., and Benveniste, O. (2013). Acquired necrotizing myopathies. Curr. Opin. Neurol. *26*, 554.

Allenbach, Y., Chaara, W., Rosenzwajg, M., Six, A., Prevel, N., Mingozzi, F., Wanschitz, J., Musset, L., Charuel, J.-L., Eymard, B., et al. (2014a). Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis. PloS One *9*, e88788.

Allenbach, Y., Drouot, L., Rigolet, A., Charuel, J.L., Jouen, F., Romero, N.B., Maisonobe, T., Dubourg, O., Behin, A., Laforet, P., et al. (2014b). Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. Medicine (Baltimore) *93*, 150–157.

Allenbach, Y., Mammen, A.L., Benveniste, O., Stenzel, W., and Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group (2018). 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. Neuromuscul. Disord. NMD *28*, 87–99.

Amir, E.D., Davis, K.L., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Levine, J.H., Bendall, S.C., Shenfeld, D.K., Krishnaswamy, S., Nolan, G.P., and Pe'er, D. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. Nat. Biotechnol. *31*, 545–552.

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

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

Atassi, M.Z., and Casali, P. (2008). Molecular mechanisms of autoimmunity. Autoimmunity *41*, 123–132.

Atkuri, K.R., Stevens, J.C., and Neubert, H. (2015). Mass cytometry: a highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development. Drug Metab Dispos *43*, 227–233.

Ayroldi, E., Zollo, O., Cannarile, L., D' Adamio, F., Grohmann, U., Delfino, D.V., and Riccardi, C. (1998). Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death. Blood *92*, 4212–4219.

Badrising, U.A., Maat-Schieman, M.L.C., Ferrari, M.D., Zwinderman, A.H., Wessels, J.A.M., Breedveld, F.C., van Doorn, P.A., van Engelen, B.G.M., Hoogendijk, J.E., Höweler, C.J., et al. (2002). Comparison of weakness progression in inclusion body myositis during treatment with methotrexate or placebo. Ann. Neurol. *51*, 369–372.

Balbir-Gurman, A., and Braun-Moscovici, Y. (2011). Scleroderma overlap syndrome. Isr. Med. Assoc. J. IMAJ *13*, 14–20.

Bandura, D.R., Baranov, V.I., Ornatsky, O.I., Antonov, A., Kinach, R., Lou, X., Pavlov, S., Vorobiev, S., Dick, J.E., and Tanner, S.D. (2009). Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem *81*, 6813–6822.

Barohn, R.J., Herbelin, L., Kissel, J.T., King, W., McVey, A.L., Saperstein, D.S., and Mendell, J.R. (2006). Pilot trial of etanercept in the treatment of inclusion-body myositis. Neurology *66*, S123-124.

Basten, A., and Silveira, P.A. (2010). B-cell tolerance: mechanisms and implications. Curr. Opin. Immunol. *22*, 566–574.

Bellanti, J.A. (1998). Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. Allergy Asthma Proc. *19*, 337–341.

Bendall, S.C., Simonds, E.F., Qiu, P., Amir, el-A., Krutzik, P.O., Finck, R., Bruggner, R.V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O.I., et al. (2011). Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science *332*, 687–696.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat. Genet. *27*, 20–21.

Benveniste, O. (2014). [Inclusion-body myositis]. Rev. Med. Interne *35*, 472–479.

Benveniste, O., Guiguet, M., Freebody, J., Dubourg, O., Squier, W., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Leite, M.I., Allenbach, Y., Herson, S., et al. (2011a). Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. Brain J. Neurol. *134*, 3176–3184.

Benveniste, O., Drouot, L., Jouen, F., Charuel, J.-L., Bloch-Queyrat, C., Behin, A., Amoura, Z., Marie, I., Guiguet, M., Eymard, B., et al. (2011b). Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. Arthritis Rheum. *63*, 1961–1971.

Benveniste, O., Stenzel, W., Hilton-Jones, D., Sandri, M., Boyer, O., and van Engelen, B.G.M. (2015). Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. Acta Neuropathol. (Berl.) *129*, 611–624.

Benveniste, O., Stenzel, W., and Allenbach, Y. (2016). Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. Curr. Opin. Neurol. *29*, 662–673.

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

Borrego, F., Masilamani, M., Kabat, J., Sanni, T.B., and Coligan, J.E. (2005). The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. Mol. Immunol. *42*, 485–488.

Bosque, A., Marzo, I., Naval, J., and Anel, A. (2007). Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss. Mol. Immunol. *44*, 1446–1453.

Brady, S., Squier, W., and Hilton-Jones, D. (2013). Clinical assessment determines the diagnosis of inclusion body myositis independently of pathological features. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *84*, 1240–1246.

Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., et al. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. Blood *101*, 2711–2720.

Brodin, P., Jojic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C.J.L., Furman, D., Shen-Orr, S., Dekker, C.L., Swan, G.E., Butte, A.J., et al. (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. Cell *160*, 37–47.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. Annu. Rev. Immunol. *33*, 257–290.

Bruggner, R.V., Bodenmiller, B., Dill, D.L., Tibshirani, R.J., and Nolan, G.P. (2014). Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, E2770–E2777.

Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. Immunol. Rev. *197*, 179–191.

Catakovic, K., Klieser, E., Neureiter, D., and Geisberger, R. (2017). T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. Cell Commun. Signal. CCS *15*.

Chattopadhyay, P.K., Hogerkorp, C.-M., and Roederer, M. (2008). A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. Immunology *125*, 441–449.

Chazaud, B., Chrétien, F., and Gherardi, R.K. (2007). Les macrophages régulent les différentes phases de la régénération musculaire. médecine/sciences *23*, 794–795.

Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annu. Rev. Immunol. *26*, 389–420.

Climent-Albaladejo, A., Saiz-Cuenca, E., Rosique-Roman, J., Caballero-Rodriguez, J., and Galvez-Munoz, J. (2002). Dermatomyositis sine myositis and antisynthetase syndrome. Jt. Bone Spine Rev. Rhum. *69*, 72–75.

Cojocaru, M., Cojocaru, I.M., and Chicos, B. (2016). New Insights into Antisynthetase Syndrome. Mædica *11*, 130–135.

Collin, M., McGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. Immunology *140*, 22–30.

Corneau, A., Cosma, A., Even, S., Katlama, C., Le Grand, R., Frachet, V., Blanc, C., and Autran, B. (2017). Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. Cytom. B Clin Cytom *92*, 21–32.

Cosma, A., Nolan, G., and Gaudilliere, B. (2017). Mass cytometry: The time to settle down. Cytom. A *91*, 12–13.

Cox, F.M., Verschuuren, J.J., Verbist, B.M., Niks, E.H., Wintzen, A.R., and Badrising, U.A. (2009). Detecting dysphagia in inclusion body myositis. J. Neurol. *256*, 2009–2013.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu. Rev. Immunol. *29*, 621–663.

Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. J. Exp. Med. *206*, 51–59.

Dalakas, M.C. (2006). Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. Nat. Clin. Pract. Neurol. *2*, 437–447.

Dalakas, M.C. (2012). Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. Autoimmun. Rev. *11*, 203–206.

Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2008). Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. J. Autoimmun. *31*, 252–256.

Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K., and Malavasi, F. (2000). CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. Chem. Immunol. *75*, 99–120.

deLuca, L.S., and Gommerman, J.L. (2012). Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. Nat. Rev. Immunol. *12*, 339–351.

Deo, S.S., Mistry, K.J., Kakade, A.M., and Niphadkar, P.V. (2010). Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. Lung India Off. Organ Indian Chest Soc. *27*, 66–71.

Dimitri, D., Benveniste, O., Dubourg, O., Maisonobe, T., Eymard, B., Amoura, Z., Jean, L., Tiev, K., Piette, J.-C., Klatzmann, D., et al. (2006). Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. Brain *129*, 986–995.

Dzangué-Tchoupou, G., Corneau, A., Blanc, C., Benveniste, O., and Allenbach, Y. (2018). Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. PloS One *13*, e0194593.

Endo, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Tumes, D.J., and Nakayama, T. (2014). Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. Trends Immunol. *35*, 69–78.

Frisullo, G., Angelucci, F., Caggiula, M., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A.K., Sancricca, C., Mirabella, M., Tonali, P.A., and Batocchi, A.P. (2006). pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. J. Neurosci. Res. *84*, 1027–1036.

Ge, Y., Lu, X., Peng, Q., Shu, X., and Wang, G. (2015). Clinical Characteristics of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Antibodies in Chinese Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies. PloS One *10*, e0141616.

Girardi, E., Yu, E.D., Li, Y., Tarumoto, N., Pei, B., Wang, J., Illarionov, P., Kinjo, Y., Kronenberg, M., and Zajonc, D.M. (2011). Unique interplay between sugar and lipid in determining the antigenic potency of bacterial antigens for NKT cells. PLoS Biol. *9*, e1001189.

Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 890–901.

Goris, A., and Liston, A. (2012). The immunogenetic architecture of autoimmune disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*.

Granucci, F., Zanoni, I., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2008). Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *65*, 1683–1697.

Greenberg, S.A., Bradshaw, E.M., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Burleson, T., Due, B., Bregoli, L., Bregoli, L.S., O'Connor, K.C., and Amato, A.A. (2005). Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. Neurology *65*, 1782–1787.

Greenberg, S.A., Pinkus, J.L., Amato, A.A., Kristensen, T., and Dorfman, D.M. (2016). Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia. Brain J. Neurol. *139*, 1348–1360.

Griggs, R.C., Askanas, V., DiMauro, S., Engel, A., Karpati, G., Mendell, J.R., and Rowland, L.P. (1995). Inclusion body myositis and myopathies. Ann. Neurol. *38*, 705–713.

Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G.A., Schulze-Koops, H., Potter, B.V., et al. (1999). Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. Nature *398*, 70–73.

Gustafson, M.P., Lin, Y., Maas, M.L., Van Keulen, V.P., Johnston, P.B., Peikert, T., Gastineau, D.A., and Dietz, A.B. (2015). A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. PloS One *10*, e0121546.

Hadaschik, E.N., Wei, X., Leiss, H., Heckmann, B., Niederreiter, B., Steiner, G., Ulrich, W., Enk, A.H., Smolen, J.S., and Stummvoll, G.H. (2015). Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease. Arthritis Res. Ther. *17*.

Haghighi, S., Andersen, O., Rosengren, L., Bergström, T., Wahlström, J., and Nilsson, S. (2000). Incidence of CSF abnormalities in siblings of multiple sclerosis patients and unrelated controls. J. Neurol. *247*, 616–622.

Hamblin, T.J. (2003). CD38: what is it there for? Blood *102*, 1939–1940.

Hamerman, J.A., Ogasawara, K., and Lanier, L.L. (2005). NK cells in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. *17*, 29–35.

Han, L., Qiu, P., Zeng, Z., Jorgensen, J.L., Mak, D.H., Burks, J.K., Schober, W., McQueen, T.J., Cortes, J., Tanner, S.D., et al. (2015). Single-cell mass cytometry reveals intracellular survival/proliferative signaling in FLT3-ITD-mutated AML stem/progenitor cells. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *87*, 346–356.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat. Immunol. *6*, 1123–1132.

Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu. Rev. Immunol. *18*, 275–308.

Herbert, M.K., Stammen-Vogelzangs, J., Verbeek, M.M., Rietveld, A., Lundberg, I.E., Chinoy, H., Lamb, J.A., Cooper, R.G., Roberts, M., Badrising, U.A., et al. (2016). Disease specificity of autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in sporadic inclusion body myositis versus known autoimmune diseases. Ann. Rheum. Dis. *75*, 696–701.

Hersperger, A.R., Martin, J.N., Shin, L.Y., Sheth, P.M., Kovacs, C.M., Cosma, G.L., Makedonas, G., Pereyra, F., Walker, B.D., Kaul, R., et al. (2011). Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. Blood *117*, 3799–3808.

Hervier, B., Devilliers, H., Stanciu, R., Meyer, A., Uzunhan, Y., Masseau, A., Dubucquoi, S., Hatron, P.-Y., Musset, L., Wallaert, B., et al. (2012). Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. Autoimmun. Rev. *12*, 210–217.

Hervier, B., Perez, M., Allenbach, Y., Hervé, D., Cohen, F., Uzunhan, Y., Ouakrim, H., Dorgham, K., Méritet, J.-F., Longchampt, E., et al. (2016). Involvement of NK Cells and NKp30 Pathway in Antisynthetase Syndrome. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *197*.

Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. Nat. Rev. Immunol. *5*, 772–782.

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

Hosono, M., Boer, O.J. de, Wal, A.C. van der, Loos, C.M. van der, Teeling, P., Piek, J.J., Ueda, M., and Becker, A.E. (2003). Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction. Atherosclerosis *168*, 73–80.

Howard, C.J., Charleston, B., Stephens, S.A., Sopp, P., and Hope, J.C. (2004). The role of dendritic cells in shaping the immune response. Anim. Health Res. Rev. *5*, 191–195.

Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G.G., Chou, Y.K., Bourdette, D., Ziegler, S.F., Offner, H., and Vandenbark, A.A. (2005). Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. J. Neurosci. Res. *81*, 45–52.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. Nat. Immunol. *6*, 1236–1244.

Jordan Greco, A.-S., Métrailler, J.-C., and Dayer, E. (2007). [The antisynthetase syndrome: a cause of rapidly progressive interstitial lung disease]. Rev. Med. Suisse *3*, 2675–2676, 2679–2681.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity *27*, 281–295.

Juedes, A.E., Rodrigo, E., Togher, L., Glimcher, L.H., and von Herrath, M.G. (2004). T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. J. Exp. Med. *199*, 1153–1162.

Juzenas, S., Venkatesh, G., Hübenthal, M., Hoeppner, M.P., Du, Z.G., Paulsen, M., Rosenstiel, P., Senger, P., Hofmann-Apitius, M., Keller, A., et al. (2017). A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. Nucleic Acids Res. *45*, 9290–9301.

Kaminski, D.A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A.F., and Sanz, I. (2012). Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. Front. Immunol. *3*.

Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.-A.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., et al. (2011a). Transcription factor T-bet represses

expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. Nat. Immunol. *12*, 663–671.

Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.-A.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., et al. (2011b). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. Nat. Immunol. *12*, 663–671.

Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. Immunity *23*, 249–262.

Klareskog, L., Rönnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L., and Alfredsson, L. (2008). Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu. Rev. Immunol. *26*, 651–675.

Kobayashi, K.S., and Van, P. den E. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. Nat. Rev. Immunol. *12*, 813–820.

Kosmidis, M.L., Alexopoulos, H., Tzioufas, A.G., and Dalakas, M.C. (2013). The effect of anakinra, an IL1 receptor antagonist, in patients with sporadic inclusion body myositis (sIBM): a small pilot study. J. Neurol. Sci. *334*, 123–125.

Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. Nature *407*, 789–795.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. Nat. Immunol. *6*, 1219–1227.

Krueger, A., Fas, S.C., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunol. Rev. *193*, 58–69.

Krutzik, P.O., Clutter, M.R., and Nolan, G.P. (2005). Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 2357–2365.

Kuemmerle, J.F., and Makhlouf, G.M. (1995). Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca(2+)-induced Ca2+ release in intestinal longitudinal muscle. J. Biol. Chem. *270*, 25488–25494.

Larman, H.B., Salajegheh, M., Nazareno, R., Lam, T., Sauld, J., Steen, H., Kong, S.W., Pinkus, J.L., Amato, A.A., Elledge, S.J., et al. (2013). Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. Ann. Neurol. *73*, 408–418.

Legout, L., Fauchais, A.L., Hachulla, E., Queyrel, V., Michon-Pasturel, U., Lambert, M., Hatron, P.Y., and Devulder, B. (2002). [The antisynthetase syndrome: a subgroup of inflammatory myopathies not to be unrecognized]. Rev. Med. Interne *23*, 273–282.

Lloyd, T.E., Mammen, A.L., Amato, A.A., Weiss, M.D., Needham, M., and Greenberg, S.A. (2014). Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. Neurology *83*, 426–433.

Lotz, B.P., Engel, A.G., Nishino, H., Stevens, J.C., and Litchy, W.J. (1989). Inclusion body myositis. Observations in 40 patients. Brain J. Neurol. *112 (Pt 3)*, 727–747.

Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Dalakas, M., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1991). A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. Medicine (Baltimore) *70*, 360–374.

Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B.A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T.R., and Venables, P.J. (2008). Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. Arthritis Rheum. *58*, 3009–3019.

Mahnke Yolanda D., Brodie Tess M., Sallusto Federica, Roederer Mario, and Lugli Enrico (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. Eur. J. Immunol. *43*, 2797–2809.

Malik, A., Hayat, G., Kalia, J.S., and Guzman, M.A. (2016). Idiopathic Inflammatory Myopathies: Clinical Approach and Management. Front. Neurol. *7*.

Mammen, A.L., Chung, T., Christopher-Stine, L., Rosen, P., Rosen, A., Doering, K.R., and Casciola-Rosen, L.A. (2011). Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. *63*, 713–721.

Mastaglia, F.L. (2008). Inflammatory muscle diseases. Neurol. India *56*, 263–270.

Miller, J.F., and Heath, W.R. (1993). Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. Immunol. Rev. *133*, 131–150.

Mondino, A., and Mueller, D.L. (2007). Review: mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. Semin. Immunol. *19*, 162–172.

Moser, B. (2015). CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. Front. Immunol. *6*.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (2005). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 5–14.

Müntzing, K., Lindberg, C., Moslemi, A.-R., and Oldfors, A. (2003). Inclusion body myositis: clonal expansions of muscle-infiltrating T cells persist over time. Scand. J. Immunol. *58*, 195–200.

Needham, M., and Mastaglia, F.L. (2016a). Sporadic inclusion body myositis: A review of recent clinical advances and current approaches to diagnosis and treatment. Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol. *127*, 1764–1773.

Needham, M., and Mastaglia, F.L. (2016b). Immunotherapies for Immune-Mediated Myopathies: A Current Perspective. Neurotherapeutics *13*, 132–146.

Needham, M., Fabian, V., Knezevic, W., Panegyres, P., Zilko, P., and Mastaglia, F.L. (2007). Progressive myopathy with up-regulation of MHC-I associated with statin therapy. Neuromuscul. Disord. NMD *17*, 194–200.

Needham, M., Corbett, A., Day, T., Christiansen, F., Fabian, V., and Mastaglia, F.L. (2008). Prevalence of sporadic inclusion body myositis and factors contributing to delayed diagnosis. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas. *15*, 1350–1353.

Neefjes, J., Jongsma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat. Rev. Immunol. *11*, 823–836.

Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat. Rev. Immunol. *17*, 281–294.

Newell, E.W., and Cheng, Y. (2016). Mass cytometry: blessed with the curse of dimensionality. Nat Immunol *17*, 890–895.

Nguyen, T., and Russell, J. (2001). The regulation of FasL expression during activation-induced cell death (AICD). Immunology *103*, 426–434.

Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dörner, T. (2000). Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 5970–5979.

Olson, J.A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S.C., and Hamilton, S.E. (2013). Effector-like $CD8^+$ T cells in the memory population mediate potent protective immunity. Immunity *38*, 1250–1260.

Palgen, J.-L., Tchitchek, N., Elhmouzi-Younes, J., Delandre, S., Namet, I., Rosenbaum, P., Dereuddre-Bosquet, N., Martinon, F., Cosma, A., Lévy, Y., et al. (2018). Prime and Boost Vaccination Elicit a Distinct Innate Myeloid Cell Immune Response. Sci. Rep. *8*, 3087.

Pandya, J.M., Venalis, P., Al-Khalili, L., Shahadat Hossain, M., Stache, V., Lundberg, I.E., Malmström, V., and Fasth, A.E.R. (2016). CD4+ and CD8+ CD28(null) T Cells Are Cytotoxic to Autologous Muscle Cells in Patients With Polymyositis. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *68*, 2016–2026.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat. Immunol. *6*, 1133–1141.

Patel, H.C., and Lauder, N.N. (2011). The Antisynthetase Syndrome. Am. J. Med. *124*, e3–e4.

Pinal-Fernandez, I., Parks, C., Werner, J.L., Albayda, J., Paik, J., Danoff, S.K., Casciola-Rosen, L., Christopher-Stine, L., and Mammen, A.L. (2017). Longitudinal Course of Disease in a Large Cohort of Myositis Patients With Autoantibodies Recognizing the Signal Recognition Particle. Arthritis Care Res. *69*, 263–270.

Pluk, H., van Hoeve, B.J.A., van Dooren, S.H.J., Stammen-Vogelzangs, J., van der Heijden, A., Schelhaas, H.J., Verbeek, M.M., Badrising, U.A., Arnardottir, S., Gheorghe, K., et al. (2013). Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. Ann. Neurol. *73*, 397–407.

Pool, M.R., Stumm, J., Fulga, T.A., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. Science *297*, 1345–1348.

Prevel, N., Allenbach, Y., Klatzmann, D., Salomon, B., and Benveniste, O. (2013). Beneficial role of rapamycin in experimental autoimmune myositis. PloS One *8*, e74450.

Qiu, P., Simonds, E.F., Bendall, S.C., Gibbs, K.D., Bruggner, R.V., Linderman, M.D., Sachs, K., Nolan, G.P., and Plevritis, S.K. (2011). Extracting a Cellular Hierarchy from High-dimensional Cytometry Data with SPADE. Nat. Biotechnol. *29*, 886–891.

Quarona, V., Zaccarello, G., Chillemi, A., Brunetti, E., Singh, V.K., Ferrero, E., Funaro, A., Horenstein, A.L., and Malavasi, F. (2013). CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. Cytometry B Clin. Cytom. *84*, 207–217.

Raychaudhuri, S., Sandor, C., Stahl, E.A., Freudenberg, J., Lee, H.-S., Jia, X., Alfredsson, L., Padyukov, L., Klareskog, L., Worthington, J., et al. (2012). Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. Nat. Genet. *44*, 291–296.

Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M., and Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. J. Immunol. Methods *293*, 127–142.

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.

Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J., and Abbas, A.K. (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. Immunity *8*, 615–623.

Rider, L.G., Werth, V.P., Huber, A.M., Alexanderson, H., Rao, A.P., Ruperto, N., Herbelin, L., Barohn, R., Isenberg, D., and Miller, F.W. (2011). Measures for Adult and Juvenile Dermatomyositis, Polymyositis, and Inclusion Body Myositis. Arthritis Care Res. *63*, S118–S157.

Riedhammer, C., and Weissert, R. (2015). Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. Front. Immunol. *6*.

Roberto, A., Castagna, L., Zanon, V., Bramanti, S., Crocchiolo, R., McLaren, J.E., Gandolfi, S., Tentorio, P., Sarina, B., Timofeeva, I., et al. (2015). Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. Blood *125*, 2855–2864.

Rock, K.L., Reits, E., and Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. *37*, 724–737.

Rose, M.R., and ENMC IBM Working Group (2013). 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul. Disord. NMD *23*, 1044–1055.

Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., and Abbas, A.K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. J. Clin. Invest. *125*, 2228–2233.

Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. Immunity *42*, 607–612.

Rothwell, S., Cooper, R.G., Lundberg, I.E., Miller, F.W., Gregersen, P.K., Bowes, J., Vencovsky, J., Danko, K., Limaye, V., Selva-O'Callaghan, A., et al. (2016). Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. Ann. Rheum. Dis. *75*, 1558–1566.

Rutkove, S.B., Parker, R.A., Nardin, R.A., Connolly, C.E., Felice, K.J., and Raynor, E.M. (2002). A pilot randomized trial of oxandrolone in inclusion body myositis. Neurology *58*, 1081–1087.

Rygiel, K.A., Miller, J., Grady, J.P., Rocha, M.C., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2015). Mitochondrial and inflammatory changes in sporadic inclusion body myositis. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *41*, 288–303.

Salgado, F.J., Lojo, J., Fernández-Alonso, C.M., Viñuela, J.E., Cordero, O.J., and Nogueira, M. (2002). Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. Immunol. Cell Biol. *80*, 138–147.

Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M., and Takehara, K. (2004). Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. Arthritis Rheum. *50*, 1918–1927.

Sekul, E.A., and Dalakas, M.C. (1993). Inclusion body myositis: new concepts. Semin. Neurol. *13*, 256–263.

Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. J. Exp. Med. *204*, 2899–2912.

Stone, K.B., Oddis, C.V., Fertig, N., Katsumata, Y., Lucas, M., Vogt, M., Domsic, R., and Ascherman, D.P. Anti–Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. Arthritis Rheum. *56*, 3125–3131.

Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P., and Giannopoulos, K. (2015). The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) *63*, 435–449.

Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. Trends Immunol. *38*, 805–816.

Tawara, N., Yamashita, S., Zhang, X., Korogi, M., Zhang, Z., Doki, T., Matsuo, Y., Nakane, S., Maeda, Y., Sugie, K., et al. (2017). Pathomechanisms of anti-cytosolic 5’-nucleotidase 1A autoantibodies in sporadic inclusion body myositis. Ann. Neurol. *81*, 512–525.

Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., and Fox, D.A. (2008). Th17 cells in human disease. Immunol. Rev. *223*, 87–113.

Tidball, J.G., Dorshkind, K., and Wehling-Henricks, M. (2014). Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. Development *141*, 1184–1196.

Tiniakou, E., Pinal-Fernandez, I., Lloyd, T.E., Albayda, J., Paik, J., Werner, J.L., Parks, C.A., Casciola-Rosen, L., Christopher-Stine, L., and Mammen, A.L. (2017). More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Rheumatol. Oxf. Engl. *56*, 787–794.

Toh, M.-L., and Miossec, P. (2007). The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. Curr. Opin. Rheumatol. *19*, 284–288.

Tripathi, S.K., and Lahesmaa, R. Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. Immunol. Rev. *261*, 62–83.

Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Johnson, J.M., Mathisen, P.M., Weinstock-Guttman, B., and Kinkel, R.P. (1998). The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Immunol. Rev. *164*, 93–100.

Váncsa, A., Gergely, L., Ponyi, A., Lakos, G., Németh, J., Szodoray, P., and Dankó, K. (2010). Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary

dermatopolymyositis: Relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. Jt. Bone Spine Rev. Rhum. *77*, 125–130.

Vanderlugt, C.L., and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. *2*, 85–95.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med. *199*, 971–979.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. Nat. Immunol. *9*, 503–510.

Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nat. Rev. Immunol. *15*, 388–400.

Walter, P., and Blobel, G. (1983). Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. J. Cell Biol. *97*, 1693–1699.

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 *87*, 1038–1044.

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.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat. Rev. Immunol. *15*, 486–499.

White, Y., Yoshimitsu, M., Kozako, T., Matsushita, K., Koriyama, C., Uozumi, K., Suzuki, S., Kofune, H., and Arima, N. (2013). Effects of exogenous interleukin-7 on CD8(+) T-cell survival and function in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. Leuk. Lymphoma *54*, 2243–2250.

Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a006957.

Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., et al. (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. J. Immunol. *169*, 5538–5545.

Yap, M., Boeffard, F., Clave, E., Pallier, A., Danger, R., Giral, M., Dantal, J., Foucher, Y., Guillot-Gueguen, C., Toubert, A., et al. (2014). Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8+ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *25*, 1856–1868.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557–1569.

Zschüntzsch, J., Voss, J., Creus, K., Sehmisch, S., Raju, R., Dalakas, M.C., and Schmidt, J. (2012). Provision of an explanation for the inefficacy of immunotherapy in sporadic inclusion body myositis: quantitative assessment of inflammation and β-amyloid in the muscle. Arthritis Rheum. *64*, 4094–4103.

RÉSUME

Contexte scientifique : Les myosites sont des pathologies auto-immunes, caractérisées par des atteintes musculaires et extra musculaires. Au début de la maladie, le diagnostic des myosites peut être difficile et nécessite de l'expertise, afin d'éviter l'administration de traitement inapproprié. Les mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de ces maladies sont peu connus.

Objectifs de thèse : Décrire le profil immunitaire propre à chaque groupe de patients, afin d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utiles au diagnostic et à la prise en charge.

Patients et méthodes : Nous avons utilisé un panel de 36 marqueurs pour caractériser les PBMC issus de patients actifs (MIs, SAS anti-Jo1, myopathies anti-SRP et anti-HMGCR) et de sujets sains par cytométrie de masse combiné à une approche de « barcoding ».

Résultats : Tout d'abord, nous avons mis au point et optimisé une procédure technique pour la détection simultanée de cibles extracellulaires et intracellulaires par cytométrie de masse. En utilisant différents outils bio-informatiques, nous avons isolé une fréquence de lymphocytes $CD8+_{T\text{-}bet+}$ > 51.5% comme étant un biomarqueur spécifique de la MIs en comparaison aux autres myosites, avec une sensibilité de 94,74% et une spécificité de 88,46%. De plus, nous avons identifié un profil immunitaire $CD8+_{T\text{-}bet+\ CD57-}$ activé, potentiellement capable de prolifération et de maintien de mécanismes auto-immuns chez les patients atteints de MIs. Chez les patients anti-Jo1, nous avons observé une dérégulation de l'homéostasie des lymphocytes B, caractérisée par une diminution des lymphocytes B mémoires circulants. La présence de ces derniers dans le muscle des patients suggère qu'ils se nichent dans le muscle afin d'éviter l'action des immunosuppresseurs.

Conclusion : Ces travaux ont permis l'identification d'un biomarqueur pouvant renforcer le diagnostic de la MIs en comparaison à d'autres myosites et l'identification de phénotypes cellulaires potentiellement impliqués au cours de la MIs et du SAS anti-Jo1.

Mots clés : myosites, cytométrie de masse, lymphocyte T CD8+, lymphocyte B, biomarqueurs

ABSTRACT

Scientific context: Myositis is a group of autoimmune diseases characterized by muscular and extra-muscular disorders. In the early stages of the disease, the diagnosis of myositis can be misleading and requires expertise, in order to avoid the administration of inappropriate treatment. The mechanisms involved in these diseases are poorly understood.

Objectives: Describe the immune profile specific to each patient group, in order to identify biomarkers that may be useful for the diagnosis and management of patients.

Methods: We used a panel of 36 markers by mass cytometry to characterize PBMCs derived from active patients (sIBM, anti-Jo1 ASyS, anti-SRP and anti-HMGCR myopathies) and healthy subjects.

Results: First, we developed and optimized a technical procedure for the simultaneous detection of extracellular and intracellular targets by mass cytometry. Using different bioinformatics tools, we isolated a frequency of $CD8\ +_{T\text{-}bet\ +}$ cells > 51.5% as a specific biomarker for sIBM compared to other myositis, with a sensitivity of 94.74% and a specificity of 88.46%. In addition, we identified an activated $CD8\ +\ _{T\text{-}bet\ +\ CD57-}$ immune profile, potentially capable of proliferation and the maintenance of autoimmune mechanisms in patients with sIBM. In anti-Jo1 patients, we observed a dysregulation of B cell homeostasis, characterized by a decrease in circulating memory B cells. The presence of the latter in the muscle of patients suggests that they nest in the muscle to avoid immunosuppressants.

Conclusion: This work allowed the identification of a biomarker that could enhance the diagnosis of sIBM compared to other myositis and the identification of cells potentially involved during sIBM and anti-Jo1 ASyS.

Key words: myositis, mass cytometry, CD8+ T cells, B cells, biomarkers