



HAL
open science

Les cellules lymphoïdes dans la biologie et la pathologie musculaire

Tassadit Saidj

► **To cite this version:**

Tassadit Saidj. Les cellules lymphoïdes dans la biologie et la pathologie musculaire. Neurosciences. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120006 . tel-04191850

HAL Id: tel-04191850

<https://theses.hal.science/tel-04191850>

Submitted on 30 Aug 2023

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.

Ecole doctorale SVS ED402 : Sciences de la Vie et de la Santé

Pour l'obtention du grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-EST**

Thèse de Doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire

Les cellules lymphoïdes dans la biologie et la pathologie musculaire

Présentée par :

Tassadit SAIDJ

Soutenue le 28 janvier 2022.

Thèse dirigée par le Professeur François Jérôme AUTHIER

JURY :

Prof. François Jérôme AUTHIER, MD, PhD

Directeur de thèse

Prof. Marie-Laure NEGRIER, MD, PhD

Rapporteur

Dr. Olivier BIONDI, PhD

Rapporteur

Prof. Emmanuèle LECHAPT, MD, PhD

Examineur

Prof. Laurent BELEC, MD, PhD

Examineur

Dr. Cyrille GITIAUX, MD, PhD

Examineur

Dr. Asma BELDI FERCHIOU, MD, PhD

Examineur

Résumés

Résumé en Français

Les Cellules lymphoïdes innées dans la biologie et pathologie du muscle squelettique

Les myopathies dysimmunes et inflammatoires (DIM) forment un groupe de maladies acquises affectant le muscle squelettique. Leur caractérisation repose sur la délimitation précise des processus immunopathologiques, notamment le phénotypage des cellules immunitaires intramusculaires. La cytométrie en flux (CMF) est la technique la plus fiable pour analyser les sous-populations de leucocytes et évaluer leurs niveaux d'activation. Nous avons d'abord développé un protocole purement mécanique d'extraction de cellules du tissu musculaire permettant de préserver les épitopes de surface cellulaire et nous avons évalué son applicabilité dans le cadre de la pathologie expérimentale chez la souris et du diagnostic myopathologique chez l'homme. Chez la souris, la régénération des muscles squelettiques était associée à l'enrichissement transitoire des macrophages ($CD11b^{high} Gr-1^{+}$), des cellules dendritiques myéloïdes (MDC, $CD3^{-}CD8^{+} CD11b^{high}$), des cellules T $CD8^{+}$ ($CD3^{+} CD8^{+}$) et NK ($CD3^{-}CD11b^{high}NKp46^{+}$). Dans les modèles murins de dystrophies musculaires héréditaires, les leucocytes représentent 23 à 84 % des cellules mononucléées intramusculaires, avec un pourcentage de cellules T $CD8^{+}$ de 4 à 17 % des cellules $CD45^{+}$, tandis que Les MDC restent minoritaires. Chez l'homme, les DIM (dysimmune and inflammatory myopathies) étaient associées au recrutement intramusculaire des cellules T $CD8^{+}$, mais pas des cellules T $CD4^{+}$ et des cellules NK. Ensuite, nous avons calculé le ratio $[mTCD4^{+}/ T CD8^{+}]/[bTCD4^{+}/ T CD8^{+}]$ que nous avons appelé IntraMuscular Inflammation IMI-index (IMI-index) pour mettre en évidence un enrichissement sélectif en cellules T $CD8^{+}$ intramusculaires dans les myopathies immunitaires. L'IMI- index était de $0,99 \pm 0,25$ dans le groupe témoin (CTL), reflétant des

proportions similaires en cellules T CD4⁺ et TCD8⁺ dans le sang et le muscle, l'IMI- index est de $0,94 \pm 0,28$ dans les conditions non inflammatoires DIM ($0,55 \pm 0,48$; $p = 0,0001$) par rapport aux groupes CTL et NIC. Enfin, nous avons utilisé notre stratégie de cytométrie en flux optimisée pour le phénotypage et l'analyse des cinétiques de recrutement des ILC dans la pathologie expérimentale murine et dans le diagnostic myopathologique. Dans la myonécrose aiguë, le recrutement des NK, des ILC1 et des ILC2 est parallèle à celui des macrophages M1. Dans le modèle murin de dysferlinopathie, l'influx des NK et des ILC1 précède la myonécrose, suggérant un rôle possible des cellules NK dans la nécrose myofibrillaire. Les ILC2 sont parallèles à l'apparition de la myonécrose. De plus, la lésion musculaire focale induit un recrutement musculaire à distance des ILC2, mais pas des NK et des ILC1.

Mots clés

Dysferlinopathies, Cytométrie en flux, ILC, IMI-index, Myonécrose aiguë, Myopathies dysimmunes et inflammatoires,

Résumé en anglais

Innate lymphoid cells in skeletal muscle biology and pathology

Dysimmune and inflammatory myopathies (DIM) form a group of acquired diseases affecting skeletal muscle. Their characterization is based on the accurate delineation of immunopathological processes at work, including the phenotyping of intramuscular immune cells. Flow cytometry (FC) is the most reliable technique for analyzing leucocyte subpopulations and evaluating their activation levels. We first developed a purely mechanical protocol for extracting cells from muscle tissue allowing us to preserve cell surface epitopes and we evaluated its applicability in the context of experimental pathology in mouse and myopathological diagnosis in human. In mouse, skeletal muscle regeneration was associated with the transient enrichment of macrophages ($CD11b^{high}Gr-1^{+}$), myeloid dendritic cells (MDC, $CD3^{-}CD8^{+}CD11b^{high}$), $CD8^{+}T$ cells ($CD3^{+}CD8^{+}$) and NK ($CD3^{-}CD11b^{high}NKp46^{+}$) cells. In murine models of inherited muscle dystrophies, leucocytes represent 23 to 84% of intramuscular mononuclear cells, with a percentage of $CD8^{+}T$ cells (4 to 17%) mirroring that of all $CD45^{+}$ cells, while MDC remained a minority. In human, DIM was associated with intramuscular recruitment of $CD8^{+}T$ cells, but not $CD4^{+}T$ cells and NK cells. Then, we calculated the ratio $[mCD4^{+}T/CD8^{+}T]/[bCD4^{+}T/CD8^{+}T]$ that we termed IntraMuscular Inflammation IMI-index to assess a selective intramuscular $CD8^{+}T$ cells enrichment in immune myopathies. IM-I index was 0.99 ± 0.25 in Control group (CTL), reflecting the similar proportion of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}T$ cells in blood and muscle, and 0.94 ± 0.28 in Non Inflammatory Condition (NIC). In contrast, IM-I index was markedly decreased in DIM (0.55 ± 0.48 ; $p=.0001$) compared to CTL and NIC. Finally, we used our Optimized flow-cytometry strategy for phenotyping and analyze the recruitment kinetics of ILC in the

context of experimental pathology in mouse and myopathological diagnosis. In acute myonecrosis, NK, ILC1 and ILC2 recruitment parallels that of M1 macrophages. In dysferlin deficiency, NK and ILC1 influx precedes myonecrosis suggesting a possible role for NK in fibers injuries. ILC2 parallels the onset of myonecrosis. Furthermore, Focal muscle injury induces remote muscular recruitment of ILC2, but not of NK and ILC1.

Key words

Dysferlin deficiency, Dysimmune and inflammatory myopathies, Flow cytometry, ILC, IMI-index, Myonecrosis

Table des matières

Remerciements	10
Liste des figures	14
Liste des tables	15
Liste des abréviations	16
Introduction	18
Chapitre 1 : Muscle squelettique structure, croissance, développement et régénération	
I. Organisation du muscle squelettique	
I.1 Structure du muscle squelettique et fibres musculaires	19
I.1.a Définition du muscle squelettique	19
I.1.b Structure du muscle squelettique	19
I.1.c Types de fibres musculaires	21
I.2 Physiologie du muscle squelettique	22
I.2.a Composition des myofibrilles	22
I.2.b Matrice extra cellulaire	22
I.3 Contraction musculaire	23
II. Régénération musculaire	25
II.1 Définition	25
II.2 Cellules satellites dans la Régénération musculaire	26
II.2.a Définition et Localisation des cellules satellites	26
II.2.b Niche des cellules satellites	27
II.2.c Mécanismes génétiques et moléculaires de l'embryogenèse musculaire	
Myogenèse embryonnaire	28
Myogenèse tardive	
II.2.d Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des cellules satellite	29
II.3 Rôle des leucocytes dans la régénération musculaire	30
II.3.a Granulocytes	33
II.3.b Macrophages	34
Ontogénie des macrophages résidents du muscle squelettique	
Les Macrophages et régénération des muscles squelettiques	
II.3.c Autres cellules immunitaires impliquées dans la réparation musculaire	

Les lymphocytes	38
Les cellules dendritiques	40
Les mastocytes	42
Chapitre 2 : La nécrose régénération en pathologie musculaire	
I. Les myopathies inflammatoires et dysimmunes (DIM)	43
I.1 Dermatomyosite (DM) et Polymyosite (PM)	43
I.2 Myosite à inclusions (IBM) sporadique	48
I.3 myopathie nécrosante auto-immun (MNAI)	50
I.4 Les Myosites de chevauchement	51
Les Myopathies associées aux anti-synthétases (MAAS)	
La sclérodermie systémique	52
I. 5 Myosites associées aux cancers	55
II. Les myopathies héréditaires non acquises	55
II.a Dystrophies musculaires congénitales	55
II.b Les dystrophies musculaires	57
<i>II.b.1 Dystrophie musculaire de Duchenne</i>	
II.b.2 Dystrophies musculaires des ceintures (Limb-Girdle Muscular Dystrophies (LGMD): les sarcoglycanes/LGMD2 C à F	59
II.b.3 Dystrophies musculaires des ceintures : Dysferline	60
II.b.4 Autres Dystrophies musculaires des ceintures : Calpaïne, Titine, Cavéoline, TRIM32, Myotiline et Téléthonine	61
II.c Mutations de gènes associés à la membrane nucléaire/ Dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss	62
II.d Dystrophie myotonique	62
II.d.1 La dystrophie myotonique de type 1 (DM1, ou maladie de Steinert)	62
II.d.2 Dystrophie myotonique de type 2	63
II.e Dystrophie musculaire fascio-scapulo humérale	63

III. Vieillesse musculaire	64
Chapitre 3. Les cellules lymphoïdes innées (ILC) dans la réparation tissulaire	
I. Définition	65
II. Développement des cellules lymphoïdes innées	66
II.1 Les facteurs de transcriptions ou transcription factors (TFs) et engagement des précurseurs des ILC	67
II.2 Différenciation vers les sous populations d'ILC	72
II.3 Localisation de la différenciation des ILC	73
III. Différentes sous populations d'ILC	73
III.a Cellules NK et ILC1	73
III.b ILC2	75
III.c ILC3	77
III.d Regulatory ILC ou ILC Regs	79
IV. Plasticité des ILC	80
Objectifs et hypothèses	82
Résultats	87
Publication 1 : Stratégie de phénotypage des leucocytes intramusculaires par cytométrie en flux	88
Présentation du sujet	88

Article	90
Application de la CMF à la myosite anti- PD-1	105
Conclusion	107
Publication 2 : La cytométrie en flux évalue le recrutement sélectif en cellules T CD8⁺ intramusculaires dans les myopathies inflammatoires idiopathiques	
Présentation du sujet	109
Article	111
Conclusion	130
Publication 3 : Les innate lymphoid cells dans la biologie et la pathologie musculaire	
Présentation du sujet	131
Article	133
Conclusion	168
Discussion générale, perspectives et conclusion	169
Références	183

Remerciements

Je souhaite remercier respectueusement les **rapporteurs** de ma thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail, Merci pour leur lecture attentive, leurs corrections et suggestions qui permettront d'améliorer ma thèse: le **Prof. Marie-Laure NEGRIER**, et le **Dr. Olivier BIONDI**.

Je souhaite remercier les membres de mon **jury de thèse** pour leur présence, et pour leur évaluation de mon travail : le **Prof. Emmanuèle LECHAPT** qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, le **Prof. Laurent BELEC**, le **Dr. Asma FERCHIOU** et le **Dr. Cyrille GITIAUX**.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le **Prof. François Jérôme AUTHIER**, de m'avoir permis de réaliser cette thèse de sciences, de m'avoir initié à la neuropathologie et de m'avoir transmis sa passion pour l'histologie musculaire. Je vous remercie pour votre confiance, votre soutien, votre disponibilité et je vous suis extrêmement reconnaissante pour toutes nos discussions très enrichissantes, tout au long de ces cinq années, de master puis de thèse.

Je tiens à remercier le **Prof. Frédéric RELAIX** de m'avoir accueilli dans son équipe, pour sa bienveillance, et ses connaissances scientifiques avisées.

Je tiens à remercier le Dr. **Asma BELDI- Ferchiou**, pour son aide très précieuse sur toute la partie Humaine de ma thèse, que ça soit dans le développement des protocoles que de l'analyse des résultats mais également pour tous ses conseils, sa gentillesse et sa disponibilité.

Je tiens à remercier **Yasmine BABA-AMER**, de m'avoir accompagné durant toutes ces années par son aide technique si précieuse et toujours avec le sourire. Merci pour ta grande bienveillance et ton soutien.

Je remercie **Baptiste**, pour son aide technique, mais surtout pour sa bonne humeur et toutes ses bêtises hilarantes. Merci de m'avoir fait rire et d'avoir été aussi sympathique.

Je tiens à remercier le **Dr. Sarah SOUVANNANORATH** et le **Dr. Edoardo Malfatti** pour les biopsies musculaires, **Mr. Ouamer NAIT SLIMANI** pour la partie organisation des recherches et tout le **personnel du service de neuropathologie**.

Je remercie le **Prof. Romain GHERARDI**, pour m'avoir fait l'honneur de m'initier la lecture des biopsies musculaires. Je mesure ma chance de vous avoir rencontré et je n'oublierai jamais vos conseils. Je garderai toujours votre livre « toxic story » que vous m'avez si gentiment offert et dédié.

Je remercie le personnel de la **plateforme de cytométrie** en flux de l'IMRB, **Adeline, Odile** et **Aurélie**.

Je remercie tout le personnel des **animaleries de l'IMRB**, Merci d'avoir pris soin de mes petites souris.

Je tiens à remercier le **Prof. Marie Hélène LARUE**, pour m'avoir permis d'utiliser la plateforme de cytométrie en flux au sein de son service d'hématologie biologie à l'hôpital Henri MONDOR.

Je tiens également à remercier le personnel de l'unité de cytométrie en flux du service d'hématologie biologie à l'hôpital Henri MONDOR, **Franck, Lili** et **Nathalie**.

Je remercie vivement **l'association française contre les myopathies** qui a financé ma thèse de science.

Je remercie également tout **le personnel de l'IMRB et de l'UPEC**, je pense surtout à **Lila** qui m'a souvent facilité les démarches administratives. Merci pour ta profonde gentillesse et pour ta disponibilité.

MERCI à tous les membres de l'équipe RELAIX, j'y ai rencontré des personnes très intelligentes et compétentes mais aussi serviables, disponibles et bienveillantes, je pense notamment à **Phillipos, Anne-Marie, Matthew, Despoina, Alessio, Valentina, Joana....**

Merci infiniment à mes camarades thésards qui pour certains sont devenus des amis et des personnes chères à mon cœur, **Farida** ma sœur thamazighth, **Louai** mon petit frère, **Nassim** mon Kho algerois, **Cyrielle** qui m'a accompagné durant toute cette aventure, **Zeyneb, JD, Perla, Stemi.....**

Merci à mes belles rencontres de l'IMRB, l'ange **Ahmed, Parida**, une admirable personne **et Maissa**, mon adorable amie.

Enfin, je remercie mon essentiel, ceux qui font ma vie,

I yeqriben-iw,

Ad snemmrey akk-wid iyi yefkan afus n tallelt, gar-asen tawacult-iw d yimawlan-iw yezgan yer tama-w yef teyzi n yiseggasen n tezrewt, iyi-yefkan tayri akked waṭas n tebyest.

I yeqriben-iw, I yimeddukkal-iw, uḡur ttsennideḡ di yal taswiḡet, mebla tillin nwen yid-i, ḡriḡ ur ttawḡeḡ ara yer wanda wwḡeḡ ass n wass-a.

Ad awen-hduḡ akk amurs-inu.

Tanemirt iwidak akk iEzizen yef ul-iw. Ahudu ahunu fellawen.

Liste des figures

Figure.1 : Schéma d'une fibre musculaire squelettique.

Doi : doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/wsbm.1462

Figure.2 : Les différentes étapes du couplage excitation- contraction dans les muscles striés squelettiques (Biodis, 2015).

[Http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/physiologieanimale/physiologie-animale-4.html](http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/physiologieanimale/physiologie-animale-4.html)

Figure.3: Recrutement intramusculaire de cellules mononuclées dans le muscle TA après une injection BaCl₂.

Doi: [10.3390/cells10040744](https://doi.org/10.3390/cells10040744)

Figure.4 : Myopathies inflammatoires et dysimmunitaires: aspects histopathologiques.

Figure.5 : La dystrophine est une grande protéine et un composant central du complexe dystrophine-glycoprotéines (CDG) qui assure la stabilité du sarcolemme.

Doi : doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091936.

Figure.6 : Développement et fonction des ILC.

Doi: [10.14348/molcells.2021.0053](https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0053)

Figure.7 : Tropisme tissulaire des ILC.

Doi: [10.14348/molcells.2021.0053](https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0053)

Figure.8: Plasticité des ILCs.

Doi: [10.14348/molcells.2021.0053](https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0053)

Figure.9. Rôle des ILC dans la réparation tissulaire (Vivier et al. 2018)

Liste des tables

Table.1 : critères diagnostiques des dermatomyosites.

DOI: 10.1097/01.md.0000173991.74008.b0

DOI: 10.1016/j.nmd.2004.02.006

Table.2 : critères diagnostiques des polymyosites.

DOI: 10.1097/01.md.0000173991.74008.b0

DOI: 10.1016/j.nmd.2004.02.006

Table.3. Critères diagnostiques de myosite à inclusions (IBM)

Doi: 10.1016/j.ncl.2014.04.001.

Figure.4. Principaux marqueurs phénotypiques des sous populations ILC (Vivier et al. 2018)

Doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017.

Liste des abréviations

BaCl₂: Barium chloride.

BSA: Bovine serum albumin.

CLP: common lymphoid progenitors.

CILCP: Common ILC precursors

DIM: Dysimmune/inflammatory myopathies.

DPI: Days post-injury.

EILP: Ealy innate lymphoid precursor

FAP: Fibro/Adipogenic progenitor.

FC: Flow cytometry.

FMO: Fluorescence-minus-one.

HE: Hematoxylin-eosin.

IBM: Inclusion body myositis.

ID2: Inhibitor of DNA binding 2.

IHC: Immunohistochemistry.

ILC: innate lymphoid cell.

LGMD: Limb girdle muscle dystrophy.

MFI: mean fluorescence intensity.

min: minutes.

NIC: Non-Immune Condition.

NFIL3: Nuclear factor Interleukin 3.

TCF1: T cell factor 1.

NK: Natural killer.

PBS: Phosphate buffered saline.

PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger.

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640.

SG: sarcoglycan.

TA: Tibialis anterior.

Treg: T regulatory cell.

Vs: Versus.

WT: Wild type.

Introduction

Chapitre 1 : Muscle squelettique structure, croissance, développement et régénération. Organisation du muscle squelettique

I.1 Structure du muscle squelettique et fibres musculaires

I.1.a Définition du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont les organes permettant de mobiliser le corps par l'intermédiaire du squelette auxquels ils sont fixés. Les muscles squelettiques sont responsables de contractions musculaires régulières, rapides et puissantes, à l'origine d'actions volontaires discontinues, les différenciant du muscle lisse et cardiaque. Le muscle squelettique également responsable de la thermorégulation et de la respiration

I.1.b Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique, une structure hiérarchisée est enveloppé dans une membrane conjonctive appelée épimysium et est divisé en plusieurs fascicules enveloppés dans des membranes conjonctives appelées périmysium. Ces fascicules (ou faisceaux musculaires) sont eux-mêmes formées de cellules musculaires squelettiques (aussi appelées rhabdomyocyte ou fibres musculaires) qui sont des grandes cellules très allongées,, avec de multiples noyaux cellulaires elliptiques, et limitées par une membrane plasmique appelée sarcolemme, et entourées d'une membrane basale essentiellement constituée de laminine, et enfin par un tissu conjonctif appelé endomysium (Turrina et al. 2013). La fibre musculaire, d'un diamètre de 10 à 100 micromètres pour une longueur pouvant atteindre 35 centimètres, est organisée en myofibrilles, de 1 à 2 micromètres de diamètre (Figure.1). L'approvisionnement des fibres musculaires en sang artériel provient de différentes branches liées à chaque groupe musculaire, et à chaque fibre.

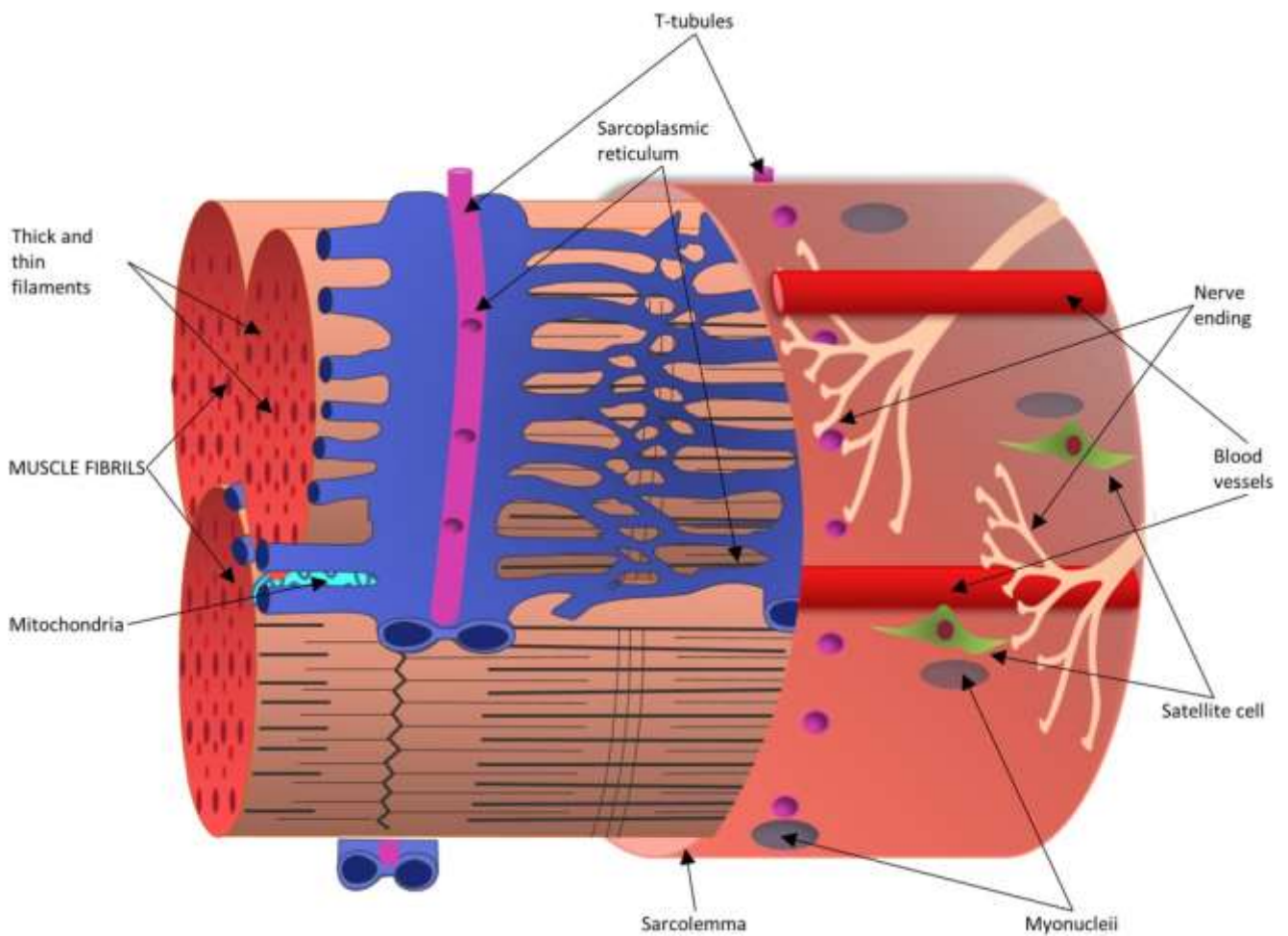


Figure.1: Schéma d'une fibre musculaire squelettique : une seule fibre musculaire mature est représentée sous la forme d'un faisceau de myofibrilles, enveloppé par le sarcolemme. Le réticulum sarcoplasmique entoure les fibrilles avec des tubules transversaux (T) qui les coupent. Des faisceaux de myofibrilles forment des fascicules, qui se regroupent ensuite pour former le tissu musculaire. Les cellules satellites résident le long de la fibre musculaire de l'hôte, directement au-dessus du sarcolemme sous la lame basale du muscle et à proximité des noyaux. Les fibres nerveuses innervantes et les capillaires locaux s'étendent le long de la fibre musculaire. Chaque couche est successivement enrobée par la matrice extracellulaire, non représentée ici (Khavita et al.2019)

I.1.c Types de fibres musculaires

Le muscle squelettique est constitué de différents types de fibres caractérisées par leur chaîne de myosine lourde (MyHC: Myosin Heavy Chains). Chez l'homme, on distingue trois principaux types :

- 1- **Les fibres lentes de type I**: de petit diamètre, elles développent peu de force et se contractent lentement mais ne se fatiguent qu'au bout d'une longue durée.
- 2- **Les fibres rapides fatigables de type II_x**: de gros diamètre, elles développent beaucoup de force et se contractent rapidement mais se fatiguent au bout de quelques minutes de stimulations répétitives.
- 3- **Les fibres rapides résistantes à la fatigue de type II_a**: elles sont intermédiaires aux deux types de fibres précités.

Un quatrième type de fibres musculaires, le type II_b, est cité mais si l'homme possède bien les gènes des protéines correspondants (MyHCII_b), ceux-ci n'ont jusqu'à présent pas été mis en évidence dans le tissu humain (Holzer et al. 2006, Smerdu et al. 1994 et seraient donc des fibres de type II_x, que l'on retrouve que chez certains animaux. La proportion des différents types de fibres musculaires dans les muscles varie en fonction des muscles (Eng et al. 2008, Mathewson et al. 2012, Rupert et al. 2015), mais également de l'âge (Meznaric et al. 2018, Nikoli et al. 2001), de la partie du muscle (Hermanson et Cobb.2005) ainsi que de l'espèce. Les techniques d'immunohistochimie ciblées sur les chaînes lourdes de myosine (MyHC) permettent de mieux différencier les types de fibres I, II_a et II_x (Bloemberg et Quadrilatero, 2012).

I.2 Physiologie du muscle squelettique

I.2.a Composition des myofibrilles

Les myofibrilles sont segmentées en sarcomères, unité de construction de la cellule musculaire d'une longueur de 2 micromètres et maintenus par des filaments de desmine. La portion protéique myofibrillaire représente jusqu'à 85 % du volume des fibres musculaires (Favier et al.2008). Les filaments contractiles du sarcomere s'organisent en filaments épais (Myosine et liaison d'actine de l'ATP au site de la tête de myosine) et en filaments minces (composés d'actine G et de complexe de troponine). Le disque ou la ligne Z se rapporte à l'adaptation des fibres musculaires au stress mécanique et comprend différents types de protéines, tels que la calcineurine, l'actine, la -actinine, la nébuline, la -filamine, la myotiline, la titine, la ZASP (protéine à motif PDZ alternativement épissé en bande Z), la myogénine et la téléthonine. La ligne M est représentée par un filament épais de myosine(Favier et al.2008).

I.2.b Matrice extra cellulaire

Les différents tissus conjonctifs enveloppant le muscle forment la matrice extracellulaire musculaire ou Extracellular Muscular Matrix (ECM) : composée d'eau, de collagène de type I, III, d'une faible proportion de collagène de type IV, V et VI, ainsi que de protéoglycanes et des glycoprotéines comme la laminine (Gillies et Lieber. 2011, Mayne et Sanderson. 1985). Le tissu conjonctif intramusculaire est divisé en endomysium, périnysium et épimysium. L'endomysium, composé essentiellement de collagène de type I et de collagène de type III, correspond au fin conjonctifs séparant les fibres musculaires (Trotter et Purslow. 1992). Le périnysium, constitué majoritairement de collagène de type I, correspond à la gaine de tissu

conjonctif recouvrant les faisceaux musculaires. Plusieurs tailles de faisceaux et plusieurs niveaux de collagène sont distingués dans la littérature. Le périmysium primaire recouvre les petits faisceaux, du périmysium secondaire recouvre les faisceaux secondaires constitués de plusieurs faisceaux (Gillies et al. 2017). La composition du périmysium en collagène et en protéoglycane étant similaire à celle du tendon, certains auteurs supposent que le tendon se trouve dans la continuité du périmysium (Gillies et Lieber, 2011).

I.3 Contraction musculaire

Le bon fonctionnement de la contraction musculaire dépend de l'intégrité des unités motrices. Chaque motoneurone est responsable de l'innervation de 100 à 10 000 fibres musculaires, selon le rôle physiologique principal du muscle. Lors des stimulations neurochimiques et électriques dans la plaque motrice, un système glycoprotéique complexe se met en place, caractérisé par la libération de l'acétylcholine, de la rapsyne (et son linker transmembranaire/RATL associé), l'utrophine, les syntrophines, l'agrine, la dolichol kinase-7 (DOK-7) et la kinase spécifique du muscle (MuSK), ainsi que le récepteur du facteur de croissance épidermique (ErbB), les biglycanes et la tension sodique SCN4A canal fermé. Ce complexe membranaire se couple au système des récepteurs de la dihydropyridine (DHPR) dans le tubule en T du muscle squelettique strié, (Reed et al. 2009, Gundersen et al. 2011) entraînant la libération intracellulaire de calcium du compartiment intrasarcoplasmique vers le cytoplasme, permettant ainsi l'initiation appropriée de la contraction musculaire par le complexe d'actomyosine (Gundersen et al. 2011, Taivassalo et al. 2000).

La contraction musculaire se fait selon différentes phases de couplages cycliques : repos, excitation, contraction, restauration et relaxation. Durant la phase de repos, il n'y a pas d'interaction des filaments et la molécule d'ATP reste attaché, l'ion calcium reste dans le

réticulum sarcoplasmique. A la phase d'excitation-activation, l'influx nerveux entraîne la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique, qui se fixe sur la troponine modifiant ainsi sa structure conformationnelle et exposant le site de liaison du complexe actomyosine. A la phase de contraction, la myosine ATPase est activée par le complexe d'actomyosine, provoquant la dégradation de l'ATP et la libération d'énergie, tandis que la myosine se lie à l'actine ; contraction musculaire dite dépendante de l'ATP. Dans la phase de restauration, une molécule d'ATP pénètre dans le complexe, inactivant le complexe d'actomyosine (Taivassalo et al. 2000). Dans la phase de relaxation tardive, le calcium est réabsorbé par le réticulum sarcoplasmique (Devries MC et al.2008).

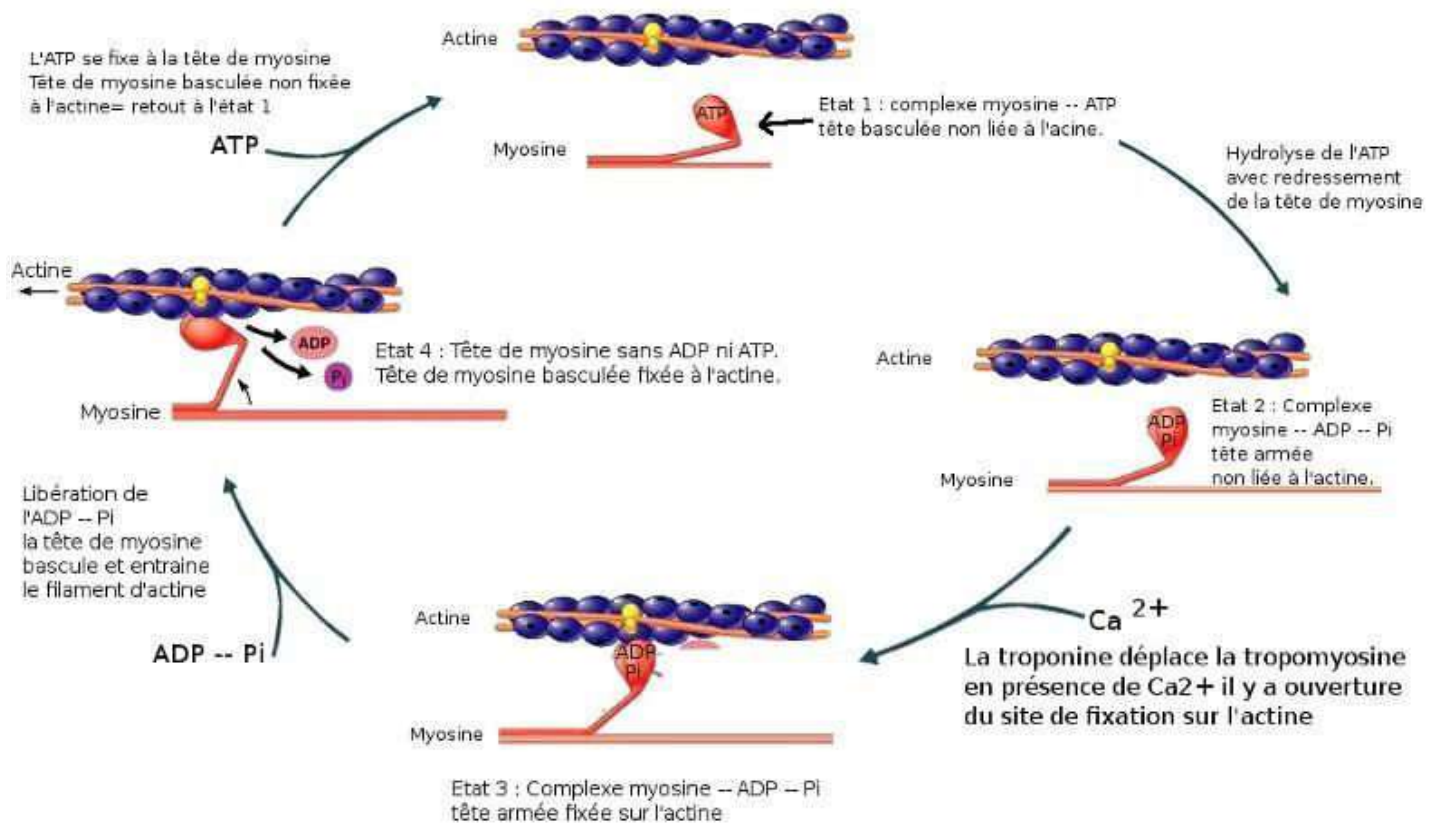


Figure.2 : Les différentes étapes du couplage excitation- contraction dans les muscles striés squelettiques (Biodis, 2015).

II. Régénération musculaire

II.1 Définition

La capacité du muscle à se régénérer repose principalement sur une population spécifique de cellules souches musculaires, quiescentes en condition normale, appelées cellules satellites (Mauro et al.1961). Les cellules satellites sont les progéniteurs myogéniques. De nombreux types de cellules supplémentaires jouent également un rôle dans la réparation tissulaire efficace, telles que les PIC (PW1⁺ interstitial cells, les mésoangioblastes, les FAPs (fibro-adipogenic Progenitors) et d'autres cellules associées à la MEC (Biferali et al. 2019). Les cellules satellites résident dans une niche caractéristique située entre la lame basale et la

membrane plasmique des myofibres (MAURO et al. 1961). Bien que plusieurs études aient montré que les myoblastes dérivés de cellules satellites peuvent synthétiser de nombreux composants de l'ECM, la principale cellule productrice de matrice est le fibroblaste (Mann et al. 2011). La délétion spécifique des fibroblastes entraîne une altération de la régénération par manque de prolifération des cellules satellites et de leur différenciation prématurée, suggérant fortement une action paracrine des fibroblastes sur les cellules musculaires (Murphy et al. 2011). Dans le processus normal de régénération musculaire, la prévention d'une accumulation excessive de l'ECM et la restauration de l'intégrité de la lame basale d'origine sont contrôlées par les activités équilibrées des protéases extracellulaires et de leurs inhibiteurs. Un dérèglement de ces activités enzymatiques peut provoquer une accumulation illimitée d'ECM et une altération de la composition de la lame basale, ce qui pourrait éventuellement conduire au développement d'une fibrose et à la perte de l'architecture musculaire normale (Serrano et al. 2011). Enfin, les facteurs pro-angiogéniques doivent également intervenir à des stades avancés du processus de réparation pour revasculariser les myofibres nouvellement formées, rétablissant ainsi le réseau vasculaire du tissu endommagé dans les lésions (Mounier R et al. 2011).

II.2 Cellules satellites dans la Régénération musculaire

II.2.a Définition et Localisation des cellules satellites

Les cellules satellites sont des cellules progénitrices musculaires au repos auto-renouvelées, situées entre la membrane basale et les fibres musculaires matures. Le facteur de transcription Pax7 permet aux cellules satellites de rester au repos en réprimant l'expression d'autres facteurs nécessaires à la prolifération et à la différenciation des cellules myogéniques. Les dommages résultant d'une lésion musculaire aiguë, entraînent

l'activation des cellules satellites qui sortent de la gaine de la lame basale, pour entrer dans un cycle cellulaire, caractérisé par une diminution de l'expression de Pax7, et par une expression d'autres facteurs de transcription spécifiques au muscle, tels que MyoD. (Allen et Boxhorn. 1989 , Fuchtbauer et Westphal. 1992, Cornélison et al. 2000, Miller et al. 2000, Tatsumi et al. 2002, Chargé et Rudnicki. 2004, Gattazzo et al. 2020). Ainsi, les cellules myogéniques Pax7⁺/MyoD⁻ sont des cellules satellites quiescentes; les cellules Pax7⁺/MyoD⁺ sont des cellules satellites activées ou des cellules myogéniques récemment activées qui ont échappé à leur localisation de cellules satellites (Tidball et al. 2021). Ces étapes sont essentielles au cours de la régénération myocytaire.

Les cellules satellites activées prolifèrent alors et leurs cellules filles sortent définitivement du cycle cellulaire et soit poursuivent leurs différenciation, soit retournent à l'état de quiescence pour reconstituer le pool de cellules satellites (Olguin et Olwin. 2004, Zammit et al. 2006). Ces étapes sont essentielles au cours de la régénération musculaire striée.

II.2.b Niche des cellules satellites

La niche des cellules satellites est composée de la fibre musculaire hôte, (Charge et Rudnicki. 2004, Tatsumi et al. 2006) de la membrane basale qui se compose principalement de laminine, de collagène et de protéoglycane et d'un système microvasculaire qui nourrit les cellules interstitielles qui interagissent avec les cellules satellites. Chez l'homme 68 % des cellules satellites (82% chez la souris), sont localisées à moins de 5 µm des capillaires ou des cellules endothéliales vasculaires voisines, à la fois dans les états de quiescence et de prolifération (Christov et al. 2007, Chazaud et al. 2007). Ces caractéristiques anatomiques de la niche des cellules satellites suggèrent donc qu'une combinaison de signaux provenant de

la fibre musculaire hôte, du système de circulation et de la matrice extra cellulaire régissent la quiescence, l'activation et la prolifération des cellules satellites.

II.2.c Mécanismes génétiques et moléculaires de l'embryogenèse musculaire

Myogenèse embryonnaire

L'origine du muscle squelettique strié est basée sur les cellules progénitrices musculaires de l'hypaxiale du somite et de la partie dorsale du mésoderme (dermomyotome). Ces cellules progénitrices musculaires de la partie hypaxiale du dermomyotome se délaminent (en fonction de l'expression de Pax3/7, cycline-D1, Myf5 et MyoD) et migrent vers le bourgeon de membre (sous l'influence de HGF, FGF et Sonic hedgehog libérés par le tissu mésodermique, et stimulation de la voie Wnt/ β -caténine), prolifèrent, expriment des déterminants myogéniques et donnent naissance à des masses musculaires ventrales et dorsales par expression de MyoD et Myf5 et Msx1 dans les muscles distaux. Les myoblastes (cellules myogéniques proliférantes) se différencient ensuite en myotubes striés et rhabdomyocytes adultes.

Myogenèse tardive

Des mécanismes moléculaires interviennent dans le développement musculaire tardif: (i) MRF4 et MLP participent à l'innervation et à la maturation tardive des myotubes, (ii) Eya2, Six1, Myf5, MyoG et Mrf4 sont responsables de la fusion et la différenciation des myofibres; (iii) Mox2, Lbx1 et c-met participent à la phase tardive de la structuration musculaire spécifique, selon une polarisation dorsoventrale. Les mécanismes moléculaires en jeu impliquent la libération de Wnt7 α par la zone d'activité polarisante dans le bourgeon de membre et la stimulation des voies Sonic hedgehog (Shh) par le tissu ectodermique

dorsal. Il est également important de souligner le rôle remarquable du dermomomyotome épaxial impliqué dans le développement du muscle paravertébral profond sous l'expression et la régulation positive de Lbx1 (Russell AP. 2009). Les péricytes périvasculaires de type 2 jouent un rôle également au cours de la régénération musculaire et de la myogénèse primaire

II.2.d Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des cellules satellite

Les cellules satellites restent quiescentes chez l'adulte, cependant leur capacité à réintégrer le cycle cellulaire après une lésion musculaire est élevée. Elles expriment p38-phosphorylée et MyoD et des niveaux élevés de Cdc6 (cycle de division cellulaire 6). La stimulation de l'oxyde nitrique active les cellules satellites provoquant la libération de HGF (facteur de croissance des hépatocytes) dans la matrice extracellulaire, conduisant à l'activation des récepteurs c-met, à la prolifération et à l'inhibition de la différenciation de ces cellules satellites. Les mêmes mécanismes d'activation ont été décrits précédemment en relation avec d'autres stimuli (facteur de mécano-croissance, MAPK, TGF et FGF2/8, syndecans, métalloprotéinases matricielles-2/9 et collagène VI). Les cellules satellites activées quittent leur emplacement typique, prolifèrent et commencent à exprimer MyoD, Pax3/7 et Myf5 (Kang et al. 2010). Les myoblastes fusionnent et forment des myotubes, qui fusionnent ensuite au niveau des myocytes lésés et expriment la myogénine. Récemment, il a été montré que la sévérité de l'atteinte clinique au cours des myopathies acquises et héréditaires étaient corrélées au degré de perte de cellules satellites. (Shadrach et al 2011, Engquist et al. 2021). De même, il a été montré que la sarcopénie liée à l'âge est associée à un défaut d'expression de Pax7, IGF-1 et à une surexpression du facteur Sprouty1, de PPAR

(récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes) et de PGC1 α (PPARS gamma coactivateur 1- α , Alway et al. 2014).

II.3 Role des leucocytes dans la régénération musculaire

Le processus de régénération musculaire squelettique nécessite une coordination complexe entre différentes populations cellulaires (Relaix F, Zammit PS. 2012). Les leucocytes qui infiltrent le muscle lésé sont indispensables avec les cellules satellites pour une régénération réussie. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) prolifératives dans la moelle osseuse sont la principale source de leucocytes présents dans le muscle régénératif à J2 post lésion musculaire. Par ailleurs, les cellules immunitaires résidentes dans le muscle sain ont également un rôle dans la réparation musculaire par la sécrétion de chimiokines nécessaires au recrutement de leucocytes circulants (Brigitte et al. 2010). Parmi ces cellules inflammatoires ce sont les monocytes/macrophages qui jouent le plus grand rôle dans ce processus de réparation (Figure .3). En réponse aux dommages vasculaires locaux et aux signaux libérés par les myofibres en dégénérescence, les cellules de la lignée monocytes/macrophages quittent la circulation sanguine et infiltrent les zones lésées, pour phagocyter les débris de myofibres. En plus de cette fonction critique, les cellules inflammatoires produisent des facteurs de croissance, des cytokines, des médiateurs inflammatoires et des signaux de danger qui conditionnent le comportement des cellules satellites pendant le processus de régénération musculaire (Tidball, Villalta. 2010).

Après une lésion musculaire, il existe donc une réponse inflammatoire bien orchestrée. La réaction inflammatoire aigue chez la souris est caractérisée par l'infiltration de neutrophiles (Schneider et al. 2007, Kawanishi et al. 2016). L'afflux de neutrophiles est suivi d'une infiltration de macrophages de type M1, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interleukine 1 bêta

(IL-1 β) et l'interféron gamma (IFN- γ ; Mosser et al. 2008). Ainsi, la présence de ces cytokines dans la culture de myoblastes primaires augmente la prolifération cellulaire, soutenant l'hypothèse que les macrophages M1 participent à l'activation des cellules satellites (Li et al. 2003). Le recrutement des macrophages M1, est suivi de celui des macrophages M2 anti-inflammatoires, qui sont associés à la réparation tissulaire et à la différenciation des cellules satellites (Arnold L et al. 2007). Les cytokines anti-inflammatoires produites par les macrophages M2, telles que l'IL-4 et l'IL-10, améliorent la différenciation des myoblastes *in vitro* et augmentent l'expression de Myogenine, nécessaire à la différenciation des cellules satellites (Deng et al. 2012). Par conséquent, la cinétique des macrophages M1 et M2 semble être associée à la régénération des muscles squelettiques. En plus de leur rôle dans la modulation de la prolifération et de la différenciation des cellules satellites; les macrophages par leurs cytokines libérées dans le muscle squelettique lésé, modulent la production de la matrice extracellulaire par le biais de cellules progénitrices fibro-adipogéniques (FAPs; Contreras et al. 2017). En effet, la production de composants de la matrice extracellulaire par les FAPs est régulée par le TNF- α et le TGF- β 1, sécrétés par les macrophages M1 et M2 respectivement. La cinétique des macrophages M1 et M2 régule l'accumulation initiale puis l'apoptose des FAPs, évitant un dépôt excessif de matrice extracellulaire dans le muscle squelettique (Mann et al. 2011). Par ailleurs, le traitement des maladies auto-immunes avec un anticorps monoclonal anti-TNF (infliximab et adalimumab) peut entraîner une fibrose pulmonaire comme effet secondaire, suggérant que l'inhibition de la signalisation du TNF conduise à un dépôt pathologique de la matrice extracellulaire (Ostor et al. 2004, Huggett et al. 2006). Les FAPs et les macrophages font ainsi partie des cellules à l'origine du microenvironnement responsable de l'activation et de la différenciation des cellules satellites, qui est la niche des cellules satellites (Mashinchian et al. 2018, Yin et al. 2013).

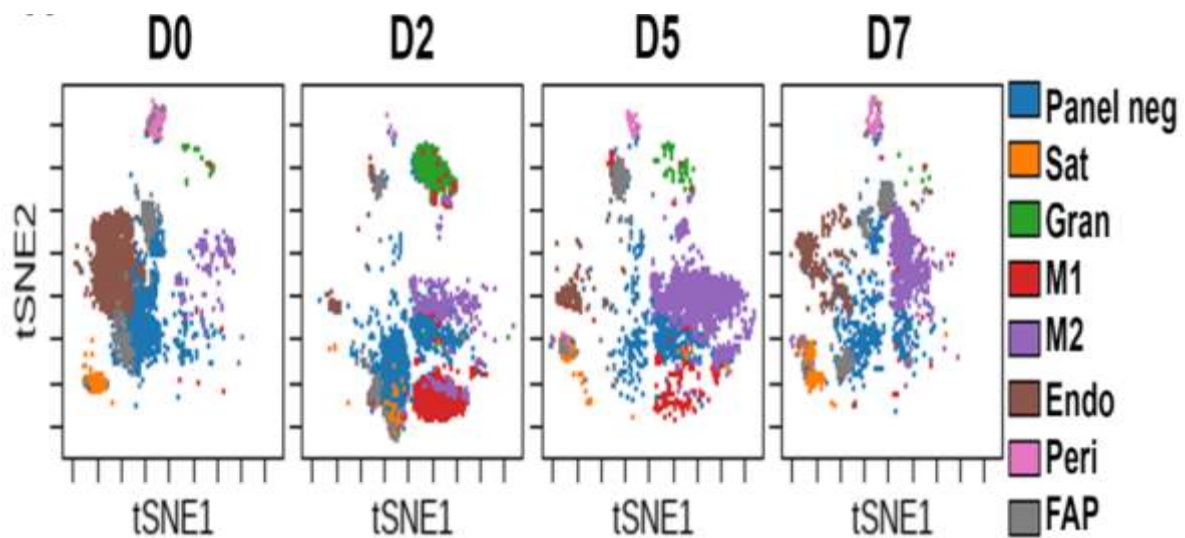


Figure.3: Recrutement intramusculaire de cellules mononuclées dans le muscle TA après une injection BaCl₂. Panelneg : cellules non caractérisées par le panel de marqueurs standard utilisé, Myo : cellules myogéniques (Pax7⁺nGFP⁺), Endo : cellules endothéliales (CD31⁺), Peri : péricytes (PDGFRβ⁺ SCA1⁻), M1 : macrophages de type 1 (F4/80⁺ LY6C⁺), M2 : macrophages de type 2 (F4/80⁺ LY6C⁻), FAP : progéniteurs fibro-adipogéniques (PDGFRα⁺ SCA1⁺), Gran : granulocytes (LY6G⁺). (Borock et al. 2021).

Par ailleurs, dans les myopathies inflammatoires et dysimmunes (DIM), dans les dystrophies musculaires, dans le vieillissement et dans l'obésité, l'inflammation chronique est associée à l'altération de la fonction des cellules satellites et des FAPs, à l'origine d'une fibrose et d'une mauvaise réparation des muscles squelettiques (Contreras et al. 2017, Mann et al. 2011, Wang et al. 2015, Rostasy et al. 2008). En effet, le déséquilibre persistant entre macrophages pro- et anti-inflammatoires dans le muscle entraîne une augmentation des cellules et des cytokines responsables d'une accumulation aberrante de composants pro-fibrotiques et, par conséquent une niche défavorable à une bonne réparation des muscles squelettiques (Contreras et. 2017, Villalta et al. 2009).

II.3.a Granulocytes neutrophiles

Au stade initial, l'infiltrat leucocytaire dans le muscle lésé chez la souris est principalement constitué de neutrophiles, qui sont généralement des cellules Ly6G⁺ et CD11b⁺, et qui ont un noyau multilobé caractéristique. En règle générale, le nombre de neutrophiles est maximal dans le muscle dans les 1 à 6 heures suivant la lésion, puis ce nombre diminue rapidement 12 à 24 heures après la lésion (Fielding et al. 1993, Tidball. 2005). Les neutrophiles ont un rôle de cellules phagocytaires des débris tissulaires (Lowe et al. 1995) et de cellules protéolytiques par la libération de protéases qui aident à dégrader les débris cellulaires, associé à la libération de concentrations élevées de molécules cytolytiques et cytotoxiques et une production accrue de radicaux libres qui peuvent endommager les muscles (Tiidus et al. 1998). Elles secrètent également des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires qui recrutent d'autres populations leucocytaires qui interviennent dans la régénération musculaire. Ainsi, l'épuisement expérimental du nombre de neutrophiles réduit les dommages musculaires causés par une ischémie musculaire suivie d'une reperfusion, ou par des étirements, ou par un exercice exhaustif (Carden et al. 1990, Kyriakides et al. 1999,). De plus, la déplétion génétique d'enzymes dans les neutrophiles qui génèrent des radicaux libres (gp91, phox ou myéloperoxydase) réduisent considérablement l'étendue des dommages causés aux fibres musculaires (Nguyen et Tidball. 2003, Nguyen et al. 2005). Les neutrophiles ont également des effets indirects en augmentant la cytotoxicité d'autres populations de leucocytes (Nguyen et Tidball, 2003).

II.3.b Macrophages

Ontogénie des macrophages résidents du muscle squelettique

Les macrophages résidant dans le tissu conjonctif sont nécessaires à l'homéostasie des tissus au cours des inflammations aiguës (Lavin et al. 2015). En utilisant des modèles souris knock-out, il a été montré que l'ablation du CSF1 (*colonystimulating factor-1*) entraîne des anomalies du développement, dont des anomalies squelettiques, neurologiques et de croissance (Sieweke et al. 2013). Les cellules exprimant le marqueur F4/80 des macrophages sont absentes dans le muscle squelettique de ces souris, et une injection intrapéritonéale de CSF1 chez les nouveau-nés n'est pas suffisante pour sauver les cellules F4/80+ (Ryan et al. 2001, Wiktor-Jedrzejczak et al. 1990). Le CSF1 est nécessaire au développement des macrophages du muscle squelettique. Cependant, l'impact de ces cellules sur le développement musculaire n'est pas encore clair. Par ailleurs, la régénération des muscles squelettiques est altérée chez les souris adultes knock-out pour le CSF3R (Hara et al. 2011) ce qui suggère que le développement des macrophages résidents du muscle squelettique pourrait ne pas se faire par le CSF1, mais par d'autres cytokines tel que le IL-34 qui est le ligand du CSF3R, comme observé dans la microglie et les cellules de Langerhans. La reconstitution des macrophages tissulaires suite à des lésions par injections de cardiotoxine, notexine ou chlorure de baryum est décrite comme associée aux monocytes circulants (Arnold et al. 2007). Les monocytes Ly6C⁻ sont des cellules patrouilles et n'infiltrent pas les tissus, alors que les monocytes inflammatoires Ly6C⁺ sont recrutés sur le site de la lésion par des chimiokines, telles que le ligand de chimiokine 2 (CCL2), qui sont produites par les cellules satellites. (Chazaud et al. 2003, Shireman et al. 2007). Ainsi, ce sont des monocytes Ly6C⁺/CX3CR1^{ow} qui vont changer leur phénotype lorsqu'ils infiltrent le muscle

en macrophage anti-inflammatoire Ly6C⁻/CX3CR1^{high}. Les macrophages expriment le CD11b mais ils peuvent être distingués des neutrophiles et autres leucocytes dans le muscle par leur expression de CD68 chez l'Homme et, chez la souris, par leur expression de F4/80.

Les Macrophages et régénération des muscles squelettiques

Les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles, car elles ont une grande capacité à éliminer les cellules mortes et apoptotiques, les débris cellulaires ainsi qu'un grand nombre d'agents pathogènes. De plus, ils produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS), sécrètent des facteurs solubles tels que des cytokines et des chimiokines et présentent des antigènes aux lymphocytes T, participant ainsi au maintien de l'homéostasie tissulaire et développent des fonctions spécialisées de manière tissu-dépendante (Medzhitov et al. 2010, Varol et al. 2015). Les macrophages musculaires, pro-inflammatoires de type M1 chez les souris sont identifiés par leur expression de F4/80 et des niveaux élevés de CD11b ou Ly6C. Les macrophages anti-inflammatoires de type M2 sont identifiés par leur expression de F4/80 et des niveaux faibles de CD11b ou Ly6C ou par leur expression de CD163 ou CD206. Les cytokines modulent le phénotype des macrophages, l'IFN γ et le TNF α pour le phénotype pro-inflammatoire M1 et l'IL4, l'IL10 et l'IL13 pour le phénotype anti-inflammatoire M2 (Mills et al. 2000, Weisser et al. 2001, Locati et al. 2020). In vitro, une co-culture de myoblastes avec des macrophages de type M1 pro-inflammatoires, obtenues par un traitement avec LPS/IFN- γ entraîne une prolifération et une croissance accrues mais une expression de Myog et une formation de myotubes fortement réduites (Varga et al. 2016). Ainsi, les cytokines secrétées par les macrophages de type M1, tels que le TNF- α , augmentent la prolifération des myoblastes. Par ailleurs, la déplétion de l'IFN- γ in vivo est associée à une augmentation des macrophages de type M2 anti-inflammatoires, qui

réduisent la prolifération des myoblastes (Villalta et al. 2011). La transition du phénotype pro- inflammatoires en phénotype anti-inflammatoire des macrophages au cours d'une lésion musculaire est essentielle pour une bonne régénération musculaire (Tidball et al. 2007). Cette transition est médiée par une augmentation de l'IL-10 et les souris knock-out pour l'IL-10 présentent une altération de la régénération des muscles squelettiques (Deng et al. 2012). Les macrophages pro-inflammatoires sont associés à la prolifération des cellules satellites, et les macrophages anti-inflammatoires sont associés à la différenciation des cellules satellites (Arnold et al. 2007), Varga et al. 2016). In vitro, la co-culture de myoblastes avec des macrophages de type M2 obtenus avec un traitement par IL-4 et IL-10 a entraîné une augmentation de la différenciation, caractérisée par une augmentation de Myogénine, et de l'indice de fusion signant la formation de myotubes (Arnold et al. 2007, Varga et al. 2016). Ainsi, la transition phénotypique de macrophages pro- à anti-inflammatoires pendant le processus de régénération musculaire est crucial pour le bon développement de nouvelles myofibres. Les voies de signalisation impliquées dans cette transition sont mal comprises. Cependant, il a été démontré que l'absence d'AMPK α 1 (protéine kinase activée par l'AMP) dans les macrophages empêche leur transition phénotypique et l'acquisition d'un phénotype M2 in vitro ; associé à une expression faible des marqueurs de macrophages de type M2 et une expression plus élevée des marqueurs de macrophages de type M1 lors de la stimulation par les IL4 et IL10 ou du traitement AICAR. Ainsi, Plusieurs fonctions sont altérées dans les macrophages AMPK α 1^{-/-}. Les macrophages M2a AMPK α 1^{-/-} n'ont pas montré l'augmentation de la phosphorylation oxydative observée dans les macrophages M2 de souris WT (wild type), confirmant que l'induction de l'oxydation des acides gras mitochondriaux est liée au phénotype M2. De même, une carence en AMPK β 1 dans les macrophages entraîne une réduction des taux d'oxydation des acides gras et une

polarisation M1-M2 altérée (Galic et al. 2011). De plus, ces macrophages AMPK α 1^{-/-} ne sont pas capables de soutenir la myogenèse ; ils stimulent la prolifération des MPC (Mononuclear phagocytes) et inhibent leur fusion, indiquant qu'ils n'ont pas acquis de phénotype M2 (Arnold et al. 2007, Saclier et al. 2013). Inversement, l'activation de l'AMPK dans les macrophages M2 favorise la myogenèse. En outre, dans le muscle AMPK α 1^{-/-} et LysM- α 1^{-/-}, le nombre de cellules CX3CR1-GFP^{high} Ly6C/G⁻ (M2) diminue au profit des cellules CX3CR1-GFP^{low} Ly6C/G⁺ (M1), indiquant un défaut d'inclinaison des macrophages.

Plusieurs autres voies de signalisation ont été impliquées dans la modulation des macrophages M1 induits par le LPS, notamment les MAPK, PI3K/Akt et NF κ B (Jeong et al. 2009, Peairs et al. 2009, Sag et al. 2008, Yi et al. 2011). Au cours de la régénération des muscles squelettiques, l'inhibition de la fonction Cebp β est associée à une augmentation des marqueurs M1 lors de la stimulation du LPS in vitro et conduit à des défauts de régénération des fibres musculaires in vivo (Ruffell et al. 2009). Il a également été démontré que la restriction de l'activation de p38 MAPK par la MAPK phosphatase-1 contrôle la transition phénotypique des macrophages et la récupération musculaire (Perdiguero et al. 2011). Enfin, la signalisation HGF/c-met semble jouer un rôle dans la réparation musculaire en favorisant la transition des macrophages vers un phénotype M2 en régulant la phosphorylation de l'AMPK via le régulateur CaMKK β , cependant, le mécanisme sous-jacent par lequel les macrophages produisent du HGF n'est pas encore compris, probablement lorsque ces cellules sont exposées à des neutrophiles apoptotiques (Choi et al. 2019).

II.3.c Autres cellules immunitaires impliquées dans la réparation musculaire

Les lymphocytes

Les cellules lymphocytaires sont également citées dans le processus de régénération musculaire. Les principaux types de cellules lymphocytaires impliquées sont les T helper (h) 1 et Th2 (Wynn et al. 2014). Les sous-types Th17 et Treg ont également été caractérisés (Sugama et al. 2012). Les cellules CD4⁺Th1 constitue l'immunité à médiation cellulaire et produisent des cytokines pro-inflammatoire: IFN γ , TNF α , IL-12 et IL-2. En revanche, les cellules CD4⁺ Th2 produisent les IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13, qui sont des cytokines anti-inflammatoires avec un effet profibrotique. Les cytokines Th1 inhibent le développement des cellules Th2 et, inversement, les cytokines Th2 inhibent le développement des cellules Th1. Les lymphocytes sont présents en nombre relativement faible dans le muscle après une lésion aigue par rapport aux cellules myéloïdes (McLennan. 1996, Castiglioni et al. 2015, Deyhle et Hyldahl. 2018). Leur recrutement au site de lésion est contemporain du recrutement des macrophages anti-inflammatoires M2, ce qui suggère qu'ils peuvent favoriser la régénération. Après une nécrose musculaire induite par injection de cardiotoxine(CTX), les populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ atteignent leur nombre maximal à 3 DPI (Day post injection). Toutefois, la déplétion en lymphocytes T et B ralentit considérablement la régénération musculaire (Zhang et al.2014 , Fu et al. 2015). De plus, les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (LTc CD8⁺) sont augmentés lors des lésions musculaires aiguës et la suppression spécifique des LTc CD8⁺ de souris par ablation génétique du *Cd8a* ralentit la régénération musculaire après injection de CTX (Zhang et al. 2014). Cependant, le nombre de cellules myéloïdes matures Gr1^{high} sont considérablement réduit dans les muscles lésés de souris mutantes pour le *CD8a*⁺, ce qui correspondait à une réduction de

l'expression du ligand de chimiokine-2 (CCL2 ; Zhang et al. 2014). Ainsi, les LTc CD8⁺ favoriseraient la régénération musculaire en attirant les macrophages vers le muscle via le CCL2, et ces macrophages accélèrent ensuite la régénération en augmentant plus rapidement la population de cellules myogéniques. D'autre part, la régénération musculaire est ralentie sans affecter le nombre de macrophages F4/80⁺ chez les souris mutantes *Rag1*, caractérisée par un défaut de production de cellules T ou de cellules B matures (Fu et al. 2015). De plus, les cytokines pro-inflammatoires (IL1 α , TNF α et IFN γ) sécrétées par les lymphocytes T augmentent la prolifération des cellules myogéniques in vitro (Fu et al. 2015). Ces résultats montrent que certains des effets pro-régénératifs des cellules T peuvent se produire par des actions directes sur les cellules myogéniques, suggérant l'implication d'une autre population lymphocytaire T que les LTc CD8⁺. Une autre population lymphocytaire intervient dans la régénération musculaire, c'est la famille des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ régulatrices (cellules Treg) (Burzyn et al. 2013, Villalta et al. 2014). Les cellules Treg, qui expriment le facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3), sont recrutées au site de lésion musculaire avec une cinétique similaire à celle des macrophages anti-inflammatoires, atteignant des pics environ au quatrième jour après lésion (Burzyn et al. 2013). De plus, leur déplétion prolonge l'inflammation et ralentit la régénération musculaire, (Burzyn et al. 2013). Elle perturbe également la transition phénotypique de macrophages M1 à M2 (Burzyn et al., 2013), et ceci, est probablement attribuable à un défaut de sécrétion de l'IL10 par les cellules Treg (Villalta et al. 2014, Castiglioni et al. 2015). Par ailleurs, les cellules Treg musculaires produisent le facteur de croissance amphiréguline qui augmente la différenciation des cellules myogéniques in vitro pour (Burzyn et al. 2013). Ainsi, tout comme les lymphocytes T, les cellules Treg peuvent avoir des fonctions régulatrices de la régénération musculaire en modulant la réponse

immunitaire et en agissant directement sur les cellules myogéniques. Les lymphocytes sont également impliqués dans la régénération musculaires et le développement de fibroses observées dans certaines myopathies dégénératives. Les premières études ont identifié la présence de cellules T dans les biopsies de patients DMD et d'autres myopathies (Arahata et al. 1984, Engel et al. 1986). Cependant, la cytotoxicité des lymphocytes T semblait limitée chez les patients DMD (dystrophie musculaire de Duchenne (Emslie-Smith AM et al. 1989). Chez les souris nu/nu/ mdx (souris nude immunodéficientes dans le fond mdx), le manque de cellules T fonctionnelles était associé à moins de fibrose du diaphragme à 3 mois, soutenant le rôle pathogène des cellules T dans le muscle mdx (Morrison J et al. 2000). Par ailleurs, La thymectomie associée à un traitement avec des anticorps anti-CD4 et/ou anti-CD8, n'a pas amélioré la fibrose du diaphragme à l'âge de six mois (Morrison et al. 2005, Spencer et al. 2001). Une étude qui analysé le rôle des lymphocytes dans la dysferlinopathie musculaire chez des souris transgéniques Scid/A/J et a montré que l'absence de lymphocytes T et B entraînaient une amélioration de la régénération musculaire (Farini et al. 2014).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC, *dendritic cells*) sont des cellules sentinelles, résidentes dans les tissus, qui font l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène (APC, antigen-presenting cells) professionnelles qui migrent dans les ganglions lymphatiques drainants et déclenchent des réponses cellulaires T et B spécifiques à l'antigène (Padilla et Reed. 2008, Hubert et al. 2019). Les DC régulent positivement les molécules co-stimulantes et les molécules du CMH de classe II (HLA-DR) et sécrètent une grande variété de cytokines. Selon le tissu, l'agent pathogène et le microenvironnement, les DC favorisent une réponse immunitaire spécifique et adéquate par

les lymphocytes (Hubert et al. 2019). Les DC CMHII⁺ sont présents dans le muscle normal, et dans le muscle lésé (Pimorady-Esfahani. 1997). Lors de lésions induites par des injections de notexine dans le muscle Tibialis Antérieur et paravertébral chez la souris, les macrophages résidents recrutent des neutrophiles et des monocytes du sang, qui sont progressivement remplacés par des DC inflammatoires dans le muscle en régénération (Brigitte et al. 2010). Les macrophages et les DC inflammatoires sont tous deux importants dans la réponse aux lésions musculaires par la reconnaissance des auto-molécules (par exemple HMGB-1, SAA1, HSP, ADN, ARN) libérées par les cellules endommagées par les Toll-like receptors (TLR TLR2/4 et TLR7/8), déclenchant l'inflammation et la réparation des tissus. Cependant, dans les dystrophies et les myosites, la libération massive de cytokines et de TLR hyperactifs peut entraîner une inflammation chronique et destructrice (De Paepe, 2020). Ainsi, les DC sont impliquées dans les myopathies inflammatoires et idiopathiques (MII) mais leur rôle n'est pas bien défini (Greenberg et al. 2007, Wirsdörfer et al. 2016, Hubert et al.2019). Les myopathies inflammatoires idiopathiques (MII) qui représentent un groupe hétérogène de maladies d'apparition chronique ou subaiguë, se divisent en quatre grands groupes :(i) le groupe des dermatomyosites, (ii) le groupe des polymyosites et myosites à inclusions, (iii) le groupe des myopathies nécrosantes auto- immunes et (iv) le groupe des myosites de chevauchement incluant les syndromes des anti-synthétases (Mariampillai et al. 2018). Elles sont caractérisées par des infiltrats inflammatoires, constitués de macrophages, de DC, de cellules TCD8⁺ (affectant principalement l'endomysium dans la polymyosite) et de cellules TCD4⁺, qui affectent le péri-mysium dans la dermatomyosite (Wiendl. 2005, Huang et al. 2018). Deux types différents de cellules dendritiques ont été décrits dans les infiltrats musculaires des patients MII, avec une prédominance de DC plasmocytoïdes dans les dermatomyosites et de DC dérivées des

monocytes dans les polymyosites et les myosites à inclusions (Pimorady-Esfahani et al. 1997, Wienke et al. 2018). Par ailleurs, les DC dérivées de monocytes activés par LPS favorisent la prolifération, la migration et la libération de cytokines des myoblastes et altèrent la différenciation des myotubes, suggérant ainsi que les DC activées inhibent la formation des myotubes et la régénération musculaire. De plus, la co-injection de myoblastes humains et de DC dans le muscle *tibialis antérieur* de souris immunodéficientes lésées par le froid, a amélioré la migration des myoblastes humains, bien que le nombre absolu de fibres musculaires humaines soit resté inchangé (Ladislau et al. 2018). Les connaissances sur les DC dans la dystrophie musculaire de Duchenne sont beaucoup plus pauvres que pour les MII. Cependant, certaines données indiquent un rôle important des DC, en effet, le TLR7 exprimé par les DC déclenche la production de cytokines dont le facteur de croissance transformant (TGF)- β , et participe au cycle Inflammation/dégénérescence /régénération, suggérant ainsi une interaction des DC avec les cellules T permettant le maintien d'un tissu fibreux et un muscle dysfonctionnel (Rosenberg et al. 2015).

Les mastocytes

Plusieurs études ont également montré que les mastocytes pouvaient jouer un rôle dans la réparation normale des muscles squelettiques. Il a été démontré que les mastocytes s'accumulent dans les muscles lésés environ 8 heures après injection de solution saline dans le muscle gastrocnémien (Gorospe et al. 1996). Les mastocytes ont également été associés au développement de la fibrose dans les muscles des souris mdx (Gorospe et al. 1996). Bien que les mastocytes sont connus pour libérer de nombreuses cytokines pro - inflammatoires telles que le TNF α et interleukines telles que l'IL-1 et l'IL-6, compatibles avec leur apparition

précoce dans le muscle après une lésion aigue, en plus de l'histamine et des protéases telles que chymase, leur rôle dans la régénération musculaire n'est pas connue.

Chapitre 2 : La nécrose régénération en pathologie musculaire

I. Les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires ou dysimmune and inflammatory myopathies (DIM)

Les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires représentent un groupe de maladies rares souvent handicapantes et de diagnostic parfois difficile. L'incidence annuelle estimée est de 5 à 10 cas par million et la prévalence de 50 à 100 cas par million. Elles peuvent s'observer à tout âge, avec une prédominance féminine sauf pour la myosite à inclusions. Chez l'enfant, la dermatomyosite est la myopathie inflammatoire la plus fréquente avec une prévalence entre 2,5 et 4,1 par million d'enfants de moins de 17 ans (Gissinger-Prévot et al. 2008). La myosite à inclusions s'observe surtout après l'âge de 50 ans.

Les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires (DIM) sont des pathologies acquises du muscle squelettique d'origine auto-immune. Cela englobe les myopathies inflammatoires proprement dites, définies par la présence de lésions inflammatoires intramusculaires, et les myopathies nécrosantes auto-immunes non inflammatoires. Le diagnostic positif des DIM repose sur un faisceau d'arguments, cliniques, biologiques (CPK, auto-anticorps), électriques, radiologiques et histologiques (Figure.4) permettant une classification précise de la DIM.

I.1 Dermatomyosite (DM) et Polymyosite (PM)

Ces deux entités constituent les prototypes des myopathies inflammatoires idiopathiques. Elles ne diffèrent pas seulement par la présence ou non d'une atteinte cutanée. Ce sont des maladies fondamentalement différentes, comme l'attestent leurs profils lésionnels musculaires respectifs. En effet, la DM est caractérisée par des lésions ischémiques du

muscle, associées à une microangiopathie endomysiale avec activation du complément. A l'histologie, la dermatomyosite est caractérisée par trois grands types d'anomalies: **(i)** La microangiopathie, **(ii)** les lésions myocytaires et l'inflammation **(iii)**.

(i) La microangiopathie endomysiale est un signe précoce, habituellement présent chez les patients sans symptôme musculaire (DM cliniquement amyopathique) et nécessitant le recours aux techniques immunohistochimiques pour être visualisée. Elle est liée à une activation locale du complément aboutissant à la formation de C5b-9 au niveau de la paroi des capillaires, les lésions microvasculaires se traduisant par une béance luminale et une déplétion capillaire multifocale.

(ii) Les lésions myocytaires sont très caractéristiques de la DM et comportent: 1. **L'atrophie périfasciculaire** (atrophie prédominant sur les myocytes situés sur les couches les plus périphériques des faisceaux), 2. **Les vacuoles à l'emporte-pièce** correspondant à des pertes myofibrillaires focales, anomalie considérée comme d'origine ischémique, 3. **Les microinfarctus** correspondant à des groupes de myocytes au même stade lésionnel du processus de nécrose/, d'origine ischémique. En immunohistochimie, on observe une réexpression myocytaire anormale du CMH-1, affectant la majorité voire la totalité des myocytes avec un renforcement périfasciculaire, sans expression myocytaire du CMH-2. **(iii) L'inflammation** est principalement septale, périmysiale et endomysiale, souvent périvasculaire, constituée de lymphocytes T notamment CD8⁺, de lymphocytes B, de macrophages et de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Tournadre et al. 2009). A l'inverse, la PM est caractérisée par un processus auto-immun à médiation cellulaire avec présence au niveau de l'endomysium de lymphocytes T CD8⁺ attaquant et envahissant des myocytes non-nécrotiques re-exprimant anormalement les antigènes du CMH-1. Les critères diagnostiques des dermatomyosites sont réunis dans la table.1.

Les critères de Bohan & Peter sont donc souvent remplacés par ceux de l'ENMC ou de Troyanov (Table.2). Ces critères, plus complets, précisent non seulement les aspects cliniques, biologiques, enzymatiques, histopathologiques et électromyographiques, mais aussi l'existence d'auto-anticorps et d'anomalies à l'IRM musculaire. A l'histologie, la polymyosite est caractérisée par un processus de myonécrose active avec des signes de nécrose et de régénération multifocaux, d'intensité variable, associée à une inflammation endomysiale constituée de lymphocytes CD8⁺ et de macrophages entourant et envahissant les fibres non nécrotiques (tunnellisation myocytaire). En immunohistochimie, on observe une réexpression myocytaire anormale diffuse du CMH-1, associée à une expression multifocale de CMH-2.

Table.1 : critères diagnostiques des dermatomyosites (Hoogendijk et al. 2004, Troyanov et al. 2005)

Clinique	Hoogendijk et al	Troyanov et al
	Début subaigu ou insidieux Déficit proximal et symétrique Signes cutanés (inconstants)	Faiblesse musculaire proximale symétrique Rash typique de dermatomyosite : rash ou papules de Gottron, ou rash héliotrope, érythème en bande, calcifications sous cutanées dans la forme juvénile (inconstants)
Enzymatique	Élévation des CPK	Élévation des enzymes musculaires sériques : CPK, ASAT, ALAT, LDH, aldolases
EMG	Syndrome myogène	Modifications spécifiques myopathiques
IRM	Hypersignaux sur séquence STIR	Hypersignaux sur séquence STIR
Auto immunité	Ac spécifiques (Ac anti-JO1, Mi2. . .)	Présence d'anticorps spécifiques des myosites : anti synthétases, anti-Mi2 ou anti-SRP
Biopsie musculaire	Atrophie péri fasciculaire ; dépôt de C5b9 dans les capillaires, infiltrat péri vasculaire (lymphocytes B, CD4+, CD8+)	Infiltrat inflammatoire avec atrophie périfasciculaire ou phénomène de dégénérescence/régénérescence, dépôt de C5b9 dans les capillaires

Table.2 : Critères Diagnostiques Des Polymyosites (Hoogendijk et al. 2004, Troyanov et al. 2005)

	Hoogendijk et al	Troyanov et al
Clinique	Début subaigu ou insidieux Age > 18 ans Déficit proximal et symétrique Pas de signes cutanés	Début subaigu ou insidieux Faiblesse musculaire proximale symétrique Pas de signes cutanés ni de forme pédiatrique
Enzymatique	Élévation des CPK	Élévation des enzymes musculaires sériques : CPK, ASAT, ALAT, LDH, aldolases
EMG	Syndrome myogène	Modifications spécifiques myopathiques
IRM	Hypersignaux sur séquence STIR	Hypersignaux sur séquence STIR
Auto immunité	Anticorps spécifiques (Ac anti-Jo1...)	Présence d'anticorps spécifiques des myosites : anti-synthétases
Biopsie musculaire	Biopsie musculaire infiltrat péri-nécrotique, et fibres envahies, expression diffuse de HLA classe 1	Infiltrat péri-nécrotique, fibres envahies, expression diffuse de HLA classe 1 Infiltrats inflammatoires de lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺ et de macrophages

I.2 Myosite à inclusions (IBM) sporadique

Elle touche le plus souvent les hommes (sex-ratio 3/1), après 50 ans. Le tableau clinique est très évocateur avec une atteinte musculaire chronique, asymétrique, bilatérale, déficitaire, amyotrophiante et indolente. Le déficit est proximal aux membres inférieurs prédominant habituellement sur les quadriceps, et distal aux membres supérieurs prédominant sur les fléchisseurs du poignet. La biopsie musculaire est la clé du diagnostic avec un profil histopathologique associant typiquement un processus immuno-inflammatoire de type PM, des anomalies dégénératives myocytaires, des signes de dysfonctionnement mitochondrial et une involution fibro-adipeuse. Cependant, dans bien des cas, la biopsie ne montre pas tous les éléments requis pour le diagnostic si bien que les critères diagnostiques actuels intègrent également les données cliniques et les CPK (Table.3). Le diagnostic histopathologique d'IBM repose sur la mise en évidence des anomalies suivantes: **(i) un processus polymyositique** avec parfois la présence de lymphocytes B; **(ii) des remaniements myopathiques chroniques** avec une anisodiamétrie myocytaire (atrophie anguleuse, hypertrophie) et une fibrose endomysiale; **(iii) des vacuoles bordées** contenant de tubulo filaments de 15–18nm en microscopie électronique, des dépôts amyloïdes, des inclusions et des agrégats protéiques immunoréactifs pour anti-SMI31 et LC3; **(iiii) des signes de dysfonctionnement mitochondrial (déficit en activité COX)**. Au stade précoce, toutes les caractéristiques cliniques et histologiques ne sont pas toujours réunies, conduisant souvent à poser le diagnostic de PM. Dans ce cas, c'est la cortico-résistance qui fait suspecter le diagnostic d'IBM et c'est à la deuxième, voire la troisième biopsie, qu'on observe les aspects histopathologiques caractéristiques. L'importance de la confirmation du diagnostic d'IBM repose dans les implications thérapeutiques, car il n'y a alors pas d'indication à un traitement immunomodulateur et qu'il faut au contraire privilégier la réadaptation fonctionnelle.

Table.3. Critères diagnostiques de myosite à inclusions (IBM) (ENMC. 2011; Dimachkie et al. 2014)

1. IBM définie au plan clinico-pathologique :

Caractéristiques cliniques et de laboratoire :

Durée > 12 mois.

Age de début > 45ans.

Faiblesse des quadriceps ≥ fléchisseurs de hanche.

Et/ou

Faiblesse des fléchisseurs des doigts > abducteurs
d'épaule.

Les CK ne dépassent pas 15 × la normale.

Caractéristiques histopathologiques: doit remplir tous les critères suivants:

- Infiltrat inflammatoire endomysial.
- Vacuole bordées.
- Accumulation de protéines* ou filaments de 15-18 nm.

2. IBM définie cliniquement:

Caractéristiques cliniques et de laboratoire :

Durée > 12 mois.

Age de début > 45ans.

Faiblesse des quadriceps ≥ fléchisseurs de hanche.

Et

Faiblesse des fléchisseurs des doigts > abducteurs
d'épaule.

Les CK ne dépassent pas 15 × la normale.

Caractéristiques histopathologiques: doit remplir un ou plusieurs des critères suivants, mais pas tous:

- Infiltrat inflammatoire endomysial.
- Expression élevée des molécules du CMHI.
- Vacuole bordées.
- Accumulation de protéines * ou filaments de

15- 18 nm.

3. IBM probable:

Caractéristiques cliniques et de laboratoire :

Durée > 12 mois.

Age de début > 45ans.

Faiblesse des quadriceps ≥ fléchisseurs de hanche.

OU

Faiblesse des fléchisseurs des doigts > abducteurs
d'épaule.

Les CK ne dépassent pas 15 × la normale.

Caractéristiques histopathologiques : doit remplir un ou plusieurs des critères suivants, mais pas tous:

- Infiltrat inflammatoire endomysial.
- Expression élevée des molécules du CMHI.
- Vacuole bordées.
- Accumulation de protéines * ou filaments de
15- 18 nm.

(*)Granulations mise en évidence par le rouge Congo ou crystal violet ou à la tau hyperphosphorylé (SMI-31) ou p62/SQSTM1 ou thioflavin T/Sou TDP-43). Le p62 est le marqueur de choix en terme de sensibilité et spécificité, mais les données de littérature sont limitées et nécessitent d'autres travaux.

I.3 Myopathie nécrosante auto-immune (MNAI)

Les MNAI ont longtemps été confondues avec les PM. Cette entité d'individualisation récente s'observe chez des patients qui présentent un tableau clinique de type PM avec un déficit moteur proximal symétrique subaigu, et le plus souvent une élévation extrêmement importante des CPK. La biopsie musculaire montre alors un processus de nécrose myocytaire actif, sans inflammation, avec activation du complément, ne répondant pas aux critères histopathologiques de PM. Elle correspond au profil d'atteinte musculaire observé en association avec les AC anti-SRP et aux anti-HMG-CR. Les critères diagnostiques utilisés sont

ceux de l'ENMC 2003 (Hoogendijk et al. 2004). Le diagnostic peut être particulièrement difficile du fait du caractère limité voire de l'absence complète d'inflammation. La myonécrose est constante, d'intensité variable, de répartition aléatoire avec des lésions d'âges différents. L'expression myocytaire de CMH-1 est variable (parfois diffuse comme dans une PM) mais il n'y a pas d'expression de CMH-2. Un élément caractéristique réside dans la présence d'une activation du complément avec formation de C5b-9 à la surface des myocytes. Il peut également exister une microangiopathie associant déplétion capillaire, élargissement luminal et dépôts capillaires de C5b-9, notamment dans les formes avec anti-SRP. La principale difficulté est de ne pas confondre la MNAI avec d'autres pathologies non immunes, comme certaines dystrophies musculaires, notamment les dysferlinopathies qui donnent un patron histopathologique comparable et peuvent avoir une évolution plus rapide qu'une autre dystrophie.

I.4 Les Myosites de chevauchement

C'est le type le plus fréquent de DIM (65 à 70 % des cas), caractérisé par la présence de signes cliniques extra-musculaires (polyarthrite, syndrome de Raynaud, sclérodactylie, calcinose, pneumopathie interstitielle) ou d'auto-anticorps (AC antisynthétase, anti-SRP, associés à la sclérodermie ou au syndrome de chevauchement). La classification de Troyanov (Table.4) qualifie l'atteinte musculaire comme PM ou DM, ce qui peut être occasionnellement le cas, mais l'analyse méthodique des profils histologiques montre que les myosites de chevauchement ont des spécificités propres qui justifient un cadre myopathologique spécifique.

Les Myopathies associées aux anti-synthétases (MAAS)

Sont caractérisées par un patron lésionnel caractéristique appelé myopathie dysimmunitaire avec pathologie périmysiale (ou immune myopathy with perimysial

pathology, IMPP). L'IMPP est donc caractérisée par: **(i) Des lésions de myonécrose d'âges différents** de localisation principalement perifasciculaire; **(ii) Une inflammation perimysiale** Majoritairement macrophagique et lymphocytaire T CD8⁺ plutôt dans l'endomysium perifasciculaire; **(iii) une fragmentation du collagène périmysial**. En immunohistochimie, on observe un patron très caractéristique avec une réexpression myocytaire anormale du CMH-1 parfois étendue, rarement diffuse, à très nette prédominance périfasciculaire, une expression myocytaire anormale du CMH-2 de localisation électivement périfasciculaire et des dépôts sarcolemmiques de C5b-9 au niveau périfasciculaire (Aouizerate et al. 2014)

La sclérodémie systémique

Peut donner une atteinte musculaire spécifique caractérisée au plan histopathologique par une fibrose périmysiale, une micro-angiopathie endomysiale et une atrophie de type 2. La nécrose et l'inflammation étant absentes ou minimales. A ces anomalies peuvent s'ajouter des lésions de myopathie inflammatoire de type PM.

Table.4: Critères diagnostiques de myosite de chevauchement (Trojanov et al, 2005)

<p>Présence de PM ou DM associée à :</p>	<ul style="list-style-type: none"> - syndrome de Raynaud - sclérodactylie, - infiltration sclérodermique, - calcinose sous cutanée, - diminution de la mobilité du bas œsophage ou de l'intestin grêle - diminution à moins de 70% de la DLCO, - pneumopathie interstitielle sur imagerie - lupus discoïde, présence d'anticorps anti-ADN natif et hypocomplémentémie, présence d'au moins 4 des 11 critères ACR du lupus systémique <li style="padding-left: 40px;">- Syndrome des anti phospholipides
<p>Et/ou la présence d'au moins un des anticorps suivants</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Anti synthétases (Jo1, PL-7, PL-12, OJ, EJ, KS) - Anti-SRP - Auto anticorps associés à la sclérodermie ou au syndrome de chevauchement (anticentromères, Scl70, ARN polymérase I/III, Pm-Scl, RNP (U1, U2, U3, U5) <li style="padding-left: 40px;">- Exclusion des anti-Mi-2 (DM), anti-SSA et anti-SSB

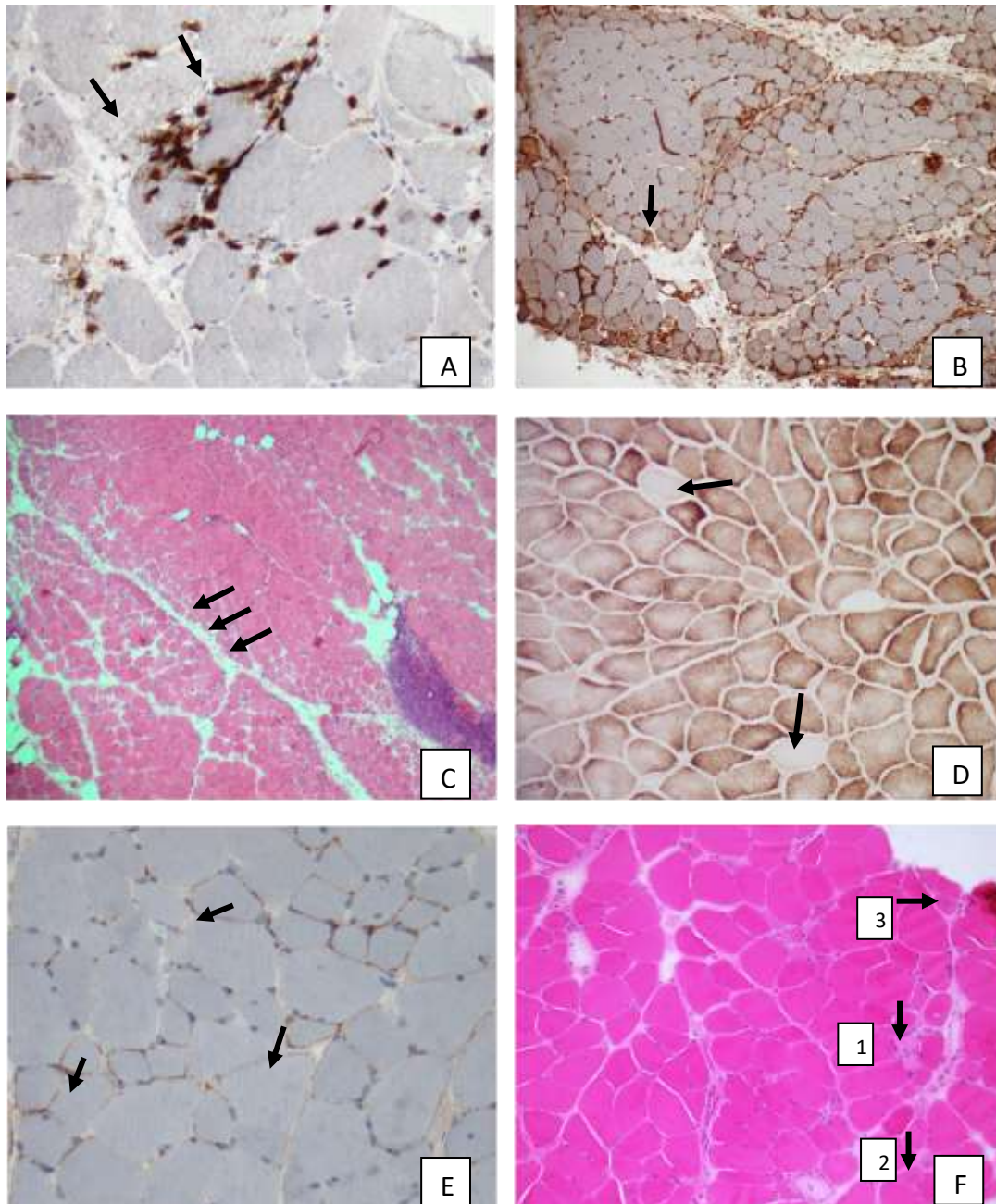


Figure.4 : Myopathies inflammatoires et dysimmunitaires : aspects histopathologiques

Poly myosite (A) : Infiltrats lymphocytaires T CD8 endomysiaux (flèche) au contact des myocytes (Immunopéroxydase) ; Syndrome des anti synthétases (B) : Expression myocytaire anormale de CMH-2 (flèche) à prédominance périfasciculaire (Immunopéroxydase) ; Dermatomyosite (C) : Atrophie myocytaire périfasciculaire (flèche) et infiltrat inflammatoire septal (H&E) ; Myosite à inclusions (D) : Déficit focal en COX (flèche) (technique histo-enzymologique) ; Myopathie nécrosante auto-immune (E, F) : Activation du complément avec dépôts de C5b-9 sarcolemmiques (E, immunoperoxydase) ; Nécrose myocytaire avec lésions d'âges différents (F, H&E) : nécrose aigue (1), fibres basophiles de régénération (2), Noyaux centralisées (3).

I. 5 Myosites associées aux cancers

La fréquence des formes paranéoplasiques de DIM est estimée à 10 % avant 65 ans et à 50 % des cas après 65 ans. Pour retenir le caractère paranéoplasique d'une DIM, il faut que le cancer apparaisse dans moins de trois ans après les signes musculaires et que les signes musculaires disparaissent avec le traitement du cancer. Les DIM paranéoplasiques sont très majoritairement des DM ou des MNAI, et, pour ces deux DIM, la recherche d'un cancer doit être systématique après 50 ans. Chez l'adulte, le risque de cancer semble plus élevé chez les patients DM en cas de présence d'un AC anti-TIF-1 γ ou à un anti-NXP2, et chez les patients MNAI, en cas de séronégativité ou d'AC anti-HMG-CR (Guis et al. 2010).

II. Les myopathies héréditaires non acquises

II.a Dystrophies musculaires congénitales

Les dystrophies musculaires congénitales (DMC) sont des troubles héréditaires affectant principalement le muscle squelettique et définis par une hypotonie et une faiblesse survenant avant l'acquisition d'une marche indépendante, un retard ou un arrêt dans l'atteinte des jalons de la motricité globale et une pathologie musculaire dystrophique. La biopsie musculaire est variable, elle peut être caractérisée par une variation de la taille des fibres musculaires, une dégénérescence-régénération, et une fibrose accrue. Les créatines kinases (CK) sont généralement élevées. La majorité des DMC sont héritées sur un mode autosomique récessif, à l'exception des mutations dominantes de novo dans les DMC liées à la Laminine α /c (LMNA), et une proportion de troubles sévères liés au collagène 6 (COL6-RD). Bien que des différences géographiques existent, les formes les plus courantes sont les mutations COL6-RD (12-19 %), les dystroglycanopathies (DGP; 12-25 %), les dystrophies liées à la laminine- α 2 (LAMA2-RD; 10-37 %) et la sélénoprotéine N

myopathie associée (SEPN1-RM ; 11,65 %). La DMC de type Fukuyama (FCMD) représente la forme la plus courante au japon (Peat et al. 2008, Sframeli et al. 2017, Clement et al. 2017).

Les DMC peuvent être classés comme suit :

- 1- Les DMCs liées à des protéines structurelles défectueuses de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire (ECM). Ceux-ci incluent LAMA2-RD, COL6-RD et DMCs avec un déficit en intégrine 7 ou 9 Alpha.
- 2- Les DMCs liés à des défauts primaires de la glycosylation DG (dystroglycan) ou α -DG. Ce sont les dystroglycanopathies et comprennent différents phénotypes allant du syndrome de Walker-Warburg (WWS) le plus sévère à la maladie muscle-œil-cerveau (MEc), DMCs avec retard mental (DMC-RM), DMCs sans retard mental (DMC-sans RM), DMC avec atteinte cérébelleuse (DMC-CR), élévation isolée de la CK \pm RM, cardiomyopathie isolé manifestations oculaires isolées (Godfrey et al. 2011, Nickolls et al. 2018).
- 3- Les DMCs liée à des défauts dans les protéines du réticulum endoplasmique (RE). Plus précisément, SEPN1-RM.
- 4- Les DMCs liés à des défauts dans les protéines de l'enveloppe nucléaire . Il s'agit notamment de la DMCs liée à la lamine a/c (LMNA) et d'une forme très rare causée par des mutations de la nesprin (DMC liée à SYNE1).
- 5- Autres DMCs : DMC liées à une atteinte du trafic ER-Golgi (par exemple, TRAPPC11, GOSR2), les troubles affectant la morphologie mitochondriale

et lysosomale (par exemple, CHKB , MICU1 et MSTO1), et les dystrophies musculaires avec atteinte multisystémique et neurodégénérescence (par exemple, le syndrome de Marinesco-Sjogren).

II.b Les dystrophies musculaires

II.b.1 Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

Les dystrophies musculaires de l'enfant ou de l'adulte se caractérisent par une faiblesse musculaire progressive pouvant avoir une prédilection pour certains groupes musculaires. Les dystrophies musculaires de l'enfance sont généralement mortelles, en raison d'une faiblesse associée du muscle cardiaque ou des muscles respiratoires. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) représente la maladie héréditaire liée à l'X la plus courante. La DMD est produite par des mutations du gène de la dystrophine sur le chromosome X, et la plupart des garçons atteints sont diagnostiqués au cours des premières années de la vie. Les garçons DMD présentent une marche retardée, des chutes, une démarche aux orteils et une hypertrophie des mollets. Généralement, les taux sériques de CPK sont substantiellement élevés. Une mutation ponctuelle est souvent responsable de cette pathologie (Chaturvedi et al. 2011); les délétions ou les duplications brutes du gène de la dystrophine représentent 60 % des mutations, et ces mutations sont détectées par un test sanguin basé sur la PCR (Miller RG et al. 1994). Un certain nombre de ces mutations ponctuelles peuvent insérer de nouveaux codons d'arrêt, et c'est ce mécanisme qui est impliqué dans le modèle de souris mdx. La souris mdx présente de nombreuses caractéristiques histopathologiques observées dans la DMD, mais ces souris, contrairement

à leurs homologues humaines, restent ambulatoires et n'ont qu'une durée de vie légèrement réduite. (Sicinski et al. 1989).

Les délétions de gènes qui ne perturbent que partiellement l'expression de la dystrophine sont associées à un phénotype moins sévère, qui est la dystrophie musculaire de Becker (DMB). La dystrophine est une grande protéine et un composant central du complexe dystrophine-glycoprotéines (CDG, Figure.5) qui assure la stabilité du sarcolemme. En l'absence de dystrophine, la contraction musculaire augmente le risque de rupture membranaire, des lésions de myofibrilles et un dysfonctionnement du sarcomère par augmentation de la teneur en calcium intracellulaire (Alderton et al. 2000). Dans la DMD, les biopsies musculaires montrent un processus de nécrose régénération associé à un remplacement adipocytaire et une fibrose musculaire avec l'évolution de la maladie. L'immunohistochimie démontre l'absence de coloration normale du sarcolemme pour la dystrophine.

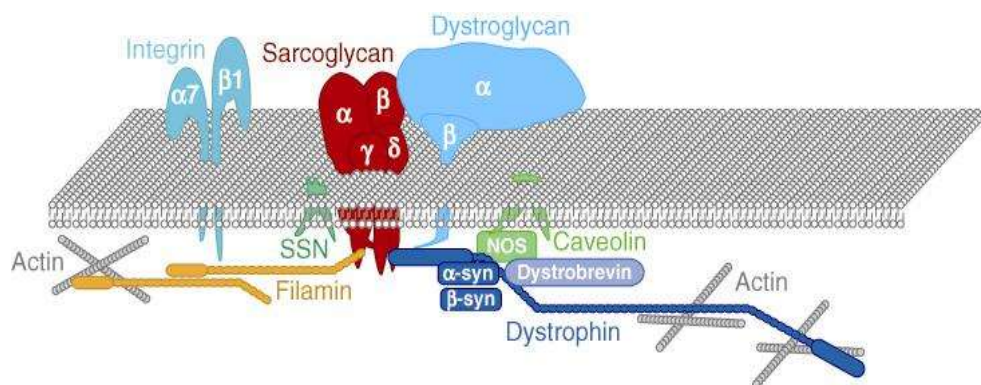


Figure.5 : La dystrophine est une grande protéine et un composant central du complexe dystrophine-glycoprotéines (CDG) qui assure la stabilité du sarcolemme (McNally et al. 2017)

II.b.2 Dystrophies musculaires des ceintures (Limb-Girdle Muscular Dystrophies)

(LGMD): les sarcoglycanes/ LGMD2 C à F

Le complexe des sarcoglycanes (SG), composé de quatre principales glycoprotéines transmembranaires (α , β , γ , et δ -SG) appartient au complexe glycoprotéique associé à la dystrophine ou CDG. Il est localisé dans la sarcolemme des fibres musculaires où il agit comme un lien entre l'extérieur (matrice extracellulaire) et l'intérieur (cytosquelette), il offre une stabilité structurelle et une protection au sarcolemme pendant le stress mécanique engendré par la contraction musculaire. La perte des SG pourrait entraîner le clivage de la bêta dystroglycane et interrompre le lien entre le sarcolemme et la membrane (Yamada et al. 2001, Ozawa et al. 2005). Les sarcoglycanopathies sont un sous-groupe de LGMD causé par des mutations d'un des gènes codant pour l'une de ces SG. Le phénotype clinique des sarcoglycanopathies est caractérisé par un âge de début et une sévérité variables, allant d'une dystrophie Duchenne-like sévère et précoce à une LGMD d'évolution moyennement sévère (Angelini et al. 1999). Une forte élévation des CPK est fréquente, notamment chez les patients encore ambulatoires. Les premiers symptômes apparaissent habituellement dans l'enfance et le confinement au fauteuil roulant vers 16 ans. Des profils évolutifs moins sévères ont été rapportés chez des patients présentant des mutations de type faux-sens ou non-sens. Une cardiomyopathie a été rapportée avec les types β , γ , et δ alors qu'une atteinte cardiaque est rarement associée aux mutations du gène codant pour α -SG (Fanin et al. 2003). Les mutations du gène α -sarcoglycane sont fréquemment des mutations ponctuelles qui peuvent être associées à des phénotypes plus légers. Le décalage du cadre de lecture et les mutations ponctuelles peuvent entraîner des phénotypes graves (McNally et al. 1996). Les caractéristiques histopathologiques des biopsies musculaires de patients mutants du sarcoglycane ne peuvent être distinguées de celles trouvées dans le muscle DMD

ou BMD. Une exception est les mutations du γ -sarcoglycane, où une coloration résiduelle du sarcoglycane peut être présente (Hack et al. 2000).

II.b.3 Dystrophies musculaires des ceintures : Dysferline

La dysferline est une protéine du sarcolemme impliquée dans l'étape de fusion membranaire calcium-dépendante du processus de réparation de la fibre musculaire (Bansal et al. 2003). Le domaine cytoplasmique de la dysferline contient six domaines C2, et les domaines C2 sont impliqués dans la liaison du calcium et des phospholipides. Les dysferlinopathies sont des dystrophies musculaires provoquées par des mutations du gène de la dysferline. Une réduction nette de l'expression de la dysferline démontrée par l'étude en WB (western blot) et en IHC constitue un des critères principaux de diagnostic et indique une analyse mutationnelle du gène. Un déficit en dysferline cause deux phénotypes principaux: une myopathie distale affectant de façon prédominante la loge postérieure de jambe, dite de Miyoshi (MM) et une myopathie des ceintures, la LGMD2B. Ces deux myopathies ont en commun un début chez l'adulte jeune, une évolution lente de la maladie et une élévation importante du taux de CPK. Des phénotypes intermédiaires ont été décrits sous le terme de *dystrophie des ceintures distales des membres*, avec un déficit à la fois proximal et distal (Nguyen K et al. 2007). La biopsie musculaire est caractérisée par une absence de coloration de la dysferline et par une inflammation avec infiltrat de cellules lymphocytes TCD8⁺ pouvant mimer des myopathies inflammatoires telles que celles observées dans la polymyosite ou la myosite à inclusions (Hoffman et al. 2002). Les mutations en cause sont réparties sur toute la séquence codante. Il s'agit majoritairement de mutations faux-sens, non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture, mais tout type de mutation peut être observé.

II.b.4 Autres Dystrophies musculaires des ceintures : Calpaïne, Titine, Cavéoline, TRIM32, Myotiline et Téléthonine

La calpaïne-3 est une protéase calcium-dépendante non lysosomale, spécifique du muscle squelettique. Des mutations dans le gène de la calpaïne-3 (CAPN3) sont retrouvées dans la LGMD2A ou calpainopathie. Elles sont réparties le long de la totalité de la séquence codante. La calpainopathie est la plus fréquente des LGMD2 (LGMD récessives, 10 à 30 %), elle est caractérisée par un déficit amyotrophique proximal, sélectif et symétrique, respectant la face et le cœur. L'évolution de la LGMD2A se fait progressivement vers une perte de la marche en moyenne dix à 30 ans après l'apparition des premiers symptômes (Bushby et al. 1999).

Plusieurs autres protéines ont été impliquées dans la dystrophie musculaire, notamment la cavéoline-3, TRIM32 et la myotiline. Les cavéoles sont des invaginations membranaires qui participent à la localisation des protéines dans la membrane musculaire. La cavéoline-3 se trouve insérée dans la membrane, et des mutations dominantes et récessives sont associées à la dystrophie musculaire (Woodman et al. 2004). TRIM32 est une ubiquitine ligase qui se lie à la myosine et participe ainsi au recyclage des sarcomères (Walter et al. 2003). La myotiline est une protéine associée à la bande Z. La mutation du gène de la myotiline conduit à une dystrophie musculaire héréditaire dominante. D'autres mutations telles que la mutation de la téléthonine (Pyle et al. 2004).

II.c Mutations de gènes associés à la membrane nucléaire/ Dystrophie musculaire d'Emery

Dreifuss

La dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss (EDMD) est un trouble lié à l'X, secondaire à une mutation dans le gène codant pour la protéine membranaire nucléaire, l'émerine, qui jouerait un rôle dans l'échafaudage de la chromatine. L'émerine est une protéine largement exprimée, mais les mutations de ce gène affectent principalement le muscle). L'EDMD associe une faiblesse musculaire progressive, des contractures et une atteinte cardiaque à type de bloc auriculo-ventriculaire. Les formes autosomiques dominantes d'EDMD (AD-EDMD) sont les plus courantes (Helbling-Leclerc et al. 2002)). Des mutations dans le gène codant pour la protéine de membrane nucléaire interne lamine A/C (gène LMNA) sont responsables de l'AD-EDMD.

II.d Dystrophie myotonique

II.d.1 La dystrophie myotonique de type 1 (DM1, ou maladie de Steinert)

Est l'une des maladies génétiques les plus courantes, affectant 1 personne sur 8 000. La DM1 est associé à une expansion de trinuécléotides sur le chromosome 19 sur l'extrémité 3' du gène de la protéine kinase de la dystrophie myotonique (DMPK). L'expansion de cette séquence répétée est accrue au fur des générations et est associée à un âge d'apparition plus précoce. La DM1 est liée à un gain de fonction associé à la production et à l'accumulation d'ARN contenant des répétitions CUG. La DM1 se manifeste par une faiblesse musculaire progressive, caractérisée au début par l'atteinte des muscles faciaux, avec ptosis, troubles de la mastication, et une myotonie. La myotonie est un retard de la

relaxation musculaire après une contraction normale et par des décharges de fibres musculaires à haute fréquence d'amplitude croissante et décroissante à l'électromyographie. Des anomalies cardiaques et neuropsychiatriques peuvent également être présentes. Le profil histologique de la DM1 est beaucoup plus variable que celle de la DMD. Il associe une variation de la taille des fibres, avec atrophie des fibres de type I et hypertrophie compensatrice des fibres de type II, des noyaux centraux internalisés, quelques signes de nécrose, une fibrose et des dépôts chroniques graisseux variable que dans la DMD (Machuca-Tzili et al. 2005).

II.d.2 Dystrophie myotonique de type 2

La DM2, comme la DM1, est associée à une expansion dans l'ARN non traduit de tétranucléotides CCTG dans le gène ZNF9. Le phénotype des DM2 peut être plus léger, bien qu'une atteinte cardiaque puisse survenir (Schooser et al. 2004).

II.e Dystrophie musculaire fascio- scapulo humérale

La dystrophie musculaire fascio-scapulo-humérale (FSHD) est la troisième forme la plus fréquente de myopathie. Elle est de transmission héréditaire dominante. Elle se manifeste dans 95% des cas avant l'âge de 20 ans par une atteinte des muscles faciaux, un ptosis et une atteinte de la ceinture scapulaire. La DFSH est associée à une délétion qui affecte la région subtélomérique du chromosome 4 au niveau du locus 4q35. Une séquence d'ADN répétée de 3,3 kb appelée D4Z4 qui se trouve normalement sur une région de 50 à 300 kb, avec 11 à 150 copies de la répétition est concernée. Chez les patients atteints de DFSH, il y a généralement moins de 11 répétitions présentes dans cette région (Tawil et al. 2008).

III. Vieillesse musculaire

La régénération des muscles squelettiques qui suit une blessure aigue fait intervenir des cellules immunitaires qui infiltrent les tissus endommagés. Au cours du vieillissement, la capacité de régénération des muscles squelettiques diminue, ce qui peut contribuer à une perte progressive de la masse et de la fonction musculaires. Ces réductions de la régénération musculaire liées à l'âge s'accompagnent de changements systémiques liés à l'âge dans le système immunitaire, qui affectent de nombreuses populations de cellules myéloïdes et lymphoïdes qui peuvent influencer la régénération musculaire. Les changements liés à l'âge dans les cellules immunitaires modifient leurs expressions de certains facteurs qui affectent la fonction des cellules satellites, nécessaires à la régénération musculaire normale. Ainsi, les réductions liées à l'âge par exemple de l'expression du facteur de différenciation de croissance-3 (GDF3) ou CXCL10 par les macrophages affectent négativement la myogenèse adulte, en perturbant les interactions régulatrices entre les macrophages et les cellules satellites. Ces changements contribuent à une réduction du nombre et de la capacité myogénique des cellules satellites dans les vieux muscles, ce qui réduit leur capacité à restaurer les muscles endommagés (Tidball et al. 2021).

Chapitre 3. Les cellules lymphoïdes innées ou Innate lymphoid cells (ILC) dans la réparation tissulaire

I. Définition :

Les cellules lymphoïdes innées ou Innate lymphoid cells (ILC) sont des lymphocytes qui n'expriment pas les récepteurs antigéniques diversifiés, générés par la recombinaison d'éléments génétiques et exprimés sur les cellules T et les cellules B. Ils sont les contreparties innées des lymphocytes T (Spits et al. 2013, Eberl et al. 2015, Artis et Spits. 2015). Les ILC1, ILC2 et ILC3 reflètent respectivement les cellules CD4⁺T helper (Th)1, Th2 et Th17 en termes de fonction, tandis que les cellules tueuses naturelles (NK) reflètent les fonctions des cellules CD8⁺T cytotoxiques. Les ILC sont en grande partie des cellules résidentes dans les tissus, elles agissent tôt dans la réponse immunitaire en réagissant rapidement aux signaux et aux cytokines inductrices exprimées par les cellules résidentes. La découverte et l'étude des ILC au cours des dernières décennies ont changé la perception de la régulation immunitaire. Nous savons maintenant que les ILC productrices de cytokines contribuent à de multiples voies immunitaires, par exemple en maintenant des réponses immunitaires appropriées aux agents pathogènes au niveau des barrières muqueuses, potentialisant l'immunité adaptative, et la régulation de l'inflammation dans les tissus. Les cellules ILC1 et Th1 réagissent aux agents pathogènes intracellulaires, tels que les virus et aux tumeurs, Les cellules ILC2 et Th2 répondent aux gros parasites extracellulaires et aux allergènes, et les cellules ILC3 et Th17 combattent les microbes extracellulaires, tels que les bactéries et les champignons

Ainsi, lors d'une réaction immunitaire, les ILC et les cellules T s'activent et se régulent mutuellement. Les ILC peuvent exprimer des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et reconnaître les antigènes, activant ainsi les lymphocytes T spécifiques de l'antigène, les cellules T produisent de l'interleukine-2 (IL-2), favorisant les activités ILC (Oliphant et al. 2014) .

II. Développement des cellules lymphoïdes innées

Les ILC commencent à fonctionner pendant le développement fœtal , en tant que cellules inductrices du tissu lymphoïde (cellules LTi) (Mebius et al. 1997), responsables du développement de la plupart des organes lymphoïdes secondaires en stimulant les cellules stromales mésenchymateuses pour produire les facteurs nécessaires pour attirer les cellules hématopoïétiques à la structure lymphoïde en développement et les y retenir (Mebius et al. 1997). Les ILC sont dérivées de progéniteur lymphoïde commun ou Common lymphoid progenitor (CLP). Il a été démontré chez la souris que les CLPs ont le potentiel de générer tous les sous-ensembles de lymphocytes connus (cellules ILC, T, B et NK; Kondo et al. 1997).

Le développement d'ILC tissu-spécifique se produit in utero dans le foie fœtal qui abrite également des NKPs capables de se différencier en cellules NK in vitro (Tang et al. 2012). Il apparaît donc que les deux premières étapes du développement des cellules ILC et NK surviennent tôt durant la période fœtale. De plus, le foie fœtal contient également un précurseur ILC3 qui exprime le facteur de transcription ROR γ t et le marqueur de surface LTi CD4 (Cherrier et al. 2012, Van de Pavert et al. 2014, Sawa et al. 2010). Ces progéniteurs ROR γ t + donnent naissance à des cellules CD4⁺ LTi qui migrent vers

l'intestin pour initier le développement du patch de Peyer et génèrent également des NKp46⁺ ILC3 producteurs d'IL-22 (Sawa et al. 2010). Des cellules NK1.1⁺ sont également présentes dans le foie fœtal (Tang et al. 2012). En revanche, l'intestin fœtal et le mésentère fœtal abritent des ILC2 et ILC3 mais peu d'ILC1 ou de cellules NK (Bando et al. 2015, Koga et al. 2018). Le mésentère fœtal contient également des ILC progenitors (ILCPs) et pourrait donc servir de site intermédiaire ou de réservoir pour le développement précoce des ILC (Koga et al, 2018).

II.1 Les facteurs de transcriptions ou transcription factors (TFs) et engagement des précurseurs des ILC

Ce sont des protéines qui stimulent ou d'inhibent l'expression de certains gènes, afin de promouvoir certaines lignées cellulaires immunitaires au détriment d'autres (Rothenberg et al. 2016). Les précurseurs communs des ILC ou common innate lymphoid progenitors (CILCPs) désignent des précurseurs lymphoïdes qui ont perdu le potentiel de donner des lymphocytes B et T et qui n'ont pas de potentiel myéloïde. Les CILCPs donnent naissance aux trois principaux groupes ILC et aux cellules NK (Serafini et al. 2015). Les CILCPs comprennent le récepteur 6 des chimiokines à motif CXC (CXCR6)⁺, les précurseurs lymphoïdes (α LP) et les « progéniteurs lymphoïdes innés précoces ou early innate lymphoid progenitors» (EILP ; Yang et al. 2015, Yu et al. 2014; figure.6)

Par ailleurs, les EILP de la moelle osseuse de souris adultes Tcf7 GFP (souris dépletées en facteur de transcription 1 des cellules T (TCF-1), codé par Tcf7 et qui joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T) sont capables de générer toutes les lignées ILC (ILC1, ILC2 et ILC3) et les cellules NK, mais pas les cellules T et B (Yang et al. 2015). Les EILPs sont essentiellement CD127⁻ (ou IL-7R⁻), contrairement aux précurseurs

CLPs et à la descendance qui sont CD127⁺ (Klose et al. 2014, Yang et al. 2015). Des travaux récents ont montré que les EILPs dérivent des CLPs, suggérant ainsi que des changements rapides dans l'expression de CD127 accompagnent le processus d'engagement de la lignée ILC (Harly et al. 2018). Mais encore, le TCF-1 impliquée dans la spécification de la lignée T pourrait stimuler d'autres gènes impliqués dans le développement des ILC tels que Gata3 et (Weber et al.2011). De plus, l'intensité et la durée de la signalisation Notch, combinées à des concentrations différentielles d' IL-7 seraient également cruciales dans la différenciation vers les cellules T ou les ILC (Radtke et al. 1999, Schmitt et Zúñiga-Pflücker. 2002). Il est également connu que les signaux Notch ne sont pas requis pour la génération de cellules NK (Radtke et al. 2000) et de cellules ROR γ t + fœtales (Possot et al. 2011). Ainsi une exposition courte ou des quantités intermédiaires de Notch combinées à des quantités élevées d'IL-7 dans les CLPS conduisent à la génération d'ILC2, tandis que des quantités soutenues ou élevées de signalisation Notch induisent une différenciation en cellules T (Koga et al. 2018). Par conséquent plusieurs facteurs de transcriptions opèrent pour séparer les CILCPs des early T cell progenitor (ETPs) permettant la séparation définitive des lignées ILC et NK des cellules T, y compris la protéine régulée par l' interleukine-3 du facteur nucléaire ou nuclear factor interleukin-3 regulated protein (NFIL3) et le thymocyte selection-associated high mobility group box protein (TOX). De faibles quantités de NFIL3 dans les CLPs et une expression élevée de NFIL3 et de TOX dans les CILCPs pourraient maintenir l'expression de TCF-1 dans les CILCPs, au moins pendant les premières étapes de l'engagement des lignées cellulaires ILC et NK (Yu et al. 2014).

La différenciation des CILCPs entraîne l'expression de l'inhibiteur de facteur de transcription de l'ADN 2 ou TF Inhibitor of DNA (ID2) et renforce leur engagement vers la lignée ILC (Figure.6). Ainsi l'ID2 semble être un mécanisme essentiel pour exclure la différenciation

vers les lymphocytes B et T et favoriser la différenciation vers la lignée ILC des CLPs (Verykokakis et al. 2014). Les signaux qui régulent positivement l'expression d'ID2 dans les CILCPs ne sont pas entièrement caractérisés, bien qu'il ait été montré que NFIL3 peut lier le promoteur ID2 dans les précurseurs des ILCs. Toutefois, l'utilisation de souris ID2 GFP à la fois CD127⁺ pré-pro NKPs et CD127⁺ $\alpha^4\beta^7$ - ID2⁺ commun « helper » innate lymphoid progenitors (CHILPs) a montré que les NKP ID2⁺ donnent naissance à des cellules NK matures in vivo tandis que ID2⁺ CHILP peuvent générer des cellules ILC1, ILC2, ILC3 et inductrices de tissu lymphoïde (LTi) la façon dont les NK Progenitor (NKP) cytotoxiques et les ILCP auxiliaires sont générés de manière différentielle est en grande partie inconnue, un mécanisme cytokinique pourrait être impliqué dans le développement de NKP à partir des CILCPs. L'IL-15 est un candidat probable de l'émergence de NKPs cytotoxiques à partir des CILCPs pour aider à établir la lignée NK.

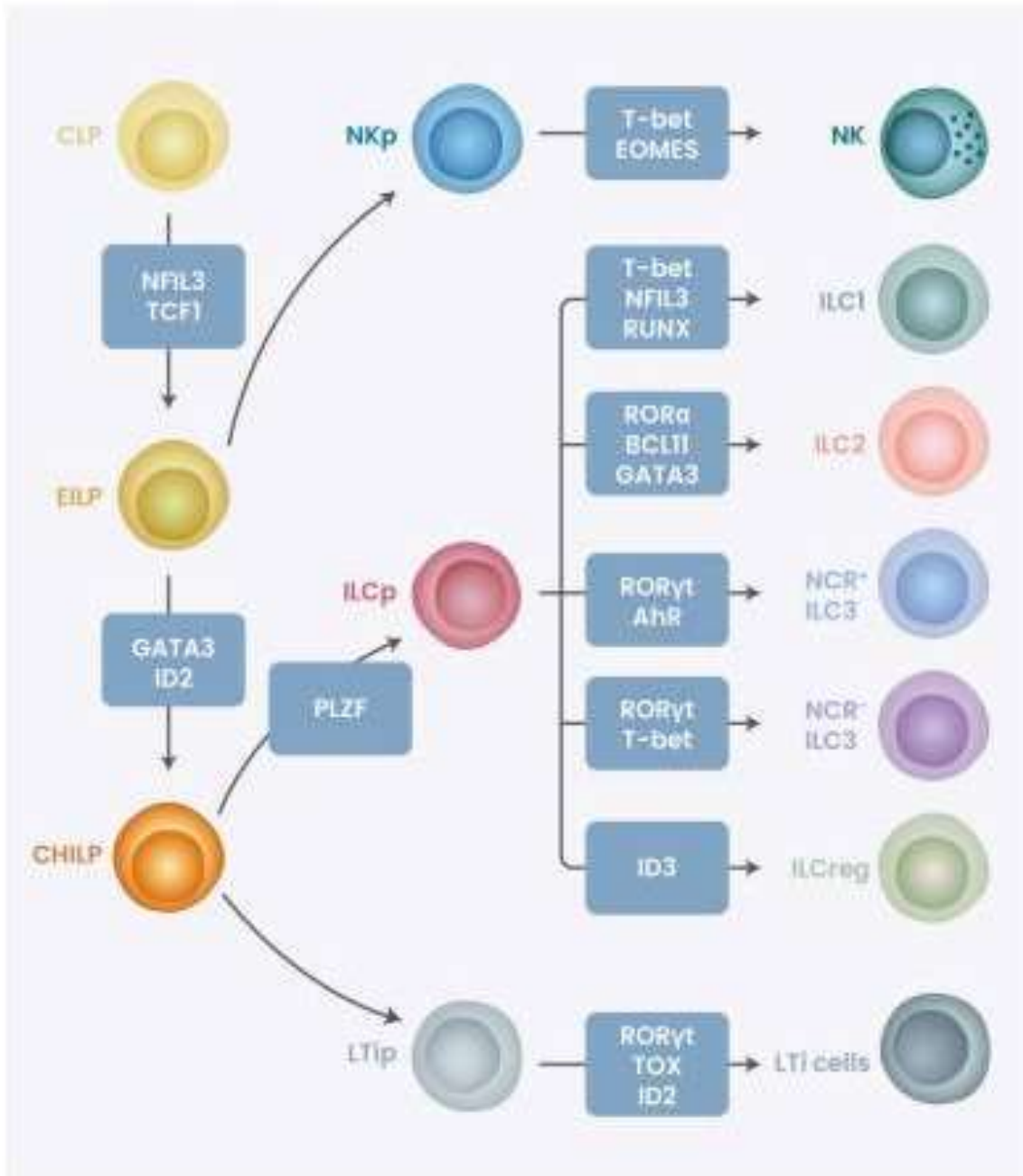


Figure.6 : Développement et fonction des ILC.

La différenciation des ILC se fait par étapes, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) aux précurseurs des ILC, puis à la lignée lymphoïde. Le développement d'ILC à partir du CLP nécessite une suppression médiée par ID2 des différenciations qui génèrent des cellules B et T. Les CLPs s'engagent en outre dans la lignée ILC/NK via des cellules ILC-précurseurs multipotentes. Les sous-populations ILC dépendent de l'expression de facteurs de transcription spécifiques. CLP, ancêtre lymphoïde commun; EILP, progéniteur lymphoïde inné précoce; CHILP, précurseur ILC auxiliaire commun; NKp, précurseur des cellules NK; ILCp, précurseur ILC; LTIp, précurseur cellulaire LTI (Kim et al., 2021).

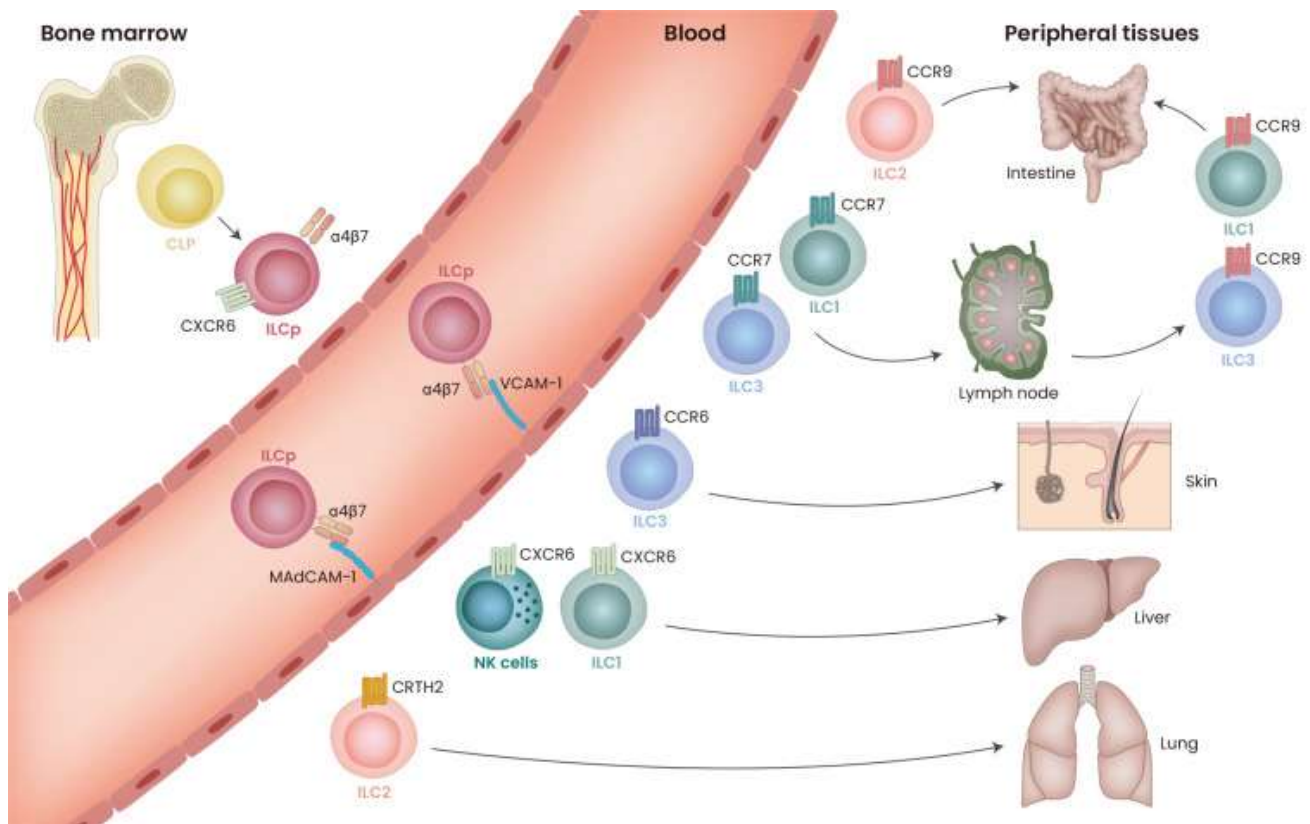


Figure.7 : Tropisme tissulaire des ILC (Kim et al. 2021)

L'ILC progéniteur dérivé de l'hématopoïèse de la moelle osseuse pénètre dans le sang pour rejoindre les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Ce processus nécessite l'expression de divers récepteurs de chimiokines et de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Leur position stratégique dans les tissus permet aux ILC d'agir comme un moniteur de tissus sains et de permettre une réponse rapide aux signaux inflammatoires. CLP (common lymphoid progenitor), ancêtre lymphoïde commun; ILCp, précurseur ILC. (Kim et al.2021)

II.2 Différenciation vers les sous populations d'ILC

Les cellules NK et les ILC1 produisent des cytokines de type 1 (y compris l'IFN- γ) d'une manière dépendante du T-bet, (Klose et al. 2014, Townsend et al. 2004). La concentration de T-bet a un impact différent sur l'homéostasie des cellules NK et ILC1. En effet, *Tbx21* est partiellement réprimé au cours du développement des cellules NK et augmenté lors du développement des ILC1 (Daussy et al 2014). Par ailleurs, l'expression de Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) est essentielle pour la génération de cellules T-bet⁺ NK, ILC1 et NKp46⁺ ILC3 (Ebihara et al. 2015). En plus du T-bet, les cellules NK nécessitent plusieurs autres facteurs de transcriptions qui ne sont pas partagés avec les ILC1, l'Eomesodermin (Eomes), le Zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) et le TF SMAD4 (Cortez et al. 2017, Robinette et al. 2015). Ainsi, chez les souris Eomes fl/fl Vav Cre/+, les NKPs n'arrivent pas à maturité, identifiant l'Eomes comme un régulateur positif de la différenciation des cellules NK mais pas des autres ILC (Gordon et al. 2012, Klose et al. 2014).

La différenciation des ILC2, implique les facteurs de transcriptions ROR α , TCF-1, BCL11b et Gata-3 (Wong et al. 2012, Califano et al. 2015, Walker et al. 2015, Yu et al. 2016). Cependant, le mécanisme de différenciation des ILC2 n'est pas connu, par ailleurs, des quantités élevées de TCF-1 dans les progéniteurs ILC peuvent prédisposer à la différenciation vers les ILC2 par les TFs Gata3 par l'activation des cytokines de type 2.

La différenciation des ILC3 est dépendante du ROR γ t pendant la vie foetale et adulte (Cording et al. 2014) et le rôle de ROR γ t dans la différenciation des ILC3 semble similaire à celui opérant au cours de la différenciation des cellules Th17 (He et al. 2017).

II.3 Localisation de la différenciation des ILC

L'identification d'un ILC progenitor (ILCP) humain circulant suggère que la différenciation des ILC pourrait être possible dans les tissus en réponse à des signaux inflammatoires locaux, on parle de ILC-poiesis (Di Santo et al. 2017, Lim et al. 2017; Figure.7). De plus, il est proposé que les ILC matures soient des cellules résidentes dans les tissus avec peu ou pas de capacité de migration (Gasteiger et al. 2015, Huang et al. 2018). Le concept supplémentaire de génération de cellules NK et de sous- populations ILC à partir de précurseurs naïfs dans les tissus en réponse à des signaux environnementaux peut aider à expliquer les différences spécifiques aux tissus dans l'homéostasie des cellules ILC et NK. Par exemple, la moelle osseuse adulte est riche en cellules NK et en ILC2 immatures, alors que les ILC3 sont rares (Hoyler et al. 2012, Sawa et al. 2010). En revanche, l'intestin foetal et adulte favorise fortement le développement d'ILC3 avec peu ou pas de génération de cellules NK (Bando et al. 2015, Cherrier et al. 2012, Klose et al. 2014).

III. Différentes sous populations d'ILC

III.a. Cellules Natural Killer (NK) et Innate lymphoid cells 1 (ILC1)

Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques qui circulent dans le sang exprimant fortement la perforine (Vivier et al. 2011). Elles peuvent tuer les cellules tumorales et les cellules infectées par les virus. Dans le thymus de souris, les cellules NK conventionnelles (NKC) cohabitent avec les ILC1 qui expriment le CD127 (IL-7R α) et le Gata-3, produisent des quantités plus élevées d'IFN- γ et de facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et dépendent de la cytokine IL-7 et du facteur de transcription Gata-3 pour leur différenciation (Vosshenrich et al. 2006), mais les ILC1 sont généralement non

cytotoxiques ou faiblement cytotoxiques, ont de faibles niveaux d'expression de la perforine et fonctionnent comme une première ligne de défense contre les infections virales et certaines bactéries, telles que *T. gondii* (Klose et al. 2014) ou *C. difficile* (Abt et al. 2015). Les cellules NK et les ILC1 ont plusieurs caractéristiques en commun. Elles produisent principalement de l'IFN- γ nécessitent le T-bet pour leur différenciation. Cependant, les NK se développent à partir d'un progéniteur lymphoïde inné commun ou Common Innate Lymphoid Progenitor (CILP) via un précurseur de cellules NK (NKP), tandis que les ILC1 se développent à partir de CILP via un précurseur de cellules lymphoïdes innées (ILCP; Constantinides et al. 2014, Klose et al. 2014, Scoville et al. 2016). Concernant la caractérisation phénotypique des cellules NK et des ILC1, les ILC1 ont des marqueurs phénotypiques en commun avec les cellules NK et les ILC3, dont le NK1.1 chez la souris et les NCR, NKp44 chez l'homme, et NKp46 chez l'homme et la souris (Table.4). Les ILC1 expriment chez l'homme le marqueur CD127 alors que les cellules NK cytotoxiques CD16⁺ CD56⁺ ne l'expriment pas. Cependant, les cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ circulantes expriment le CD127. Par ailleurs, le CD200R distingue les ILC1 des cellules NK chez la souris (Weizman et al. 2017). Les cellules NK humaines expriment le NKp80, qui n'est pas exprimé sur les ILC1 (Freud et al. 2016). Les ILC1 sont des cellules résidentes dans les tissus, tandis que les cellules NK circulent dans la circulation sanguine (Peng et al. 2013, Gasteiger et al. 2015). Chez la souris, les ILC1 sont détectées avant la naissance, tandis que les cellules NK émergent deux à trois semaines après la naissance (Diefenbach et al. 2014). Il existe également des différences dans la production et la dépendance des facteurs de transcription. Chez la souris, les ILC1 dépendent strictement de T-bet alors que les cellules NK nécessitent le facteur T-box Eomes (Daussy et al. 2014).

Table.4 : Principaux marqueurs phénotypiques des sous populations ILC (Vivier et al. 2018).

	Mouse							Human						
	NK	ILC1	ILC2	LTi	NKp46 ⁻ ILC3	NKp46 ⁺ ILC3		NK	ILC1	ILC2	LTi	NKp44 ⁻ ILC3	NKp44 ⁺ ILC3	
Cell-surface molecules	CD45	+	+	+	Int	+	+	CD45	+	+	++	Int	+	+
	CD127 (IL-7Ra)	^a	^b	+	++	W	W	CD127 (IL-7Ra)	-/+	^b	+	+	+	+
	CD161 (NK1.1)	+	+	-	-	-	-/+	CD161 (NK1.1)	+/-	+	+	+/-	+	+
	ST2 (IL-33R)	-	nd	+/-	nd	nd	nd	ST2 (IL-33R)	+/-	-	+/-	nd	nd	-
	CD278 (ICOS)	W	nd	++	nd	W	W	CD278 (ICOS)	-	nd	+	nd	nd	+
	IL-17Rβ (IL25R)	-	nd	+	-	-	-	IL-17Rβ (IL25R)	-	-	+	-	nd	-
	CD294 (CRTH2)	-	nd	+	nd	nd	nd	CD294 (CRTH2)	-	-	+	-	-	-
	KLRG1	++	-	+	-	-	-	KLRG1	+	-	+	-	-	-
	CD117 (c-kit)	-	+/-	+/-	++	W	W	CD117 (c-kit)	-W	-	+/-	+	+	+
	CD69	^a	+	nd	nd	nd	nd	CD69	W	+/-	nd	nd	nd	nd
	CD254 (RANKL)	nd	nd	nd	+	+	+	CD254 (RANKL)	-	nd	nd	+	+	+
	CD196 (CCR6)	-	nd	-	+	+/-	-	CD196 (CCR6)	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	CD335 (NKp46)	+	+	-	-	-	+	CD335 (NKp46)	+	-	-	-	-W	W+
	CD25 (IL-2Rα)	^d	-W	+	+/-	+/-	+/-	CD25 (IL-2Rα)	+/-	W	+	W	+/-	-W
	MHC-II	-	-	+	+	+	-	MHC-II	+/-	nd	+/-	nd	nd	+/-
	IL23R	-	-	nd	+	+	+	IL23R	+/-	+/-	-W	+	+	+
	IL1Rβ	-	+	nd	+	+	+	IL1R	+/-	+	W	+	+	+
	CD122	+	+	W	-	-	-	CD122	+	nd	nd	-W	W	W
	CD314 (NKG2D)	+	nd	-	-	-	+	CD314 (NKG2D)	+	nd	nd	-	-W	-W
	Ly49	+/-	+/-	-	-	-	-	KIR	+/-	-	-	-	-	-
	CD94	+/-	nd	+/-	nd	-	+/-	CD94	+/-	-	-	-	-	-
	Perforin	+	W	-	-	-	-	Perforin	+	-	-	-	-	-
	CD253 (TRAIL)	-	+	nd	nd	nd	nd	IL12Rβ	+	+	-	-	-	+/-
	Sca-1 (Ly6a)	^d	+	+	-	nd	+	CD194 (CCR4)	nd	+/-	+	nd	nd	nd
	CD49d (Integrin α4β7)	nd	nd	-	nd	+	+	CD56	+	-	-	-W	+/-	+/-
	CD49a (Integrin α1β1)	^a	+	nd	nd	nd	nd	CD183 (CXCR3)	nd	+	nd	nd	nd	nd
	CD90 (Thy1)	+/-	+	+	+	+	+	CD337 (NKp30)	+	+	+	+/-	+/-	+/-
CD160	^f	+	nd	nd	nd	nd	CD336 (NKp44)	^g	-	-	-	-	+	
CD103	^h	-	nd	nd	nd	nd	CD16	+/-	-	-	-	-	-	
CD200R	-	+	nd	nd	nd	nd	NKp80	+	-	nd	nd	nd	nd	
Transcription factors	Tbet	+	+	-	-	+/-	+	Tbet	+	+	-	-	-	
	Eomes	+	+/-	-	-	-	-	Eomes	+	+/-	-	-	-	
	RORγt	-	-	-	+	+	+	RORγt	-	-W	-W	+	+	
	GATA3	-W	-W	+	-W	-W	-W	GATA3	-W	-W	+	-W	-W	
	AhR	-	nd	nd	+	+	+	AhR	-W	W	+	+	+	
RORα	nd	nd	+	nd	nd	nd								

The expression of certain markers varies according to the organs. Int, intermediate expression; W, weak expression; nd, not determined. "+/-" means that expression is detected in some, but not all, cells. ^aNot expressed by NK cells of liver, intestine, skin, uterus, salivary gland, bone marrow, or lymph nodes. Expressed by NK cells in the thymus and in some spleen populations.

^bExpressed by the majority of ILC1, except for liver populations and intraepithelial gut ILC1.

^cExpressed by NK cells of the intestine, uterus, and thymus, but not the spleen and liver.

^dExpressed by activated cells.

^eExpressed by the majority of ILC1, except for tonsil and intraepithelial ILC1.

^fNot expressed by NK cells of the spleen, liver, uterus, or blood. Expressed by NK cells in the gut.

^gNot expressed by liver or spleen NK cells. Expressed by NK cells in the blood.

III.b. Les innate lymphoid cells 2 (ILC2)

Les ILC2 sont définies par leur capacité à produire les cytokines de type 2 IL-4, IL-5 et IL-13 (Moro et al. 2010, Price et al. 2010) et sont résidentes dans les tissus (Gasteiger et al.

2015, Moro et al. 2016). Elles répondent aux cytokines IL-25 et IL-33 et sont impliquées dans la lutte contre les parasites, tels que l'helminthe *Nippostrongylus brasiliensis* et la réparation des tissus endommagés en produisant AREG (amphiréguline; Monticelli et al. 2015). Les ILC2 nécessitent le facteur Gata-3 pour leur développement et leur fonctionnalité (Hoyler et al. 2012, Furusawa et al. 2013, Mjösberg et al. 2012).

Les ILC2 de souris expriment le CD45, l'IL-7R α (CD127), le CD90 (Thy1) et l'IL-2R α (CD25, (Moro et al. 2010, Price et al. 2010). L'expression du récepteur IL-33 (ST2) et du récepteur IL-25 varie en fonction de l'organe. ST2 est exprimée surtout dans le poumon, le foie et le tissu adipeux (Monticelli et al. 2011, Chang et al. 2011, Mchedlidze et al. 2013, Lee et al. 2015), en revanche, l'IL-25R est fortement exprimé par les ILC2 de l'intestin grêle (Schneider et al. 2018).

Les ILC2 humaines, que ce soit dans le sang périphérique ou dans les tissus, expriment sélectivement le récepteur chimiotactique Th2 (CRTH2) et des taux élevés de CD161, ainsi que le CD127 et le CD25 (Mjösberg et al. 2011). Les ILC2 du sang périphérique humain expriment également l'IL-18R α (Simoni et al. 2017). De plus, le facteur de transcription Gata-3 est fortement exprimé par les ILC2 murines et humaines et, par conséquent, il s'agit d'un marqueur utile pour l'identification des ILC2 (Hoyler et al. 2012, Mjösberg et al. 2012).

Les ILC2, la réparation tissulaire et la fibrose

Les ILC2 jouent un rôle important dans la limitation des lésions tissulaires après une infection par la production de ligands pour le récepteur du facteur de croissance épithélial, l'amphiréguline (AREG). En effet, il a été démontré que l'AREG produit par les ILC2 contrôle la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, qui elles sont nécessaires à la

réparation épithéliale après une infection grippale (Monticelli et al. 2011, Zaiss et al. 2015). De même, les dommages tissulaires étendus après la migration et l'expulsion des helminthes conduisent également à la production d'AREG (Monticelli et al. 2015). Il est donc possible que le circuit de signalisation (IL-13 et AREG) qui favorisent la réparation des tissus puissent être dérégulés en présence d'une inflammation chronique et d'un milieu cytokinique altéré pour favoriser les réponses fibrotiques (Mathä et al. 2021). En effet, les ILC2 sont une source pertinente d'IL-5 au début des réponses immunitaires et sont indispensables pour le recrutement des éosinophiles et la programmation des macrophages anti-inflammatoires (Molofsky et al. 2013). Lors d'une lésion musculaire, l'IL-4 dérivée des éosinophiles induit la prolifération de progéniteurs fibro/adipogéniques (FAPs) empêchant leur différenciation en adipocytes. De cette façon, les FAPs soutiennent la myogenèse et la régénération du muscle squelettique 2 (Heredia et al. 2013).

Les ILC2 mémoires

Chez la souris, les ILC2 pulmonaires peuvent acquérir une mémoire immunologique (Martinez-Gonzalez et al. 2016) capables de développer des réponses immunitaires robustes à la stimulation ultérieure par des allergènes ou des cytokines non apparentés. Ils expriment l'IL17rb, une sous-unité du récepteur IL-25 et IL-10 (Seehus et al. 2017). Chez l'homme, les iILC2 mémoires sont caractérisées par l'expression de l'isoforme CD45R (CD45RO) notamment dans le sang périphérique (Gray et al. 1993).

III.c. Les innate lymphoid cells 3 (ILC3)

Les ILC3 sont abondantes au niveau des sites muqueux et sont impliquées dans la réponse immunitaire innée aux bactéries extracellulaires et des commensaux intestinaux (Satoh-

Takayama et al. 2008, Buonocore et al. 2010, Sonnenberg et al. 2012, Rankin et al., 2016). Les ILC3 produisent de l'IL-22, grâce à laquelle elles maintiennent l'homéostasie intestinale et favorisent la prolifération des cellules souches intestinales. De plus, les ILC3 peuvent réguler les réponses adaptatives de type Th17 (Hepworth et al. 2013). Deux sous-populations d'ILC3 peuvent être distingués selon l'expression de marqueur NKp46 (chez la souris) et NKp44 (chez l'homme) (Luci et al. 2009, Cupedo et al. 2009, Sanos et al. 2009), ce sont les NCR^{+/-} ILC3. Les ILC3 murines et humaines peuvent produire du GM-CSF. Chez la souris, les NKp46⁺ ILC3 dépendent de Tbet et peuvent produire de l'IFN- γ (Klose et al. 2013, Rankin et al. 2013).

Les ILC3 et la réparation tissulaire

Pour être réparé, un tissu doit être nettoyé des microbes, des cellules mourantes et des débris, les ILC1 et ILC3 sont nécessaires pour procéder à la réparation avant que le tissu ne puisse retourner à l'homéostasie (Figure.9). En effet, l'IL-22, produite principalement par les ILC3, induit les cellules épithéliales à exprimer des peptides antibactériens tels que Reg3 γ et Reg3 β , ainsi que des protéines antivirales via le renforcement de la signalisation de l'interféron- λ (Hernández et al. 2015) alors que l'absence constitutive d'IL-22 augmente le cancer colorectal induit par l'inflammation (Huber et al. 2012), l'effet favorisant la prolifération de l'IL-22 sur les cellules épithéliales peut également soutenir la progression du cancer du côlon (Kirchberger et al. 2013, Hernandez et al. 2018).

Les Cellules LTi

Les cellules LTi sont cruciales pour la formation des ganglions lymphatiques secondaires et des plaques de Peyer au cours du développement embryonnaire, par l'action de la

lymphotoxine (Mebius et al. 1997). Ces cellules expriment c-Kit et CCR6, mais pas les NCR. Comme les ILC3, ils sont strictement dépendants de ROR γ t.

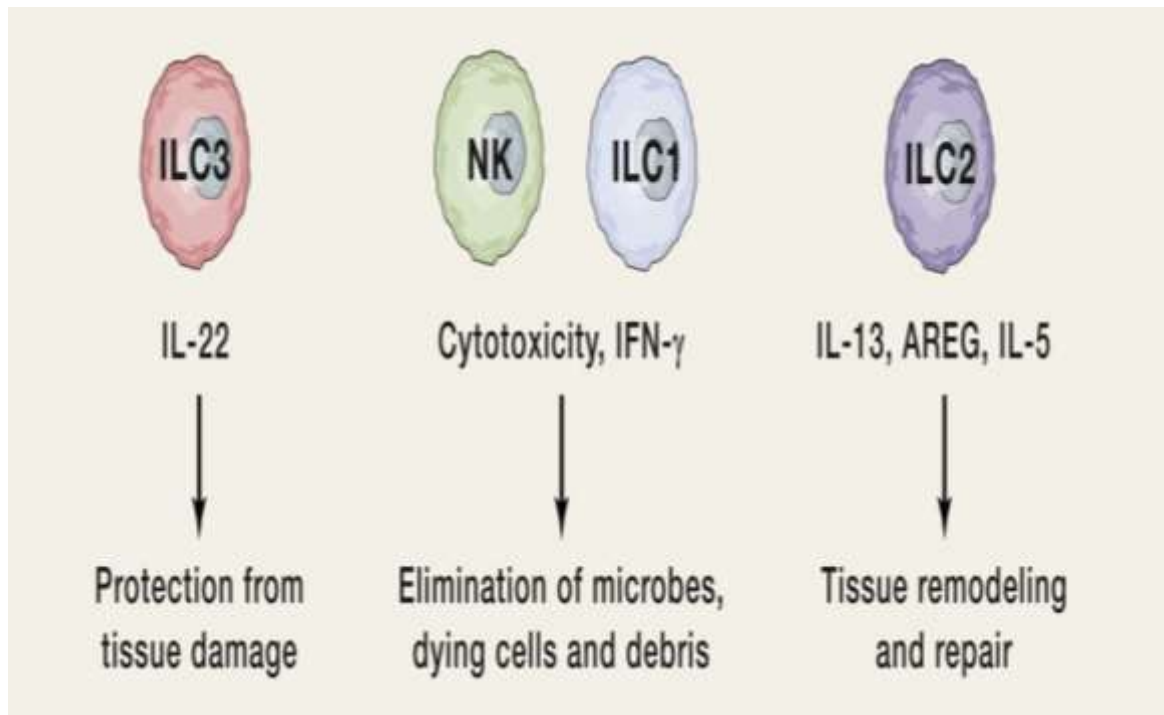


Figure.9 : Rôle des ILC dans la réparation tissulaire (Vivier et al. 2018)

III.d. Regulatory ILC (ILC Regs)

Récemment, une nouvelle sous population ILC a été identifiée, il s'agit d'ILC productrices d'IL-10 appelés Regulatory ILC (ILCregs) (Golebski et al. 2021, Morita et al. 2019, Wang et al. 2017). Les ILC Regs expriment un facteur de transcription distinct qui est l'ID3 (inhibiteur de la liaison à l'ADN 3), de plus, la signalisation du facteur de croissance autocrine transformant bêta (TGF- β) est importante pour leur développement (Wang et al. 2017).

IV. Plasticité des ILC

Une fois que les progéniteurs des ILC (ILCP) et les ILC matures pénètrent dans les tissus, elles semblent y résider et proliférer localement (Gasteiger et al. 2015, Kim et al. 2016). Dans le tissu, l'ILCP se différencie en sous-populations d'ILC en fonction de l'environnement tissulaire. Par ailleurs, on dit que les ILC sont plastiques, ce qui signifie qu'ils peuvent se convertir en d'autres sous-types d'ILC en réponse aux cytokines environnementales (Fig. 8). Ainsi, la stimulation des ILC3 ROR γ t⁺ avec de IL-12 et IL-15 augmente leur expression de T-bet et d'IFN γ , ce qui est caractéristique des ILC1 (Bernink et al. 2015, Montaldo et al. 2015). De plus, les ILC1 peuvent également être transformées à la fois in vivo et in vitro en ILC3 par IL-2, IL-1 β et IL-23 (Bernink et al. 2015). Il existe aussi une plasticité réversible similaire entre les ILC2 et les ILC1, les ILC2 stimulées in vitro par l'IL-12 présentent une expression accrue de T-bet et d'IFN γ , ce qui est inversé par l'IL-4 (Bal et al. 2016, Lim et al. 2016, Silver et al. 2016). Cette plasticité ILC met en évidence la capacité des ILC à communiquer avec les autres cellules du micro-environnement tissulaire et à s'adapter.

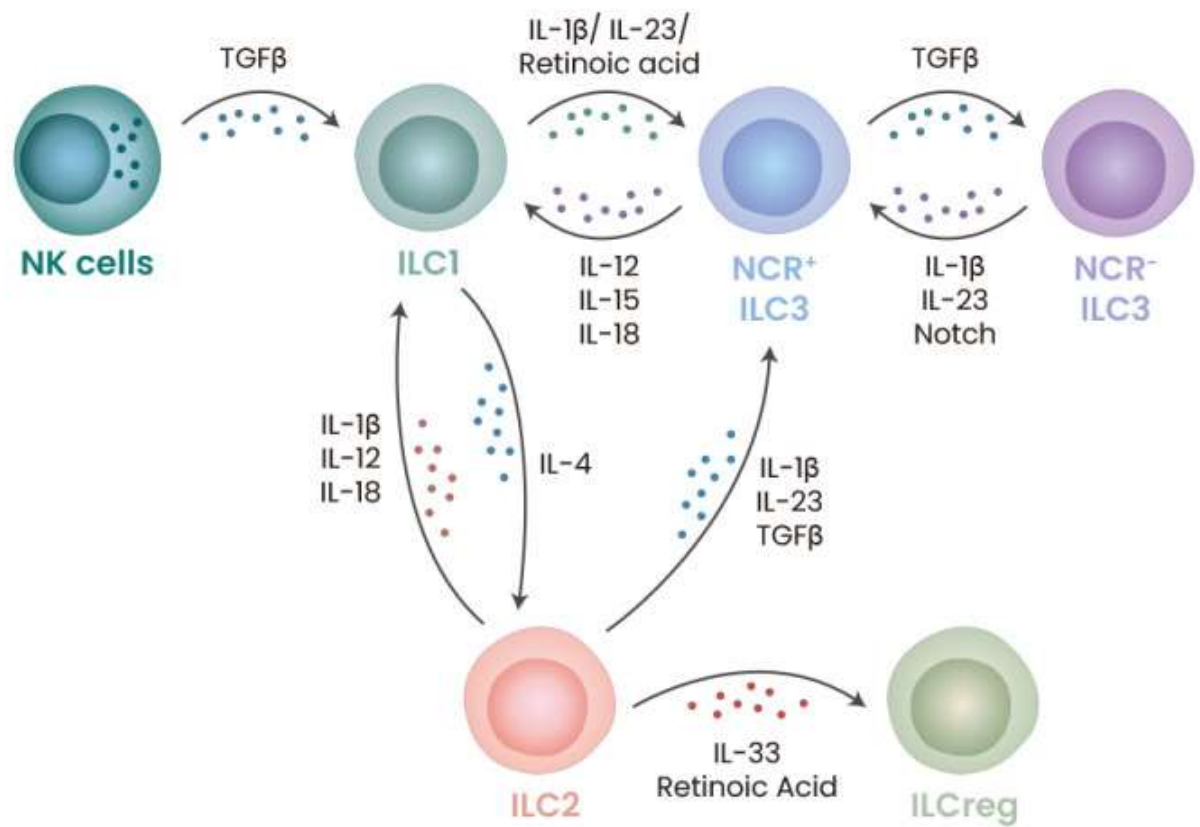


Figure.8: Plasticité des ILC.

Les ILC présentent une plasticité qui peut basculer entre des sous-populations pour s'adapter rapidement aux changements de l'environnement. La plasticité des ILC1, ILC2 et ILC3 dépend des signaux du microenvironnement tissulaire, principalement des cytokines (Kim et al. 2021)

Objectifs et hypothèses

Durant cette thèse, nous avons abordé les infiltrats leucocytaires au cours de différents processus myopathiques; les processus myopathiques inflammatoires et les processus de nécrose – régénération. Le rôle des macrophages dans la nécrose- régénération myocytaire aigüe a été et est toujours très étudié. Les autres populations leucocytaires n'ont été que peu étudiées, comme par exemple les lymphocytes T (implication des lymphocytes T CD8⁺ dans les dystrophies musculaires) .L'implication de cellules de l'immunité innée et adaptative n'a jamais été étudiée. Un résultat préliminaire obtenu durant mon stage de master a été la mise en évidence de la présence d'un petit contingent de cellules NK parmi les infiltrats leucocytaires (2% des leucocytes) dans les muscles dystrophiques de souris *Bla/J* et souris *Sgca*. Les cellules NK sécrétant de l'IFN γ , elles pourraient intervenir dans l'activation des macrophages pro-inflammatoires. De même, les cellules de l'immunité innée ILC2, connues pour avoir un rôle dans la réparation tissulaire, pourraient intervenir dans la régénération post myonécrose. L'objectif de cette thèse est triple :

Objectif 1 : Optimiser la méthode de phénotypage des leucocytes intramusculaires par cytométrie en flux

Les leucocytes sont impliqués de manière cruciale dans la réparation post lésionnelle du muscle squelettique et dans la physiopathologie des myopathies inflammatoires et dysimmunitaires. La caractérisation des processus immunopathologiques nécessite un phénotypage précis des cellules immunitaires intramusculaires, ce qui ne peut pas être réalisé de manière optimale par les approches immunohistochimiques conventionnelles. La cytométrie en flux (CMF) est la technique la plus fiable pour analyser les sous-populations

leucocytaires et évaluer leurs niveaux d'activation, cependant les protocoles classiques d'extraction cellulaire basés sur la digestion enzymatique peuvent fausser les résultats en lysant les molécules de surface cellulaire. L'hypothèse est qu'un protocole purement mécanique d'extraction des cellules mononuclées du tissu musculaire pourrait permettre une meilleure caractérisation des cellules leucocytaires qu'un protocole enzymatique.

Notre protocole optimisé de phénotypage des leucocytes intramusculaires pourrait permettre d'étudier précisément les cinétiques de recrutement des sous populations leucocytaires dans les situations de myonécrose aiguë et de muscles dystrophiques

Méthodes : Etudes in vivo sur des modèles murins de myonécrose aiguë et de dystrophies musculaires, comparaison d'une méthode d'extraction purement mécanique des leucocytes à la classique technique enzymatique sur des muscles de souris dystrophiques. Analyse par cytométrie en flux des suspensions cellulaires et comptage immunohistochimiques.

Objectif 2: Etude du recrutement intramusculaires lymphocytes T et NK et description de l'index « Intra Muscular Inflammation (IMI-index) » permettant de détecter un enrichissement intramusculaire en lymphocytes TCD8⁺

L'enrichissement intramusculaire en lymphocytes TCD8⁺ ainsi que la diminution du taux de lymphocytes TCD4⁺ est décrit par immunohistochimie dans les biopsies musculaires de myopathies inflammatoires et dysimmunitaires. L'hypothèse est que le calcul du ratio $[mCD4^+T/CD8^+T] / [bCD4^+T/CD8^+T]$ que nous avons appelé « IntraMuscular Inflammation (IMI) index » permet d'éviter le biais induit par les variations de répartition des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang.

Méthodes : Extraction mécanique des leucocytes intramusculaires, prélèvement de sang total. Analyse cytométrique des populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺. Calcul des ratios muscle (m) CD4⁺/CD8⁺ Et sang (b) CD4⁺/CD8⁺.

Objectif 3: Mettre en évidence et analyser la cinétique de recrutement des cellules lymphoïdes innées ou innate lymphoid cells dans le muscle

Les innate lymphoid cells (ILC) ou cellules lymphoïdes innées sont des cellules de l'immunité innée qui sont les contreparties innées des lymphocytes T. Les ILC sont en grande partie des cellules résidentes dans les tissus, elles agissent tôt dans la réponse immunitaire en réagissant rapidement aux signaux et aux cytokines inductrices, exprimées par les cellules résidentes dans les tissus. La découverte et l'étude des ILC au cours des dernières décennies ont changé la perception de la régulation immunitaire. Des résultats préliminaires avaient mis en évidence la présence de cellules NK dans les muscles lésés par des injections de chlorure de barium. L'hypothèse est que les ILC sont impliqués dans le processus de nécrose-régénération musculaire et dans les processus inflammatoires des myopathies dysimmunes.

Méthodes : Extraction mécanique des leucocytes au niveau de muscles de modèles murins de myonécrose aigue et de dystrophies musculaires. Extraction leucocytaire de biopsies Humaines. Analyse des cinétiques de recrutements des ILC par cytométrie en flux et études immunohistochimiques.

Aucune étude n'avait recherché la présence des ILC dans les muscles, que ça soit dans les modèles murins ou dans les biopsies de pathologies musculaires Humaines. Nous avons abordé cette question en mettant au point des panels d'anticorps permettant de rechercher les différentes sous populations d'ILC dans les muscles de souris et dans les muscles de biopsies Humaines

Résultats

Publication 1 : Stratégie de phénotypage des leucocytes intramusculaires par cytométrie en flux

Présentation du sujet

Le phénotypage des cellules immunitaires intramusculaires est essentiel pour la caractérisation des myopathies inflammatoires et dysimmunitaires (DIM). La cytométrie en flux (CMF) est la technique la plus fiable pour analyser les sous-populations de leucocytes et l'évaluation de leurs niveaux d'activation.

Dans ce travail, Nous avons développé un protocole d'extraction cellulaire purement mécanique, qui permet de préserver les épitopes de surface cellulaire et nous avons évalué son applicabilité dans le contexte de pathologies murines et pour le diagnostic myopathologique chez l'homme.

*Des souris *Bla/J* (n=10) qui représentent le modèle murin de la dystrophinopathie ont été utilisées pour comparer les deux méthodes d'extraction des cellules mononuclées; la méthode enzymatique et la méthode purement mécanique chez la souris.*

La cohorte de patients utilisée pour la comparaison des deux méthodes d'extraction cellulaire comporte des patients avec une myopathie inflammatoire et dysimmunitaire DIM : n=9 et des patients avec des conditions non immunitaires NIC: n=7,

Dans le cadre de cette publication où je suis 1^{ère} auteure, j'ai réalisé les extractions des cellules mononuclées, les marquages des leucocytes, l'analyse des résultats de cytométrie en flux, la création des figures et la rédaction de la publication.


Article sous presse dans *J. NeuropatholExpNeurol*

Optimized flow-cytometry strategy for phenotyping intramuscular leucocytes:

Application to the evaluation of myopathological processes.

SAIDJ Tassadit, BABA AMER Yasmine, PLONQUET Anne, HENRY Adeline,
SOUVANNANORATH Sarah, RELAIX Frederic, BELDI-FERCHIOU Asma, AUTHIER
François Jérôme

Optimized Flow Cytometry Strategy for Phenotyping Intramuscular Leukocytes: Application to the Evaluation of Myopathological Processes

Tassadit Saidj, MD, Yasmine Baba Amer, AE, Anne Plonquet, MD, PhD, Adeline Henry, Ass Eng, Sarah Souvannanorath, MD, Frederic Relaix, PhD, Asma Beldi-Ferchiou, MD, PhD, and François Jérôme Authier  MD, PhD

Abstract

Phenotyping intramuscular immune cells is essential for the characterization of dysimmune/inflammatory myopathies (DIM). Flow cytometry (FC) is the most reliable technique for analyzing leukocyte subpopulations and evaluating their activation levels. We developed a purely mechanical protocol for extracting cells from muscle tissue allowing us to preserve cell surface epitopes and determined its applicability to experimental pathology in mice and myopathological diagnosis in human. Skeletal muscle regeneration in mice was associated with a transient enrichment of macrophages (CD11b^{high}Gr-1⁺), myeloid dendritic cells (CD3⁻CD8⁺CD11b^{high}), CD8⁺ T cells (CD3⁺CD8⁺), and NK cells (CD3⁻CD11b^{high}NKp46⁺). In murine models of inherited muscle dystrophies, leukocytes represented 23%–84% of intramuscular mononuclear cells, with a percentage of CD8⁺ T cells (4%–17%) mirroring that of all CD45⁺ cells, while MDCs remained a minority. In human 16 samples (DIM: n = 9; nonimmune conditions: n = 7), DIM was associated with intramuscular recruitment of CD8⁺ T cells, but not CD4⁺ T cells and NK cells. FC allowed concomitant quantification of HLA-DR, CD25, CD38, and CD57 activation/differentiation biomarkers and showed increased activation levels of CD4⁺ and CD8⁺

T cells in DIM. In conclusion, FC is an appropriate method for quantifying intramuscular leukocyte subpopulations and analyzing their activation states.

Key Words: Flow cytometry, Inflammatory myopathy, Lymphocytes, Muscular dystrophy, Myofiber necrosis, Myopathy.

INTRODUCTION

Dysimmune and inflammatory myopathies (DIM) form a group of acquired diseases affecting skeletal muscle. Their characterization is based on the accurate delineation of immunopathological processes at work, including the phenotyping of intramuscular immune cells (1–3). Among the cell populations present in normal adult skeletal muscle tissue, leukocytes represent a low percentage and are mainly resident macrophages (4). In pathological conditions, myofiber necrosis induces marked leukocyte recruitment (5). Indeed, following an early, transient recruitment of neutrophils, myeloid mononuclear cells that are mainly derived from a pool of circulating monocytes infiltrate the injured tissue. Most recruited leukocytes are macrophages, with an initial proinflammatory, or M1 phenotype. These proinflammatory macrophages are required for the efficient clearance of apoptotic or necrotic cells and debris; a subsequent population of anti-inflammatory, or M2-type, macrophages have specific proregenerative functions such as matrix remodeling and promotion of angiogenesis (6). Lymphocytes also accumulate in skeletal muscle after acute injury, as well as in chronic muscle dystrophies related to dystrophin (5), dysferlin (7), and sarcoglycan (8) deficiencies. The function of intramuscular lymphocytes is poorly understood, although both CD4⁺ and CD8⁺ T cells seem to play a role in the pathological features of dystrophinopathies (9). In addition, CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells accumulate in acutely injured skeletal muscle and are required for the completion of postinjury muscle repair (6).

Flow cytometry (FC) is the standard technique for phenotyping and quantifying leukocyte subpopulations. Current multichannel devices allow the parallel analysis of up to 20

From the Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Relaix, Créteil, France (TS, YBA, SS, FR, FJA); AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Laboratoire d'Immunologie Biologique, Créteil, France (AP, AB-F); Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Plateforme de Cytométrie en flux, Créteil, France (AH); Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Cohen, Créteil, France (AB-F); and Département de Pathologie, APHP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Centre de Référence des Maladies Rares Neuromusculaire Nord/Est Ile-de-France, ERN Euro-NMD, Créteil, France (SS, FJA).

Send correspondence to: François Jérôme Authier, MD, PhD, Département de Pathologie, Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP), 51, Av. du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, France; E-mail: francois-gerome.authier@aphp.fr.

This work was funded by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), Pole Transmuscle (project number 19507), and RHU CARMMA. T.S. benefited from a fellowship from AFM (grant number 19507).

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

Supplementary Data can be found at academic.oup.com/jnen.

different cell membrane markers, compared with the restricted number of markers (usually <4) that can be evaluated by immunohistochemical techniques performed on tissue sections. The FC analysis of intramuscular leukocytes requires the extraction of a sufficient number of mononuclear cells, with preserved cell membrane markers. Most studies investigating intramuscular leukocytes use enzymatic digestion to optimize cell extraction output because of the large quantity of connective tissue within skeletal muscle (10, 11). However, the use of enzymes may alter or suppress surface molecule expression (12), and therefore could distort FC results. In addition, skeletal muscle is a highly vascularized tissue, necessitating the elimination of blood from samples before subjecting them to cell extraction to avoid any contamination. In experimental conditions, it is possible to perfuse animals with solutes to remove intravascular blood before death and sampling (9), an approach inappropriate for human samples.

In the present work, we developed a protocol for FC analysis of intramuscular leukocytes including manual draining of tissue blood and purely mechanical dissociation of muscle tissue. Compared with standard enzymatic digestion, our procedure increased leukocyte extraction output and preserved their surface markers expression, thereby improving the discrimination of subpopulations. In the context of myopathological processes, this technique is highly useful for analyzing intramuscular lymphocytes subpopulation phenotypes and activation states.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Approval and Consent to Participate

Experiments conducted in animals have been formally approved by the animal steering committee and ethical committee (ComEth) of the Mondor Institute of Biomedical Research (IMRB) (authorization APAFIS number 13472-2018030914428353v3). In accordance with current French legislation and hospital research ethics committee (Approval number 12-009 at CPP/IRB Ile-de-France IX), patients gave their written informed consent for their participation in research.

Animal Models

One- to 6-month-old mice of different genotypes were used, normal or transgenic: (1) wild-type mice C57BL/6 J; (2) dysferlin-deficient *Bla/J* mice, in which the progressive muscular dystrophy (*prmd*) allele from the *A/J* inbred strain, an ETn retrotransposon (5–6 kb) inserted in the intron 4 of dysferlin gene, is crossed onto the C57BL/6 genetic (13); and (3) α -sarcoglycan-deficient *Sgca* C57BL/6 mice, in which exons 2 and 3 of the α -sarcoglycan gene were replaced by a neomycin resistance cassette (14). *Bla/J* and *Sgca* mice are mouse models of limb girdle muscle dystrophy-type 2B and D, respectively. In both models, skeletal muscle changes are typically characterized by ongoing muscle myofiber necrosis and regeneration, leukocyte recruitment, myofiber atrophy, and fibrosis, with first muscular changes being detectable by 1 week and 2 months of age in *Sgca* and *Bla/J*, respectively. Animals were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All

the experiments were carried out per French and European Community guidelines.

Experimental Muscle Injury

For muscle injury, WT mice were anesthetized with 80 mg/kg Ketamine and 20 mg/kg xylazine, and the left tibialis anterior (TA) muscles were injected with 50 μ L barium chloride (1.2% BaCl₂ in PBS) (15). Noninjected right TA muscles were used as controls. TA muscles were dissected at 1-, 3-, 5-, and 7-day postinjection (DPI).

Skeletal Muscle Sampling in Animals and Intramuscular Leukocyte Extraction

Mice were killed by cervical dislocation. One forelimb muscle (*Biceps brachii*), and hindlimb muscles, that is, *Psoas*, *Gluteus maximus*, *Gluteus medius*, *Quadriceps femoris*, *Semimembranosus* and *Semitendinosus*, *Sartorius*, *Gastrocnemius*, *Soleus*, *TA*, and *Extensor digitorum longus* muscles were dissected for *Bla/J* and *Sgca* models. TAs were dissected for the myonecrosis model. Muscles were kept in a wet gauze pad and weighed. Samples dedicated to histology were snap frozen at -80°C in nitrogen-cooled isopentane as described (2). Hematoxylin and eosin stain and immunofluorescence techniques were performed on 7- μm cryosections. Samples dedicated to cytology were carefully and repeatedly rinsed with 0.9% NaCl to eliminate most of the blood. Then, muscle samples were subjected either to mechanical dissociation or enzymatic digestion. In case of mechanical dissection, muscle samples were minced with a microscissor or scalpels, then gently crushed with a syringe plunger, and collected in 20 mL of RPMI 1640 Medium GlutaMAX (ThermoFisher Scientific Life Technologies SAS; Les Ulis, France). The cell suspension was filtered at 100, 70, and 40 μm successively then centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. In case of enzymatic digestion, we added a step of incubation (2 h, 37°C) with collagenase A (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma Aldrich [Saint-Quentin-Fallavier, France] number 10103578001) and dispase II (12 U/mL; Sigma Aldrich number D4693-1G). The specific effects of enzymes on cell surface markers were evaluated by performing experiments with inactivated enzymes (2-hour incubation at 4°C for collagenase, addition of EDTA 1 mM for dispase II). Obtained cell pellets were subjected to cytocentrifugation and immunocytochemical techniques, or to FC. For cytocentrifugation, cell pellets were recovered in 600 μL bovine serum albumin (BSA)/RPMI 1640 Medium GlutaMAX 0.2%/PFA 2%, then subjected to cytocentrifugation (500 rpm for 15 min, Cytospin).

Immunofluorescence Analysis of Leukocyte Subpopulations

Immunofluorescence labeling of CD45, CD8, and CD11b was performed on muscle cryosections or cytocentrifugation smears following the same protocol. After fixation (PFA 2%, 5 minutes at room temperature (RT)), slides were washed 3 times with PBS and blocked with 10% BSA (Sigma Aldrich A7906-100G) in PBS for 30 minutes at RT. For

CD11b and CD8 slides, cells were incubated with Avidin Block (ThermoFisher, 004303) for 10 minutes, washed 2 times with PBS, then incubated with Biotin Block for 10 minutes. The following primary antibodies diluted 1:50 in PBS were used: Rabbit antimouse CD45 (abcam10558; Cambridge, UK), rat antimouse CD8 (abcam22378) and rat-antimouse CD11b (BIO-RAD MCA 711; Marnes-la-Coquette, France). The incubation was performed overnight at 4°C. Secondary antibody incubation was performed for 1 hour at RT; biotinylated antirat 1:200 (Vector Laboratories, BA9400; Burlingame, CA), or Cy3-Donkey antirabbit 1:200 (Jackson IR, 711-006-152; Ely, UK). For CD11b- and CD8-stained sections, streptavidin-FITC (BD Pharmingen, 54060; Allschwil, Switzerland) was added at 1:100 for 30 minutes at RT, and DAPI staining (Hoechst, Romainville, France) was performed for 10 seconds. Slides were mounted using Vectashield Mounting Medium. Images were acquired using a Zeiss (Versailles, France) microscope and Axio vision 4.0 software.

FC Protocol for Mouse CD45⁺ Cells, CD8 T Cells, CD4⁺ T Cells, and CD11b⁺ Cells: Analysis and Quantification

The following fluorochrome-conjugated antibodies directed against different cell surface markers were used: PE anti-CD45 (clone 30-F11), FITC anti-CD3 (clone 17A2), FITC anti-CD8 (clone 53-6.7), APC anti-CD11b (clone M1/70), APC anti-Gr-1 (clone RB6-8C5), and cell viability was ensured by using 7-AAD viability staining solution (all from BioLegend, San Diego, CA). The obtained cell pellet was recovered in 0.2% BSA/RPMI-GlutaMAX. After blocking non-specific Fc-mediated interactions with 0.5 µg/100 µL antimouse CD16/CD32, for 15 minutes at 4°C, the cell suspension was aliquoted (100 µL per tube) and the recommended quantity of each primary antibody was combined with an appropriate volume of 0.2% BSA/RPMI-GlutaMAX for a final staining volume of 100 µL for each tube. The incubation was performed for 30 minutes at 4°C protected from light. Cells were washed by adding 1 mL of 0.2% BSA/GlutaMAX in each tube, then centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the cell pellet recovered in BSA/RPMI GlutaMAX, 400 µL for each tube.

To subtract autofluorescence from analysis, unlabeled cells, and fluorescence-minus-one controls were used to determine positive and negative thresholds. Leukocytes were first gated on live CD45⁺ singlets and subsequently the different subpopulations were identified according to the relevant markers. Data were collected on a 14-color LSR Fortessa (BD Biosciences).

FC Protocol for Mouse Satellite Cells and Fibroadipogenic Progenitor Cells: Analysis and Quantification

The previous protocol was used to analyze satellite cells (SCs) and fibroadipogenic progenitor (FAP) cells with mechanical and enzymatic methods, and the following fluorochrome-conjugated antibodies directed against different cell surface markers were used: PECY7 anti-CD45 (clone 30-

F11), PECY7 anti-TER119 (clone TER-119), BV421 anti-CD34 (clone RAM34), PE anti-SCA1 (clone D7), A700 anti-α integrin-7 (clone FAB3518N), and APC anti-CD140 (clone APA5). Data were collected on a 14-color LSR Fortessa (BD Biosciences).

Human Samples (Blood and Muscle)

Blood and muscle samples were obtained from 16 patients undergoing muscle biopsies for diagnostic purposes in Henri Mondor Reference Center for Neuromuscular Diseases. The routine diagnostic classification of patients combined clinical and histopathological data. In particular, European Neuromuscular Centre (ENMC) criteria were used to diagnose dermatomyositis, immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) and inclusion body myositis (IBM), and Troyanov classification was used to diagnose overlap myositis (OM) (29). Based on clinicopathological criteria, patients were classified as DIM or noninflammatory condition (NIC). The study was carried out per current French and European Community regulations (Henri Mondor Biological Resource Platform: registration number DC-2009-930, French Ministry of Research; approval by the *Comité de Protection des Personnes* [CPP]/IRB Ile de France-IX, March 12, 2012).

FC Protocol for Human Samples (Blood and Muscle)

FC protocols require the use of fresh muscle tissue. Seven muscle samples were used to compare mechanical dissociation and enzymatic digestion techniques following the protocol described above. Other samples were subjected to mechanical dissociation only. After mechanical dissociation or enzymatic digestion of muscle biopsies, cells were collected in flow cytometer tubes in RPMI-GlutaMAX with 2% BSA (100 µL of the cell suspension/tube). Cells were then immediately incubated in the dark for 30 minutes at 4°C with a mix of the following antibodies: Kro anti-CD45 (clone J.33), ECD anti-CD3 (clone UCHT1), PB anti-CD4 (clone L3B8.2), and APC-Alexa700 anti-CD8 (clone B9.11) (all from Beckman Coulter, Villepinte, France). Viability was assessed using 7-AAD Viability Dye. In some cases, staining with the following antibodies was also performed: PCy7 anti-CD19 (clone J3-119), PE anti-CD56 (clone N901), PCy7 anti-CD4 (clone SFCH12T4D11), FITC anti-CD57 (clone NC1), PB anti-HLADR (cloneImmu-357) or its PB IgG1 isotype control, PE anti-CD38 (cloneLS198-4-3) or its PE IgG1 isotype control (all from Beckman Coulter), and APC anti-CD25 (clone 2A3) or its APC IgG1k isotype control (both from BD Biosciences, Allschwil, Switzerland). Samples were then washed in PBS with 2% BSA and immediately acquired using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter).

Blood samples were simultaneously collected in EDTA tubes and shipped at RT. Immunostaining was performed on 100 µL of fresh whole blood and incubated in the dark for 10 minutes at RT with the same mix of antibodies used for muscle analysis. Red blood cell lysis was then performed using VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Finally, samples were

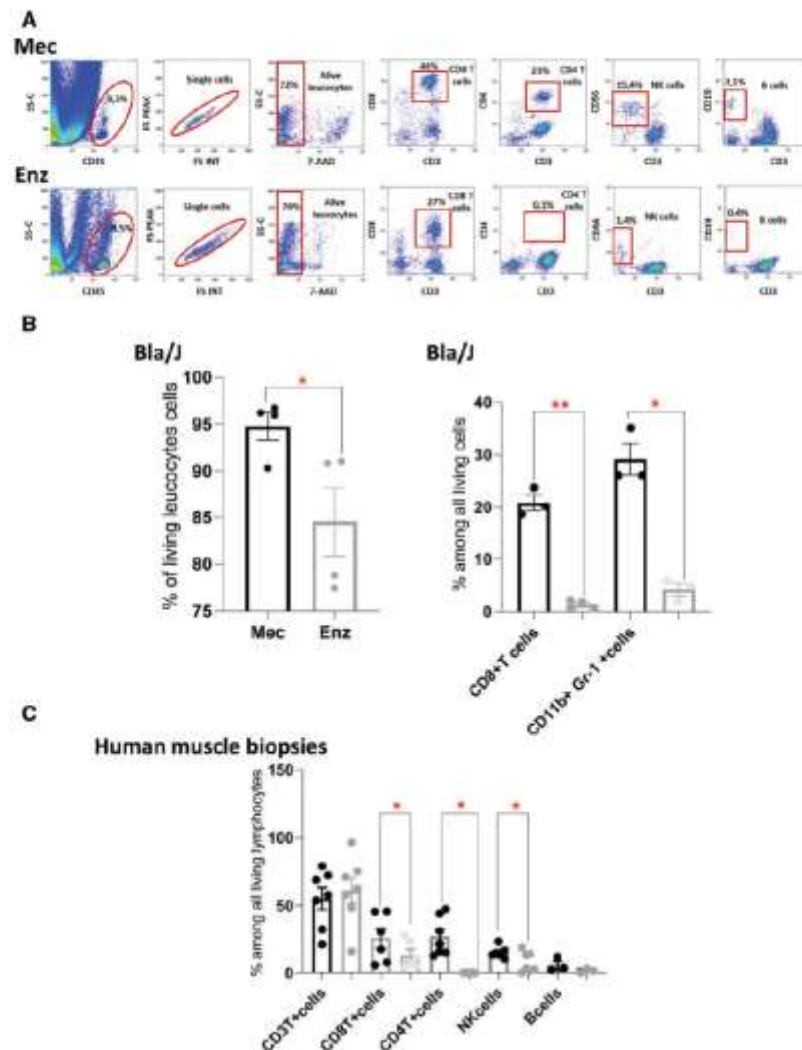


FIGURE 1. Intramuscular leukocyte detection comparing mechanical dissociation and enzymatic digestion techniques in muscle biopsies. **(A)** Representative panel of FC intramuscular lymphocyte detection using either mechanical dissociation (upper panel) or enzymatic digestion (lower panel). Lymphocytes were gated on viable singlet SS-C low CD45⁺ cells. CD8⁺ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ cells, T CD4⁺ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ cells, NK cells were identified as CD45⁺ CD3⁻ CD56⁺ cells and B cells were identified as CD45⁺ CD3⁻ CD19⁺ cells. Statistical dot plots representing the percentage of each studied population obtained with either mechanical dissociation (in black) or enzymatic digestion (in gray) in the Bla/J mouse model **(B)** and human biopsies **(C)**. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, Wilcoxon paired test ($n = 7$ /condition).

washed in PBS with 2% BSA and immediately acquired using the 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter). All the obtained data were analyzed with Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter). Lymphocytes from blood and muscle

samples were gated according to high-CD45 fluorescence intensity and low side scatter intensity; CD4⁺ T cells were defined as CD3⁺CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ T cells as CD3⁺CD8⁺ lymphocytes, NK cells as CD3⁻CD56⁺ lympho-

TABLE 1. Comparison of Mechanical and Enzymatic Leukocyte Extraction Methods

	Murine Mec	Murine Enz	Human Mec	Human Enz
CD45 ⁺ cells	94.78 ± 3.0%	84.50 ± 7.40%	0.52 ± 0.86%	3.80 ± 4.0%
CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ cells	30.6 ± 6.40%	4.16 ± 2.1%		
CD4 ⁺ T cells			26.62 ± 14.40%	Undetectable
CD8 ⁺ T cells	20.8 ± 2.60%	1.28 ± 0.80%	25.39 ± 17.90%	12.27 ± 10.07%
NK cells			14.95 ± 4.06%	7.52 ± 7.37%
Satellite cells	0.25 ± 0.16%	2.70 ± 0.46%	2.0 ± 1.90%	4.50 ± 7.70%
FAPS cells	0.17 ± 0.07%	3.40 ± 2.0%		

FAPS, fibro/adipogenic progenitors; Enz, enzymatic; Mec, mechanical.

cytes and B cells as CD19⁺ lymphocytes. When indicated, the expression of CD38, HLA-DR, CD25, and CD57 was studied on CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells (Supplementary Data Fig. S3). The corresponding isotype controls were used to set the threshold of expression. SCs were gated according to CD45⁻ cells and were defined as CD45⁻CD56⁺ cells. In addition, we analyzed the effect of different enzymes on the surface markers: collagenase A + dispase II, liberase (Liberase TL Research Grade, Roche, Mannheim, Germany) and Liberase + dispase II. The blood of 3 patients was incubated with 1 of the 3 enzyme mixes and then immediately incubated in the dark for 30 minutes at 4°C with a mix of the following antibodies: Kro anti-CD45 (clone J33), ECD anti-CD3 (clone UC11), PB anti-CD4 (clone 13B8.2), and APC-Alexa700 anti-CD8 (clone B9.11) PCy7 anti-CD19 (clone J3-119), PE anti-CD56 (clone N901) (all from Beckman Coulter). Viability was assessed using 7-AAD staining solution (ab228563) and acquired using 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter).

Statistics

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism V7 software (La Jolla, CA) with an α error of 5%. Significantly different values are indicated on graphs by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. Bartlett test allowed us to determine the equality of variances between groups. One-way ANOVA was used when there were more than 2 groups, followed by a Tukey post hoc test in the case of equal variances or by a Dunnett test if the variances were unequal. The Student test was used to compare 2 groups. For human samples, nonparametric paired Wilcoxon test and Mann-Whitney test were used to compare FC data.

RESULTS

Mechanical Tissue Dissociation Improves the Reliability of Intramuscular Mononuclear Cell Analysis Compared with Enzymatic Digestion

To establish a reliable protocol for analyzing intramuscular leukocytes by FC, we used the Bla/J strain, a mouse model of muscular dystrophy characterized by abundant intramuscular leukocyte infiltration. In 3-month-old Bla/J mice, the total number of mononuclear cells extracted by mechanical dissociation of all sampled muscles was $6.19 \pm 0.38 \times 10^6$

versus $4.13 \pm 1.01 \times 10^6$ with the enzymatic method, corresponding to an output of 4.12 ± 0.25 and $2.75 \pm 0.67 \times 10^6$ cells per gram of muscle tissue, respectively ($p = 0.02$). Immunofluorescence performed on cytocentrifugation smears showed that leukocytes consisted mainly of macrophages (CD11b⁺), with a CD8/CD45 ratio of 0.35 with mechanical dissociation versus 0.01 with enzymatic digestion ($n = 3$; $p < 0.001$) (data not shown).

FC analysis showed that the percentage of leukocytes (CD45⁺) among living cells was 94.78% with mechanical extraction versus 84.50% with enzymatic digestion (Fig. 1; Supplementary Data Fig. S1). Moreover, with the mechanical method, the proinflammatory M1 macrophages and CD8⁺ T cell subpopulations (CD11b⁺Gr-1⁺ cells and CD3⁺CD8⁺, respectively) were better discriminated than with the enzymatic digestion method. The proportion of CD11b⁺Gr-1⁺ was 30.6% of CD45⁺ cells with the mechanical method but 4.16% with the enzymatic one (Fig. 1B, left). Similarly, CD3⁺CD8⁺ T cells represent 20.8% and 1.28% of CD45⁺ cells with mechanical and enzymatic methods, respectively (Fig. 1B, right). The staining index (SI) is calculated as the difference between the mean fluorescence intensity (MFI) of the positive and negative populations, divided by 2 times the standard deviation of the negative populations (12). The higher the index, the better the discrimination of the positive population. With the mechanical method, the SI of the CD3⁺CD8⁺ T population was 32.9 versus 3.99 with the enzymatic method; similarly, the SI of the CD11b⁺Gr-1⁺ population was 41.0 with the mechanical method versus 21.8 with enzymatic digestion (Supplementary Data Fig. S1C).

The cell yield was better with the enzymatic digestion for SCs and FAP cells as assessed by the percentages of CD34⁺Sca1⁻ α 7 integrin⁺ cells (SCs) and CD34⁺Sca1⁺CD140⁺ cells (FAPs) among CD45⁺ TER119⁻ living cells in mice and CD45⁻CD56⁺ cells (SCs) in human (Table 1; Fig. 2A).

Enzymes used for tissue digestion (collagenase A, dispase II) affected cell surface markers and therefore may distort FC results. CD45 molecules were resistant to enzymatic digestion (93.3% with inactivated enzymes versus 90.3% with fully active enzymes). A marked distortion was observed with CD8 since the percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells among living CD45⁺ cells dropped from 25% to 8.90% when enzymes were not inactivated. In human muscles, mechanical dissociation displayed a better output for the overall number of mononu-

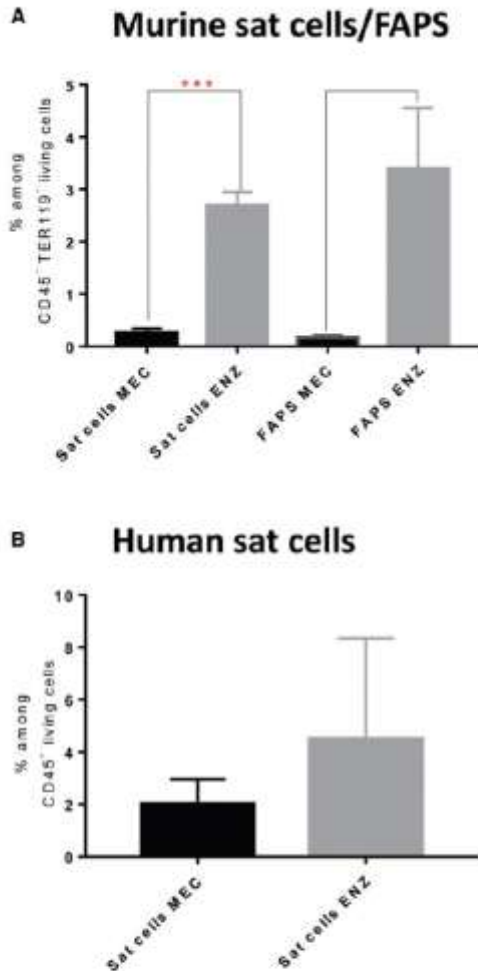


FIGURE 2. (A, B) Satellite and FAP cell detection comparing mechanical dissociation and enzymatic digestion techniques in C57BL6/J mouse and muscle biopsies. Statistical dot plots representing the percentage of each studied population obtained with either mechanical dissociation (in black) or enzymatic digestion (in gray) in the C57BL6/J mouse model **(A)** and human biopsies **(B)**. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, Wilcoxon paired test for human biopsies. **(C)** Human circulating leukocyte detection comparing 3 enzyme mixes: Statistical dot plots representing the mean fluorescence intensity (MFI) of each studied population (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, and CD56) obtained with the 3 enzyme mixes. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, unpaired test ($n = 3$ /condition).

clear cells (mean: 26.1×10^3 cells/g of tissue, range: 54×10^3 g to 7.2×10^3 g) compared with enzymatic digestion (mean:

TABLE 2. Comparison of the Different Enzymatic Digestion Techniques

	No Enz	CollA + DispII	Lib + DispII	Lib
MFI CD3	7.0	3.5	3.4	3.0
MFI CD4	21.4	16.0	14.8	16.5
MFI CD8	6.5	11.0	15.0	11.0
MFI CD19	8.5	5.9	5.9	7.8
MFI CD56	2.5	1.50	3.0	2.0

CollA+DispII, collagenase A+dispase II; Lib, liberase; Lib+DispII, liberase+dispase II; MFI, mean fluorescence intensity; No Enz, no enzyme.

16.2×10^3 cells/g of tissue, range: 40.3×10^3 g o 2.5×10^3 g). The percentage of extracted CD45⁺ cells among living cells was higher using enzymes. However, the percentages of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells among CD45⁺ cells were higher after mechanical dissociation compared with enzymatic methods (Fig. 1A, C). Indeed, with the enzymatic method, CD4⁺ T cells were undetectable and the percentage of CD8⁺ T cells and NK cells was significantly lower compared with the mechanical method (Table 1; Fig. 1C). The percentage of CD3⁺ cells was comparable with both methods.

Similarly, MFI (mean \pm SD) of CD8, CD56, and CD19 was higher with mechanical dissociation compared with enzymatic digestion (Supplementary Data Fig. S2). The MFI of the CD4 population could not be compared since it was undetectable with the enzymatic method. CD45⁺ and CD3⁺ populations were similarly detected with both methods since the MFI of CD45 and CD3 were comparable with mechanical and enzymatic methods (Supplementary Data Fig. S2). Regarding SCs, the results were similar to those in mice: The percentage of CD45⁺ CD56⁺ cells being higher with enzymatic digestion than with mechanical dissociation (Fig. 2B). Finally, the MFI of the CD3, CD4, CD19, and CD56 markers was higher with mechanical dissociation than with enzymatic digestion and no significant difference was observed in the MFI between the 3 enzymatic methods. Collagenase A + Dispase II, Liberase + Dispase II, and Liberase (Table 2). The MFI of CD8 was higher with enzymes and there was no difference for the CD45 MFI (Table 2; Fig. 2C). Finally, we did not find significant differences between the different enzyme combinations for the percentages of CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, and C56 populations (data not shown).

FC Allows Assessment of Intramuscular Recruitment of Myeloid and Lymphoid Cells in Experimental Conditions

In BaCl₂-injected animals, histological examination of injured muscle showed extensive acute myonecrosis followed by regeneration, with numerous pale necrotic fibers at 1 DPI, myophagocytosis, and SC proliferation at 3 DPI, presence of immature basophilic regenerating fibers at 5 DPI, and centro-nucleated fibers at 7 DPI (Fig. 3A) and 12 DPI (data not shown). We performed FC to quantify and analyze the intramuscular recruitment of myeloid and lymphoid cells throughout acute myofiber necrosis and regeneration. The myofiber

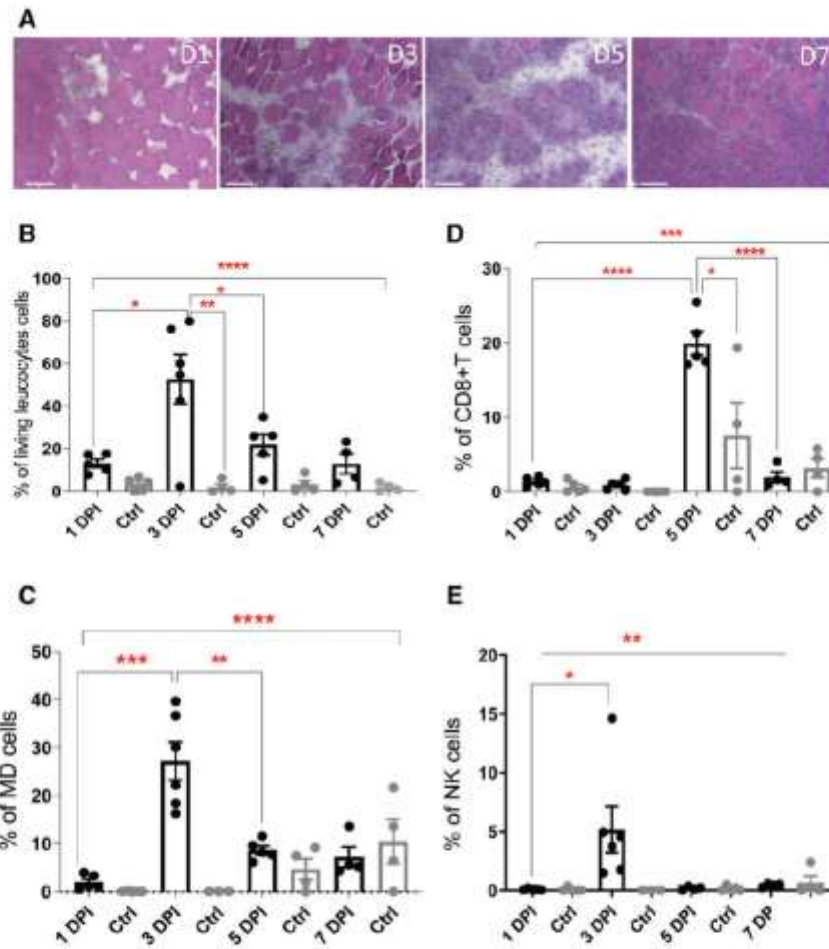


FIGURE 3. Intramuscular leukocyte recruitment in mouse during postinjury muscle repair. **(A)** Acute muscle injury induced by intramuscular BaCl₂ injection (TA muscle). For each animal, contralateral noninjured TA muscle was used as control. Upper panel: Muscle histology at different time points after injury: day 1 (D1), D3, D5, and D7 (hematoxylin and eosin staining on cryosections; scale bar: 50 μm). Leukocyte recruitment in injured TA and contralateral noninjured (control, Ctrl) at different time points after injury (day postinjury [DPI] 1, 3, 5, and 7). Percentage of leukocytes **(B)** among all living cells, myeloid dendritic (MD) cells **(C)**, CD8⁺T cells **(D)**, and NK cells **(E)**.

	1 DPI	Ctrl	3 DPI	Ctrl	5 DPI	Ctrl	7 DPI	Ctrl
CD45 ⁺ cells	13.0 ± 4.30%	3.50 ± 3.0%	52.5 ± 28.3%	2.0 ± 2.80%	21.90 ± 11.0%	3,203.90 ± %	12.9 ± 9.3%	1.90 ± 1.90%
CD8 ⁺ T cells	1.35 ± 0.60%	0.60 ± 0.80%	0.90 ± 0.60%	0.0 ± 0.0%	19.9 ± 3.5%	7.50 ± 8.80%	2.0 ± 1.40%	3.20 ± 2.50%
MD cells	2.0 ± 1.50%	0.0 ± 0.0%	27.20 ± 9.80%	0.0 ± 0.0%	8.70 ± 2.10%	4.70 ± 4.30%	7.20 ± 4.30%	10.40 ± 9.30%
NK cells	0.10 ± 0.10%	0.10 ± 0.16%	5.20 ± 4.80%	0.0 ± 0.0%	0.40 ± 0.40%	0.10 ± 0.20%	0.40 ± 0.10%	0.70 ± 1.20%

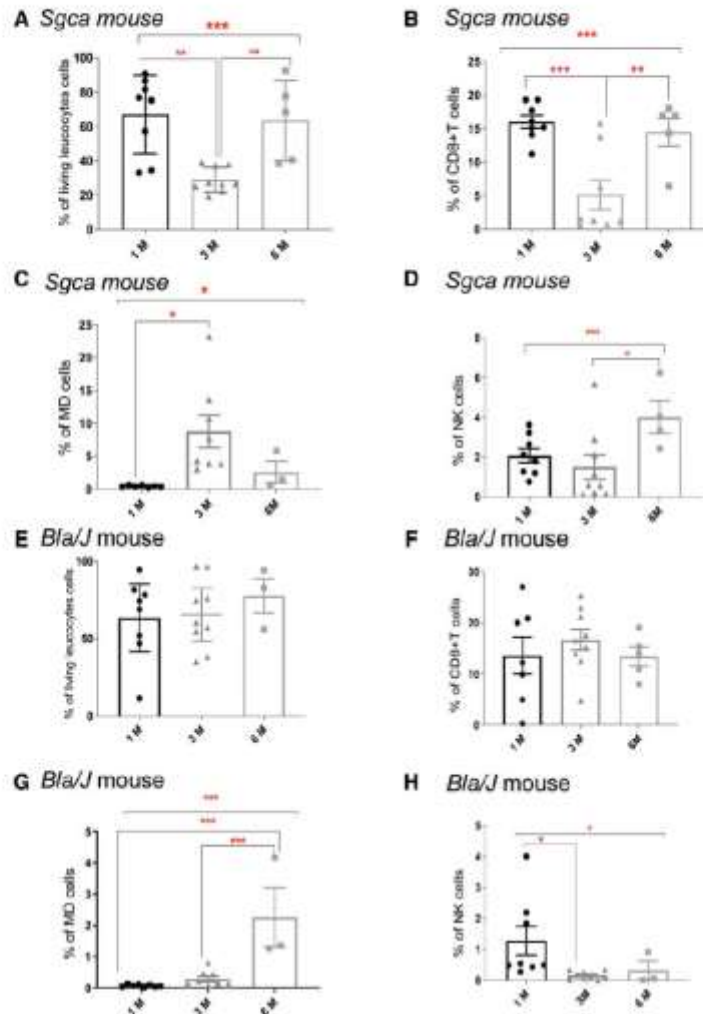


FIGURE 4. Intramuscular leukocyte recruitment in 2 mouse models of muscular dystrophies. Intramuscular leukocyte recruitment in *Sgca* mouse at different ages (1, 3, and 6 months); percentage of leukocytes among all living cells (**A**); CD8⁺T cells (**B**); myeloid dendritic (MD) cells (**C**); NK cells (**D**). Intramuscular leukocyte recruitment in *Bla/J* mouse at different ages (1, 3, and 6 months); percentage of leukocytes among all living cells (**E**); CD8⁺T cells (**F**); myeloid dendritic (MD) cells (**G**); NK cells (**H**). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 10^{-4}$.

necrosis/regeneration process was associated with a massive infiltration of the injured muscle by leukocytes (CD45⁺), mainly macrophages (CD11b^{high}Gr-1⁺), peaking at 3 DPI, then decreasing to baseline levels by 7 DPI (Fig. 3B). Intramuscular MDCs (CD3⁻CD8⁺CD11b^{high}) peaked at 3 DPI, at the same time as M1 macrophages (Fig. 3C). In contrast, CD8⁺ T cells (CD3⁺C8⁺) were mainly observed at 5 DPI

(Fig. 3D) then decreased at 7 DPI. NK cells (CD3⁻CD11b^{high} NKP46⁺) transiently peaked at 3 DPI (Fig. 3E). Numerical values are indicated in Table 3.

In dystrophic muscles, the proportion of leukocytes (CD45⁺) among the overall intramuscular population of mononuclear cells was found markedly increased, but their dynamics varied between *Sgca* (Fig. 4A) and *Bla/J* mice

TABLE 4. Phenotyping of Intramuscular Leukocytes in Murine Dystrophic Process

	Bla/J mouse			Sgea mouse		
	1 Month	3 Months	6 Months	1 Months	3 Months	6 Months
CD45 ⁺ cells	67.0 ± 22.8%	29.0 ± 7.2%	63.5 ± 23.5%	63.4 ± 26.1%	65.4 ± 22.4%	77.5 ± 19.4%
CD8 ⁺ T cells	13.6 ± 9.5%	16.7 ± 6.1%	13.4 ± 4.2%	16.0 ± 2.7%	5.2 ± 5.4%	14.5 ± 4.7%
MDC cells	0.1 ± 0.04%	0.3 ± 0.2%	2.3 ± 1.7%	0.4 ± 0.1%	8.8 ± 7.0%	2.6 ± 2.8%
NK cells	1.3 ± 1.3%	0.15 ± 0.1%	0.33 ± 0.5	2.1 ± 1.0%	1.5 ± 1.8%	4.0 ± 1.6%

DPI, day postinjection; MDCs, myeloid dendritic cells; NK cells, natural killer cells.

(Fig. 4E). The percentage of CD3⁺CD8⁺T cells among CD45⁺ cells paralleled that of CD45⁺ cells in both Sgea (Fig. 4B) and Bla/J mice (Fig. 4F). In Sgea, it changed significantly over time, while in Bla/J mice it persisted at the same level from 1 to 6 months of age. The percentage of MDCs (CD3⁺C8⁺CD11b^{high}) also varied with time and Bla/J (Fig. 4C, G). Lastly, the percentage of NK cells increased with time in Sgea, while it was maximal at 1 month, then decreased in Bla/J (Fig. 4D, H). Numerical values are indicated in Table 4.

FC is a Suitable Technique for Phenotyping Intramuscular Lymphocyte Subpopulation Infiltrates in Human Pathology

FC was used to analyze CD3⁺T cells, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, and NK cells in the muscles of 16 patients and in the blood of 11 patients. Age, sex, and detailed diagnoses are indicated in Table 5. Nine patients were diagnosed as DIM including IMNM (n = 4), OM (n = 2), and anti-PD1 antibody-induced myositis (n = 3). Seven patients were diagnosed as NIC including neurogenic atrophy (n = 4) and fibromyalgia (n = 3). Representative histological features are shown in Figure 5. The percentages of circulating CD8⁺T cells, CD4⁺T cells, and NK cells were comparable in DIM and NIC (Fig. 6A–C, left panel), while in muscle that of CD8⁺T cells was higher in DIM compared with NIC (Fig. 6A–C, middle panel). After normalization with relation to blood percentages (calculation of muscle/blood [m/b] ratios), FC analysis showed that the m/b ratio between the percentage of intramuscular (muscle [m]) and circulating (blood [b]) CD3⁺CD8⁺T cells was higher (p < 0.01) in DIM patients compared with NIC (2.3% ± 1.0% vs 0.7.0% ± 0.4%), while m/b CD3⁺CD4⁺T cells and m/b CD3⁺CD56⁺NK cells ratios were comparable in both groups (0.5% ± 0.2% vs 0.5% ± 0.4%, 1.7% ± 1.5% vs 0.7% ± 0.6%, respectively; Fig. 6A–C, right panel).

FC Allows the Evaluation of the Activation State of Intramuscular Lymphocytes

In order to more thoroughly decipher T and NK cells activation status in the muscle, we analyzed the expression of the activation markers HLA-DR, CD25, and CD38 along with the expression of the terminal differentiation marker CD57, that is, associated with a cytotoxic phenotype in CD8⁺T cells

(16–18). Our results showed evidence for a highly activated state of intramuscular CD8⁺T cells as shown by the significantly increased proportion of cells with enhanced expression of CD38 and HLA-DR in DIM compared with NIC (CD38⁺CD8⁺T: 48.4% ± 16.8% vs 16.5% ± 5.9%; HLA-DR⁺CD8⁺T: 58.7% ± 20.6% vs 26.7% ± 23.9%; Fig. 7A; Supplementary Data Fig. S3).

Regarding CD4⁺T cells, the proportion of cells with enhanced CD25, CD38, and HLA-DR expression appeared increased in DIM compared with NIC (CD25⁺CD4⁺T cells: 46.0% ± 16.3% vs 28.2% ± 11.2%; CD38⁺CD4⁺T cells: 39.7% ± 12.4% vs 17.9% ± 17.10%; HLA-DR⁺CD4⁺T cells: 32.3% ± 12.2% vs 12.7% ± 9.5%), but the difference was only significant for CD25 and HLA-DR markers, possibly due to a small number of samples (Fig. 7B; Supplementary Data Fig. S4).

The level of CD25 and HLA-DR expression on NK cells was comparable between the 2 studied groups (CD25⁺NK: 8.7% ± 9.8% vs 4.0% ± 6.0%; HLA-DR⁺NK: 13.3% ± 8.4% vs 6.9% ± 8.6%; Fig. 7C; Supplementary Data Fig. S4). The analysis of CD57 expression on CD8⁺T cells, CD4⁺T cells and NK cells did not show any difference between DIM and NIC groups (CD57⁺CD8⁺T cells: 58.2% ± 21.2% vs 51.4% ± 25.9%; CD57⁺CD4⁺T cells: 11.9% ± 5.4% vs 16.9% ± 16.1%; CD57⁺NK cells: 47.1% ± 15.2% vs 47.7% ± 5.9%; Fig. 7A–C).

DISCUSSION

The isolation of specific cell populations from tissue remains a critical step in the understanding and characterization of many human diseases (19). A crucial issue for FC applied to tissue-derived cell evaluation is the development of optimum approaches for cell isolation. That is especially challenging in the case of skeletal muscle tissue, which displays a highly organized architecture supported by connective tissue scaffolding. For decades, cell extraction protocols applied to skeletal muscle tissue were based on mechanical dissection followed by lengthy enzymatic digestion using various enzymes including collagenase, dispase, and pronase (20–22). These protocols were initially setup for studying myogenic stem cells (20), and further extended to the isolation of other muscle cell types. To date, numerous studies still utilize enzymatic digestion-based cell extraction protocols to investigate the role of leukocytes in muscle biology and pathology using FC (6, 23–27). Disparities among existing protocols are likely

TABLE 5. Clinical Data, Histological Features and FC Intramuscular Lymphocyte Phenotyping in Included Patients 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.

Case	Age/Sex	Clinical Features	Histopathological Diagnosis	T-Cells m/b	CD4 ⁺ T Cells m/b	CD8 ⁺ T Cells m/b	NK Cells m/b
	25/F	<ul style="list-style-type: none"> Proximal (UL+LL) weakness Progression: 24 weeks CK: 50×N Anti-SRP+ 	IMNM	0.739	0.225	1.837	3.853
	25/F	<ul style="list-style-type: none"> Proximal weakness in UL and LL Dyspnea Progression: 1 year CK: 45×N Anti-Jo1+ 	IMNM(*)	1.087	0.457	2.624	0.6658
	68/F	<ul style="list-style-type: none"> Proximal (UL+LL) and axial weakness Progression: 4 months CK: 20×N Anti-SRP+ 	IMNM	1.190	0.929	1.359	0.559
	64/F	<ul style="list-style-type: none"> Proximal (UL+LL) weakness and myalgias Progression: 12 weeks CK: 15×N Anti-HMGCR+ 	IMNM	0.945	0.484	2.380	1.625
	57/F	<ul style="list-style-type: none"> Melanoma Anti-PD1 and anti-CTLA4 therapy (nivolumab, ipilumab) Fasciitis/panniculitis Progression: 4 weeks CK: N 	Immune checkpoint inhibitor-induced myositis	1.029	0.474	1.978	
	86/F	<ul style="list-style-type: none"> Breast and lung cancers Anti-PD1 and anti-CTLA4 therapy (nivolumab, ipilumab) Diffuse muscle weakness, dropped-head syndrome, dysphagia, cachexia Progression: 4 weeks CK: 1.5×N 	Immune checkpoint inhibitor-induced myositis	1.011	0.770	1.464	
	68/M	<ul style="list-style-type: none"> Lung cancer Anti-PD1 therapy (pembrolizumab) Diffuse muscle weakness, dropped-head syndrome, dysphagia Progression: 3 weeks CK: 11×N 	Immune checkpoint inhibitor-induced myositis	1.672	0.440	4.370	
	26/F	<ul style="list-style-type: none"> Chronic myalgias in LL Progression: 24 weeks CK: N 	OM, probable				
	39/M	<ul style="list-style-type: none"> Systemic sarcoidosis Proximal UL weakness and myalgias Progression: 12 weeks CK: 6×N 	OM				
	23/F	<ul style="list-style-type: none"> Chronic diffuse myalgias Progression: > 1 year CK: N 	Mild type-II fiber atrophy				
	72/M	<ul style="list-style-type: none"> Proximal LL weakness and myalgias Progression: 20 years 	Pseudo-myopathic neurogenic atrophy				

(continued)

TABLE 5. Continued

Case	Age/Sex	Clinical Features	Histopathological Diagnosis	T-Cells m/b	CD4 ⁺ T Cells m/b	CD8 ⁺ T Cells m/b	NK Cells m/b
	60F	<ul style="list-style-type: none"> CK: 8×N Proximal (UL+LL) weakness and arthromyalgias Progression: 10 years 	Mild type-II fiber atrophy	0.629	0.496	0.856	0.499
	52M	<ul style="list-style-type: none"> CK: 5×N Esophagus and lung cancer Proximal (UL+LL) weakness and arthromyalgias Progression: 5 months CK: N 	Mild type-II fiber atrophy	0.040	0.020	0.067	0.127
	36F	<ul style="list-style-type: none"> Chronic diffuse myalgias Sicca syndrome Progression: 6 year CK: N 	No histological change	1.011	0.887	1.097	0.712
	41F	<ul style="list-style-type: none"> Chronic diffuse myalgias Progression: 20 year CK: N Ultrasound suggesting inflammation 	No histological change				
	44F	<ul style="list-style-type: none"> Chronic diffuse myalgias Progression: 12 years CK: N 	No histological change	0.617	0.544	0.656	1.4794

CK, creatine kinase; HMG-CR, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; IMNM, immune-mediated necrotizing myopathy; LL, lower limbs; m/b, ratio between the percentage cells among muscular (m) and blood (b) lymphocytes for T-cells (CD45⁺CD3⁺), CD4⁺T cells (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), CD8⁺T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), and NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺); OM, overlap-myositis; SRP, signal recognition particle; UL, upper limb.
 *This patient was initially diagnosed in another center as antisynthetase syndrome with myositis and lung involvement. After recovery under immunosuppressive therapy, she stopped her treatment and medical follow-up for 2 years. Afterwards, she relapsed and was taken in charge in our center. A second biopsy was performed and unexpectedly showed IMNM instead of the typical histopathological features of antisynthetase myopathy.

to produce suboptimal cell isolates, inconsistencies between cell yields, viability, or cell surface marker expression leading to poor reproducibility, and ultimately to unintended biases in subsequent data interpretation (19). In particular, studies investigating the potential changes induced by tissue enzymatic digestion showed that the types of enzymes used, their possible combination with mechanic agitation, and the time of incubation are factors that can change the respective proportion of leukocyte subsets among studied cells (19, 28, 29). Our results showed that the overall yields of enzymatic digestion and its unwanted effects on surface cell marker detection also depend on the studied species. Putting together all these considerations, we conclude that enzymes used for tissue dissociation may impair the reliability of leukocyte phenotyping and this should be considered when investigating myopathological processes. In contrast, our results confirmed the usefulness and reliability of enzymatic digestion for SCs and FAPs extraction, probably because collagen fibers and other extracellular matrix components impair the retrieval of these cells after simple mechanical tissue dissociation.

Our protocol proved to be fully applicable for investigating the role of leukocytes in myopathological processes. In the context of experimental acute muscle injury, FC showed the massive recruitment of macrophages, peaking at day 3 DPI and the later recruitment of CD8⁺T cells (peaking at 5 DPI). An injury-induced innate immune response favors the

collaboration of myogenic progenitors with nonmuscle cells, and this response is integral to the repair process. It is well established that the huge macrophage infiltration is beneficial to muscle regeneration but whether this process also plays an immune protective role is unknown (30, 31). Our FC approach also uncovered the recruitment of a minority CD45⁺CD3⁻CD8⁺CD11b^{high} subpopulation, corresponding to MDCs and peaking at 3 DPI, like other monocyte-derived cells. Skeletal muscle tissue destruction, such as that induced by i.m. injection of BaCl₂, triggers a “sterile” inflammatory response (15) similar to the response to infection in terms of leukocyte infiltration and formation of proinflammatory mediators at the site of injury (32); logically DC have been identified in injured muscle (33–35). Whether these cells play a role in myofiber regeneration remains unclear and it seems more probable that DCs that accumulate in regenerating skeletal muscle remain there “on demand”; and they may migrate into the draining lymph node in the case of the presence of a pathogen to boost antigen-specific T-cell responses (32). The recruitment of MDCs within injured muscle associates with that of CD8⁺T cells, suggesting these cells could also contribute to the immunological protection. In addition, CD8⁺T cells have been shown to be directly involved in the repair and regeneration of damaged muscle tissue by regulating the secretion of MCP1 to recruit Gr1^{high} macrophages, which facilitate myoblast proliferation (36, 37).

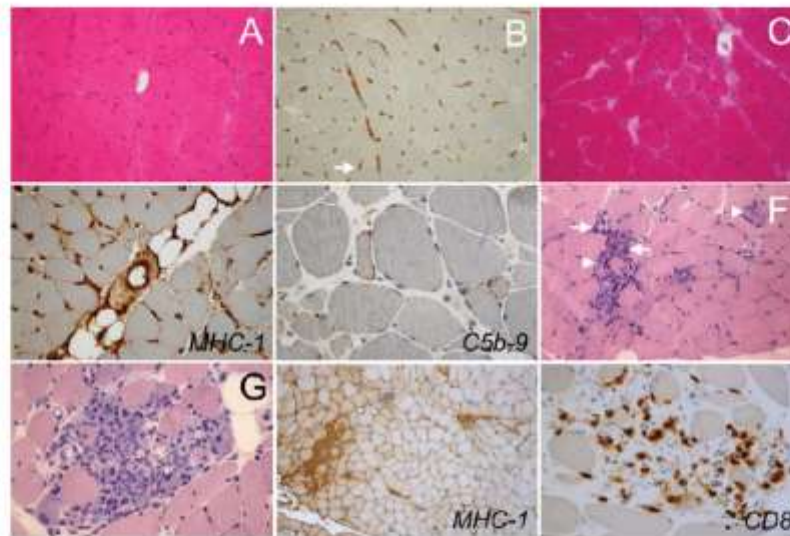


FIGURE 5. Muscle biopsies from patients with NIC and dysimmune/inflammatory myopathy (DIM). Type-2 atrophy (**A, B**), immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM; **C–E**), and nivolumab-induced myositis (**F–I**). Type-2 atrophy (NIC): (**A**) Mild-myofiber angulous atrophy without inflammatory infiltrate or myofiber necrosis; (**B**) Normal immunostaining for major histocompatibility complex (MHC)-I with negative myofibers and positive capillaries (arrow). IMNM: (**C**) Randomly distributed necrotic myofibers at different stages of the healing process, without conspicuous inflammatory infiltrates; (**D**) Varying myofiber MHC-1 expression with strongly positive small fibers (arrow) alongside fibers with positive immunostaining restricted to sarcolemma and negative fibers; (**E**) Membrane attack complex/C5b-9 immunostaining showing granular C5b-9 deposit at the level of non-necrotic fiber sarcolemma (arrows). Nivolumab myositis: (**F, G**) Focal nodular endomysial mononuclear cells infiltrate (arrows) and myofiber necrosis (arrowheads); (**H**) Ubiquitous abnormal MHC-I expression by myofibers with strong staining of inflammatory cells (star); (**I**) CD8⁺ T cells (arrows) within nodular infiltrates. All stainings were performed on 7- μ m cryosections; (**A, F, G**) Hematoxylin and eosin; (**B, D, E, H, I**) immunoperoxidase techniques were carried out using Bond-III automaton (Leica, Nanterre, France) for detecting HLA-ABC (**C, H**; clone number W6/32, 1/4000, Dako, Glostrup, Denmark), MAC/C5b-9 (**E**; clone number ab55811, 1/50, Dako), and CD8 (**I**; clone C8/144B number M7103, 1/400, Dako).

The recruitment of intramuscular leukocytes to dystrophic muscles must be analyzed taking into account the molecular basis and stage of disease. In Bla/J mice, a marked intramuscular recruitment of leukocytes can be observed from the first month of life, although myofiber necrosis will not be visible until the third month (13). This apparent discrepancy can be explained by breaches persisting at the surface of non-necrotic fibers leading to an uninterrupted release out of the cell of various molecules acting as danger signals and promoting the recruitment of inflammatory cells (38). In Sgca mice, myofibers are unable to sustain the physical strains of muscle contraction, and leading to their necrosis (14). It must be noted that in both models, while pathology and fibrosis progressed with time, our protocol has proved to be fully suitable for the analysis of intramuscular cells despite the lack of enzymatic digestion.

To our knowledge, our study is the first one using FC for analyzing intramuscular leukocytes in the context of human pathology. In routine practice, muscle biopsy samples are conventionally processed for histology (39), leukocyte phenotyping being carried out through immunohistochemistry (IHC)

on a limited number of sections. In contrast to IHC, FC has the advantage to allow the simultaneous assessment of up to 20 markers in a much larger tissue volume, precisely quantifying the different subpopulations. The main disadvantages of FC may be found in (1) the necessity to immediately process muscle samples at the time of biopsy and therefore to coordinate 2 different lab benches; (2) the time required for appropriately preparing samples and extracting cells; (3) the obligation to a priori arrange an antibody panel blind to pathological findings; and (4) the necessity to perform in parallel a blood analysis to avoid possible erroneous analyses due to circulating leukocyte subpopulations. Notwithstanding these constraints, FC was extremely efficient in studying muscle pathology. Indeed, despite the small number of patients included in our study, FC highlighted intramuscular recruitment of CD8⁺ T cells in all types of DIM analyzed. Using m/b ratios allows the avoidance of misinterpretation of results linked to potentially marked variations of circulating CD8⁺ T cells. The accumulation of CD8⁺ T cells within muscle tissue cannot be ascribed to ongoing myofiber necrosis because then it would have been associated with CD4⁺ T cells (37). In the context of DIM, the IHC

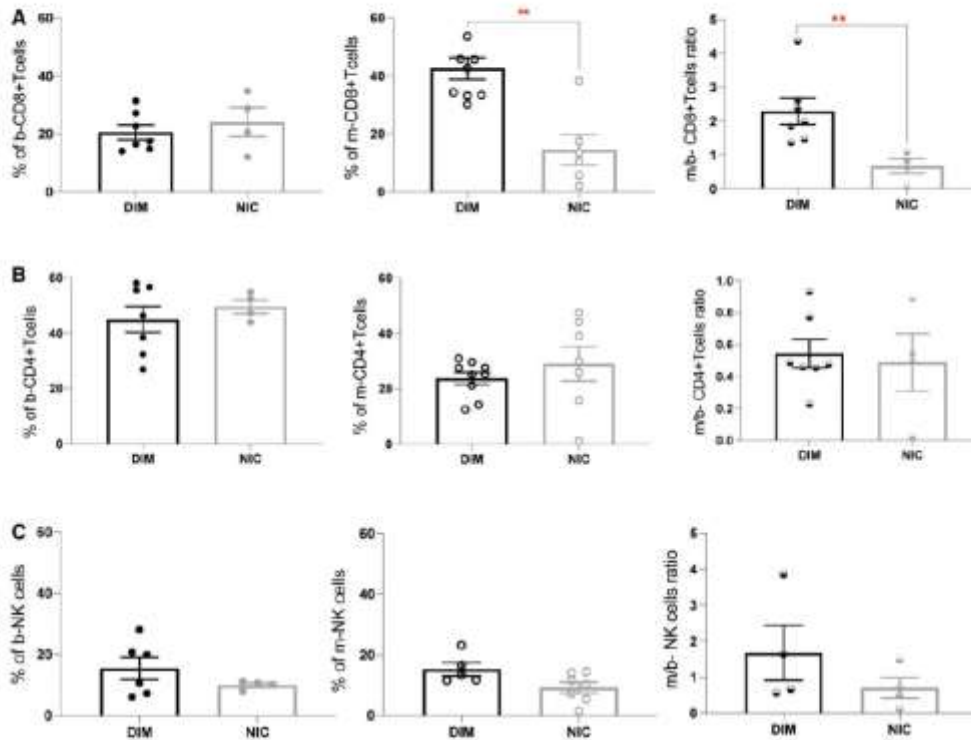


FIGURE 6. Characterization of intramuscular lymphocytes in DIM and NIC biopsies. Percentage in blood (left) and in muscle (middle), and muscle (m)/blood (b) ratio (right) for CD8⁺ T cells (**A**), CD4⁺ T cells (**B**), and NK cells (**C**) in DIM and NIC patients.

phenotyping of intramuscular cell infiltration in muscle biopsies is usually directed toward the identification of a characteristic process (38, 39). The discovery of leukocyte population imbalance in DIM provides an exciting prospect for diagnosis. Of course, the number of cases evaluated in this study is too small to draw firm conclusions, but these first results are sufficiently encouraging to plan further studies on a larger scale. Lastly, we also showed that FC allows the accurate and easy analysis of T- and NK-cell activation states. Interestingly, we found a significant proportion of activated CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells within muscle tissue from the NIC group that mostly includes patients with chronic muscle pain. Fibromyalgia is a very frequent condition, significantly associated with inflammatory joint diseases (40) and therefore frequently raising the question of inflammatory muscle damage. Various nonspecific morphological and metabolic changes exist in the muscles of patients with fibromyalgia but are not sufficient for a definite diagnosis, as in our patients (10). In fact, the main question is to determine the exact levels of T and NK cells activation in healthy muscle. Overall, the evaluation of leukocyte activation by FC is highly useful for pathophysio-

logical research, and this technique could also help to monitor the therapeutic response in patients with DIM.

In conclusion, our work demonstrates that FC is a technique fully suitable for quantifying intramuscular leukocyte subpopulations and analyzing their activation states. We showed that preanalytic conditions are a determining factor for the reliability of results and that enzymatic digestion must be avoided when studying immune cells. Our results obtained in human, even if very preliminary, indicate that the evaluation of muscle versus blood leukocyte subpopulation balance as well as the quantification of activation states could open new tracks for understanding the pathophysiology of muscle diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We are extremely grateful to the patients who kindly accepted to contribute to our research. We acknowledge Dr Matthew Borok (matthew.borok@inserm.fr) for critical reading of the manuscript.

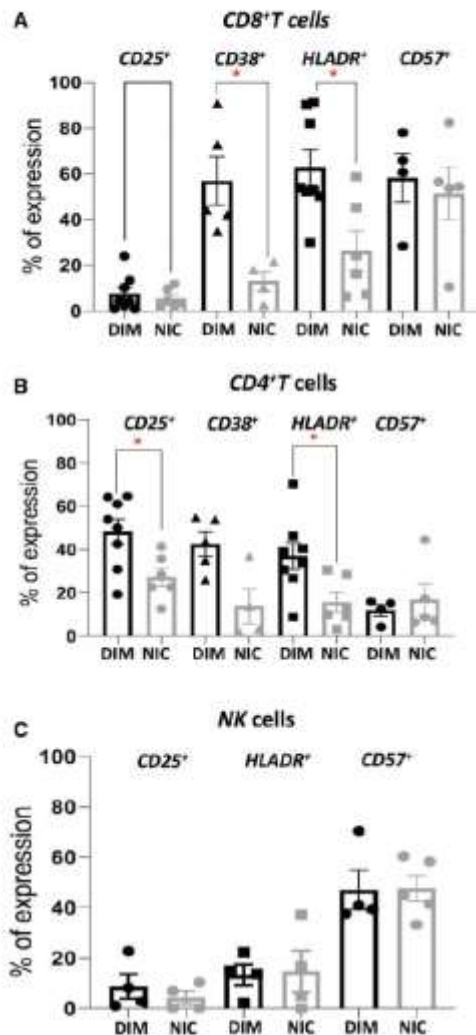


FIGURE 7. Comparison of activation states of CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, and NK cells in DIM and NIC. Activation states were assessed by the expression of CD25, CD38, HLA-DR, and CD57 activation markers on intramuscular cytotoxic CD8⁺ T cells (A), CD4⁺ T cells (B), and NK cells (C), from DIM (black) and NIC (gray). Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, nonpaired Mann-Whitney test.

DATA AVAILABILITY

In accordance with French legislation, all nominative data from patients are stored and kept in Henri Mondor University Hospital. Detailed quantitative data from animals and patients can be obtained upon request to corresponding author and after anonymization for patients.

REFERENCES

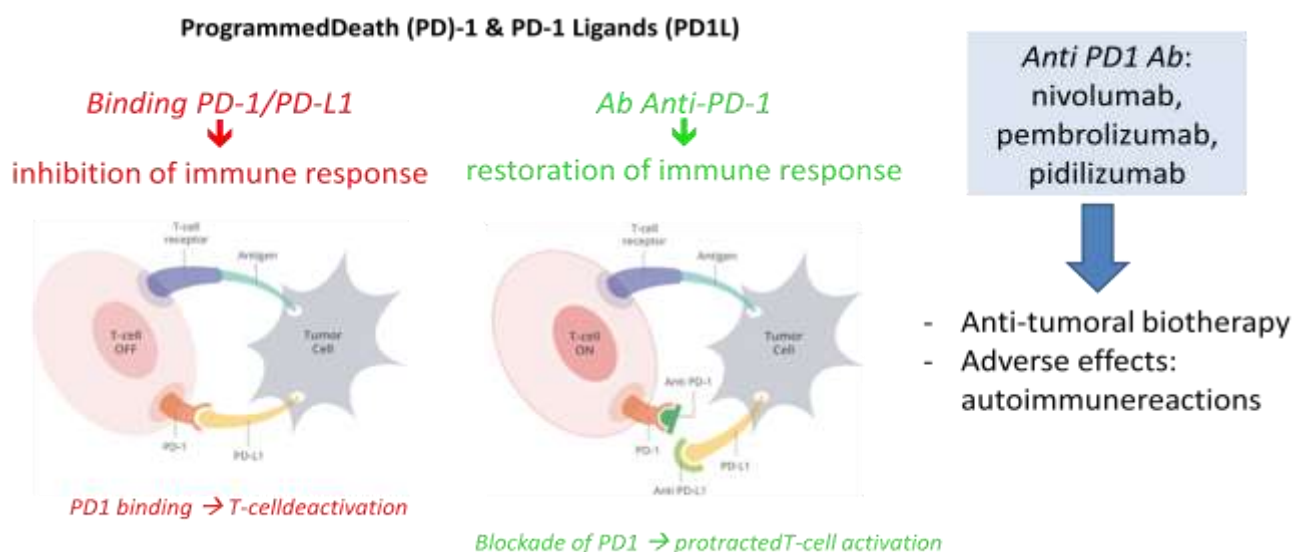
- Allenbach Y, Benveniste O, Goebel H-H, Stenzel W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017; 43:62–81
- Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:154
- Rigolet M, Hou C, Baba Amer Y, et al. Distinct interferon signatures stratify inflammatory and dysimmune myopathies. *RMD Open* 2019;5: e000811
- Chazaub B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Execr Sport Sci Rev* 2009;37:18–22
- Tidball JG, Vialta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:R1173–87
- Burzyn D, Kuswanto W, Kolodín D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 2013;155:1282–95
- Gallardo E, Rojas-García R, De Luna N, et al. Inflammation in dystferlin myopathy: Immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 2001;57:2136–8
- Türk R, Steinerburg E, Van der Wees CG, et al. Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *FASEB J* 2006; 20:127–9
- Burzyn D, Wagers A, Mathis D, et al. Methods of isolation and analysis of TREG immune infiltrates from injured and dystrophic skeletal muscle. *Method Mol Biol* 2019;1899:229–37
- Ruggiero L, Manganeli F, Santoro L. Muscle pain syndromes and fibromyalgia: The role of muscle biopsy. *Curr Opin Support Palliat Care* 2018;12:382–7
- Miersch C, Stange K, Röntgen M. Effects of trypsinization and of a combined trypsin, collagenase, and DNase digestion on liberation and in vitro function of satellite cells isolated from juvenile porcine muscles. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2018;54:406–12
- Schreurs RRCE, Drewniak A, Bakx R, et al. Quantitative comparison of human intestinal mononuclear leukocyte isolation techniques for flow cytometric analyses. *J Immunol Methods* 2017;445:45–52
- Biondi O, Villemeur M, Marchand A, et al. Dual effects of exercise in dystferlinopathy. *Am J Pathol* 2013;182:2298–309
- Duclos F, Straub V, Moore SA, et al. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998;142:1461–71
- Hardy D, Besnard A, Latif M, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One* 2016;11:e0147198
- Kared H, Martelli S, Ng TP, et al. CD57 in human natural killer cells and T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65:441–52
- Lopez-Vergés S, Milush JM, Pandey S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56^{dim}CD16⁺ NK-cell subset. *Blood* 2010;116:3865–74
- Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8⁺ CD28[−] and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; 134:17–32
- Hagman DK, Kuzma JN, Larson I, et al. Characterizing and quantifying leukocyte populations in human adipose tissue: Impact of enzymatic tissue processing. *J Immunol Methods* 2012;386:50–9
- Bonavaud S, Thibert P, Gherardi RK, et al. Primary human muscle satellite cell culture: Variations of cell yield, proliferation and differentiation rates according to age and sex of donors, site of muscle biopsy, and delay before processing. *Biol Cell* 1997;89:233–40
- Shahini A, Vydiam K, Choudhury D, et al. Efficient and high yield isolation of myoblasts from skeletal muscle. *Stem Cell Res* 2018;30:122–9
- Pakula A, Spinazzola JM, Gussoni E. Purification of myogenic progenitors from human muscle using fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Methods Mol Biol* 2019;1889:1–15
- Latroche C, Weiss-Gayet M, Giffaux C, et al. Cell sorting of various cell types from mouse and human skeletal muscle. *Methods* 2018;134–135: 50–5
- Khan IM, Dai Perrard XY, Perrard JL, et al. Attenuated adipose tissue and skeletal muscle inflammation in obese mice with combined CD4⁺ and CD8⁺ T cell deficiency. *Atherosclerosis* 2014;233:419–28

25. Zimowska M, Kasprzycka P, Bocian K, et al. Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. *Muscle Nerve* 2017;55:400-9
26. Kastenschmidt JM, Avetyan I, Villalta SA. Characterization of the inflammatory response in dystrophic muscle using flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2018;1687:43-56
27. Pilgaard L, Lund P, Rasmussen JG, et al. Comparative analysis of highly defined proteases for the isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Regen Med* 2008;3:705-15
28. Liang F, Ploquin A, Hernández JD, et al. Dissociation of skeletal muscle for flow cytometric characterization of immune cells in macaques. *J Immunol Methods* 2015;425:69-78
29. Brigitte M, Schulte C, Plonquet A, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myosin injury. *Arthritis Rheum* 2010;62:268-79
30. Forcina L, Cossentino M, Musarò A. Mechanisms regulating muscle regeneration: Insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing. *Cells* 2020;9:1297
31. Wirsdörfer F, Bangen JM, Pastille E, et al. Dendritic cell-like cells accumulate in regenerating murine skeletal muscle after injury and boost adaptive immune responses only upon a microbial challenge. *PLoS One* 2016;19:e0155870
32. Pimorady-Esfahani A, Grounds MD, McMenamin PG. Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1997;20:158-66
33. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, et al. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1031-6
34. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R345-53
35. Zhang J, Xiao Z, Qu C, et al. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gαi(high) macrophage infiltration. *J Immunol* 2014;193:5149-60
36. Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN, et al. Divergent roles of inflammation in skeletal muscle recovery from injury. *Front Physiol* 2020;11:87
37. Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle* 2011;1:10
38. Neuromuscular Disease Center. Available at: <https://neuromuscular.wustl.edu/lab/mbiopsy.html>. Accessed July 31, 2021
39. Mammen AL. Autoimmunemyopathies: Autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2011;8:343-54
40. Zhao SS, Duffield SJ, Goodson NJ. The prevalence and impact of comorbid fibromyalgia in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2019;33:101423

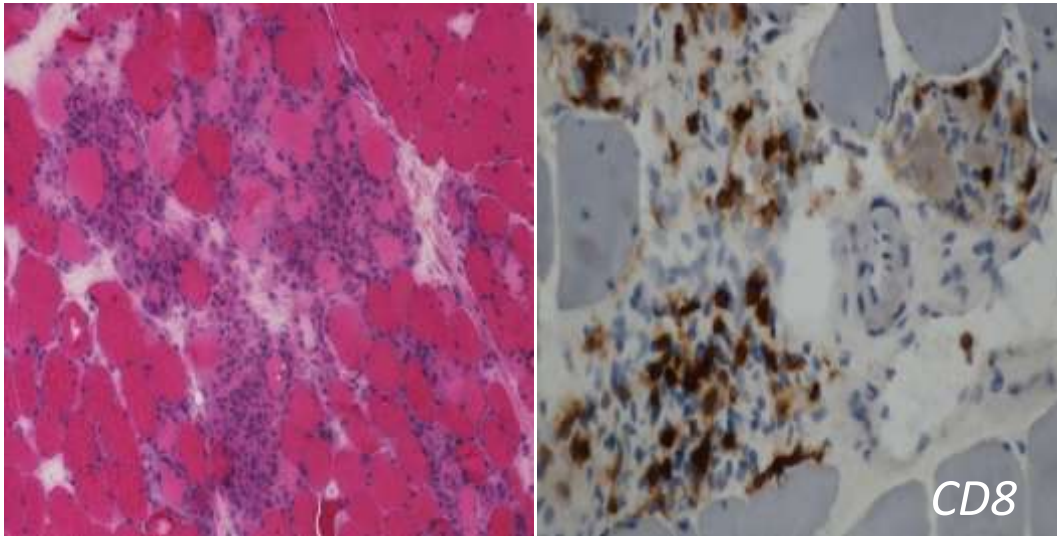
Application du protocole optimisé de CMF à la myosite induite par pembrolizumab/Anti PD-1

Les inhibiteurs du check-point, y compris including programmed-cell death (PD)-1 and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA)-4 inhibitors, se sont avérés efficaces dans le traitement de nombreux cancers, mais dans de rares cas, ils sont responsables de complications graves menaçant le pronostic vital. Le principal mécanisme d'action de ces agents est l'activation du système immunitaire contre le cancer. Cependant, la réactivation de l'immunité cellulaire a été associée à des complications telles que des œdèmes périphériques, fatigue, prurit, éruption cutanée, élévation des taux d'enzymes hépatiques et d'autres évènements endocriniens, gastro-intestinaux et hématologiques. Une myosite à médiation immunitaire a également été rapportée chez moins les patients ayant bénéficié d'un traitement par l'inhibiteur du check-point immunitaire, le pembrolizumab.

Dans ce travail, nous avons utilisé deux clones de l'anticorps anti PD-1 afin d'étudier l'effet du Pembrolizumab sur les lymphocytes T et le PD-1 lymphocytaire. L'analyse des Lymphocytes T a été faite par CMF.

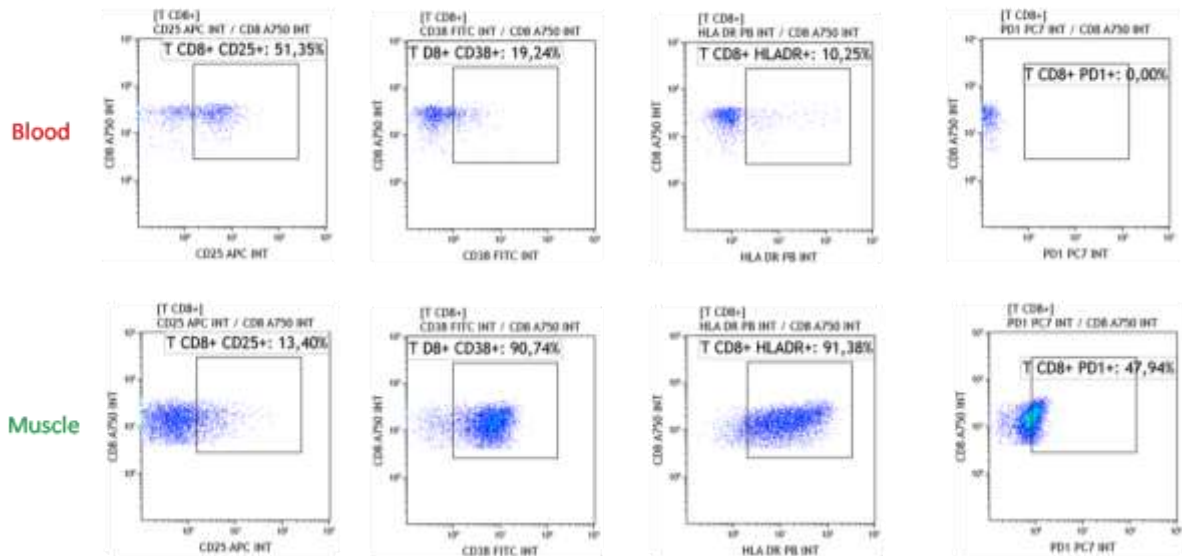


Immunohistochimie d'une myosite antiPD-1



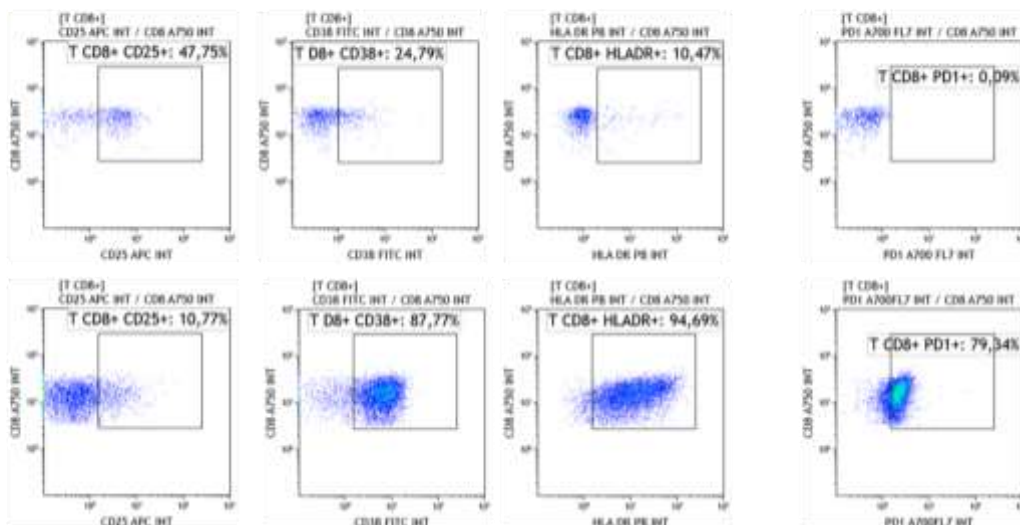
Analyse cytométrique d'une myosite induite par le Pembrolizumab

ClonePD1-3



Clone EH12.2H7

Blood



Les analyses par cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence que le complexe PD1-anticorps anti-PD-1 impliqué dans la myosite anti-PD-1 reste en surface et n'est pas internalisé. Ainsi la CMF est tout à fait applicable à l'étude des mécanismes physiopathologiques des myosites.

Conclusion

Nos travaux ont montré que la CMF est une technique tout à fait adaptée pour quantifier les sous-populations leucocytaires intramusculaires et analyser leurs états d'activation. Nous avons montré que les conditions pré-analytiques sont déterminantes pour la fiabilité des résultats et ainsi que la digestion enzymatique doit être évitée lors de l'étude des cellules immunitaires. En effet, certaines populations leucocytaires peuvent être indétectables telle que la population de lymphocytes TCD4⁺ en utilisant des enzymes de digestion pour l'extraction des cellules mononuclées, ce qui fausse les interprétations et analyses physiopathologiques.

Nos résultats obtenus sur les biopsies humaines, même si très préliminaires, indiquent que l'évaluation par CMF de l'équilibre des sous-populations leucocytaires musculaires vs leucocytes sanguins ainsi que la quantification des états d'activation pourraient ouvrir de nouvelles pistes pour comprendre la physiopathologie des maladies musculaires. Ainsi, les DIM sont associées à un recrutement de cellules T CD8⁺, mais pas de cellules T CD4⁺ et de cellules NK. De plus, la quantification des biomarqueurs d'activation et de différenciation HLA-DR, CD25, CD38 et CD57 ont montré des niveaux d'activation accrus des cellules TCD4⁺ et T CD8⁺ dans les DIM.

Chez la souris, nos résultats indiquent que la régénération post lésionnelle du muscle squelettique est associée à l'enrichissement transitoire en macrophages (CD11b^{high} Gr-1⁺), en cellules dendritiques myéloïdes (MDC, CD3⁻ CD8⁺ CD11b^{high}), en cellules T CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺) et en cellules NK (CD3⁻ CD11b^{high} NKp46⁺). Dans les modèles murins de dystrophies musculaires héréditaires, les leucocytes représentent 23 à 84 % des cellules mononuclées intramusculaires, avec un pourcentage de cellules T CD8⁺ de 4 à 17% de tous les leucocytes, tandis que les MDC restent minoritaires.

Ce travail a donc montré que la CMF est une technique tout à fait adaptée pour quantifier les sous-populations de leucocytes intramusculaires et analyser leurs états d'activation à condition de réaliser une extraction des cellules purement mécanique respectant les épitopes de surface cellulaire.

Publication 2 : La cytométrie en flux montre que les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires (DIM) se caractérisent par un recrutement sélectif en cellules T CD8⁺ intramusculaires

Présentation du sujet

La biopsie musculaire est l'examen clé pour le diagnostic des DIM en permettant la caractérisation précise des processus immunopathologiques et le phénotypage de l'infiltration intramusculaire de cellules immunitaires. Parmi les populations cellulaires présentes dans le tissu musculaire squelettique adulte normal, les leucocytes représentent un contingent minoritaire formé principalement de macrophages résidents. Par ailleurs, quelle qu'en soit la cause, le processus de nécrose myocytaire induit un recrutement leucocytaire, marqué principalement de macrophages, pro-inflammatoires et de macrophages anti-inflammatoires, mais également de manière beaucoup moins marquée, de lymphocytes. En effet, il se produit un enrichissement intramusculaire en lymphocytes après une lésion aigüe du muscle et lors de processus dystrophiques chroniques liées à des déficits en dystrophine, dysferline ou en sarcoglycane. La fonction des lymphocytes intramusculaires n'a pas été bien étudiée, bien que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ semblent jouer un rôle dans la pathologie de la dystrophinopathie. De plus, il a été récemment montré que les suppresseurs de réponse immunitaire Foxp3⁺CD4⁺ les lymphocytes T régulateurs (Treg) s'accumulent dans le muscle squelettique lésé et sont nécessaires pour achever la réparation musculaire post-lésionnelle.

Les DIM se différencient par le profil des infiltrats inflammatoires. Les polymyosites et IBM sont caractérisés par la présence d'un infiltrat endomysial de lymphocytes T CD8⁺

cytotoxiques. Dans les myosites de chevauchement on observe également des infiltrats T CD8⁺ notamment dans l'endomysium) mais aussi des macrophages dans le périmysium, parfois des infiltrats périvasculaires lympho-histiocytaires et la présence de cellules NK (Hervier et al. 2016). Dans la dermatomyosite, les infiltrats inflammatoires sont décrits comme polymorphes (macrophages, lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, lymphocytes B), septaux et souvent périvasculaires. Une particularité de la DM est la présence de cellules dendritiques plasmacytoïdes sécrétrices d'IFN de type I dans le perimysium. Dans, les myopathies nécrosantes autoimmunes on considère que les infiltrats inflammatoires se limitent en général au recrutement leucocytaire post-nécrotique (cf supra) avec parfois des agrégats voire des infiltrats lympho-histiocytaires périvasculaires.

Article, en preparation

Flow cytometry assesses selective intramuscular CD8⁺T cells enrichment in immune myopathies regardless of the type of the idiopathic inflammatory myopathies

SAIDJ Tassadit, PLONQUET Anne, RELAX Frederic, BELDI-FERCHIOU Asma, AUTHIER François Jérôme

Flow cytometry assesses selective intramuscular CD8⁺T cells enrichment in immune

Flow cytometry assesses selective intramuscular CD8⁺T cells enrichment in immune myopathies regardless of the type of the idiopathic inflammatory myopathies

SAIDJ Tassadit, MD,¹ PLONQUET Anne, MD, PhD,² RELAIX Frederic, PhD,¹ BELDI-FERCHIOU

Asma, MD, PhD,^{2,3} AUTHIER François Jérôme, MD, PhD^{1,4}

Addresses:

1. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Relaix, F-94010 Creteil, France ;
2. AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Laboratoire d'immunologie biologique, F-94010 Créteil, France ;
3. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Cohen, F-94010 Créteil, France ;
4. APHP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Département de Pathologie, UF Centre expert de pathologies neuromusculaires, F-94010 Créteil, France.

Corresponding author:

AUTHIER François Jérôme, MD, PhD,

Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, Département de Pathologie,

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP),

51, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, FRANCE

Phone : +33 1 4981 2735 – Fax : +33 1 4981 2733

Mail: francois-jerome.authier@aphp.fr

Abstract

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) form a heterogeneous group of autoimmune disorders differentiating from each other by clinical features, treatment responses and prognoses. They can be classified into several subgroups; dermatomyositis, antisynthetase syndrome, immune-mediated necrotizing myopathy, inclusion body myositis. However, flow cytometry (FC) associated to a purely mechanical extraction of leucocytes allows to evaluate at the same time a large number of cell surface markers with their expression levels, and to provide an exact count of different leucocyte subtypes. Then, FC seems especially appropriate for investigating muscular inflammatory infiltrates. In a retrospective analysis of FC phenotyping of blood and muscle leukocytes in muscle biopsy patients, we showed that IIM specifically associates with muscle enrichment in CD8⁺ T cells. From our results, we determined an intramuscular inflammation index (IM-I) which is characterized by a muscle/blood ratio of the CD4⁺/ CD8⁺ ratio. The MI-I has a cut-off value correlated with the IIM diagnosis according to the EULAR / ACR classification. These preliminary data suggest that FC may have its place in the panel of techniques for analyzing muscle biopsies, especially when an IIM is suspected.

Keywords

Inflammatory and dysimmune myopathies, CD8⁺T cells enrichment, Idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) (IM-I) index, EULAR/ACR classification

Introduction

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM), also termed myositis, form a heterogeneous group of autoimmune disorders differentiating from each other by clinical features, treatment responses and prognoses [1]. Various myositis-specific autoantibodies have been identified and, on the basis of clinical, histopathological and immunological features, IIM can be classified into several subgroups — dermatomyositis (including amyopathic dermatomyositis), antisynthetase syndrome, immune-mediated necrotizing myopathy, inclusion body myositis, polymyositis and overlap myositis [1]. For decades, the diagnosis of IIM was based on muscle biopsy which allows to accurately delineate immunopathological processes at work and to precisely characterize intramuscular immune cells infiltration [2]. However, the constant progress in circulating myositis-specific autoantibodies (MSA) screening and muscle imaging make this view disputed and some authors go so far as to consider that there is no longer a gold standard for the diagnosis of IIM [3, 4]. Interestingly, recent algorithm-based classification systems showed that it can be possible to diagnose an IIM without taking into account myopathological data [5]. An explanation could be that the common holistic approach of muscle biopsy interpretation is not suitable for a quantitative diagnostic scoring, especially since the interrater variability in muscle biopsy reading appears disappointingly high [6]. This state of facts points out the crucial need for accurately quantifying individual histopathological features.

Phenotyping and quantifying intra-tissular leucocytes subpopulations can be achieved through immunohistochemistry (IHC) or flow cytometry (FC). IHC is the most used technique since it is rapid and easy-to-do and can be *a-posteriori* performed on frozen or paraffin sections. In contrast, FC required to be extemporaneously performed on cells extracted from

fresh tissue. However, compared to IHC, FC allows to evaluate at the same time a much larger number of cell surface markers with their expression levels, and to provide an exact count of different leucocyte subtypes present in a tissue or fluid sample. So, FC seems especially appropriate for investigating muscular inflammatory infiltrates with the advantage to provide rater-independent quantitative results, fully suitable for IIM diagnostic scoring.

Here, from the retrospective analysis of FC phenotyping of blood and muscle leucocytes in patients with muscle biopsy, we showed that IIM specifically associate with muscular enrichment in CD8⁺ T-cells. From our results, we determined an IntraMuscular Inflammation (IM-I) index with a cut-off value correlated with IIM diagnosis according to EULAR/ACR classification. These preliminary data suggest that FC could have a place in the panel of techniques used for analysing muscle biopsies, especially when IIM is suspected.

Methods

We retrospectively analysed the data from patients who underwent a muscle biopsy for diagnosis purposes between 01/01/2000 and 12/31/2020 in our centre. We selected patients in whom FC leucocyte phenotyping was performed in both muscle sample and blood, and included at least CD45, CD3, CD4, CD8 and CD56 markers. Diagnostic classification combined clinical, immunological and histopathological data and patients were separated in three groups: (i) Dysimmune and Inflammatory Myopathies (DIM); Non-Inflammatory Conditions (NIC); and patients without definite muscle pathology, named Controls (CTL). Histopathological techniques were carried-out as described [7]. All patients were *a posteriori* classified according to the EULAR Classification of Immune Idiopathic Myopathies [8]. Study was approved by the Institutional Review Board (IRB00003888,

IORG0003254, FWA00005831) of the French Institute of Medical Research and Health (approval #20-724).

Statistical analyses were carried out by Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter) with an alpha error of 5%. The differences are significant for a value $P < 0.05$ and indicated on graphs by *, or ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test was used to compare flow cytometry data.

Results

101 muscle biopsies were performed in our centre during the study period. FC was done in 92 (90.20%) including 44 DIM, 32 NIC and 16 CTL. Age, sex and detailed diagnoses are indicated in Table.1.

Quantification of circulating and intramuscular T cells and NK cells

The repartition of studied circulating (blood, b) leucocytes subsets was similar in DIM, NIC and CTL (Fig. 1B). FC analysis showed that DIM group distinguished from NIC and CTL by a higher percentage of intramuscular (muscle, m) $CD3^+ CD8^+$ T cells and a lower percentage of $m CD3^+ CD4^+$ T cells. In contrast, $mCD3^- CD56^+$ NK cells were similar in the three groups (Fig.1C). In addition, $mCD8^+$ T cells/ $bCD8^+$ T cells ratio was significantly higher in DIM (1.58 vs 0.97 and 0.95 for NIC and CTL, respectively) whereas there was no difference regarding $mCD4^+$ T cells/ $bCD4^+$ T cells ratio (0.67 vs 0.88 and 0.99, Fig.2A). Similarly, $mCD4^+/CD8^+$ T cells ratio was significantly decreased in DIM (1.03 vs 1.88 and 1.45 for NIC and CTL, respectively) whereas there was no difference regarding $bCD4^+/CD8^+$ T cells ratio (2.20 vs 2.04 and 1.54, Fig.2B).

IntraMuscular Inflammation (IM-I) index in DIM, NIC and CTL

To avoid the bias induced by variations of CD4⁺ and CD8⁺ T cells repartition in blood, we calculated the ratio $[mCD4^+T/CD8^+T]/[bCD4^+T/CD8^+T]$ that we termed IntraMuscular Inflammation (IM-I) index. IM-I index was similar in CTL and NIC (0.99 ± 0.25 in CTL vs 0.94 ± 0.28 in NIC, ns) reflecting the similar proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in blood and muscle. In contrast, IM-I index was markedly decreased in DIM (0.55 ± 0.48 ; $p=.0001$) compared to CTL and NIC, with minimum overlapping between DIM and CTL or NIC (Fig. 2C), witnessing the selective intramuscular enrichment in CD8⁺ T-cells in DIM compared to CTL and NIC. Four cases with DIM had IM-I index within the values corresponding to non-inflammatory muscles (1.52, 1.75, 2.22 and 2.36, Fig. 2C). Two of them had abnormally high number of circulating CD8⁺ T cells (61% and 80% of T cells). The two others had granulomatous myositis, which is characterized by the presence in muscle tissue of non-caseous giant-cell granulomas with numerous CD4⁺ T cells [9]. Our results didn't show any difference between DIM and NIC and CTL regarding NK cell muscle infiltration when comparing muscle NK cells percentage and NK muscle/NK blood.

Correlation between IM-index and EULAR classification of Idiopathic Inflammatory Myopathies

In order to validate the IMI-index, we classified the cohort of 92 patients according to the EULAR/ACR classification of idiopathic inflammatory myopathies (Fig. 3A). FC diagnosis and EULAR/ACR classification were indicated in table.1. The required data were available for 89 patients: (i) *Definite IIM* (PM, IBM, AINM, DM, amyopathic DM and Juvenile DM, n=14); (ii) *Probable IIM* (n=15) and (iii) *Not Probable IIM* (n=60) (Fig. 3B). IM-I index was 0.83 ± 0.72 and 0.87 ± 0.33 in *Probable IIM* and *Not Probable IIM* groups, respectively, while it was markedly

decreased in *Definite IIM* (0.4 ± 0.27) (Fig. 3C). Three patients, who have been classified as *Probable IIM* according to EULAR/ACR classification, had a high IM-I index (1.75, 2.22 and 2.36, Fig. 3C). This apparent discrepancy can be explained by their peculiar conditions. Indeed, one of them had a chronic CD8⁺ T cell hyperlymphocytosis associated with HIV infection, and the two others had a granulomatous myositis, which is known to be characterized by the abundance of CD4⁺ T cells.

Discussion

Diagnosing idiopathic inflammatory myopathies (IIM) requires to evidence the immunological nature of muscle involvement and to accurately delineate the subtype of IIM. IIM delineation is an important step since that will determine the complementary workup, the prognosis and the treatment. Although non- or minimally-invasive methods such as muscle imaging or MSA screening are currently preferred to muscle biopsy in first intention, biopsy keeps all its usefulness for detecting and characterizing myopathological processes, especially when diagnosis remains ambiguous or in case of therapeutic failure. Ancient studies reported that, in IIM, false-negative results may occur in 10–20% of all biopsies, a finding ascribed to the focal nature of inflammatory muscle injuries [10, 11]. Pathologists constantly seek to improve the diagnostic performance of muscle biopsy, in particular by using a large number of immunopathological markers [7]. FC is an additional technique which allows to precisely count the different leucocyte subpopulations present within tissue as well to precisely measure their activation state. Our present results points out its potential diagnostic usefulness, since DIM associated with an elective intramuscular enrichment in CD8⁺ T cells compared to NIC and CTL. Interestingly, this finding was not restricted to polymyositis and IBM, which are known to be characterized by CD8⁺ T-cells muscular

infiltration, but was also observed in other types of DIM such as dermatomyositis. At any rate, FC allows to accurately detect intramuscular inflammation and therefore to overcome the inter-rater variability in muscle biopsy reading. In our cohort, nine DIM patients were classified as “Not IIM” by the EULAR classification, while the calculation of the IMI index found a rate <0.55 , supporting the diagnosis of DIM. Thus, the IMI index could be a complementary marker for assessing the diagnosis of IIM in situations of uncertainty, and help to prompt treatment initiation. Of course, we are aware of the limitations of such retrospective study and of the need for further studies, but these preliminary results seem sufficiently encouraging to consider FC as a new promising for that analysis of muscle inflammation.

References

1. Lundberg IE, Fujimoto M, Vencovsky J, Aggarwal R, Holmqvist M, Christopher-Stine L, Mammen AL, Miller FW. Idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):86. Doi: 10.1038/s41572-021-00321-x.
2. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975; 292:344–7.
3. Walter HAW, Kamperman RG, Raaphorst J, Verhamme C, Koelman JHTM, Potters WV et al. Optimisation of Diagnostic Accuracy in idiopathic inflammatory myopathies (ADAPT study): a protocol for a prospective diagnostic accuracy study of multimodality testing in patients suspected of a treatable idiopathic inflammatory myopathy. *BMJ Open*. 2021; 11(12):e053594. Doi: 10.1136/bmjopen-2021-053594.
4. Malartre S, Bachasson D, Mercy G, Sarkis E, Anquetil C, Benveniste O, Allenbach Y. MRI and muscle imaging for idiopathic inflammatory myopathies. *Brain Pathol*. 2021; 31(3):e12954. Doi: 10.1111/bpa.12954.
5. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol*. 2018; 75(12):1528-1537. Doi: 10.1001/jamaneurol.2018.2598.
6. Olivier PA, De Paepe B, Aronica E, Berfelo F, Colman R, Amato A et al. Idiopathic inflammatory myopathy: Interrater variability in muscle biopsy reading. *Neurology*. 2019;93(9):e889-e894. Doi: 10.1212/WNL.0000000000008005.
7. Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, Gherardi RK, Berenbaum F, Guillevin L et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2:154. Doi: 10.1186/s40478-014-0154-2. PMID: 25339355.
8. Lundberg IE, Tjárnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, de Visser M, Alfredsson L et al. European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Adult and Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies and Their Major Subgroups. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69(12):2271-2282. Doi: 10.1002/art.40320.
9. Hewer E, Goebel HH. Myopathology of non-infectious inflammatory myopathies - the current status. *Pathol Res Pract*. 2008; 204(9):609-23. Doi: 10.1016/j.prp.2008.03.006.
10. Bohan A, Peter JB, Bowman RL, Pearson CM. Computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine*. 1977; 56(4): 255-86.
11. Amato AA, Barohn RJ. Evaluation and treatment of inflammatory myopathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80(10):1060-8. Doi: 10.1136/jnnp.2008.

Legends

Figure 1. A. Representative panel of flow cytometry intramuscular lymphocytes detection using mechanical dissociation. Lymphocytes were gated on viable singlet SS-C low CD45⁺ cells. CD8⁺ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ cells, CD4⁺ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ cells, NK cells were identified as CD45⁺ CD3⁻ CD56⁺ cells. **B-C:** Flow cytometry detection of blood (**B**) and mechanically extracted muscular (**C**) CD4⁺ T, CD8⁺ T and NK lymphocytes in DIM (blue, n=), NIC (red, n=) and CTL (green, n=) groups. Results are presented as mean \pm SD. *p < 0.05, One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test.

Figure 2. A. Muscle/blood CD8⁺ T and CD4⁺ T NK lymphocytes ratio in DIM (blue, n=), NIC (red, n=) and CTL (green, n=) groups. **B.** Muscular and Blood CD4⁺ T/CD8⁺ T ratio in DIM, NIC and CTL groups. **C.** (IMI)-Index (Left graph) and ectopic points of (IMI)-index in DIM, NIC and CTL groups (Right graph). Results are presented as mean \pm SD. *p < 0.05, One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test.

Figure 3. A. Calculator used by the EULAR classification. **B.** Classification tree of idiopathic inflammatory myopathies according to EULAR/ ACR criteria. **C.** (IMI)-Index and ectopic points of (IMI)-index in DIM, NIC and CTL groups. Results are presented as mean \pm SD. *p < 0.05, One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test

Table 1. Sex, Age, histological diagnosis, EULAR classification and IMI-index in included patients

Patient	Sex	Age	Histological Diagnosis	EULAR	CD4/CD8 mb
Patient 1	F	34	CD8 ⁺ T cell Inflammation	PROBABLE IIM	0,08951049
Patient 2	F	66	Polymyositis	DEFINITE IIM (IBM)	0,121693122
Patient 3	F	63	Inclusion body myositis	DEFINITE IIM (IBM 99%)	0,125217391
Patient 4	F	48	Dermatomyositis	DEFINITE IIM PM 99%)	0,146666667
Patient 5	M	44	HIV Polymyositis	PROBABLE IIM (PM 85%)	0,238095238
Patient 6	F	67	Vasculopathy+ Atrophy	NOT IIM 38%	0,244186047
Patient 7	M	64	Inclusion body myositis	DEFINITE IIM (IBM)	0,252543941
Patient 8	M	60	Lupus myositis	PROBABLE IIM (PM 87%)	0,285326087
Patient 9	F	71	Vasculopathy	DEFINITE IIM	0,289224953
Patient 10	M	23	Dermatomyositis	DEFINITE IIM	0,289285714
Patient 11	M	27	Polymyositis	NOT IIM 11%	0,291083567
Patient 12	F	56	Dermatomyositis	DEFINITE IIM (DM 96%)	0,291666667
Patient 13	M	59	Endomysial Inflammation +Neuropathy	NOT IIM 29%	0,3125
Patient 14	M	41	Probable Polymyositis		0,318027211
Patient 15	F	66	Non specific myositis	NOT IIM	0,333333333

Patient 16	F	35	Dermatomyositis	PROBABLE IIM 76%	0,333333333
Patient 17	M	36	Auto-immune necrotizing myopathy	NOT IIM 50%	0,350793651
Patient 18	F	74	Inclusion body myositis	DEFINITE IIM (IBM)	0,391111111
Patient 19	M	68	Inflammatory myopathy	PROBABLE IIM	0,4
Patient 20	M	64	Myositis secondary to thymoma		0,408067542
Patient 21	F	42	Neurogenic disease + Probable Polymyositis		0,419533851
Patient 22	F	72	Inclusion body myositis	PROBABLE IIM	0,449197861
Patient 23	F	59	Dermatomyositis	DEFINITE IIM	0,464629121
Patient 24	M	46	Overlap myositis	PROBABLE IIM	0,464646465
Patient 25	F	19	Probable polymyositis	DEFINITE IIM	0,497142857
Patient 26	F	25	Overlap myositis	NOT IIM 4%	0,498113208
Patient 27	F	54	Non specific myositis+ vasculitis	NOT IIM 16%	0,51242236
Patient 28	F	33	Fasciitis	NOT IIM 2%	0,532258065
Patient 29	F	20	Non specific myositis	PROBABALE IIM	0,542635659
Patient 30	F	32	Dermatomyositis	NOT IIM 23%	0,555555556

Patient 31	M	59	Inclusion body myositis + Neurogenic disease	DEFINITE IIM (IBM)	0,594871795
Patient 32	M	60	Necrotizing myopathy	NOT IIM 5%	0,595744681
Patient 33	M	46	Dermatomyositis	DEFINITE IIM	0,689035917
Patient 34	M	49	Auto-immune necrotizing with anti SRP	PROBABLE IIM (PM 83%)	0,697560976
Patient 35	M	60	Overlap myositis + septal inflammation	PROBABLE IMM	1,755944931
Patient 37	M	72	Granulomatous myositis	PROBABLE IIM	2,364864865
Patient 38	M	51	Macrophagic myofascitis, Non specific myositis	NOT IIM 16%	0,442687747
Patient 39	F	59	Non specific myositis		0,68
Patient 40	M	51	Granulomatous myositis	NOT IIM	0,750617284
Patient 41	M	54	Chronic myopathy	NOT IIM 16%	0,76754386
Patient 42	F	46	Necrotizing myopathy	NOT IIM 2%	1,124615385
Patient 43	F	72	Overlap myositis	NOT IIM 1%	1,523809524
Patient 44	F	61	Atrophy type II + microangiopathy	NOT IIM 13%	0,470779221
Patient 45	M	54	Neurogenic disease	NOT IIM	0,615090213

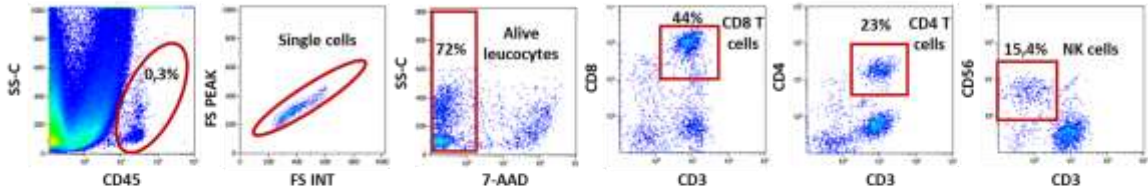
Patient 46	F	57	Atrophy type II	NOT IIM 8%	0,631897203
Patient 47	M	69	Neurogenic disease	NOT IIM 1%	0,694214876
Patient 48	M	41	Myofiberatrophy	NOT IIM 2%	0,707082833
Patient 49	M	49	Myofiberatrophy	NOT IIM	0,712891986
Patient 50	M	72	Neurogenic disease	NOT IIM 13%	0,719298246
Patient 51	F	57	Proximal myotonic myopathy	NOT IIM 7%	0,721925134
Patient 52	F	75	Atrophy type II+ neurogenic disease	NOT IIM	0,756481481
Patient 53	F	40		NOT IIM	0,760869565
Patient 54	F	65	Atrophy type II	PROBABLE IIM	0,761313221
Patient 55	F	57	Inflammatory neuropathy	NOT IIM 16%	0,763636364
Patient 56	M	40	Mitochondriopathy + HIV Polymyositis	PROBABLE IMM (PM62%)	0,806100218
Patient 57	F	57	Myopathie necrosante	DEFINITE IIM	0,811965812
Patient 58	F	74	Neurogenic disease	NOT IIM 3%	0,852713178
Patient 59	M	32	Atrophy type II (myasthenia)	NOT IIM 2%	0,90625
Patient 60	F	43	Congenital myasthenia	NOT IIM 1%	0,908424908
Patient 61	M	76	Atrophy type II	NOT IIM 4%	0,912280702
Patient 62	F	33	Ischemia	DEFINITE IIM (DM 99%)	0,965106383

Patient 63	F	50	Atrophy type II	NOT IIM 1%	0,972
Patient 64	F	69	Neurogenic atrophy	NOT IIM 2%	0,985248447
Patient 65	F	84	Rod myopathy	NOT IIM 4%	0,992063492
Patient 66	F	73	Neurogenic atrophy	NOT IIM	1,018518519
Patient 67	F	48	Atrophy type II	NOT IIM	1,06557377
Patient 68	M	51	Macrophagic myofascitis	NOT IIM	1,166240409
Patient 69	M	44	Neurogenic atrophy	NOT IIM 1%	1,21969697
Patient 70	F	49	Macrophagic myofascitis	NOT IIM 7%	1,34375
Patient 71	M	28	Macrophagic myofascitis	NOT IIM	1,387755102
Patient 72	F	42	Neuropathy	NOT IIM	1,404958678
Patient 73	M	78	Neurogenic atrophy	NOT IIM 1%	1,479289941
Patient 74	F	84	Lobular fibers	NOT IIM	1,666976744
Patient 75	M	37	Dysferlinopathy (LGMD 2B)	NOT IIM 25%	0,51
Patient 76	M	37	Multicore myopathy	NOT IIM 1%	0,672131148
Patient 77	M	62	Normal	NOT IIM	0,669856459
Patient 78	F	41	Normal	NOT IIM 7%	0,683333333
Patient 79	F	22	Normal	PROBABLE IIM	0,722222222
Patient 80	F	60	Normal	NOT IIM 1%	0,748051948

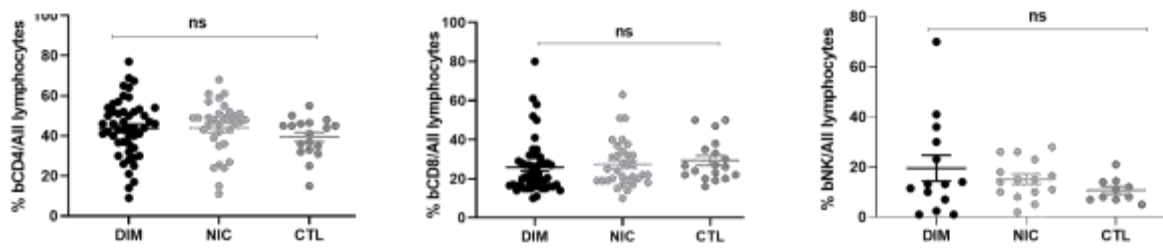
Patient 81	M	63	Normal	NOT IIM	0,782608696
Patient 82	F	40	Normal	NOT IIM 5%	0,787878788
Patient 83	M	41	Normal	NOT IIM 5%	0,859375
Patient 84	F	35	Normal	NOT IIM 2%	0,960170697
Patient 85	F	56	Normal	NOT IIM 5%	0,987317073
Patient 86	M	55	Normal)	NOT IIM 7%	1,041666667
Patient 87	M	65	Normal	NOT IIM 1%	1,080392157
Patient 88	F	56	Normal	NOT IIM 5%	1,120769231
Patient 89	M	51	Macrophagic myofascitis	NOT IIM 7%	1,142857143
Patient 90	F	22	Normal	NOT IIM	1,186507937
Patient 91	F	34	Normal	NOT IIM 2%	1,322962963
Patient 92	M	35	Normal	NOT IIM 3%	1,433691756

Figure.1

A



B



C

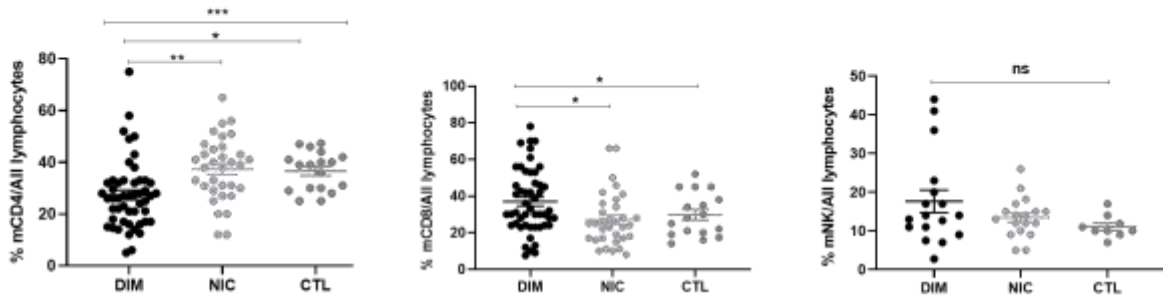
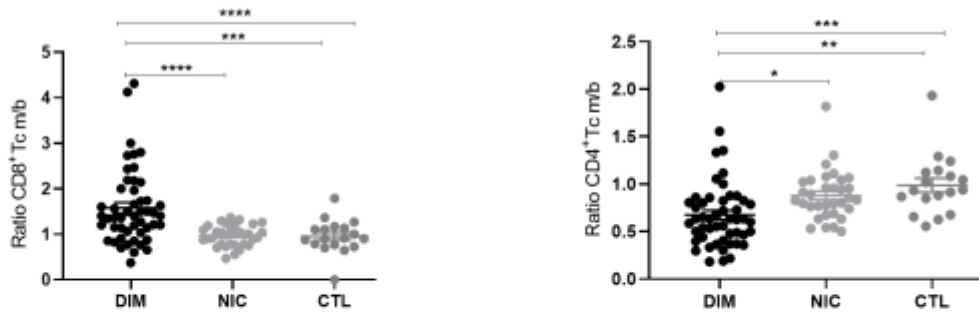
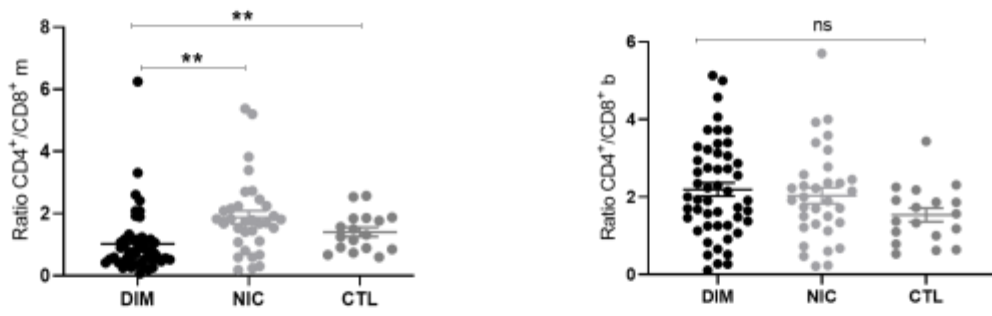


Figure.2

A



B



C

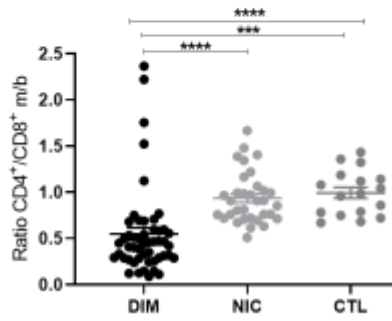
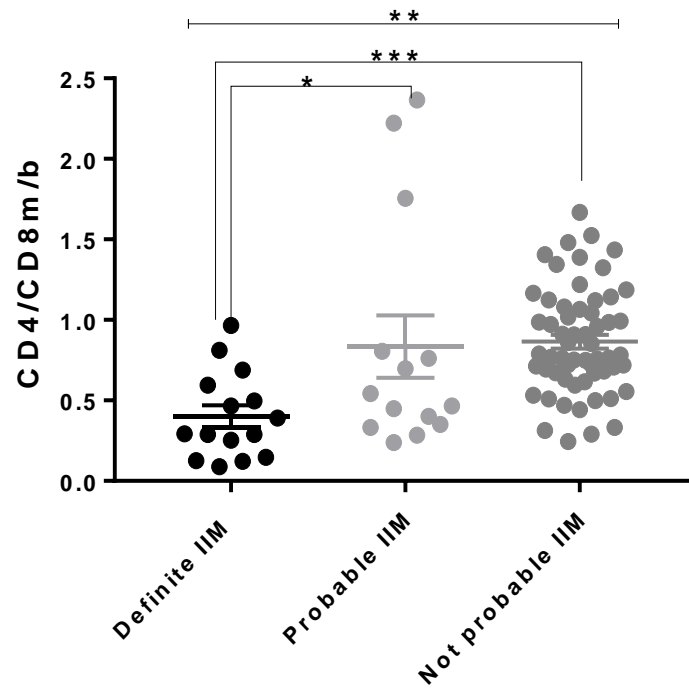


Figure.3



Conclusion

Dans ce travail, nous avons défini le rapport $[mCD4^+T/CD8^+T]/ [bCD4^+T/CD8^+T]$ que nous avons appelé index d'Inflammation IntraMusculaire (IMI-I) qui permet de s'affranchir des biais induits par les variations de la répartition des lymphocytes TCD4⁺ et CD8⁺ dans le sang. L'indice IMI-I était de 0.99 ± 0.25 dans le groupe CTL, reflétant la proportion similaire de cellules TCD4⁺ et CD8⁺ dans le sang et le muscle, et de 0.94 ± 0.28 dans le groupe NIC. En revanche, l'indice IMI-I était nettement diminué dans le groupe DIM (0.55 ± 0.48 ; $p = 0.0001$) ce qui témoigne de l'existence d'un recrutement lymphocytaire T CD8⁺ intramusculaire dans les DIM quelque soit leur type (à l'exception des myosites granulomateuses). Ainsi un IMI-Index ≤ 0.55 peut être comme marqueur de recrutement intramusculaire de LTCD8⁺ et donc un indice diagnostique de DIM.

Publication 3 : Les innate lymphoid cells dans la biologie et la pathologie musculaire

Présentation du sujet

Les cellules lymphoïdes ou innate lymphoid cells (ILC) ou cellules lymphoïdes innées sont les contreparties innées des lymphocytes T. Les ILC sont en grande partie des cellules résidentes dans les tissus, elles agissent tôt dans la réponse immunitaire en réagissant rapidement aux signaux et aux cytokines inductrices, exprimées par les cellules résidentes dans les tissus. Les ILC1, ILC2 et ILC3 sont les homologues innés des cellules T CD4⁺ auxiliaires (Th)1, Th2 et Th17, respectivement en termes de fonction, alors que les cellules NK reflètent les fonctions des cellules T CD8⁺ cytotoxiques: les ILC1 sont T-bet⁺ et produisent de l'interféron gamma, les ILC2 expriment fortement Gata-3 et libèrent l'IL-5 et l'IL-13, tandis que les ILC3 dépendent de ROR γ t et sécrètent l'IL-22 et l'IL-17. La découverte et l'étude des ILC au cours des dernières décennies ont changé la perception de la régulation immunitaire. Dans nos résultats préliminaires, nous avons mis en évidence un recrutement de cellules NK, contemporain de l'infiltrat de macrophages pro- inflammatoires dans les muscles Tibialis Antérieurs lésés par des injections de chlorure de baryum.

Depuis leur découverte initiale dans l'intestin, les ILC ont été identifiées dans plusieurs autres organes chez la souris, notamment les poumons, la peau, le tissu adipeux, le foie, le pancréas et le cœur, ainsi que chez l'homme. Leurs rôles pathologiques et protecteurs dans de multiples conditions humaines ont été décrits comme dans l'asthme, la dermatite atopique, la fibrose et les infections. Les ILC2 jouent également un rôle essentiel dans l'homéostasie du tissu adipeux en soutenant l'immunité de type 2 et en favorisant la formation de tissu adipeux blanc.

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique de recrutements des sous populations ILC dans des modèles murins : (i) Modèle murin de myonécrose aigüe (n=10 par date) obtenu par injection de chlorure de baryum ;(ii) Deux modèles murins de dystrophie musculaire donc de myonécrose chronique : La souris *Bla/J* qui est modèle murin de la dysferlinopathie et la souris *Sgca* qui est modèle murin de l'alpha sarcoglycanopathie (n=10 par condition). Nous avons également recherché les ILC dans des biopsies humaines obtenues dans le cadre de la routine (n=12, 10 muscles histologiquement normaux et 2 muscles myopathiques)

Dans le cadre de cette publication où je suis 1^{ère} auteure, j'ai réalisé les extractions des cellules mononuclées, les marquages des leucocytes, l'analyse des résultats de cytométrie en flux, la création des figures et la rédaction de la publication.

Article: En preparation,

Innate lymphoid cells in skeletal muscle biology and pathology

SAIDJ Tassadit, MD, PhD, 1 BABA AMER Yasmine, A.E.,1 HENRY Adeline, Ass. Eng, 3 SOUVANNANORATH Sarah, MD, 1, 5 Edoardo Malfatti, MD 1,5 RELAIX Frederic, PhD,1 BELDI-FERCHIOU Asma, MD, PhD, 2,4 AUTHIER François Jérôme, MD, PhD1, 5

Innate lymphoid cells in skeletal muscle biology and pathology

SAIDJ Tassadit, MD,¹ BABA AMER Yasmine, Eng,¹ SOUVANNANORATH Sarah, MD,^{1,2} HENRY Adeline, Eng,³ MALFATTI Edoardo, MD^{1,2} RELAIX Frederic, PhD,¹ BELDI-FERCHIOU Asma, MD, PhD,^{4,5} AUTHIER François Jérôme, MD, PhD^{1,2}

1. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Relaix, F-94010 Créteil,

France ;

2. APHP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Centre de Référence des Maladies

Rares Neuromusculaire Nord/Est/Ile-de-France, Département de Pathologie, F-94010,

Créteil, France;

3. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Plateforme de Cytométrie en flux, F-94010

Créteil, France;

4. AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Laboratoire d'immunologie biologique, F-94010 Créteil, France.

5. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Equipe Cohen, F-94010 Créteil, France ;

Corresponding author:

AUTHIER François Jérôme, MD, PhD,

Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, Département de Pathologie,

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP),

51, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, FRANCE

Phone : +33 1 4981 2735 – Fax : +33 1 4981 2733

Mail:francois-jerome.authier@aphp.fr

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Experiments conducted in animals have been formally approved by the animal steering committee and ethical committee (ComEth) of the Mondor Institute of Biomedical Research (IMRB) (authorization APAFIS#13472-2018030914428353v3). In accordance with current French legislation and hospital research ethics committee (Approval #12-009 at CPP/IRB Ile de- France IX), patients gave their written informed consent for their participation in research.

Consent for publication

All authors have read and approved the final version of the paper.

Availability of data and material

In accordance with French legislation, all nominative data from patients are stored and kept in Henri Mondor University Hospital. Detailed quantitative data from animals and patients can be obtained upon request to corresponding author and after anonymization for patients.

Competing interests

Authors have no conflict of interest to disclose.

Funding

This work was funded by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), Pole Translamuscle (project number 19507) and RHU CARMMA. TS benefited from a fellowship from AFM (grant # 19507).

Authors' contributions

TS: performing animal experiments, cell extraction from muscles in animals and human, and

FC techniques; results analysis; scientific discussions and paper writing; YBA: logistic organization, contribution to animal experiments cell extraction from muscles in animals;AH: supervision of FC in animals; EM, SS: inclusion of patients; muscle sampling;; FR: scientific discussion and results analysis; ABF: supervision of FC in human, results analysis, scientific; FJA: study conception and supervision, patients' inclusion, myological evaluation and diagnostic classification of patients, scientific discussions and paper writing.

Acknowledgements

We are extremely grateful to the patients who kindly accepted to contribute to our research.

Abstract

Among the cell populations present in normal adult skeletal muscle tissue, leucocytes represent a low percentage, mainly formed by resident macrophages. In pathological conditions, myofiber necrosis by itself induces marked leucocyte recruitment. Indeed, following an early, transient recruitment of neutrophils, myeloid mononuclear cells, mainly derived from a pool of circulating monocytes, infiltrate the injured tissue. Most recruited leucocytes are macrophages, with an initial proinflammatory or M1 phenotype, required for the efficient clearance of apoptotic or necrotic cells and derivative debris; a subsequent population of anti-inflammatory (M2- type) macrophages displays specific pro-regenerative functions. Lymphocytes also accumulate in skeletal muscle after acute injury, as well as in the case of chronic muscle dystrophies related to dystrophin, dysferlin or sarcoglycan deficiencies. We have also described in the muscles of acute myonecrosis and chronic necrosis a small infiltrate of NK cells. Other leucocytes among them Innate lymphoid cells (ILC) may be involved in the process of necrosis-regeneration. Flow cytometry (FC) associated to a purely mechanical extraction of leucocytes is the most reliable technique for analyzing leucocyte subpopulations and evaluating their activation levels. In mouse, skeletal muscle regeneration was associated with the enrichment of NK, ILC1 and ILC2 which parallels that of M1 macrophages in acute myonecrosis. In dysferlin deficiency, NK and ILC1 influx precedes myonecrosis suggesting a possible role for NK in fibers injuries. ILC2 parallels the onset of myonecrosis. Furthermore, focal muscle injury induces remote muscular recruitment of ILC2, but not of NK and ILC1.

Key words: Bla/J mouse, flow cytometry (FC), innate lymphoid cells (ILC), myofiber necrosis and regeneration, tissue repair.

Abbreviations

BaCl₂: Barium chloride.

BSA: Bovine serum albumin.

CLP: common lymphoid progenitors.

CILCP: Common ILC precursors

DIM: Dysimmune/inflammatory myopathies.

DPI: Days post-injury.

FAP: Fibro/Adipogenic progenitor.

FC: Flow cytometry.

FMO: Fluorescence-minus-one.

HE: Hematoxylin-eosin.

IBM: Inclusion body myositis.

ID2: Inhibitor of DNA binding 2.

IHC: Immunohistochemistry.

ILC: innate lymphoid cell

LGMD: Limb girdle muscle dystrophy.

LL: Lower limbs.

MFI: mean fluorescence intensity.

min: minutes.

NIC: Non-Immune Condition.

NFIL3: Nuclear factor Interleukin 3

TCF1: T cell factor 1

NK: Natural killer cell.

PBS: Phosphate buffered saline.

PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger.

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640.

RT: Room temperature.

SC: satellite cells

SG: sarcoglycan.

TA: Tibialis anterior.

Treg: T regulatory cell.

UL: Upper limb.

Vs: Versus.

WT: Wild type.

Introduction

Several muscle diseases are characterized by regenerative necrosis implying the activation of satellite cells (SC). Myofiber necrosis induces marked leucocyte infiltration [1]. Following early transient recruitment of neutrophils, myeloid mononuclear cells, mainly derived from a pool of circulating monocytes, infiltrate the injured tissue. Most recruited leucocytes are macrophages, with an initial proinflammatory, or M1 phenotype. These proinflammatory macrophages are required for the efficient clearance of apoptotic or necrotic cells and derivative debris. A subsequent population of anti-inflammatory, or M2- type, macrophages displays specific pro-regenerative functions, such as myogenic cell differentiation, matrix remodeling and the promotion of angiogenesis [2]. Other immune cells have been observed in damaged muscle, among them dendritic cells which participate in the cycles of inflammatory necrosis - muscle regeneration by interacting with T CD8⁺ lymphocytes [3, 4]. Lymphocytes also accumulate in skeletal muscle after acute injury, as well as in the case of chronic muscle dystrophies related to dystrophin [1], dysferlin [5] or sarcoglycan [6] deficiencies. The function of intramuscular lymphocytes is poorly understood, although both CD4⁺ and CD8⁺ T cells seem to play a role in the pathological features of dystrophinopathy [6]. In addition, it was recently shown that CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) accumulate in acutely injured skeletal muscle and are required for the completion of post-injury muscle repair [2].

Innate lymphoid cells (ILC) are lymphocytes that do not express the type of diverse antigen receptors expressed on T cells and B cells [7, 8]. ILC are mostly tissue resident cells. The discovery and study of ILC has contributed to the understanding of the role of the immune system in tissue homeostasis, in particular by the production of type 1 and type 2 cytokines to control pathogens at mucosal barriers, potentiating adaptive immunity and regulating

tissue inflammation [10]. They are the counterparts of T helper lymphocytes; ILC1, ILC2, and ILC3 mirror CD4⁺ T helper (Th)1, Th2, and Th17 cells, respectively, in terms of function, whereas natural killer cells mirror the functions of CD8⁺ cytotoxic T cells [9,10]. Indeed, the group of ILC1 includes ILC1 themselves and natural killer (NK) cells that express CD161 and interleukin (IL)-12 receptor beta (IL-12R β) on their surface, and the transcription factor T-bet. ILC1 secrete interferon γ (IFN γ) and tumor necrosis factor α (TNF α), while NK cells produce TNF α , IFN γ , perforin, and granzyme [11, 12, 13, 14]. ILC2 express the IL-33 receptor (IL-33R) and the transcription factors Gata binding protein 3 (Gata-3) and RAR-related orphan receptor alpha (ROR α), and release IL-5 and IL-13, amphiregulin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and IL-9 [7,15, 16]. ILC3 are subdivided into three populations according to their expression of C-C motif chemokine receptor 6 (CCR6) and natural cytotoxicity receptors (NCR), NKp46 in mouse and NKp44 in human. ILC3 typically express IL-1 and IL-23 receptors and the ROR γ t and aryl-hydrocarbon receptor (AhR) transcription factors and release IL-17 and IL-22 [13, 17]. The different phenotypic markers of ILC subsets are reported in the table 1. Furthermore, regulatory ILC are IL-10 producing ILC and express the inhibitor of DNA binding 3 (ID3) transcription factor and the transforming growth factor beta (TGF- β) [18, 19, 20].

Lymphocyte subpopulations (ILC, T, B, and NK cells) develop from common lymphoid progenitors (CLPs) in the fetal liver and the adult bone marrow [21]. Common ILC precursors (CILCP) denote lymphoid precursors that have lost B and T cell potential, have no myeloid potential, and give rise to the three main ILC groups and conventional NK cells [22]. In the mouse, the differentiation of CLP into mature ILC subsets is regulated by the coordinated expression of a variety of transcription factors that activate or repress critical target genes. These transcription factors include ID2, NFIL3, promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF),

TCF1 and GATA3 [9]. The expression of the transcription factor NFIL3 that controls ID2, Gata-3, EOMES, and T-bet correlates with the engagement of progenitors in the ILC2, ILC3, ILC1 and NK pathways [22, 23, 24]. The Notch signal is crucial for generation of T cells and NK cells. However, a recent study suggests that short exposition or intermediary amounts of Notch combined with high amounts of IL-7 in CLP leads to ILC2 generation, while sustained or high amounts of Notch signaling induces differentiation into T cells [22].

Since their initial discovery in the gut, ILC2 have been identified in several other organs in mice, including the lung, skin, adipose tissue, liver, pancreas, and heart, as well as in humans and their pathological and protective roles in multiple human conditions such as asthma, atopic dermatitis, fibrosis, and infections. ILC2 also play a critical role in adipose tissue homeostasis by supporting type 2 immunity and promoting the formation of white adipose tissue [25, 26]. Furthermore, different murine studies suggest that ILC2 are involved in the process of tissue repair. In murine models of infection with helminth *N. brasiliensis*, ILC2 were found to alleviate the lung tissue damage [27]. Indeed, ILC2 seems to play a role in cutaneous wound healing [28]. Thereby, the depletion of ILC2 in an influenza experimental infection was found to aggravate the loss of epithelial integrity cause by influenza A virus in mice [29,30].

In the present work, we studied and analyzed the recruitment kinetics of ILC1, ILC2, ILC3 and NK in mouse models of acute necrosis and muscular dystrophies and also in human muscle.

Materials and Methods

Animal models

One to 12 month old mice of different genotypes were used, normal or transgenic: (i) wild type mice C57BL/6 J; (ii) dysferlin-deficient Bla/J mice, in which the progressive muscular dystrophy (*prmd*) allele from the A/J inbred strain, an ETn retrotransposon (5-6kb) inserted

in the intron 4 of dysferlin gene, is crossed onto the C57BL/6 genetic background [31]; and (iii) α -sarcoglycan-deficient *sgca* C57BL/6 mice, in which exons 2 and 3 of the α -sarcoglycan gene were replaced by a neomycin resistance cassette [32]. *Bla/J* and *sgca* mice are mouse models of limb girdle muscle dystrophy (LGMD)-type 2B and D, respectively. In both models, skeletal muscle changes are typically characterized by ongoing muscle myofiber necrosis and regeneration, leucocyte recruitment, myofiber atrophy and fibrosis, with first muscular changes being detectable by 1 week and 2 months of age in *sgca* and *Bla/J*, respectively. For each experimental group, 10 animals have been used. Animals were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All the experiments were carried out per French and European Community guidelines.

Experimental muscle injury

For acute muscle injury experiments, WT mice (n=5 for each time point) were anesthetized with 80mg/kg ketamine and 20 mg/kg xylazine, and the left *Tibialis anterior* (TA) muscle was injected with 50 μ L barium chloride (1.2% BaCl₂ in PBS) [33]. Non injected right TA muscles were used as controls. Dates of study were 1, 3, 5 and 7-day post injection (DPI).

Skeletal muscle sampling in animals and intramuscular leucocytes extraction

Mice were euthanatized by cervical dislocation. For acute necrosis experiments, only TAs were taken off. For the study of *Bla/J* and *Sgca* models, one forelimb muscle (*Biceps brachii*), and hindlimb muscles, *Psoas*, *Gluteus maximus*, *Gluteus medius*, *Quadriceps femoris*, *Semi membranosus* and *Semi tendinosus*, *Sartorius*, *Gastrocnemius*, *Soleus*, *Tibialis anterior*, and *Extensor digitorum longus* muscles were dissected for *Bla/J* and *Sgca* models. Muscles were kept in a wet gauze pad and weighed. Samples dedicated to histology were snap frozen at -80 °C in nitrogen-cooled isopentane as described [34]. Hematoxylin-eosin (HE) stain and immunofluorescence techniques were performed on 7- μ m cryosections. Samples dedicated

to cytology were carefully and repeatedly rinsed with 0.9% NaCl to eliminate most of the blood. Then, minced with a micro-scissor or scalpels, and gently crushed with a syringe plunger, and collected in a 20 ml of RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific Life Technologies SAS; Les Ulis, France). The cell suspension was filtered at 100, 70 and 40 µm successively then centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. Obtained cell pellets were subjected to cytocentrifugation and immunocytochemical techniques, or to flow cytometry. For cytocentrifugation, cell pellets were recovered in 600 µl bovine serum albumin (BSA)/RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ 0.2%/PFA 2%, then subjected to cytocentrifugation (500 rpm for 15 mn, Cytospin®).

Immunofluorescence analysis of leucocyte subpopulations

Immunofluorescence labelling of NK46 was performed on muscle cryosections or cytocentrifugation smears following the same protocol. After fixation (PFA 2%, 5 min at room temperature), slides were washed three times with PBS and blocked with 10% BSA (Sigma Aldrich A7906-100G) in PBS for 30 minutes at room temperature. Primary antibody was rat anti-mouse NKP46 (Biolegend 137602; San Diego, USA) diluted 1:50 in PBS and incubated overnight at 4°C. Secondary antibody was Cy3-Donkey anti-rat 1:200 (Jackson IR, 711-006-152; Ely, UK) 1 hour at room temperature (RT) and DAPI staining (Hoechst, Romainville, France) was performed for 10 sec. Slides were mounted using Vectashield Mounting Medium. Images were acquired using a Zeiss (Versailles, France) microscope and Axio vision 4.0 software.

Flow cytometry (FC) protocol for mouse ILC1, ILC2 and NK cells analysis and quantification

The following fluorochrome-conjugated antibodies directed against different cell surface markers were used: Brilliant Violet 510 anti-CD45 (clone 30-F11; Biolegend, San Diego, USA), PE/Cyanine 7 anti-CD3 (clone 17A2; Biolegend), APC750 anti-CD8a (clone 53-6.7; Biolegend), APC anti-CD11B (clone M1/70; Biolegend), Brilliant Violet anti-CD11c (clone N418; Biolegend), Brilliant Violet anti-CD19 (clone 6D5; Biolegend), Brilliant Violet anti-Gr-1 (clone RB6-8C5; Biolegend), Brilliant Violet anti-TER119 (clone TER119; Biolegend), PE-CF594 anti-CD127 (clone SB/199, BD biosciences ; Rue Aristide Berger, pont de Claix, 38800), Brilliant Violet 785 anti-NKP46 (clone 29A1.4; Biolegend), Brilliant Violet 421 anti-NKG2A/C/E (clone 20d5; BD biosciences), Alexa Fluor647 anti-CD200R (clone OX-110; BD biosciences), Alexa Fluor 488 anti-Eomes (clone Dan11mag, Thermo Fischer), PE anti-GATA3 (clone 16E10A23, Biolegend) and cell viability was ensured by using 7-AAD Viability Staining Solution (Biolegend, San Diego, USA). The obtained cell pellet was recovered in 0.2% BSA/RPMI-GlutaMAX™. After blocking non-specific Fc-mediated interactions with 0.5 µg/100 µL anti-mouse CD16/CD32, for 15 minutes at 4°C, the cell suspension was aliquoted (100 µL per tube) and the recommended quantity of each primary antibody was combined with an appropriate volume of 0.2% BSA/RPMI-GlutaMAX™ for a final staining volume of 100 µL for each tube. The incubation was performed for 30 minutes at 4°C protected from light. Cells were washed by adding 1 mL of 0.2% BSA/GlutaMAX™ in each tube, then centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded, and the cell pellet recovered in BSA/RPMI GlutaMAX™, 400 µl for each tube.

To subtract autofluorescence from analysis, unlabeled cells and fluorescence-minus-one (FMO) controls were used to determine positive and negative thresholds. Leucocytes were first gated on live CD45⁺ singlets and subsequently the different subpopulations were

identified according to the relevant markers. Data were collected on a 14-colour LSR Fortessa (BD). ILC1 were defined as CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻ (lineage negative, CD19, CD11C, Gr-1, TER119) CD11b^{low} NKP46^{+/-} CD200R⁺, ILC2 as CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻ CD11b^{low} CD127^{+/-} Gata-3⁺ and NK cells as CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻ NKP46⁺ CD159a^{+/-} Eomes⁺.

Human samples (blood and muscles)

Blood and muscle samples were obtained from 12 patients undergoing muscle biopsies for diagnostic purposes in Henri Mondor Reference Center for Neuromuscular Diseases. The routine diagnostic classification of patients combined clinical and histopathological data. In particular, European Neuromuscular Centre (ENMC) criteria were used to diagnose dermatomyositis (DM), immune mediated necrotizing myopathy (IMNM) and inclusion body myositis (IBM), and Troyanov classification was used to diagnose overlap myositis (OM)[35]. According to clinicopathological diagnosis, patients were classified as Dysimmune/Inflammatory Myopathy (DIM, n=2) or Non-Inflammatory Condition (NIC, n=10). The study was carried out per current French and European Community regulations (Henri Mondor Biological Resource Platform: registration #DC-2009-930, French Ministry of Research; approval by the *Comité de Protection des Personnes* (CPP)/IRB Ile de France-IX, March 12th, 2012).

Flow cytometry protocol for human samples (blood and muscles)

FC protocols require the use of fresh muscle tissue. Twelve muscle samples were used to analyze the kinetics of recruitment of ILC in human muscle biopsies. After mechanical dissociation of muscle biopsies, cells were collected in flow cytometer tubes in RPMI-GlutaMAX with 2% BSA (100µL of the cell suspension/tube). Cells were then immediately incubated in the dark for 30 minutes (min) at 4°C with a mix of the following antibodies: Kro anti-CD45 (clone J.33, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD3 (clone REA613, MiltenyBiotec),

PerCP-Vio700 anti-CD4 (clone REA623, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD8 (clone REA734, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD14 (clone REA599, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD15 (clone VIMC6, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD19 (clone REA675, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD20 (clone REA780, v), PerCP-Vio700 anti-CD33 (clone REA775, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD34 (clone REA1164, MiltenyBiotec), PerCP-Cy5.5 anti-CD1c (clone REA694), PerCP-Cy5.5 anti-CD203c (clone REA826, Biolegend), PerCP-Vio700 anti-CD11c (clone MJ4-27G12.4.6, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD123 (clone REA918, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-FcεRIα (clone REA758, MiltenyBiotec), PerCP-Vio700 anti-CD11c (clone MJ4-27G12.4.6, MiltenyBiotec), VioBright 515 anti-CD161 (clone REA631, MiltenyBiotec) or its VioBright 515 IgG1 isotype control, APC-Vio770 anti-CD294 (clone REA598, MiltenyBiotec) or its APC-Vio770 IgG1 isotype control, PerCP-Vio700 anti-KLRG1 (clone REA261, MiltenyBiotec) or its PerCP-Vio700 IgG1 isotype control, PE-Vio615 anti-CD117 (clone REA787, MiltenyBiotec) or its PE-Vio615 IgG1 isotype control, PCy7 anti-CD16 (clone 3G8, Beckman Coulter), PE anti-NKP44 (clone Z231, Beckman Coulter) or its PE IgG1 isotype control, APC anti-CD56 (clone N90, Beckman Coulter) or its APC IgG1 isotype control and the Viability was assessed using 7-AAD Viability Dye. Samples were then washed in PBS with 2% BSA and immediately acquired using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter).

Simultaneously, blood samples were collected in EDTA tubes and shipped at room temperature. Immunostaining was performed on 100 μL of fresh whole blood and incubated in the dark for 10 min at room temperature (RT) with the same mix of antibodies used for muscle analysis. Red blood cell lysis was then performed using VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter) according to manufacturer instructions. Finally, samples were washed in PBS with 2% BSA and immediately acquired using the 10-color Navios flow cytometer

(Beckman Coulter). All the obtained data were analyzed with Kaluza 2.1 software (BeckmanCoulter). Lymphocytes from blood and muscle samples were gated according to high-CD45 fluorescence intensity and low side scatter intensity; ILC2 were defined as CD45⁺ Lineage⁻ (CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33, CD34, CD1c, CD203c, CD11c, CD123, FcεR1α ;lin⁻) CD161⁺CD117⁺ KLRG1⁺ CD294⁺. ILC3 were defined as CD45⁺ Lin⁻ CD161⁺ CD117⁺ NKP44^{+/-}CD56^{+/-} and NK cells as CD45⁺ Lin⁻ CD161⁺ CD117⁻ CD56⁺ CD16⁺ NKP44⁺. The corresponding isotype controls were used to set the threshold of expression.

Statistics

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism V8 (La Jolla, CA) with an alpha error of 5%. The differences are significant for a value of $P < 0.05$ and indicated on graphs by *, or ** ($p < 0.01$), and *** ($p < 0.001$). Bartlett test allowed us to determine the equality of variances between groups. One-way ANOVA was used when there were more than two groups, followed by a Tukey post-hoc test in the case of equal variances or by a Dunnett test if the variances were unequal. The Student's test was used to compare two groups. For human samples, statistical analyses were carried out by Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter) with an alpha error of 5%. The differences are significant for a value $P < 0.05$ and indicated on graphs by *, or ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test and unpaired t test were used to compare flow cytometry data.

Results

Intramuscular recruitment of innate lymphoid cells (ILC1, NK cells and ILC2) in experimental conditions

In BaCl₂-injected animals, histological examination of injured muscle showed extensive acute myonecrosis followed by regeneration, with numerous pale necrotic fibers at one day post injection (1DPI), myophagocytosis and satellite cell proliferation at 3 DPI, the presence of

immature basophilic regenerating fibers at 5 DPI, and centronucleated fibers at 7 DPI (Fig. 1A) and 12 DPI (data not shown). We performed FC to quantify and analyze the intramuscular recruitment of ILC1, ILC2 and NK cells throughout acute myofiber necrosis and regeneration. The myofiber necrosis/regeneration process was associated with a massive infiltration of the injured muscle by leucocytes (CD45⁺), mainly macrophages (CD11b^{high} Gr-1⁺), peaking at 3 DPI, then decreasing to baseline levels by 7 DPI (Fig. 1B). Intramuscular ILC1 (CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻CD11b^{low} NKP46^{+/-} CD200R⁺) and NK cells (CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻ NKP46⁺ CD159a^{+/-} Eomes⁺) peaked at 3 DPI, at the same time than M1 macrophages (ILC1: 48.10±13% of CD11b^{low} cells and NK cells: 5.18±4.80% of CD11b^{High} cells; Fig. 1C-D). Indeed, Immunofluorescence performed on cytocentrifugation smears showed an NK cell infiltrates at 3DPI (Fig. 1E). Regarding Intramuscular ILC2 (CD45⁺ Lin⁻ CD3⁻ CD11b^{Low} CD127^{+/-} Gata-3⁺), they peaked also at 3 DPI on both sides (ILC2: 30.90±8.50% of CD11b^{low} cells for the injured TA and 38.20±5.40% of CD11b^{low} cells for the contralateral non-injected TA (Fig. 2A-B) evidencing that focal muscle injury induced remote muscular recruitment of ILC2. The ILC infiltration precedes the recruitment of CD8⁺T cells on day 5 post injection on both sides, injected and non-injected TA, at the rate of 19.9% and 7.5% of CD45⁺ population, respectively (Figure. 2B).

Intramuscular recruitment of innate lymphoid cells (ILC1, NK cells and ILC2) in murine dystrophic muscles

In dystrophic muscles, the ILC recruitment differs according to the considered condition. In dysferlin-deficient Bla/J mice, the recruitment of NK cells and ILC1 preceded the occurrence of first muscle injuries, since it appeared at 1 month of life (NK: 12.2±5.50% of CD11b^{high} cells; ILC1: 19.70±11.50% of CD11b^{low} population, Fig. 3 C-D). Regarding ILC2, their infiltration paralleled the onset of myonecrosis and remained at the same level at 12 months

of life (ILC2: $48.2 \pm 26.60\%$ and $46.40 \pm 4.60\%$ of $CD11b^{low}$ population, at 3 and 12 months, respectively, Fig. 3E).

In contrast, in α -sarcoglycan (SG) deficient *sgca* mice leucocyte $CD45^+$ infiltration significantly varied over time. At 1 month of life, *sgca* mice started to walk and presented a myopathic crisis that corresponded to massive myocytic necrosis and massive leucocytes infiltration at a rate of $67 \pm 22.80\%$ (Fig. 4B). At 3 months, $CD45^+$ cells dropped to $29 \pm 7.20\%$ and paralleled the rate of myofiber regeneration (Fig. 4A) to increase again at the age of six months ($63.5 \pm 23.5\%$). The NK cells were regularly recruited at low rates in parallel with overall leucocyte infiltration ($2.10 \pm 1.10\%$; $1.5 \pm 1.80\%$ and $4.0 \pm 1.60\%$ respectively at 1, 3 and 6 months of life, Fig4C).

Intramuscular ILC infiltrates in the context of human pathology

Flow cytometry and immunoperoxidase staining were used to analyze ILC1, NK cells, ILC2 and ILC3, in muscles and blood of 12 patients. Detailed diagnoses are indicated in Table 2. Two patients were diagnosed as DIM, including lupus myositis (n=1) and dermatomyositis (n=1) and ten patients were diagnosed as NIC including neurogenic changes (n=3), type II atrophy (n=3), mitochondriopathy (n=1), lipid overload myopathy (n=1), non-specific myofiber atrophy (n=1) and minimal change myopathy with lobulated fibers (n=1).

The percentages of lineage⁻ (lin^-) which includes the ILC and NK subpopulations was higher in NIC compared to DIM (NIC : $6.55 \pm 3.70\%$, DIM : $2.20 \pm 1.70\%$; Fig. 5A, left panel). Four NIC patients had high Lin^- populations (12.20% , 9.70% , 8.20% and 7.80%) and corresponded to three patients with neurogenic changes and one patient with type I atrophy. The biopsies of these patients displayed small lesions of myonecrosis on histological examination.

Regarding the percentages of the different subpopulations of ILC, the NK were similar in both groups: NIC and DIM (NK cells: $76.80 \pm 29.80\%$ vs $92.90 \pm 10.10\%$ respectively). However,

a small contingent of ILC2 was found in the NIC and DIM groups (DIM: 11.60±19.60%; NIC: 3.00±4.30%). Moreover, immunoperoxidase GATA-3 staining performed on cryosection of the amyopathic dermatomyositis showed the presence of a Th2 canonical transcription factor; Gata-3.

Discussion

This work is the first investigating innate lymphoid cells (ILC) in muscle pathology. The main result was the evidence for ILC1, NK and ILC2 recruitment at the site of acute muscle injury and for synchronous remote ILC2 recruitment in non-injured muscles. Knowing that CD8⁺ T cells are involved in skeletal muscle regeneration by regulating the secretion of MCP-1 to recruit Gr1 (high) macrophages, which facilitate myoblast proliferation [36] and that ILC2 facilitate pro-inflammatory macrophages differentiation to anti-inflammatory macrophages under IL-4, IL-13 secretion [37], it is therefore possible that ILC2 and TCD8⁺ cells interact in the muscle repair process. The alteration of this interaction would lead to an absence of the inflammation resolution and/or to the perpetuation of the myonecrosis process. ILC2 recruitment in remote non-injured muscles could constitute a protective reaction towards the possibility of a future aggression. The mechanism by which remote muscles tissues are able to recruit ILC2 remains unknown to date. The connection existing between peripheral nervous system and ILC [9] could be a way to launch the remote muscular recruitment of ILC in response to focal injury.

In dystrophic muscles, the ILC recruitment differs according to the mechanisms of myofiber injury. Bla/J mice are deficient in dysferlin, a molecule crucially involved in plasma membrane repair. Myofibers being unable to repair plasma membrane tears induced by muscle contraction, breaches persist at the surface of non-necrotic fibers with an uninterrupted release out of the cell of various molecules acting as danger signals and

promoting the recruitment of inflammatory cells [38]. The accumulation of unrepaired membrane breaches ultimately leads to myofiber necrosis [39, 40], which repeats itself continuously and perpetuates the accumulation of leucocytes within muscle tissue. Myofiber necrosis will not be really visible in Bla/j mouse until the third month [39], but CD45⁺ leucocytes infiltration was detectable as early as the first month of life and at the same level throughout the pathology (Fig. 3B). Such early recruitment of NK cells and ILC1 preceding the occurrence of first muscle injuries, suggests a possible role for NK and ILC1 in myofiber injuries, either directly or indirectly through the activation of macrophages and IFN γ secretion [41].

Regarding ILC2, their infiltration in the muscles from Bla/j mice paralleled the onset of myonecrosis and remained at the same level at 12 months of life (Fig. 3E), suggesting a role of ILC2 in muscle regeneration. Such pro-reparative effects could be mediated through the secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-9 as well as the growth factor amphiregulin [27]. One identified function of ILC2 is to promote the shift of macrophage from pro-inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 phenotype through IL-4 and IL-13 secretion [37]. They also promote the differentiation of helper T cells into Th2 type by inducing the migration of activated dendritic cells to the draining lymphoid nodes [42]. ILC2 also produce amphiregulin (AREG) in response to IL-33 release to support tissue regeneration [43] and activate Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T (Treg) cells [43], which are required for the normal repair of skeletal muscle [44]. The major IL-33-expressing cells in skeletal muscle display fibro/adipogenic progenitor (FAP) cells markers [44, 45]. The role of ILC2 in sub epithelial fibrosis under the influence of IL-13 was also characterized in lung [46, 47]. Once activated, a proportion of ILC2 acquire immunological memory and some of them may

transdifferentiate into IFN γ producing ILC1-like cells or IL-17-producing ILC3-like cells upon the stimulation by IL-1 β and IL-12 or by IL-1 β , IL-23 and TGF β respectively [48].

The pathophysiological mechanism is different in *sgca* mice since the genetic defect leads to complete α -sarcoglycan (SG) deficiency. The lack of α -SG destabilizes the dystrophin-associated glycoproteins complex and makes myofibers unable to sustain the physical strain induced by muscle contraction leading to their necrosis [32]. The lack of compensation of α -SG deficiency explains the very early onset (from day 8) and the severity and persistence of dystrophic process in *Sgca* mice (Fig. 4A), and therefore the marked leukocyte infiltration of muscle tissue we observed from month 1 [32]. It must be noted that similarly to *Bla/J* mice fibrosis, progresses with time [32].

In human, our results remain preliminary and only witness the possible presence of ILC within skeletal muscle tissue in pathological condition. We are aware that the small number of included patients and their heterogeneity do not allow definitive conclusion. Because of their sparsity relative to other immune cells, the importance of ILC has long been underestimated. Since ILC share many properties with T cells, specific treatment targeting ILC are not available until now [14]. However, different studies, especially dealing with immune diseases clearly showed that ILC participate in tissue homeostasis and disease pathogenesis. It has been shown in particular that in allergic asthma, the pulmonary ILC2 are activated by various factors which include the cytokines IL-33, IL-25 and prostaglandins and then recruit other immune cells such as anti-inflammatory M2 macrophages which are responsible for the inflammation of the respiratory tract [49, 50, 51, 52, 53, 54]. Moreover, it has been shown that ILC3, are increased in the cerebrospinal fluid and blood of multiple sclerosis, suggesting their involvement in the pathogenesis of multiple sclerosis [55].

Although very preliminary, our results indicate that ILC could be new actors in the context of muscle pathology and should deserve further studies.

ILC are fundamental front linedefenders. Numerous studies clearly showed that ILC participate in tissue homeostasis and disease pathogenesis [56]. ILC could play an important role in priming the immune response at different stages of the disease by secreting large amounts of cytokines.

Our work is the first to our knowledge to analyze this population in experimental mouse models but also in human muscle biopsies. However, these studies must be further optimized, notably by increasing the cohort of patients and also by investigating different types of muscle pathological conditions.

References

- 1- Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*. 2013; 155(6):1282-95. Doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054.
- 2- Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown RH Jr, Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology*. 2001; 57(11):2136-8. Doi:10.1212/wnl.57.11.2136. .
- 3- Mbongue J, Nicholas D, Firek A, Langridge W. The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *J Immunol Res*. 2014;2014:857143. Doi:10.1155/2014/857143
- 4- Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA et al. Immune pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med*. 2015;7:299rv4. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7322
- 5- Turk R, Sterrenburg E, van der Wees CG, de Meijer EJ, de Menezes RX, Groh S et al. Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *FASEB J*. 2006; 20(1):127-9. Doi: 10.1096/fj.05-4678fje.
- 6- Burzyn D, Wagers A, Mathis D, Cerletti M. Methods of Isolation and Analysis of TREG Immune Infiltrates from Injured and Dystrophic Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol*. 2019;1899:229-237. Doi: 10.1007/978-1-4939-89386_16.
- 7- Morita H, Moro K, Koyasu S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1253-1264. Doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.011.
- 8- Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Nov;138(5):1265-1276. Doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.009.
- 9- Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-1066. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
- 10- Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*. 2013 Mar;14(3):221-9. Doi: 10.1038/ni.2534.
- 11- Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, Hernandez PP, Kiss EA, Hoyler T et al. Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):736-51. Doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.017.
- 12- Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1055-62. Doi: 10.1038/ni.2104.
- 13- Cortez VS, Colonna M. Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. *Immunol Lett*. 2016;179:19-24. Doi: 10.1016/j.imlet.2016.07.005.

- 14- Kim J, Ryu S, Kim HY. Innate Lymphoid Cells in Tissue Homeostasis and Disease Pathogenesis. *Mol Cells*. 2021; 44(5):301-309. Doi: 10.14348/molcells.2021.0053.
- 15- Sanos SL, Bui VL, Mortha A et al. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol*. 2009; 10(1):83-91. Doi:10.1038/ni.1684
- 16- Serafini N, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(7):415-28. Doi: 10.1038/nri3855.
- 17- Entwistle LJ, Gregory LG, Oliver RA, Branchett WJ, Puttur F, Lloyd CM. Pulmonary Group 2 Innate Lymphoid Cell Phenotype Is Context Specific: Determining the Effect of Strain, Location, and Stimuli. *Front Immunol*. 2020; 10:3114. Doi: 10.3389/fimmu.2019.03114.
- 18- Meininger I, Carrasco A, Rao A, Soini T, Kokkinou E, Mjösberg J. Tissue-Specific Features of Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol*. 2020;C41(10):902-917. Doi: 10.1016/j.it.2020.08.009.
- 19- Golebski K, Layhadi JA, Sahiner U, Steveling-Klein EH, Lenormand MM, Li RY et al. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response. *Immunity*. 2021; 54(2):291-307.e7. Doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.013.
- 20- Morita H, Kubo T, Rückert B, Ravindran A, Soyka MB, Rinaldi AO, Sugita K et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol*. 2019; 143(6):2190-2201.e9. Doi: 10.1016/j.jaci.2018.12.1018.
- 21- Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B et al. Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*. 2017; 171(1):201-216.e18. Doi: 10.1016/j.cell.2017.07.027.
- 22- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997; 91(5):661-72. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80453-5.
- 23- Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP. Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective. *Immunity*. 2018; 48(6):1091-1103. Doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.010.
- 24- Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DS, Carlyle JR, Lord GM et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J Exp Med*. 2014; 211(4):635-42. Doi: 10.1084/jem.20132398.
- 25- Xu W, Domingues RG, Fonseca-Pereira D, Ferreira M, Ribeiro H, Lopez-Lastra S et al. NFIL3 orchestrates the emergence of common helper innate lymphoid cell precursors. *Cell Rep*. 2015; 10(12):2043-54. Doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.057.
- 26- Maazi H, Patel N, Sankaranarayanan I, Suzuki Y, Rigas D, Soroosh P et al. ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity*. 2015; 42(3):538-51. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.007.

- 27- Maazi H, Akbari O. Type two innate lymphoid cells: the Janus cells in health and disease. *Immunol Rev.* 2017;278(1):192-206. Doi:10.1111/imr.12554
- 28- Simmerman E, Qin X, Marshall B, Perry L, Cai L, Wang T et al. Innate lymphoid cells: a paradigm for low SSI in cleft lip repair. *J Surg Res.* 2016; 205(2):312-317. Doi: 10.1016/j.jss.2016.06.081.
- 29- Rak GD, Osborne LC, Siracusa MC, Kim BS, Wang K, Bayat A t al. IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 2016; 136(2):487-496. Doi: 10.1038/JID.2015.406. .
- 30- Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol.* 2011; 12(11):1045-54. Doi: 10.1031/ni.2131.
- 31- Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, Pryadkina M et al. Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One.* 2012; 7(5):e38036. Doi: 10.1371/journal.pone.0038036.
- 32- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH et al. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998; 142(6):1461-71. Doi: 10.1083/jcb.142.6.1461.
- 33- Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C et al. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One.* 2016; 11(1):e0147198. Doi: 10.1371/journal.pone.0147198.
- 34- Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, Gherardi RK, Berenbaum F, Guillevin L et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2:154. Doi: 10.1186/s40478-014-0154-2.
- 35- Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(1):268-79. Doi: 10.1002/art.27183.
- 37- Zhang J, Xiao Z, Qu C, Cui W, Wang X, Du J. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1 (high) macrophage infiltration. *J Immunol.* 2014; 193(10):5149-60. Doi: 10.4049/jimmunol.1303486.
- 38- Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine.* 2015; 75(1):68-78. Doi:10.1016/j.cyto.2015.05.014.
- 39- Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle.* 2011; 1(1):10. Doi: 10.1186/2044-5040-1-10.
- 40- Biondi O, Villemeur M, Marchand A, Chretien F, Bourg N, Gherardi RK et al () Dual Effects of Exercise in Dysferlinopathy. *Am JPathol* 2013; 182: Doi: 10.1016 / j.ajpath.2013.02.045.

- 41- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*. 1998;187(12):2103-2108. Doi:10.1084/jem.187.12.2103
- 42- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(5):R1173-87. Doi:10.1152/ajpregu.00735.2009.
- 43- Halim TY, Steer CA, Mathä L, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*. 2014; 40(3):425-435. Doi:10.1016/j.immuni.2014.01.011
- 44- Halim TYF, Rana BMJ, Walker JA, Kerscher B, Knolle MD, Jolin HE et al. Tissue-Restricted Adaptive Type 2 Immunity Is Orchestrated by Expression of the Costimulatory Molecule OX40L on Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*. 2018; 48(6):1195-1207.e6. Doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.003.
- 45- Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ et al. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*. 2016; 44(2):355-67. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.009.
- 46- Hams E, Armstrong ME, Barlow JL, Saunders SP, Schwartz C, Cooke G et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(1):367-72. Doi: 10.1073/pnas.1315854111.
- 47- Zhao Y, De Los Santos FG, Wu Z, Liu T, Phan SH. An ST2-dependent role of bone marrow-derived group 2 innate lymphoid cells in pulmonary fibrosis. *J Pathol*. 2018; 245(4):399-409. Doi: 10.1002/path.5092.
- 48- Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(6):1422-1432.e11. Doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.011.
- 49- Mathä L, Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. The Fate of Activated Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2021; 12:671966. Doi: 10.3389/fimmu.2021.671966.
- 50- Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*. 2015; 42(3):566-79. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.011.
- 51- Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y, Hendriks RW. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol*. 2012; 42(5):1106-16. Doi: 10.1002/eji.201142018.
- 52- Doherty TA, Broide DH. Airway innate lymphoid cells in the induction and regulation of allergy. *Allergol Int*. 2019; 68(1):9-16. Doi: 10.1016/j.alit.2018.11.001.

- 53- Liu T, Barrett NA, Kanaoka Y, Yoshimoto E, Garofalo D, Cirka H et al. Type 2 Cysteinyl Leukotriene Receptors Drive IL-33-Dependent Type 2 Immunopathology and Aspirin Sensitivity. *J Immunol.* 2018; 200(3):915-927. Doi: 10.4049/jimmunol.1700603.
- 54- und SJ, Portillo A, Cavagnero K, Baum RE, Naji LH, Badrani JH et al. Leukotriene C4 Potentiates IL-33-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Lung Inflammation. *J Immunol.* 2017; 199(3):1096-1104. Doi: 10.4049/jimmunol.1601569.
- 55- Degn M, Modvig S, Dyring-Andersen B, Bonefeld CM, Frederiksen JL, Geisler C, von Essen MR. Increased prevalence of lymphoid tissue inducer cells in the cerebrospinal fluid of patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016; 22(8):1013-20. Doi: 10.1177/1352458515609795.
- 56- Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Hanning U, Posevitz-Fejfar A, Korsukewitz C, Schwab N et al. Distinct pattern of lesion distribution in multiple sclerosis is associated with different circulating T-helper and helper-like innate lymphoid cell subsets. *Mult Scler.* 2017; 23(7):1025-1030. doi: 10.1177/1352458516662726.

Legends

Figure 1. Intramuscular leucocytes recruitment in mouse during post-injury muscle

repair. A- E: Acute muscle injury induced by intramuscular BaCl₂ injection (*Tibialis anterior* [TA] muscle). For each animal, contralateral non-injured TA muscle was used as control. A: Muscle histology at different time points after injury: day 1 (D1), D3, D5 and D7 (hematoxylin and eosin staining on cryosections; bar: 50µm). B-D: Leucocytes, ILC1 and NK cells recruitment in injured TA and contralateral non-injured (control, Ctrl) at different time points after injury (day post-injury [DPI] 1, 3, 5 and 7). Percentage of leucocytes (B) among all living cells, innate lymphoid cells 1 (ILC1; C) among CD11b^{low} population, and NK cells (D) among CD11b^{high}. E: Immunostaining on cryosections (bar: 50µm) using an anti-NKP46 antibody at different time points after injury: day 1 (D1), D3, D5 and D7.

Figure 2. Intramuscular ILC2 and CD8⁺T cells recruitment in mouse during post-injury

muscle repair. A-B: ILC2 and CD8⁺T cells recruitment in injured TA and contralateral non-injured (control, Ctrl) at different time points after injury (day post-injury [DPI] 1, 3, 5 and 7). A: Percentage of ILC2 among CD11b^{low} population. B: Percentage of CD8⁺T cells among CD45⁺ cells.

Figure 3. Intramuscular leucocytes recruitment in *Bla/J* model.

A: Muscle histology at different ages; 1, 3 and 12 months (hematoxylin and eosin staining on cryosections; bar: 50µm). B-E: Intramuscular leucocyte recruitment in *Bla/J* mouse at different ages (1, 3, and 12 months); B: Percentage of leucocytes among all living cells; C: NK cells among CD11b^{high} population; D: Innate lymphoid cells 1 (ILC1) among CD11b^{low} population; E: Innate lymphoid cells 2 (ILC2) among CD11b^{low} population. Statistics: (*) p<.05, (**) p<.01, (***) p<.001, (****) p<10⁻⁴.

Figure 4. Intramuscular leucocytes recruitment in *Sgca* model: A: Muscle histology at different ages; 1, 3 and 6 months (hematoxylin and eosin staining on cryosections (bar: 50 μ m). B-C: Intramuscular leucocyte recruitment in *Sgca* mouse at different ages (1, 3, and 6 months); B: Percentage of leucocytes among all living cells; C: NK cells among CD11b^{high} population. Statistics: (*) p<.05, (**) p<.01, (***) p<.001, (****) p<10⁻⁴.

Figure 5. Muscle biopsies from patients with non-inflammatory condition (NIC) and dysimmune/inflammatory myopathy (DIM): A-B: Percentages in muscle. A: Percentage of lineage⁻ among CD45⁺ population. B: Percentage of NK cells among CD11b^{high} population, percentage of ILC2 and ILC3 among CD11b^{low} population. C: Immunoperoxidase Gata-3 staining on cryosections (bar: 50 μ m). Statistics: (*) p<.05, (**) p<.01, (***) p<.001, (****) p<10⁻⁴. One-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test and unpaired t test

Table 1. Main Phenotypic Markers of the Different Subsets of Murine and Human ILC [9]

		Mouse						Human						
		NK	ILC1	ILC2	LT1	NKp46 ⁻		NK	ILC1	ILC2	LT1	NKp44 ⁻		NKp44 ⁺
						ILC3	ILC3					ILC3	ILC3	
Cell-surface molecules	CD45	+	+	+	int	+	+	CD45	+	+	++	int	+	+
	CD127 (IL-7R α)	^a	^b	+	++	W	W	CD127 (IL-7R α)	-/+	^a	+	+	+	+
	CD161 (NK1.1)	+	+	-	-	-	-/+	CD161 (NK1.1)	+/-	+	+	+/-	+	+
	ST2 (IL-33R)	-	nd	+/-	nd	nd	nd	ST2 (IL-33R)	+/-	-	+/-	nd	nd	-
	CD278 (ICOS)	W	nd	++	nd	W	W	CD278 (ICOS)	-	nd	+	nd	nd	+
	IL-17R β (IL25R)	-	nd	+	-	-	-	IL-17R β (IL25R)	-	-	+	-	nd	-
	CD294 (CRTH2)	-	nd	+	nd	nd	nd	CD294 (CRTH2)	-	-	+	-	-	-
	KLRG1	++	-	+	-	-	-	KLRG1	+	-	+	-	-	-
	CD117 (c-kit)	-	+/-	+/-	++	W	W	CD117 (c-kit)	-W	-	+/-	+	+	+
	CD69	^c	+	nd	nd	nd	nd	CD69	W	+/-	nd	nd	nd	nd
	CD254 (RANKL)	nd	nd	nd	+	+	+	CD254 (RANKL)	-	nd	nd	+	+	+
	CD196 (CCR6)	-	nd	-	+	+/-	-	CD196 (CCR6)	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
	CD335 (NKp46)	+	+	-	-	-	+	CD335 (NKp46)	+	-	-	-	-W	W/+
	CD25 (IL-2R α)	^d	-W	+	+/-	+/-	+/-	CD25 (IL-2R α)	+/-	W	+	W	+/-	-W
	MHC-II	-	-	+	+	+	-	MHC-II	+/-	nd	+/-	nd	nd	+/-
	IL23R	-	-	nd	+	+	+	IL23R	+/-	+/-	-W	+	+	+
	IL1R β	-	+	nd	+	+	+	IL1R	+/-	+	W	+	+	+
	CD122	+	+	W	-	-	-	CD122	+	nd	nd	-W	W	W
	CD314 (NKG2D)	+	nd	-	-	-	+	CD314 (NKG2D)	+	nd	nd	-	-W	-W
	Ly49	+/-	+/-	-	-	-	-	KIR	+/-	-	-	-	-	-
	CD94	+/-	nd	+/-	nd	-	+/-	CD94	+/-	-	-	-	-	-
	Perforin	+	W	-	-	-	-	Perforin	+	-	-	-	-	-
	CD253 (TRAIL)	-	+	nd	nd	nd	nd	IL12R β	+	+	-	-	-	+/-
	Sca-1 (Ly6a)	^e	+	+	-	nd	+	CD194 (CCR4)	nd	+/-	+	nd	nd	nd
	CD49d (Integrin $\alpha 4 \beta 7$)	nd	nd	-	nd	+	+	CD56	+	-	-	-W	+/-	+/-
CD49a (Integrin $\alpha 1 \beta 1$)	^a	+	nd	nd	nd	nd	CD183 (CXCR3)	nd	+	nd	nd	nd	nd	
CD90 (Thy1)	+/-	+	+	+	+	+	CD337 (NKp30)	+	+	+	+/-	+/-	+/-	
CD160	^f	+	nd	nd	nd	nd	CD336 (NKp44)	^g	-	-	-	-	+	
CD103	^h	-	nd	nd	nd	nd	CD16	+/-	-	-	-	-	-	
CD200R	-	+	nd	nd	nd	nd	NKp80	+	-	nd	nd	nd	nd	
Transcription factors	Tbet	+	+	-	-	+/-	+	Tbet	+	+	-	-	-	-
	Eomes	+	+/-	-	-	-	-	Eomes	+	+/-	-	-	-	-
	ROR γ t	-	-	-	+	+	+	ROR γ t	-	-W	-W	+	+	+
	GATA3	-W	-W	+	-W	-W	-W	GATA3	-W	-W	+	-W	-W	-W
	AhR	-	nd	nd	+	+	+	AhR	-W	W	+	+	+	+
ROR γ z	nd	nd	+	nd	nd	nd								

The expression of certain markers varies according to the organs. int, intermediate expression; W, weak expression; nd, not determined. ^a+/- means that expression is detected in some, but not all, cells. ^bNot expressed by NK cells of liver, intestine, skin, uterus, salivary gland, bone marrow, or lymph nodes. Expressed by NK cells in the thymus and in some spleen populations.

^cExpressed by the majority of ILC1, except for liver populations and intraepithelial gut ILC1.

^dExpressed by NK cells of the intestine, uterus, and thymus, but not the spleen and liver.

^eExpressed by activated cells.

^fExpressed by the majority of ILC1, except for tonsil and intraepithelial ILC1.

^gNot expressed by NK cells of the spleen, liver, uterus, or blood. Expressed by NK cells in the gut.

^hNot expressed by liver or spleen NK cells. Expressed by NK cells in the blood.

Table 2. Histological diagnosis in included patients

Patient	Histological diagnosis
Patient 1	No Necrose- Miyhochondriopathy
Patient 2	No Necrose- Atrophy type II
Patient 3	No Necrose- lipidosis
Patient 4	No Necrose- myocytic atrophy
Patient 5	No Necrose- Neurogenic desease
Patient 6	No Necrose- Atrophy type II
Patient 7	No Necrose- Neurogenic desease
Patient 8	No Necrose- Lobular myositis
Patient 9	No Necrose- Atrophy type II
Patient 10	No Necrose- Neurogenic desease
Patient 11	Necrotizing lupus myositis
Patient 12	Necrotizing dermatomyositis

Figure.1

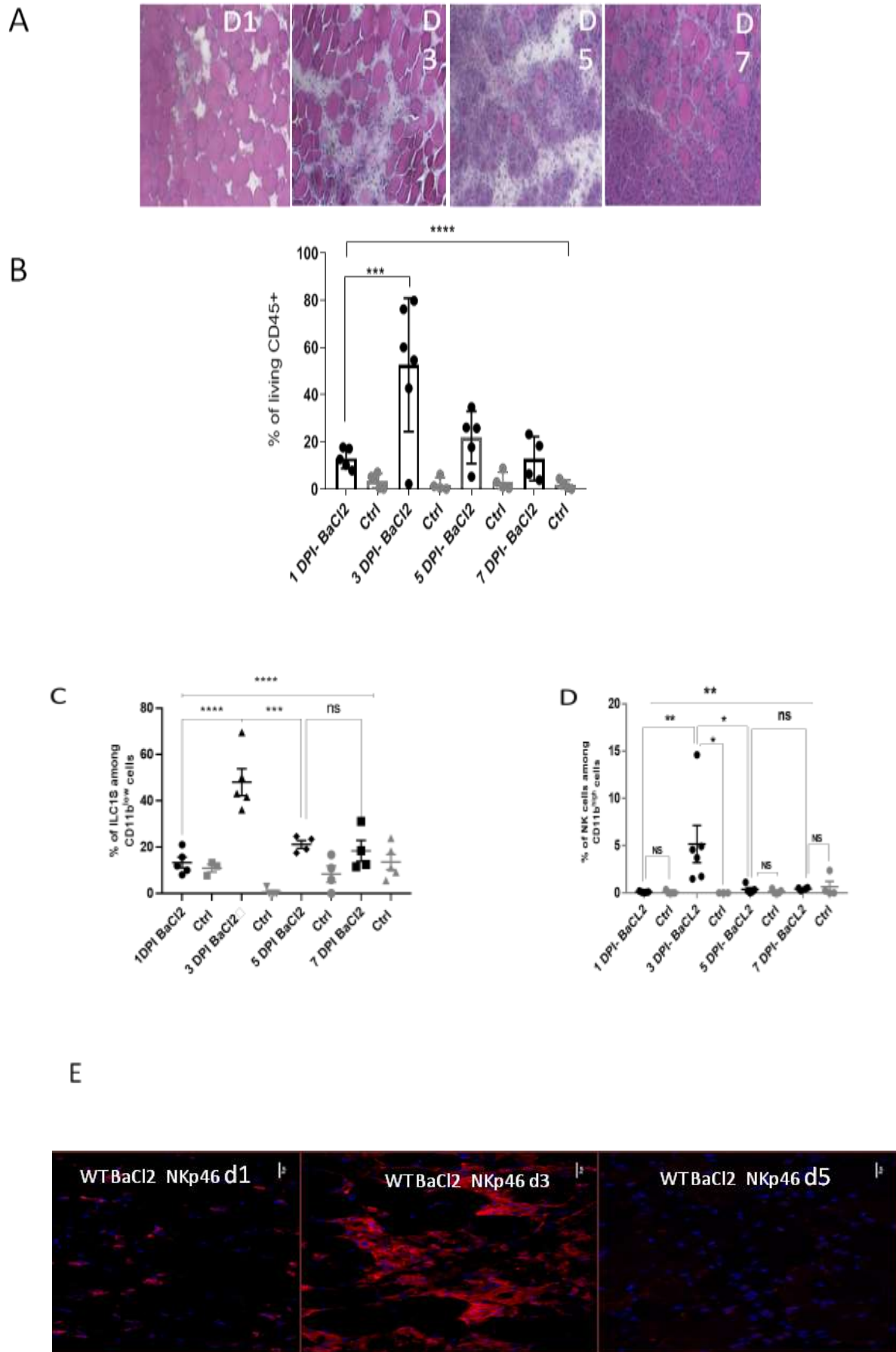
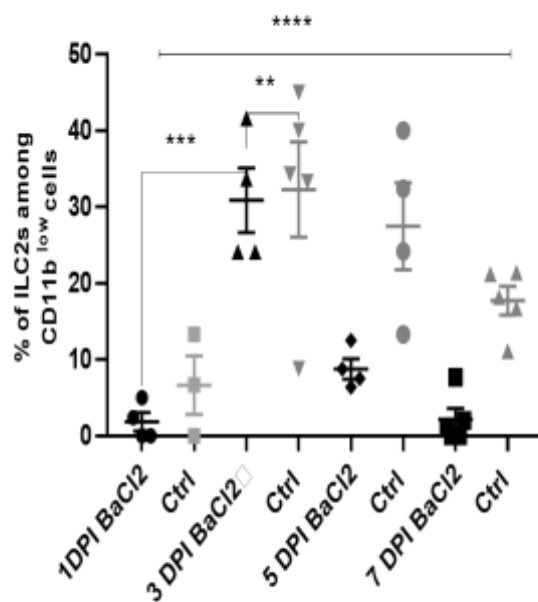


Figure.2

A



B

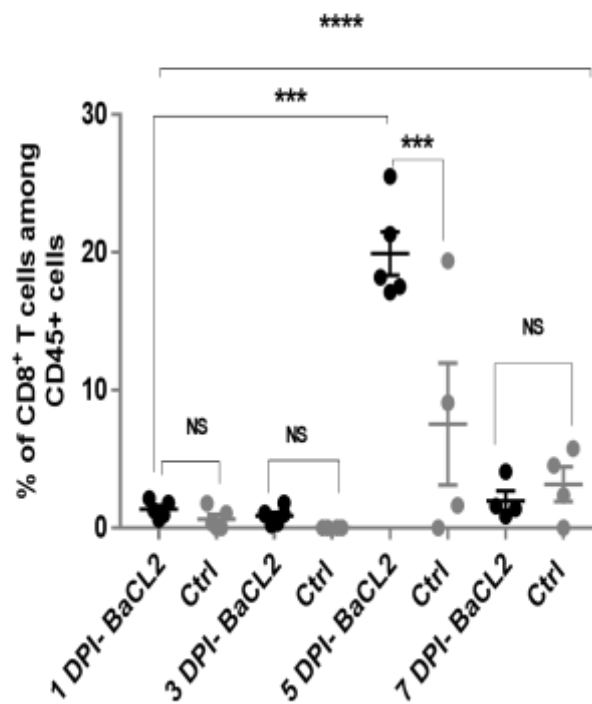


Figure.3

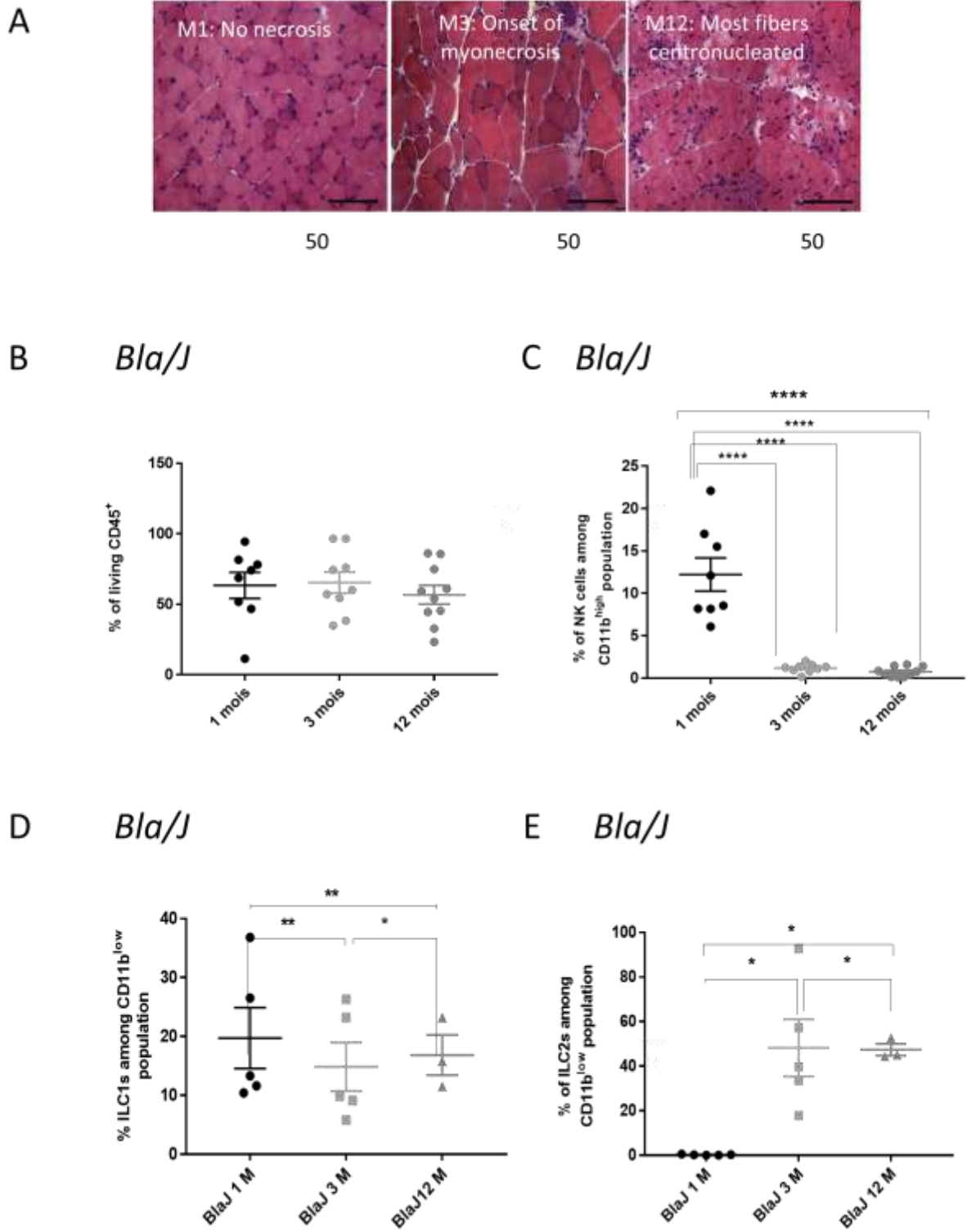
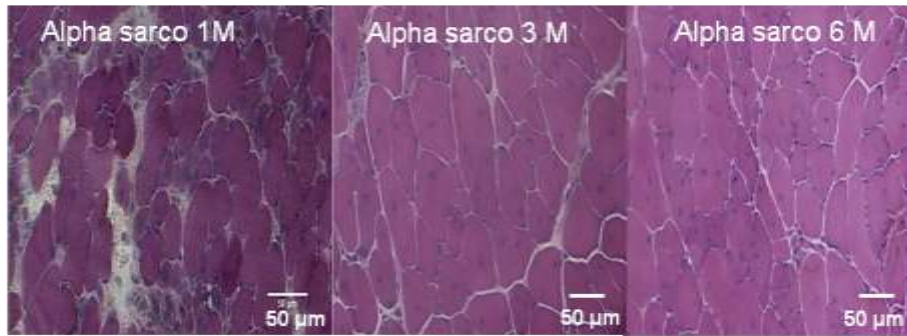


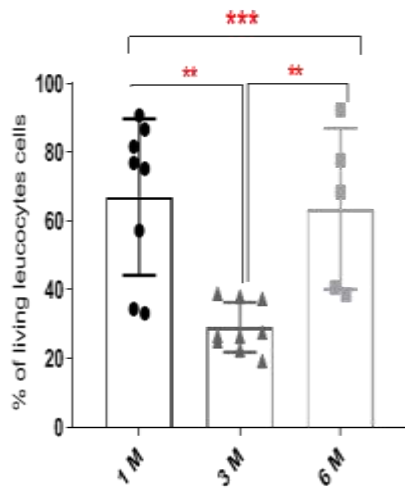
Figure.4

A



B

Sgca



C *Sgca*

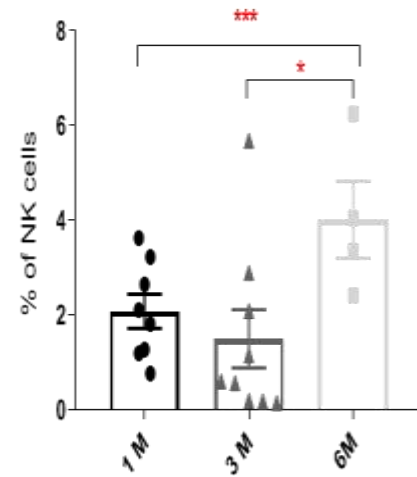
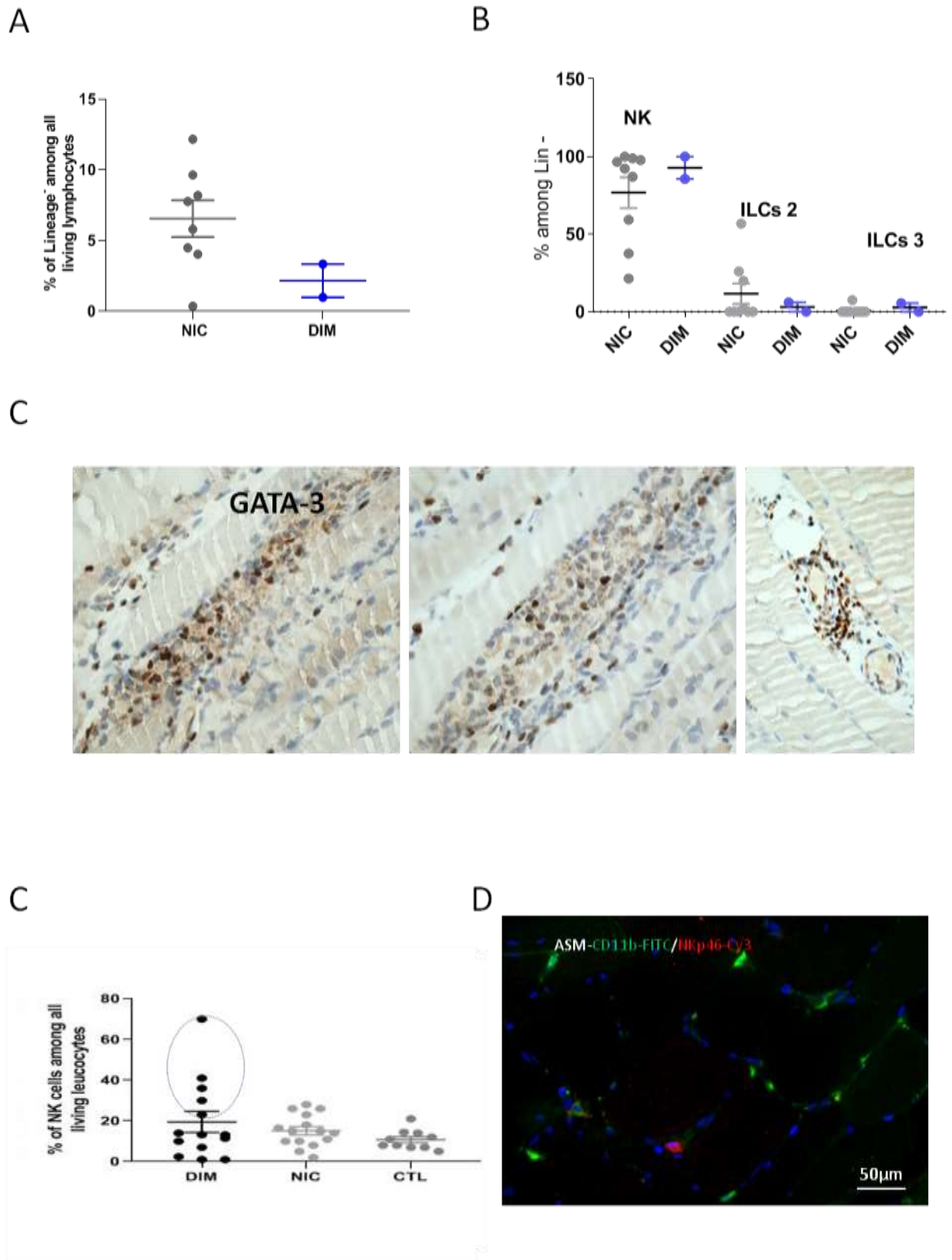


Figure.5



Conclusion

Dans ce travail, nous avons analysé le recrutement des ILC dans des conditions expérimentales de myonécrose aigue et de modèles murins de dystrophies musculaires, mais également dans des biopsies musculaires humaines. Dans les modèles de myonécrose aigue, le recrutement des cellules NK, des ILC1 et des ILC2 est parallèle à celui des macrophages pro-inflammatoires M1 et, fait intéressant, les ILC sont également recrutés au niveau du muscle controlatéral non injecté. Dans le modèle de déficience en dysferline (Bla/J), l'influx de cellules NK et de cellules ILC1 précède la myonécrose, suggérant un rôle pour les cellules NK dans les lésions musculaires et le recrutement des ILC2 est parallèle à l'apparition de la myonécrose. Par ailleurs, dans les biopsies musculaires humaines, les cellules NK sont majoritaires dans les deux groupes DIM et NIC, cependant la petite taille de la cohorte de patients inclus et l'hétérogénéité des pathologies présentes ne permettent pas de conclure. En raison de leur rareté par rapport aux autres cellules immunitaires, le rôle des ILC a longtemps été sous-estimé. De nombreuses études ont clairement montré que les ILC participent à l'homéostasie tissulaire et à la pathogenèse de la maladie. En effet, les ILC pourraient jouer un rôle important dans l'amorçage de la réponse immunitaire à différents stades de la maladie en sécrétant de grandes quantités de cytokines.

A notre connaissance, notre travail est le premier à analyser cette population dans des modèles murins expérimentaux mais aussi dans des biopsies musculaires humaines. Cependant, ces études doivent encore être optimisées, notamment en augmentant la cohorte de patients et aussi en stratifiant les différentes pathologies musculaires.

Discussion générale, perspectives et conclusion

Les leucocytes forment un des groupes cellulaires constitutifs du muscle squelettique à l'état physiologique. Le tissu conjonctif est un des composants fondamentaux du muscle squelettique divisé en trois compartiments distincts : l'endomysium qui est interposé entre les cellules musculaires, le périmysium qui est en entoure et délimite les faisceaux musculaires et l'épimysium qui entoure les groupes de faisceaux et le muscle et qui contient des adipocytes. Les leucocytes font partie des cellules libres qu'on peut trouver dans les tissus conjonctifs lâches, leur nombre et leur type pouvant varier en fonction de l'organe et des contraintes physiologiques. Classiquement, on décrit les mastocytes dans l'espace interstitiel du muscle, généralement à proximité des vaisseaux sanguins, certains monocytes sanguins dits patrouilleurs, localisés au niveau de la paroi endothéliale, et les macrophages résidents, au sein de l'épimysium et du périmysium (Figure 1) (Dufresne et al .2016). Dans le muscle sain, le maintien de la population de macrophages résidents ne dépend pas du recrutement des monocytes circulants, mais plutôt de leur capacité d'auto-renouvellement (Ginhoux et al. 2014). Dans différents tissus, les macrophages résidents participent à la préservation de l'homéostasie ainsi qu'au débridement et au remodelage tissulaire (Davies et al. 2013). Dans le tissu musculaire, ces cellules agissent comme des sentinelles. Elles perçoivent les perturbations de l'homéostasie tissulaire et favorisent le recrutement des leucocytes sanguins (Brigitte et al. 2010). En condition pathologique (cf *Introduction*), la nécrose myocytaire s'accompagne du recrutement séquentiel de différents types de leucocytes nécessaires à la régénération post-lésionnelle. Ce recrutement leucocytaire intramusculaire peut être considéré comme physiologique car il permet la réparation du tissu musculaire. Dans d'autres situations pathologiques, on observe une infiltration inflammatoire du tissu musculaire, sans lien avec la régénération, et pouvant être à l'origine de lésions myocytaires. C'est le cas des myopathies inflammatoires, qu'elles soient d'origine

auto-immune, infectieuse ou autre. L'étude des populations leucocytaires intramusculaires est une étape déterminante de l'analyse et de la compréhension des mécanismes de réparation post-lésionnelle et de la physiopathologie des maladies musculaires acquises et non-acquises. Elle comprend la caractérisation précise des différentes populations cellulaires présentes et l'évaluation de leur état d'activation, à partir de tissu prélevé chez l'homme (biopsie dans le contexte de l'investigation diagnostique myologique) ou à partir de modèles expérimentaux chez l'animal visant à reproduire des lésions élémentaires ou des maladies plus complexes. Les résultats des travaux scientifiques réalisés sont conditionnés par la pertinence des modèles choisis et le type de protocole technique utilisé.

L'étude de la réparation musculaire après lésion aigue peut se faire en utilisant différent modèles. Les plus couramment utilisés sont la cryolésion, l'injection de chlorure de baryum ($BaCl_2$), l'injection de notexine (NTX) et l'injection de cardiotoxine (CTX). Dans une étude comparative de ces différents modèles (Hardy et al. 2016), il a été montré que la cryolésion induit les lésions les plus sévères puisque dans ce modèle, jusqu'à 96 % des cellules satellites (SC) sont détruites avec leur environnement (lame basale et système vasculaire) laissant une « zone morte » dépourvue de cellules viables. Le processus de régénération lui-même est réalisé dans les quatre modèles avec pratiquement aucune fibrose 28 jours après la lésion, sauf dans le modèle de cryolésion. Les cellules inflammatoires reviennent à des niveaux basaux avec la CTX et le $BaCl_2$, mais restent significativement élevés 1 mois après la lésion dans les modèles cryolésion et NTX. Il est intéressant de noter que le nombre de SC est revenu à la normale uniquement avec la cryolésion à 1 mois post-lésion, alors que les SC prolifèrent encore jusqu'au 3^{ème} mois après l'induction de la blessure dans les autres modèles. Dans cette étude, le profil des types leucocytaires recrutés au site lésionnel était le même entre les modèles, la principale

différence ne concernant que l'intensité des infiltrats inflammatoires (Hardy et al. 2016). Les résultats de cette étude ont justifié le choix du modèle BaCl₂ pour notre étude, car il avait l'avantage d'une part d'une réparation complète à J28 et d'autre part d'induire le plus important infiltrat inflammatoire.

L'immunohistochimie est la technique classiquement utilisée pour le phénotypage des leucocytes intramusculaires. Elle a l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre, peu coûteuse et surtout de pouvoir être réalisée a posteriori sur des prélèvements tissulaires stockés, inclus en paraffine ou congelés. En revanche, la quantification des différentes sous-populations leucocytaires et de leur état d'activation ne peut être qu'approximative en immunohistochimie (IHC), notamment en raison du petit nombre de marqueurs évaluables en même temps. L'accessibilité des antigènes cible et la performance des anticorps utilisés peut constituer également une limitation technique. Il est intéressant de noter que Hardy et coll. n'ont pas mis en évidence de lymphocytes T au site lésionnel lors du processus de nécrose/régénération alors que la présence de lymphocytes Treg CD4⁺ Foxp3⁺ avait déjà été montrée au site lésionnel (Burzyn et al. 2013). Dans notre travail, la CMF nous a permis de montrer la présence de lymphocytes T CD8⁺ à la phase de régénération post-nécrotique et surtout nous avons pu identifier par cette techniques des populations leucocytaires jamais décrites dans ce contexte, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILC). On voit donc que la CMF est beaucoup plus performante et précise que l'IHC, mais avec comme principal inconvénient de devoir être réalisée extemporanément et d'avoir accès à un cytomètre.

Un résultat important de ma thèse est d'avoir montré que les conditions pré-analytiques conditionnent les résultats obtenus en CMF. En effet, la méthode d'extraction

des leucocytes intramusculaire peut modifier les résultats de la CMF en altérant de manière inégale les déterminants antigéniques présents à la surface des leucocytes.

Les protocoles d'extraction des cellules musculaires squelettiques sont habituellement basés sur la dissection mécanique suivie d'une digestion enzymatique utilisant divers mélanges enzymatiques comprenant la collagénase, la dispase et la pronase (Latroche et al. 2018, Pakula et al. 2019). Ces protocoles ont été initialement développés pour l'étude des cellules myogéniques et leur utilisation a par la suite été étendue à l'analyse des leucocytes intramusculaires et d'autres cellules (Latroche et al. 2018). Selon les différentes combinaisons enzymatiques et les temps d'incubations utilisés, les enzymes peuvent protéolyser entièrement ou de manière différentielle les déterminants antigéniques de surface et de fait modifier les résultats de la CMF en induisant une grande variabilité dans les populations leucocytaires décrites (Hagman et al. 2012, Liang et al. 2015). Notre travail est le premier qui démontre l'impact de la digestion enzymatique sur les résultats d'un phénotypage par CMF des leucocytes intra-tissulaires. Nous avons également confirmé l'utilité de la digestion enzymatique pour l'extraction des SC et des FAPs, ce qui peut s'expliquer d'une part par l'adhérence forte de ces cellules à la matrice extracellulaire rendant difficile leur extraction par une technique purement mécanique, et d'autre part par la résistance des déterminants antigéniques utilisés pour leur identification à la digestion enzymatique. On voit qu'une procédure technique qui peut être optimale pour un type de population cellulaire, peut être totalement inadaptée à l'étude d'un autre. L'importance des conditions pré-analytiques a également été montrée pour l'analyse du transcriptome des cellules myogéniques. En effet, La majorité des protocoles d'isolement cellulaire qui impliquent de longues étapes de dissociation mécanique et enzymatique et exposent les

cellules au stress, perturbent leur niche physiologique et entraînent des changements transcriptionnels majeurs (Machado et al. 2017).

L'utilisation de la CMF pour l'analyse des sous populations leucocytaires est déjà largement utilisée dans le domaine de la recherche (Latroche et al. 2018, Burzyn et al. 2013) en raison de sa capacité à analyser simultanément de nombreux déterminants cellulaires. Durant ma thèse, j'ai utilisé cette technique pour l'analyse des infiltrats leucocytaires dans des suspensions cellulaires musculaires, obtenues à partir de biopsies musculaires réalisées dans le cadre de la routine diagnostique, ce qui a permis une meilleure appréciation des sous populations leucocytaires recrutés dans le muscle. Cependant cette technique présente des difficultés qui consistent en la nécessité de pratiquer la CMF sur des prélèvements musculaires frais, en effet, les protocoles de congélation et décongélation peuvent altérer les marqueurs leucocytaires. De plus, la technique de dissociation purement mécanique des échantillons musculaires, que nous avons développé passe par une étape de lavage des muscles à l'aide de sérum physiologique, indispensable pour améliorer la fiabilité de nos analyses en réduisant le risque d'une contamination de nos échantillons musculaires par les leucocytes circulants, ce qui rallonge le temps de préparations des suspensions leucocytaires. Des procédures automatisées ont été développées par certains laboratoires mais ne sont qu'à usage enzymatique (Liang et al. 2015). Une autre limite est la nécessité de disposer d'une unité de cytométrie en flux. Il n'en reste pas moins que la CMF constitue une technique innovante qui pourrait profondément modifier notre approche diagnostique des myopathies. La biopsie musculaire a représenté pendant des décennies le principal (sinon le seul) outil de diagnostic positif et de classification nosologique pour les maladies musculaires, et la définition des maladies musculaires a reposé sur une caractérisation toujours plus précises des mécanismes lésionnels tissulaires. Les années 2000 ont été

marquées par l'introduction en myologie de nouvelles méthodes diagnostiques non- ou peu invasives, comme l'imagerie par IRM ou par échographie, les dot-blots commerciaux permettant la détection d'un panel complet d'autoanticorps circulants et l'accès simplifié à de nombreuses techniques de génétique moléculaire. Pour autant, la procédure d'analyse du tissu musculaire est restée basée sur une approche histologique qualitative, améliorée par l'automatisation des techniques facilitant la réalisation des immunomarquages, mais finalement toujours axée sur l'identification du processus lésionnel. Une évolution est actuellement en train de se mettre en place avec la numérisation des lames et le développement de procédures automatisée d'analyse d'image permettant de quantifier les lésions histologiques (Reyes-Fernandez P et al, 2019). Cette évolution qui va ajouter à approche histologique purement qualitative, une approche quantitative s'inscrit dans le prolongement de travaux de recherche montrant que la quantification des lésions peut avoir une valeur pronostique en myologie (Desguerre et al, 2009 ; Aouizerate et al, 2018). La CMF est beaucoup plus disruptive car on sort complètement de l'analyse morphologique du tissu musculaire pour aller vers une quantification très précise des sous-populations leucocytaires intramusculaires et de leur état d'activation. Mon travail a confirmé non seulement l'applicabilité de la CMF à l'étude du tissu musculaire, mais également la relevance diagnostique de la quantification des sous-populations lymphocytaires, la possibilité d'identification de types leucocytaires peu ou pas étudiés et les perspectives apportées par cette technique en termes de redéfinition diagnostique. A une époque où l'intérêt de la biopsie musculaire est constamment remis en cause sur la base d'arguments médiocres, la CMF montre que l'étude directe du tissu cible de la maladie est un déterminant essentiel pour la précision du diagnostic et la compréhension physiopathologique.

Les processus de nécrose aiguë et chronique sont caractérisés par un infiltrat important de leucocytes (Latroche et al. 2018). L'utilisation de notre protocole optimisé de CMF a permis de montrer que le recrutement massif de macrophages lors de la nécrose aiguë, avec un pic au 3^{ème} jour post lésionnel, qui est nécessaire à la réparation musculaire (Forcina et al. 2020), s'accompagne d'un recrutement de cellules dendritiques myéloïdes (MDC) culminant au 3^{ème} jour et de lymphocytes TCD8⁺ au 5^{ème} jour. La lésion musculaire aiguë telle que celle induite par l'injection de BaCl₂, déclenche une réponse inflammatoire « stérile » (Hardy et al. 2016) similaire à la réaction inflammatoire induite par une infection (Pimorady-Esfahani et al. 1997). Le recrutement de MDC dans le muscle lésé est suivi par celui des lymphocytes T CD8⁺, suggérant que les MDC pourraient migrer dans les ganglions lymphoïdes de drainage pour recruter des lymphocytes T CD8⁺ et contribuer à la protection immunologique. Notre travail est le premier, à notre connaissance, qui montre le recrutement des cellules lymphoïdes innées dans la nécrose aiguë (NK, ILC1 et ILC2 qui culminent au J3 post-lésionnel. Fait intéressant, les ILC2 ont également été recrutés au niveau du muscle TA controlatéral non lésé, indiquant une réaction immunitaire à distance. La libération de signaux de danger par les muscles lésés pourrait être à l'origine d'une réponse inflammatoire systémique. Il serait intéressant de regarder si les ILC2 sont également recrutés au niveau d'autres organes. Comme les ILC2 étaient les seules recrutées à distance, on peut se poser la question d'un mécanisme plus complexe et plus sélectif faisant intervenir le système nerveux périphérique. Les neuropeptides jouent un rôle crucial dans la communication entre les systèmes nerveux et immunitaire, et nombre de ces molécules sont produites directement par les cellules immunitaires. Les ILC, notamment les ILC2 de l'intestin et des poumons, expriment des récepteurs pour les neurotransmetteurs (Vivier et al. 2018). Ainsi les ILC1 recrutées lors de la libération de signaux de danger par le

muscle lésé pourraient produire des neurotransmetteurs qui à leur tour stimulerait une réaction neuro-immunitaire à distance permettant au tissu musculaire non touché de se mettre en état de se protéger dans l'hypothèse où le processus lésionnel le toucherait à son tour.

Les ILC sont des cellules résidentes des tissus, les ILC et les macrophages résidents pourraient partager certaines similitudes (Bando et al. 2015), les ILC2 ont été impliqués dans la réparation tissulaire, notamment lors des infections pulmonaires (Vivier et al. 2018, Mazi et al. 2017). En effet, ils produisent des ligands pour le récepteur du facteur de croissance épithélial, tel que l'AREG qui contrôle la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales nécessaires à la réparation de l'épithélium (Monticelli et al. 2011, Zaiss et al. 2015). Il est donc possible que le circuit de signalisation des ILC2 qui favorise la réparation tissulaire peut être dérégulé lors de myopathies inflammatoires chroniques. En effet, les ILC2 sont une source pertinente d'IL-5 indispensable pour le recrutement des éosinophiles et des macrophages anti-inflammatoires de type M2 (Molofsky et al. 2013). De plus, Lors d'une lésion musculaire, l'IL-4 produit par les éosinophiles induit la prolifération de progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs), qui inhibent la différenciation des adipocytes et favorisent la régénération du muscle squelettique lésé (Heredia et al. 2013). Par ailleurs, les ILC1 et les ILC3 dont la fonction impliquent les cellules phagocytaires semblent nécessaires pour la réparation tissulaire, en effet, pour être réparé, un tissu doit être débarrassé des microbes, des cellules mourantes et des débris (Vivier et al. 2018). L'IL-22, produit principalement par les ILC3, induit l'expression de molécules antibactériennes, des protéines antivirales et stabilise la barrière épithéliale (Vivier et al. 2018).

Le recrutement de leucocytes intramusculaires dans les processus dystrophiques doit être analysé en tenant compte du stade de la maladie. Chez les souris *Bla/J*, le recrutement intramusculaire des leucocytes peut être observé à partir du premier mois de la vie, bien que la nécrose des myofibres ne soit visible qu'au troisième mois (Biondi et al. 2013). Ce décalage apparent peut s'expliquer par la présence de brèches membranaires non réparées à la surface des myofibres non-nécrotiques, conduisant à une libération ininterrompue de signaux de danger, induisant le recrutement leucocytaire. Le déficit en dysferline entraîne une incapacité de réparer les lésions sarcolemmiques induites par la contraction physiologique de la cellule musculaire, mais il faut un nombre suffisant de lésions membranaires accumulées à la surface myocytaire pour que surviennent la nécrose, d'où le décalage observé. Chez les souris *Sgca*, les myofibres sont incapables de supporter les efforts physiques des muscles, ce qui fait que dès qu'il y a contraction, il y a nécrose (Duclos et al. 1998). Il faut noter que dans les deux modèles, notre protocole s'est révélé parfaitement adapté à l'analyse des infiltrats leucocytaires. Ainsi, nous avons quantifié pour la première fois la proportion de cellules TCD8⁺ recrutées parmi tous les leucocytes lors des processus dystrophiques. Nous avons observés que les cinétiques de recrutements des LTCD8⁺ étaient déterminées par les stades de la maladie. Notre protocole a également permis de décrire pour la première fois à notre connaissance le recrutement d'autres sous populations leucocytaires dans les modèles *Bla/J* et *Sgca* de dystrophies musculaires, à savoir les MDC (CD3⁺ CD8⁺ CD11b^{high}) et les cellules lymphoïdes innées, avec des cinétiques de recrutement qui suivent la physiopathologie des processus dystrophiques. En effet, dans le modèle *Bla/J*, les cellules NK et ILC1 étaient recrutés avant l'apparition des lésions de nécrose, dès l'apparition des premières brèches membranaires, alors que les ILC2 étaient recrutés au moment où apparaît la nécrose myocytaire et la régénération myocytaire.

Dans les myopathies dysimmunes et inflammatoires (DIM), l'implication des mécanismes immunitaires est depuis longtemps reconnue comme capitale et de nombreuses études ont démontré la participation de diverses cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et les lymphocytes B (Zaho et al. 2021). Une bonne compréhension de la pathogenèse des DIM est nécessaire pour une intervention thérapeutique efficace. Les lymphocytes sont une classe importante de cellules immunitaires qui sont subdivisés en lymphocytes T, lymphocytes B et en NK. Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont des composants majeurs de l'immunité adaptative, reconnaissant des antigènes spécifiques et générant des réponses cellulaires ou anticorps spécifiques (Netea et al. 2019). Les cellules NK participent à l'immunité innée et fonctionnent en libérant des cytokines immunomodulatrices ou des granules cytotoxiques après leur activation (Mace et al. 2019). Les autres cellules immunitaires innées comprennent principalement les cellules dendritiques et les macrophages. Par ailleurs, une bonne analyse des phénotypes leucocytaires et la compréhension de leurs significations est indispensable à la maîtrise de la physiopathologie des DIM. Les lymphocytes T naïfs expriment la molécule costimulatrice CD28 nécessaire à leur activation et leur prolifération (Acuto et al. 2003) et la proportion de cellules TCD8^{null} augmente avec la différenciation des lymphocytes T conventionnels en lymphocytes T mémoires (Mou et al. 2014). Une réduction de l'expression du CD28 provoque des réponses immunitaires rapides et peuvent libérer de grandes quantités de cytokines ainsi que des granules cytolytiques, conférant une cytotoxicité aux tissus affectés (Betjes et al. 2016, Zaho et al. 2021, Strioga et al. 2011). Ainsi les LTCD8⁺CD28^{null} sont augmentées dans les muscles de polymyosite (PM), de dermatomyosite (DM) et myosite à inclusions (IBM) (Zaho et al. 2021). D'autres marqueurs de surface ont été mise évidence sur

les lymphocytes recrutés dans les muscles DIM, tels que le facteur de transcription T-bet décrit dans les IBM ou encore NKGD2 (Zaho et al. 2021).

De plus, classiquement les DM sont décrites comme des myopathies inflammatoires à LTCD4⁺. Cependant, l'analyse rétrospective de notre cohorte de 101 patients qui ont bénéficié d'une biopsie musculaire suivie d'une étude cytométrique des suspensions cellulaires a montré que toutes les DIM étaient caractérisées par un enrichissement intramusculaire de LTCD8⁺, y compris les dermatomyosites. Une étude majeure publiée en 2005 a montré que la DM est électivement associée à la présence de cellules dendritiques plasmacytoides (PDC) dans les muscles (Greenberg et al. 2005). Les PDC expriment le CD4 et il était plausible que les cellules CD4⁺ précédemment décrites comme T CD4⁺ dans les études antérieures sur les DM correspondaient en fait aux PDC décrites par Greenberg. Nos résultats étayaient cette hypothèse puisque nous n'avons observées de recrutement de T CD4⁺ dans la DM. L'enrichissement en LTCD8⁺ mis en évidence dans les muscles DIM par le calcul de l'IMI-index que j'ai décrit semble être intéressant et pourrait augmenter la performance diagnostique de la biopsie pour le diagnostic de DIM. Des études prospectives doivent être menées pour confirmer la fiabilité de cet index. Il pourrait ainsi être utilisé comme un marqueur biologique dans les situations de doute diagnostique et permettre ainsi d'instaurer un traitement immuno-modulateur plus précoce.

Concernant les ILC, nos résultats n'étaient pas concluants, certainement à cause du nombre limité de cas mais aussi à cause du panel d'anticorps qui doit encore être optimisé. Des études prospectives doivent aussi être menées avec une meilleure stratification des groupes de patients analysés. Ce travail constitue une première étape pour l'analyse des profils phénotypiques des cellules ILC recrutés, de leur signification dans la réparation

physiologique des cellules musculaire, mais également en pathologie dysimmunitaire et inflammatoire. Il serait donc intéressant d'étudier les sécrétomes des ILC, et d'utiliser des modèles murins déplétés en ILC notamment en NK et en ILC2 (Vivier et al. 2018, Rafei-Shamsabadi et al. 2018) afin d'en évaluer leur implication sur le recrutement leucocytaire et la réparation musculaire.

Conclusion

Mon travail de thèse a apporté trois avancées significative dans le domaine de la myologie : 1/ la mise au point d'une procédure de cytométrie en flux dédiée à l'étude des populations leucocytaires intramusculaire ; 2/ la démonstration du rôle clé du lymphocyte T CD8⁺ dans les pathologies musculaires avec myonécrose ; et 3/ l'identification de nouveaux acteurs de la biologie du muscle squelettique, à savoir les cellules lymphoïdes innées (ILC1, NK et ILC2). Le rôle exact des ILC en pathologie musculaire reste à caractériser, mais nous pouvons dire d'ores et déjà qu'il s'agit d'un type cellulaire qui pourrait être déterminants dans la réparation lésionnelle. Globalement, ce travail démontre également l'importance de l'étude du tissu dans la compréhension des processus biologiques et pathologiques et de la nécessité de toujours savoir contester les dogmes existants pour faire progresser la connaissance.

References

Acuto O, Mise-Omata S, Mangino G, Michel F. Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol Rev.* 2003;192:21-31. Doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00034.x.

Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology.* 1999;52(1):176-9. Doi: 10.1212/wnl.52.1.176.

Aouizerate J, De Antonio M, Bader-Meunier B, Barnerias C, Bodemer C, Isapof A et al. Muscle ischaemia associated with NXP2 autoantibodies: a severe subtype of juvenile dermatomyositis. *Rheumatology.* 2018 May 1;57(5):873-879.

Doi: 10.1093/rheumatology/kex516.

Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, Gherardi RK, Berenbaum F, Guillevin L et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:154. Doi: 10.1186/s40478-014-0154-2.

Alderton JM, Steinhardt RA. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10(6):268-72. Doi: 10.1016/s1050-1738(00)00075-x.

Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* 1989;138(2):311-5. Doi: 10.1002/jcp.1041380213.

Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Front Aging Neurosci.* 2014 ; 22;6:246. Doi: 10.3389/fnagi.2014.00246.

Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann Neurol.* 1984;16(2):193-208. Doi: 10.1002/ana.410160206.

Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204(5):1057-1069. doi:10.1084/jem.20070075

Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun; 8(6):411-20. Doi: 10.1038/nri2316.

Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M, Groot J, Shikhagaie MM, Golebski K et al. IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol*. 2016;17(6):636-45. Doi: 10.1038/ni.3444.

Bando JK, Liang HE, Locksley RM. Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat Immunol*. 2015;16(2):153-160. doi:10.1038/ni.3057

Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003; 423(6936):168-72. Doi: 10.1038/nature01573.

Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K, Kofoed-Nielsen M et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity*. 2015; 43(1):146-60. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.019.

Betjes MG. Clinical consequences of circulating CD28-negative T cells for solid organ transplantation. *Transpl Int*. 2016;29(3):274-84. Doi: 10.1111/tri.12658.

Biferali B, Proietti D, Mozzetta C, Madaro L. Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front Physiol*. 2019;10:1074. Published 2019 Aug 21. Doi:10.3389/fphys.2019.01074

Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Mintz A, Delbono O. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front Aging Neurosci.* 2014; 18;6:245. Doi: 10.3389/fnagi.2014.00245.

Bloemberg D, Quadrilatero J. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. 2012 ; PLOS ONE 7, e35273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>.

Borok M, Didier N, Gattazzo F, Ozturk T, Corneau A, Rouard H, Relaix F. Progressive and Coordinated Mobilization of the Skeletal Muscle Niche throughout Tissue Repair Revealed by Single-Cell Proteomic Analysis. *Cells.* 2021 ; 28;10(4):744. Doi: 10.3390/cells10040744.

Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chrétien F. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* 2010 ; 62(1):268-79. Doi: 10.1002/art.27183.

Bt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Sušac B et al. Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host Microbe.* 2015;18(1):27-37. Doi: 10.1016/j.chom.2015.06.011.

Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature.* 2010;464(7293):1371-5. Doi: 10.1038/nature08949.

Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, Sefik E, Tan TG, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell.* 2013;155(6):1282-95. Doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054.

Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain.* 1999; 122 (Pt 8):1403-20. Doi: 10.1093/brain/122.8.1403.

Califano D, Cho JJ, Uddin MN, Lorentsen KJ, Yang Q, Bhandoola A, Li H, Avram D. Transcription Factor Bcl11b Controls Identity and Function of Mature Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*. 2015;43(2):354-68. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.005.

Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature*. 2014; 508(7496):397-401. Doi: 10.1038/nature13047.

Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*. 1990; 66(5):1436-44. Doi: 10.1161/01.res.66.5.1436.

Carotta S, Pang SH, Nutt SL, Belz GT. Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood*. 2011; 117(20):5449-52. Doi: 10.1182/blood-2010-11-318956.

Castiglioni A, Corna G, Rigamonti E, Basso V, Vezzoli M, Monno A, Almada AE, Mondino A, Wagers AJ, Manfredi AA, Rovere-Querini P. FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0128094. Doi: 10.1371/journal.pone.0128094.

Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN, Smith DE et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2011; 12(7):631-8. Doi: 10.1038/ni.2045.

Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004; 84(1):209-38. Doi: 10.1152/physrev.00019.2003.

Chaturvedi LS, Mukherjee M, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med*. 2001; 33(4):251-6. Doi: 10.1038/emm.2001.41.

Chazaud B, Gherardi RK. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. 2007; 18(4):1397-409. Doi: 10.1091/mbc.e06-08-0693.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003; 163(5):1133-43. Doi: 10.1083/jcb.200212046.

Cherrier M, Ohnmacht C, Cording S, Eberl G. Development and function of intestinal innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(3):277-83. Doi: 10.1016/j.coi.2012.03.011.

Choi W, Lee J, Lee J, Lee SH, Kim S. Hepatocyte Growth Factor Regulates Macrophage Transition to the M2 Phenotype and Promotes Murine Skeletal Muscle Regeneration. *Front Physiol.* 2019;10:914. Doi: 10.3389/fphys.2019.00914.

Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(4):1397-409. Doi: 10.1091/mbc.e06-08-0693.

Clement EM, Feng L, Mein R, Sewry CA, Robb SA, Manzur AY et al. Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001-2008. *Neuromuscul Disord.* 2012; 22(6):522-7. Doi: 10.1016/j.nmd.2012.01.010.

Contreras O, Brandan E. Fibro/adipogenic progenitors safeguard themselves: a novel mechanism to reduce fibrosis is discovered. *J Cell Commun Signal.* 2017;11(1):77-78. Doi:10.1007/s12079-016-0372-4.

Cording S, Medvedovic J, Cherrier M, Eberl G. Development and regulation of ROR γ t(+) innate lymphoid cells. *FEBS Lett.* 2014 ; 588(22):4176-81. Doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.034.

Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. MyoD (-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* 2000 ; 15;224(2):122-37. Doi: 10.1006/dbio.2000.9682.

Cortez VS, Ulland TK, Cervantes-Barragan L, Bando JK, Robinette ML, Wang Q et al. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- β signaling. *Nat Immunol.* 2017 Sep;18(9):995-1003. Doi: 10.1038/ni.3809.

Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol.* 2009; 10(1):66-74. Doi: 10.1038/ni.1668.

Daussy C, Faure F, Mayol K, Viel S, Gasteiger G, Charrier E et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med.* 2014 Mar 10;211(3):563-77. Doi: 10.1084/jem.20131560.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013; 14(10):986-95. Doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013 Sep 18.

De Padilla CM, Reed AM. Dendritic cells and the immunopathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2008; 20(6):669-74. Doi: 10.1097/BOR.0b013e3283157538.

De Paepe B. Progressive Skeletal Muscle Atrophy in Muscular Dystrophies: A Role for Toll-like Receptor-Signaling in Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(12):4440. Doi: 10.3390/ijms21124440.

Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol.* 2012; 1;189(7):3669-80. Doi: 10.4049/jimmunol.1103180.

Desguerre I, Mayer M, Leturcq F, Barbet JP, Gherardi RK, Christov C. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Jul;68(7):762-73. Doi: 10.1097/NEN.0b013e3181aa31c2.

Devries MC, Tarnopolsky MA. Muscle physiology in healthy men and women and those with metabolic myopathies. *Neurol Clin.* 2008;26(1):115-48; ix. Doi: 10.1016/j.ncl.2007.11.010.

Deyhle MR, Hyldahl RD. The Role of T Lymphocytes in Skeletal Muscle Repair From Traumatic and Contraction-Induced Injury. *Front Physiol.* 2018;9:768. Doi: 10.3389/fphys.2018.00768.

Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2014;41(3):354-365. Doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.005.

Dimachkie MM, Barohn RJ. Inclusion body myositis. *Neurol Clin.* 2014;32(3):629-46, vii. Doi: 10.1016/j.ncl.2014.04.001.

Di Santo JP, Lim AI, Yssel H. 'ILC-poiesis': generating tissue ILCs from naïve precursors. *Oncotarget.* 2017;8(47):81729-81730. Doi: 10.18632/oncotarget.21046.

Dufresne SS, Frenette J, Dumont NA. Inflammation and muscle regeneration, a double-edged sword. *Med Sci* 2016;32(6-7):591-7. French. Doi: 10.1051/medsci/20163206022.

Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science.* 2015;348(6237):aaa6566. Doi: 10.1126/science.aaa6566.

Ebihara T, Song C, Ryu SH, Plougastel-Douglas B, Yang L, Levanon D et al. Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2015;16(11):1124-33. Doi: 10.1038/ni.3272

Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol.* 1989; 20(3):224-31. Doi: 10.1016/0046-8177(89)90128-7.

Eng CM, Smallwood LH, Rainiero M P, Lahey M, Ward S R, Lieber R L. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *J. Exp. Biol.* 2008 ; 211, 2336–2345. <https://doi.org/10.1242/jeb.017640>.

Engel AG, Arahata K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum Pathol.* 1986;17(7):704-21. Doi: 10.1016/s0046-8177(86)80180-0.

Engquist EN, Zammit PS. The Satellite Cell at 60: The Foundation Years. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(s2):S183-S203. Doi: 10.3233/JND-210705.

Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord.* 2003;13(4):303-9. Doi: 10.1016/s0960-8966(02)00280-8.

Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Influence of immune responses in gene/stem cell therapies for muscular dystrophies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:818107. doi:10.1155/2014/818107.

Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, Salomonsson S, Pandya JM, Lindroos E et al. T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells. *J Immunol.* 2009 1;183(7):4792-9. Doi: 10.4049/jimmunol.0803688

Favier FB, Benoit H, Freyssenet D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch.* 2008;456(3):587-600. Doi: 10.1007/s00424-007-0423-z.

Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):R166-72. Doi: 10.1152/ajpregu.1993.265.1.R166.

Forcina L, Cosentino M, Musarò A. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells*. 2020; 9(5):1297. Doi:10.3390/cells9051297

Freud AG, Keller KA, Scoville SD, Mundy-Bosse BL, Cheng S, Youssef Y et al. NKp80 Defines a Critical Step during Human Natural Killer Cell Development. *Cell Rep*. 2016;16(2):379-391. Doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.095.

Fu X, Wang H, Hu P. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2015 May;72(9):1663-77. Doi: 10.1007/s00018-014-1819-5.

Füchtbauer EM and Westphal H. *MyoD* and *myogenin* are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev. Dyn*. 1992 ; 193: 34-39. doi: 10.1002/aja.1001930106.

Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H et al. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J Immunol*. 2013;191(4):1818-26. Doi: 10.4049/jimmunol.1300379.

Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, Izon D, Honeyman J, Chen ZP, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121(12):4903-15. Doi: 10.1172/JCI58577.

Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science*. 2015;350(6263):981-5. Doi: 10.1126/science.aac9593. Epub 2015 Oct 15.

Gattazzo F, Laurent B, Relaix F, Rouard H, Didier N. Distinct Phases of Postnatal Skeletal Muscle Growth Govern the Progressive Establishment of Muscle Stem Cell Quiescence. *Stem Cell Reports*. 2020 ; 8;15(3):597-611. Doi: 10.1016/j.stemcr.2020.07.011.

Gillies A R, Chapman M A, Bushong E A, Deerinck T J, Ellisman, M Het al. High resolution three-dimensional reconstruction of fibrotic skeletal muscle extracellular matrix. *J. Physiol.* 2017 ; 595, 1159–1171. <https://doi.org/10.1113/JP273376>

Gillies AR, Lieber R L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve.* 2011 ; 44, 318–331. <https://doi.org/10.1002/mus.22094>.

Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392-404. Doi: 10.1038/nri3671.

Gissingier-Prévot S, Figarella-Branger D, Mancini J, Chabrol B. La dermatomyosite de l'enfant: diagnostic et prise en charge [Juvenile dermatomyositis: diagnosis and treatment]. *Arch Pediatr.* 2008;15(1):50-3. French. Doi: 10.1016/j.arcped.2007.08.025.

Godfrey C, Foley AR, Clement E, Muntoni F. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(3):278-85. Doi: 10.1016/j.gde.2011.02.001.

Golebski K, Layhadi JA, Sahiner U, Steveling-Klein EH, Lenormand MM, Li RCY et al. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response. *Immunity.* 2021; 54(2):291-307.e7. Doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.013.

Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity.* 2012;36(1):55-67. Doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.016.

Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci.* 1996 ; 135 (1):10-7. Doi: 10.1016/0022-510x(95)00255-z.

Gorospe JR, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *J Neurol Sci.* 1994; 122(1):44-56. Doi: 10.1016/0022-510x(94)90050-7.

Gray D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:49-77. Doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.000405.

Greenberg SA, Pinkus GS, Amato AA, Pinkus JL. Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis. *Muscle Nerve.* 2007;35(1):17-23. Doi: 10.1002/mus.20649.

Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Sanoudou D, Tawil R et al. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol.* 2005;57(5):664-78. Doi: 10.1002/ana.20464.

Guis S, Mattei J, Figarella-branger D and Bendahan, D. Idiopathic Inflammatory Myopathies of the Adult: Diagnostic and Classification Criteria. *Revue Du Rhumatisme Monographies.* 2010; 77,99-102. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2010.01.011>

Gundersen, K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews.* 2011; 86: 564-600. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x>.

Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA et al. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 14):2535-44.

Hagman DK, Kuzma JN, Larson I, et al. Characterizing and quantifying leukocyte populations in human adipose tissue: Impact of enzymatic tissue processing. *J Immunol Methods* 2012;386:50–9

Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med.* 2011; 208(4):715-27. Doi: 10.1084/jem.20101059.

Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C et al Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0147198. Doi: 10.1371/journal.pone.0147198.

Harly C, Bhandoola A. Switch hitter: Bcl11b in T cells and ILC2s. *J Exp Med*. 2020;217(1):e20191739. doi:10.1084/jem.20191739

Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(3):157-61. Doi: 10.1038/sj.ejhg.5200744.

Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):113-7. Doi: 10.1038/nature12240.

Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013;153(2):376-88. Doi: 10.1016/j.cell.2013.02.053.

Hermanson JW, Cobb M A. Four forearm flexor muscles of the horse, *Equus caballus*: Anatomy and histochemistry. *J. Morphol*. 2005; 212,269–280.
doi.org/10.1002/jmor.1052120306.

Hernandez P, Gronke K, Diefenbach A. A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur J Immunol*. 2018;48(1):15-31. Doi: 10.1002/eji.201747183.

Hernández PP, Mahlakoiv T, Yang I, Schwierzeck V, Nguyen N, Guendel F et al. Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol*. 2015;16(7):698-707. Doi: 10.1038/ni.3180.

Hervier B, Perez M, Allenbach Y, Devilliers H, Cohen F, Uzunhan Y et al. Involvement of NK Cells and NKp30 Pathway in Antisynthetase Syndrome. *J Immunol*. 2016;197(5):1621-30. Doi: 10.4049/jimmunol.1501902.

Hoffman EP, Rao D, Pachman LM. Clarifying the boundaries between the inflammatory and dystrophic myopathies: insights from molecular diagnostics and microarrays. *Rheum Dis Clin North Am.* 2002;28(4):743-57. Doi: 10.1016/s0889-857x(02)00031-5.

Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord* 2004; 14 : 337-45.

Holzer N, Ziltener J L, Menetrey J. Plasticity of striated skeletal muscle: training effect and perspectives. *Rev. Med. Suisse.* 2006 ; 2, 1798–1804.

Hoyler T, Klose CS, Souabni A, Turqueti-Neves A, Pfeifer D, Rawlins EL et al. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37(4):634-48. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.020. Epub 2012

Huang K, Li QX, Bi FF, Duan HQ, Mastaglia F, Luo YB, Yang H. Comparative immunoprofiling of polymyositis and dermatomyositis muscles. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(8):3984-3993.

Huang Y, Mao K, Chen X, Sun MA, Kawabe T, Li W, et al. S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science.* 2018;359(6371):114-119. Doi: 10.1126/science.aam5809.

Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature.* 2012 ;491(7423):259-63. Doi: 10.1038/nature11535.

Hubert M, Gobbin E, Bendriss-Vermare N, Caux C, Valladeau-Guilemond J. Human Tumor-Infiltrating Dendritic Cells: From In Situ Visualization to High-Dimensional Analyses. *Cancers* 2019, 11, 1082. <https://doi.org/10.3390/cancers11081082>.

Huggett MT, Armstrong R. Adalimumab-associated pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(10):1312-3. Doi: 10.1093/rheumatology/kel220.

Jenkins SJ, Hume DA. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol.* 2014;35(8):358-67. Doi: 10.1016/j.it.2014.06.006.

Jeong HW, Hsu KC, Lee JW, Ham M, Huh JY, Shin HJ, Kim WS, Kim JB. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296(4):E955-64. Doi: 10.1152/ajpendo.90599.2008.

Kang JS, Krauss RS. Muscle stem cells in development and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(3):243–8. Doi: 10.1097/MCO.0b013e3283336ea98.

Kawanishi N, Mizokami T, Niihara H, Yada K, Suzuki K. Neutrophil Depletion Attenuates Muscle Injury after Exhaustive Exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(10):1917-24. Doi: 10.1249/MSS.0000000000000980.

Kim J, Ryu S, Kim HY. Innate Lymphoid Cells in Tissue Homeostasis and Disease Pathogenesis. *Mol Cells.* 2021;44(5):301-309. doi:10.14348/molcells.2021.0053.

Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* 2014;157(2):340-356. Doi: 10.1016/j.cell.2014.03.030.

Klose CSN, Kiss EA, Schwierzeck V, Ebert K, Hoyler T, d'Hargues Y, et al. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ ⁺ innate lymphoid cells. *Nature.* 2013; 494(7436):261-5. Doi: 10.1038/nature11813.

Koga S, Hozumi K, Hirano KI, Yazawa M, Terooatea T, Minoda A, Nagasawa T, Koyasu S, Moro K. Peripheral PDGFR α ⁺gp38⁺ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J Exp Med.* 2018 ; 215(6):1609-1626. Doi: 10.1084/jem.20172310.

Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, Weissman IL. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature.* 2000 Sep 21;407(6802):383-6. Doi: 10.1038/35030112.

Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, Thornton E, Franchini F, Szabady RL et al. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med*. 2013;210(5):917-31. Doi: 10.1084/jem.20122308.

Kyriakides C, Austen W Jr, Wang Y, Favuzza J, Kobzik L, Moore FD Jr, Hechtman HB. Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex. *Am J Physiol*. 1999; 277(6):C1263-8. Doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1263.

Ladislau L, Suárez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M et al. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain*. 2018 Jun 1;141(6):1609-1621. Doi: 10.1093/brain/awy105.

Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(12):731-44. Doi: 10.1038/nri3920.

Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*. 2015;160(1-2):74-87. Doi: 10.1016/j.cell.2014.12.011.

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*. 2011 Apr 6;13(4):376-388. Doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.009.

Li YP, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL, Reid MB. TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *FASEB J*. 2003;17(9):1048-57. Doi: 10.1096/fj.02-0759com.

Liang F, Ploquin A, Hernandez JD, et al. Dissociation of skeletal muscle for flow cytometric characterization of immune cells in macaques. *J Immunol Methods* 2015; 425:69–78

Lim AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A et al. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell*. 2017; 168(6):1086-1100.e10. Doi: 10.1016/j.cell.2017.02.021.

Lo BC, Canals Hernaez D, Scott RW, Hughes MR, Shin SB, Underhill TM ET A. The Transcription Factor ROR α Preserves ILC3 Lineage Identity and Function during Chronic Intestinal Infection. *J Immunol*. 2019 ;203(12):3209-3215. doi: 10.4049/jimmunol.1900781.

Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020; 15:123-147. Doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718

Lowe DA, Warren GL, Ingalls CP, Boorstein DB, Armstrong RB. Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. *J Appl Physiol* (1985). 1995; 79(4):1260-70. Doi: 10.1152/jappl.1995.79.4.1260.

Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L et al. Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol*. 2009;10(1):75-82. Doi: 10.1038/ni.1681.

Mace EM, Orange JS. Emerging insights into human health and NK cell biology from the study of NK cell deficiencies. *Immunol Rev*. 2019;287(1):202-225. Doi: 10.1111/imr.12725

Machado L, Esteves de Lima J, Fabre O, Proux C, Legendre R, Szegedi A et al. In Situ Fixation Redefines Quiescence and Early Activation of Skeletal Muscle Stem Cells. *Cell Rep*. 2017 ; 14; 21(7):1982-1993. Doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.080.

Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve*. 2005;32(1):1-18. Doi: 10.1002/mus.20301.

Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2011; 4;1(1):21. Doi: 10.1186/2044-5040-1-21.

Martinez-Gonzalez I, Mathä L, Steer CA, Ghaedi M, Poon GF, Takei F. Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity*. 2016;45(1):198-208. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.017

Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol*. 2018;75(12):1528-1537. Doi: 10.1001/jamaneurol.2018.2598.

Mashinchian O, Pisconti A, Le Moal E, Bentzinger CF. The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. *Curr Top Dev Biol*. 2018;126:23-65. doi: 10.1016/bs.ctdb.2017.08.003.

Mathä L, Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. The Fate of Activated Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2021;12:671966. Doi: 10.3389/fimmu.2021.671966.

Mathewson M A, Chapman M A, Hentzen E R, Fridén J, Lieber RL. Anatomical, architectural, and biochemical diversity of the murine forelimb muscles. *J. Anat.*2012 ; 221.

Mayne R, Sanderson R D. The extracellular matrix of skeletal muscle. *Coll. Relat. Res*. 1985;5, 449–468.

Mchedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin A, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-Dependent Innate Lymphoid Cells Mediate Hepatic Fibrosis. *Immunity*. 2013;39:357–71. 10.1016/j.immuni.2013.07.018

McLennan IS. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J Anat*. 1996;188 (Pt 1)(Pt 1):17-28.

McNally EM, Passos-Bueno MR, Bönnemann CG, Vainzof M, de Sá Moreira E, Lidov HG et al. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet.* 1996; 59(5):1040-7.

Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity.* 1997;7(4):493-504. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80371-4.

Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010; 140(6):771-6. Doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.

Meznaric M, Eržen I, Karen P, Cvetko E. . Effect of ageing on the myosin heavy chain composition of the human sternocleidomastoid muscle. *Ann. Anat. - Anat. Anz.*2018 ; 216, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.001>.

Miller K.J. Thaloor D. Matteson S. Pavlath G.K. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 278: C174-C181.

Miller RG, Hoffman EP. Molecular diagnosis and modern management of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Clin.* 1994;12(4):699-725.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164(12):6166-73. Doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

Mjösberg J, Bernink J, Golebski K, Karrich JJ, Peters CP, Blom B et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37(4):649-59. Doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.015.

Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011 Sep;12(11):1055-62. Doi: 10.1038/ni.2104.

Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med*. 2013;210(3):535-49. Doi: 10.1084/jem.20121964

Montaldo E, Juelke K, Romagnani C. Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur J Immunol*. 2015 45(8):2171-82. Doi: 10.1002/eji.201545598.

Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DM, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(34):10762-7. Doi: 10.1073/pnas.1509070112.

Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. . Innate Lymphoid Cells Promote Lung-Tissue Homeostasis After Infection With Influenza Virus. *Nat Immunol*. 2011 ; 12:1045–54. 10.1038/ni.2131.

Morita H, Kubo T, Rückert B, Ravindran A, Soyka MB, Rinaldi AO et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(6):2190-2201.e9. Doi: 10.1016/j.jaci.2018.12.1018.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463(7280):540-4. Doi: 10.1038/nature08636.

Morrison J, Lu QL, Pastoret C, Partridge T, Bou-Gharios G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest*. 2000;80(6):881-91. Doi: 10.1038/labinvest.3780092.

Morrison J, Palmer DB, Cobbold S, Partridge T, Bou-Gharios G. Effects of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1701-1710. Doi:10.1016/S0002-9440(10)62480-7.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69. Doi: 10.1038/nri2448. Erratum in: *Nat Rev Immunol.*2010 ; 10(6):460.

Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? *Am J Transplant.* 2014;14(11):2460-6. Doi: 10.1111/ajt.12937.

Mounier R, Chrétien F, Chazaud B. Blood vessels and the satellite cell niche. *Curr Top Dev Biol.* 2011;96:121-38. Doi: 10.1016/B978-0-12-385940-2.00005-X

Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3625-37. Doi: 10.1242/dev.064162.

Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe.* 2019 ;25(1):13-26. Doi: 10.1016/j.chom.2018.12.006.

Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol.* 2003 ; 15;547(Pt 1):125-32. Doi: 10.1113/jphysiol.2002.031450.

Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforêt P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol.* 2007; 64(8):1176-82. Doi: 10.1001/archneur.64.8.1176.

Nguyen LT, Lim S, Oates T, Chung KF. Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. *Respir Med.* 2005 ; 99(2):200-7. Doi: 10.1016/j.rmed.2004.06.007.

Nickolls AR, Bönnemann CG. The roles of dystroglycan in the nervous system: insights from animal models of muscular dystrophy. *Dis Model Mech.* 2018;11(12):dmm035931. Doi: 10.1242/dmm.035931.

Nikoli M, Malnar-Dragojevi D, Bobinac D, Bajek S, Jerkovi R, Soj-Vrani T. Age-related skeletal muscle atrophy in humans: an immunohistochemical and morphometric study. *Coll. Antropol.* 2001 ; 25, 545–553.

Olguin HC, Olwin BB. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 2004; 15;275(2):375-88. Doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.015.

Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, Salimi M, Wong SH, Brewer JM, Englezakis A et al. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity.* 2014 Aug 21;41(2):283-95. Doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.016.

Ostor AJ, Crisp AJ, Somerville MF, Scott DG. Fatal exacerbation of rheumatoid arthritis associated fibrosing alveolitis in patients given infliximab. *BMJ.* 2004 ; 27;329(7477):1266. Doi: 10.1136/bmj.329.7477.1266.

Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve.* 2005;32(5):563-76. doi: 10.1002/mus.20349.

Pakula A, Spinazzola JM, Gussoni E. Purification of myogenic progenitors from human muscle using fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Methods Mol Biol* 2019; 1889:1–15.

Peairs A, Radjavi A, Davis S, et al. Activation of AMPK inhibits inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(3):542-551. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03924.x.

Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, Kaufman SJ, Lamandé SR, North KN. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology*. 2008;71(5):312-21. Doi: 10.1212/01.wnl.0000284605.27654.5a.

Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1444-56. Doi: 10.1172/JCI66381. Epub 2013 Mar 25.

Perdiguerro E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Caelles C, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J Cell Biol*. 2011;195(2):307-22. doi: 10.1083/jcb.201104053.

Pimorady-Esfahani A, Grounds MD, McMenamin PG. Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 1997;20(2):158-66. Doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199702)20:2<158::aid-mus4>3.0.co;2-b.

Possot C, Schmutz S, Chea S, Boucontet L, Louise A, Cumano A, Golub R. Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of ROR γ t(+) innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2011;12(10):949-58. Doi: 10.1038/ni.2105.

Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Easley CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 22;107(25):11489-94. Doi: 10.1073/pnas.1003988107.

Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*. 2004;94(3):296-305. Doi: 10.1161/01.RES.0000116143.74830.A9.

Radtke F, Ferrero I, Wilson A, Lees R, Aguet M, MacDonald HR. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. *J Exp Med*. 2000;191(7):1085-1094. doi:10.1084/jem.191.7.1085

Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999;10(5):547-58. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80054-0.

Rafei-Shamsabadi DA, van de Poel S, Dorn B, et al. Lack of Type 2 Innate Lymphoid Cells Promotes a Type I-Driven Enhanced Immune Response in Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2018;138(9):1962-1972. Doi:10.1016/j.jid.2018.03.001.

Rankin J, Matthews L, Cobley S, Han A, Sanders R, Wiltshire HD, Baker JS. Psychological consequences of childhood obesity: psychiatric comorbidity and prevention. *Adolesc Health Med Ther*. 2016;7:125-146. Doi: 10.2147/AHMT.S101631.

Rankin LC, Groom JR, Chopin M, et al. The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway [published correction appears in *Nat Immunol*. 2013;14(4):389-395. Doi:10.1038/ni.2545

Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009; 67(2A):343-62. Doi: 10.1590/s0004-282x2009000200035.

Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*. 2012; 139(16):2845-56. Doi: 10.1242/dev.069088.

Reyes-Fernandez PC, Periou B, Decrouy X, Relaix F, Authier FJ. Automated image-analysis method for the quantification of fiber morphometry and fiber type population in human

skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2019;9(1):15. Published 2019 May 27. Doi:10.1186/s13395-019-0200-7.

Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS, Lee JS, Wang Y, Durum SK et al. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol*. 2015; 16(3):306-17. Doi: 10.1038/ni.3094.

Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2013:564-73. doi: 10.1038/ni.2584.

Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA et al. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 5;7(299):299rv4. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7322.

Rostasy KM, Schmidt J, Bahn E, Pfander T, Piepkorn M, Wilichowski E, Schulz-Schaeffer J. Distinct inflammatory properties of late-activated macrophages in inflammatory myopathies. *Acta Myol*. 2008;27(2):49-53.

Rothenberg EV, Ungerbäck J, Champhekar A. Forging T-Lymphocyte Identity: Intersecting Networks of Transcriptional Control. *Adv Immunol*. 2016;129:109-74. Doi: 10.1016/bs.ai.2015.09.002.

Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, et al. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(41):17475-17480. doi:10.1073/pnas.0908641106

Rupert J E, Rose J A, Organ J M, Butcher M T. Forelimb muscle architecture and myosin isoform composition in the groundhog (*Marmota monax*). *J. Exp. Biol*. 2015 ; 218, 194–205. <https://doi.org/10.1242/jeb.107128>.

Russell AP. The molecular regulation of skeletal muscle mass. *Proc Aust Physiol Soc.* 2009;40:85–93.

Ryan GR, Dai XM, Dominguez MG, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Russell RG, Pollard JW, Stanley ER. Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1 (op)/Csf1 (op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood.* 2001; 98(1):74-84. Doi: 10.1182/blood.v98.1.74.

Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan Met al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells.* 2013;31(2):384-96. Doi: 10.1002/stem.1288.

Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8633-41. Doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8633.

Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, Diefenbach A. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol.* 2009; 10(1):83-91. Doi: 10.1038/ni.1684.

Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F et a. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity.* 2008;29(6):958-70. Doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.001.

Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP, Eberl G. Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. *Science.* 2010;330(6004):665-9. Doi: 10.1126/science.1194597.

Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*. 2002 Dec;17(6):749-56. Doi: 10.1016/s1074-7613(02)00474-0.

Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med*. 2007;37(10):837-56. Doi: 10.2165/00007256-200737100-00002.

Schneider C, O'Leary CE, von Moltke J, Liang HE, Ang QY, Turnbaugh PJ, Radhakrishnan S et al. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell*. 2018; 174(2):271-284.e14. Doi: 10.1016/j.cell.2018.05.014.

Schoser BG, Ricker K, Schneider-Gold C, Hengstenberg C, Dürre J, Bültmann B et al. Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2. *Neurology*. 2004;63(12):2402-4. doi:10.1212/01.wnl.0000147335.10783.e4.

Scoville SD, Mundy-Bosse BL, Zhang MH, et al. A Progenitor Cell Expressing Transcription Factor ROR γ t Generates All Human Innate Lymphoid Cell Subsets. *Immunity*. 2016; 44(5):1140-1150. Doi:10.1016/j.immuni.2016.04.007.

Seehus CR, Kadavallore A, Torre B, Yeckes AR, Wang Y, Tang J, Kaye J. Alternative activation generates IL-10 producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):1900. Doi: 10.1038/s41467-017-02023-z.

Serafini N, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jul;15(7):415-28. Doi: 10.1038/nri3855.

Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, Ardite E, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol*. 2011;96:167-201. Doi: 10.1016/B978-0-12-385940-2.00007-3.

Sframeli M, Sarkozy A, Bertoli M, Astrea G, Hudson J, Scoto M et al. Congenital muscular dystrophies in the UK population: Clinical and molecular spectrum of a large cohort diagnosed over a 12-year period. *Neuromuscul Disord.* 2017; 27(9):793-803. Doi: 10.1016/j.nmd.2017.06.008.

Shadrach JL, Wagers AJ. Stem cells for skeletal muscle repair. *Philos Trans R Soc B.* 2011;366:2297–306. Doi: 10.1098/rstb.2011.0027.

Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(3):775-85. Doi: 10.1189/jlb.0506356.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 1989; 244(4912):1578-80. Doi: 10.1126/science.2662404.

Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science.* 2013 ; 22;342(6161):1242974. Doi: 10.1126/science.1242974.

Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L et al. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol.* 2016 Jun;17(6):626-35. Doi: 10.1038/ni.3443. Epub 2016 Apr 25.

Simoni Y, Fehlings M, Kløverpris HN, McGovern N, Koo SL, Loh CY et al. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity.* 2017;46(1):148-161. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.005.

Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1994 ; 267, C1723–C1728. Doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1723.

Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1321-5. doi: 10.1126/science.1222551

Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol*. 2001;98(2):235-43. Doi: 10.1006/clim.2000.4966.

Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145-9. Doi: 10.1038/nri3365.

Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134(1):17-32. Doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x

Sugama K, Suzuki K, Yoshitani K, Shiraishi K, Kometani T. IL-17, neutrophil activation and muscle damage following endurance exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2012;18:116-27.

Taivassalo T, Reddy H, Matthews PM. Muscle responses to exercise in health and disease. *Neurol Clin*. 2000;18(1):15-34. Doi: 10.1016/s0733-8619(05)70177-8.

Tang Y, Peitzsch C, Charoudeh HN, Cheng M, Chaves P, Jacobsen SE, Sitnicka E. Emergence of NK-cell progenitors and functionally competent NK-cell lineage subsets in the early mouse embryo. *Blood*. 2012 5;120(1):63-75. Doi: 10.1182/blood-2011-02-337980.

Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, and Allen RE. Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanically Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and Role of pH and Nitric Oxide. *Molecular Biology of the Cell* 2002 13:8, 2909-2918.

Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, Sakata T, Dial S, Hattori A, Ikeuchi Y, Allen RE. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte

growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290(6):C1487-94. Doi: 10.1152/ajpcell.00513.2005.

Tawil R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurotherapeutics.* 2008;5(4):601-606. Doi:10.1016/j.nurt.2008.07.005.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):R345-53. Doi: 10.1152/ajpregu.00454.2004.

Tidball JG, Flores I, Welc SS, Wehling-Henricks M, Ochi E. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis, *Experimental Gerontology.* 2021.

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(5):R1173-87. Doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009. Epub 2010; 10. PMID: 20219869.

Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 2007; 578(Pt 1):327-36. Doi: 10.1113/jphysiol.2006.118265.

Tiidus PM. Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998; 76(5):533-8. Doi: 10.1139/cjpp-76-5-533.

Tournadre A, Miossec P. Chemokines and dendritic cells in inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(3):300-4. Doi: 10.1136/ard.2008.095984.

Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, Gapin L, Glimcher LH. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity.* 2004; 20(4):477-94. Doi: 10.1016/s1074-7613(04)00076-7.

Trotter JA, Purslow P P. Functional morphology of the endomysium in series fibered muscles. *J. Morphol.*1992; 212, 109–122. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052120203>.

Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, Goulet JR, Raymond Y, Senécal JL. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84(4):231-249. Doi: 10.1097/01.md.0000173991.74008.b0.

Turrina A, Martínez-González MA, Stecco C. The muscular force transmission system: Role of the intramuscular connective tissue. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 2013; 17, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2012.06.001>.

Van de Pavert SA, Ferreira M, Domingues RG, et al. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature*. 2014;508(7494):123-127. Doi:10.1038/nature13158

Varga T, Mounier R, Patsalos A, Gogolák P, Peloquin M, Horvath A et al. Macrophage PPAR γ , a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity*. 2016; 45(5):1038-1051. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.016.

Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:643-75. Doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.

Verykokakis M, Zook EC, Kee BL. ID'ing innate and innate-like lymphoid cells. *Immunol Rev*. 2014;261(1):177-97. Doi: 10.1111/imr.12203.

Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol*. 2011; 187(10):5419-5428. doi:10.4049/jimmunol.1101267.

Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;(3):482-96. Doi: 10.1093/hmg/ddn376.

Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci Transl Med*. 2014; 6(258):258ra142. Doi: 10.1126/scitranslmed.3009925.

Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-1066. Doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017.

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier L.L et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; 331, 44–49.

Vosshenrich CA, Di Santo JP. Developmental programming of natural killer and innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(2):130-8. Doi: 10.1016/j.coi.2013.02.002.

Walker JA, Oliphant CJ, Englezakis A, Yu Y, Clare S, Rodewald HR, Belz G, Liu P, Fallon PG, McKenzie AN. Bcl11b is essential for group 2 innate lymphoid cell development. *J Exp Med*. 2015; 212(6):875-82. Doi: 10.1084/jem.20142224.

Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, Schmidt C et al. Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM. *J Neurol*. 2003; 250(12):1431-8. Doi: 10.1007/s00415-003-0234-x.

Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B et al. Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*. 2017;171(1):201-216.e18. Doi: 10.1016/j.cell.2017.07.027.

Wang Y, Wehling-Henricks M, Samengo G, Tidball JG. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell*. 2015; 14(4):678-88. Doi: 10.1111/accel.12350.

Weber BN, Chi AW, Chavez A, Yashiro-Ohtani Y, Yang Q, Shestova O, Bhandoola A. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature*. 201; 476(7358):63-8. Doi: 10.1038/nature10279.

Weisser SB, McLaren KW, Kuroda E, Sly LM. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. *Methods Mol Biol.* 2013; 946:225-39. Doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_14.

Weizman OE, Adams NM, Schuster IS, Krishna C, Pritykin Y, Lau C et al. ILC1 Confer Early Host Protection at Initial Sites of Viral Infection. *Cell.* 2017 Nov 2;171(4):795-808.e12. Doi: 10.1016/j.cell.2017.09.052.

Wiendl H. Idiopathic inflammatory myopathies: current and future therapeutic options. *Neurotherapeutics.* 2008;5(4):548-57. Doi: 10.1016/j.nurt.2008.08.008.

Wienke J, Deakin CT, Wedderburn LR, van Wijk F, van Royen-Kerkhof A. Systemic and Tissue Inflammation in Juvenile Dermatomyositis: From Pathogenesis to the Quest for Monitoring Tools. *Front Immunol.* 2018;9:2951. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02951.

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(12):4828-32. Doi: 10.1073/pnas.87.12.4828.

Wirsdörfer F, Bangen JM, Pastille E, Schmitz D, Flohé S, Schumak B, Flohé SB. Dendritic Cell-Like Cells Accumulate in Regenerating Murine Skeletal Muscle after Injury and Boost Adaptive Immune Responses Only upon a Microbial Challenge. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155870. Doi: 10.1371/journal.pone.0155870.

Wong SH, Walker JA, Jolin HE, Drynan LF, Hams E, Camelo A et al. Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nat Immunol.* 2012; 13(3):229-36. Doi: 10.1038/ni.2208.

Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP. Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology.* 2004; 62(4):538-43. Doi: 10.1212/wnl.62.4.538.

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004; (8):583-94. Doi: 10.1038/nri1412.

Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K et al. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet.* 2001;10(15):1563-9. Doi: 10.1093/hmg/10.15.1563.

Yang J, Zhao L, Xu M, Xiong N. Establishment and function of tissue-resident innate lymphoid cells in the skin. *Protein Cell.* 2017;8(7):489-500. Doi:10.1007/s13238-017-0388-4

Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013; 93(1):23-67. Doi: 10.1152/physrev.00043.2011.

Yu X, Wang Y, Deng M, et al. The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *Elife.* 2014;3:e04406. Published 2014 Oct 13. doi:10.7554/eLife.04406.

Yu Y, Tsang JC, Wang C, Clare S, Wang J, Chen X, et al. Single-cell RNA-seq identifies a PD-1^{hi} ILC progenitor and defines its development pathway. *Nature.* 2016; 539(7627):102-106. Doi:10.1038/nature20105.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54(11):1177-91. Doi: 10.1369/jhc.6R6995.2006.

Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine.* 2008; 42(1):128-36. Doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.003.

Zhang J, Xiao Z, Qu C, Cui W, Wang X, Du J. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1 (high) macrophage infiltration. *J Immunol.* 2014;193(10):5149-60. Doi: 10.4049/jimmunol.1303486.

Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity.* 2015;42(2):216-226. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.020.