



**HAL**  
open science

# Physiopathologie des myopathies inflammatoires idiopathiques : étude de la myostatine et spécificité des myopathies nécrosantes auto-immunes

Alexandrine Mahoudeau

► **To cite this version:**

Alexandrine Mahoudeau. Physiopathologie des myopathies inflammatoires idiopathiques : étude de la myostatine et spécificité des myopathies nécrosantes auto-immunes. Immunologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS563 . tel-04248942

**HAL Id: tel-04248942**

**<https://theses.hal.science/tel-04248942v1>**

Submitted on 19 Oct 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.



# Sorbonne Université

Ecole doctorale 515 Complexité du vivant

*U974 Centre de recherche en myologie – Equipe 8 : Myopathies inflammatoires idiopathiques et thérapies innovantes ciblées*

## **Physiopathologie des myopathies inflammatoires idiopathiques: étude de la myostatine et spécificité des myopathies nécrosantes auto-immunes**

Par Alexandrine MAHOUDEAU

Thèse de doctorat en Biologie cellulaire et Immunologie

Dirigée par Olivier BENVENISTE et Yves ALLENBACH

Présentée et soutenue publiquement le 18 Octobre 2022

### **Devant un jury composé de :**

Pr François-Jérôme AUTHIER

Rapporteur et Président

Pr Werner STENZEL

Rapporteur

Pr Anne TOURNADRE

Examinatrice

Dr Delphine SAUCE

Examinatrice

Dr Emmanuelle HAVIS

Examinatrice

Pr Olivier BENVENISTE

Directeur de thèse



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Olivier Benveniste de m'avoir accueillie dans son équipe et encadrée tout au long de cette thèse. Merci également de m'avoir permis de passer les 9 mois au Canada. Merci au Pr Yves Allenbach pour ses encouragements, sa bienveillance et pour avoir pris du temps pour m'encadrer, surtout en fin de thèse.

Merci aux rapporteurs, Pr Stenzel et Pr Authier, et aux examinatrices Dr Havis, Dr Sauce et Pr Tournadre, d'avoir accepté de consacrer de leur temps précieux pour l'évaluation de cette thèse.

Merci aux membres de l'équipe qui sont devenus plus que des collègues :

Damien, animateur en chef de l'équipe, toujours prêt à aider et à répondre à n'importe quelle question. Julian et Bérénice, à notre team JAB. Julian pour sa maîtrise de la transcriptomique sans laquelle une partie de cette thèse n'aurait pas vu le jour et son soutien moral, et Bérénice pour son aide continue dans les manips, nos longues discussions et nos sorties shopping. Céline, qui a été ma 3<sup>e</sup> encadrante non officielle, pour toutes les relectures, l'aide sur les manips, la réflexion sur les projets, toutes les pauses café et les pep talks. Linda, Mazdak, Alistair et Solal pour leur contribution à la bonne ambiance qui règne dans l'équipe. Et finalement aux anciens: Nadège, Loïs, Nozomu, Solène, Kubé, François, Virginie.

Merci à Sarah et Angeline pour l'aide considérable en anapath malgré leurs emplois du temps chargés.

Merci aux Dr Laurent Drouot et Jean-Luc Charuel pour leur aide et leur expertise technique.

Merci à Gill pour les relectures de mes textes en anglais et son aide sur les différents projets.

Merci à Capucine, Elisa, Laura et Mona pour leur aide dans le projet de transcriptomique et à Anne et Kamel pour leur aide en culture en début de thèse.

Merci aux filles de la gestion Élise, Marie-Ange, Florence et Delphine pour avoir poussé le départ au Canada et géré les nombreux problèmes administratifs lors de ma thèse.

Thanks to the Gilbert lab in Toronto: Penney for hosting me in her lab and taking time to supervise me, and to all the lab members Heta, Erik, Brennen, Katy, Caro, Nitya, Sadegh, Louise, Saif, Ting, Krystina, Jo and Bella for their help with the experiments and integrating me in the team.

Merci aux amis du labo: Charles mon co-bureau de M2, Deborah, Eline et Cloé pour tous les bons moments, les ragots, les verres partagés et leur hospitalité pour les nombreuses nuits où je n'avais pas de domicile fixe.

Merci à l'équipe 7 et à l'équipe 10 avec qui nous partageons l'étage, toujours prêts à aider.

Merci à Nathalie Holic, Laurence Jeanson-Leh et Stéphanie Lorain qui ont suivi mon parcours de près ou de loin et ont été les premières à me donner ma chance et envie de continuer dans la science.

Merci à mes amis de la fac Aline, Axel, Sarah et Émeline pour les nombreux échanges à propos des galères de la recherche.

Merci à ma meilleure amie Alicia pour son soutien et mes supers copines Virginie et Marion qui ne comprennent pas forcément ce que je fais mais qui sont toujours partantes pour m'écouter.

Merci à ma famille : à Papé, Mamé (toujours prête à m'accueillir en dernière minute et à s'assurer que je n'ai jamais faim), mes parents et ma soeur pour leur soutien.

Et enfin, à Nicolas pour sa présence, son soutien continu et sa capacité à me remonter le moral à coup de tortiglioni gratinati al forno. C'est finalement grâce à nos projets de thèse que tout a commencé.

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	1
<b>Table des figures</b> .....	5
<b>Table des tableaux</b> .....	5
<b>Abbréviations</b> .....	6
<b>INTRODUCTION</b> .....	7
<b>I- Homéostasie musculaire</b> .....	7
A. Le muscle squelettique .....	7
1) Description du muscle squelettique.....	7
a- Structure musculaire.....	7
b- Fibres musculaires.....	9
c- Cellules satellites.....	10
d- Matrice extracellulaire.....	11
2) Fonctions du muscle squelettique.....	13
a- Contraction musculaire.....	13
b- Fonction sécrétrice : les myokines .....	15
B. Maintien de l'homéostasie musculaire .....	17
1) Mécanismes de régénération .....	18
a- Rôle des cellules souches dans la régénération .....	18
b- Implication de l'immunité et des cytokines.....	20
2) Régulation de la masse musculaire.....	22
a- Maintien de la balance protéique.....	22
b- Vieillesse musculaire et sarcopénie.....	23
<b>II. Muscle et auto-immunité</b> .....	25
A. Myopathies inflammatoires idiopathiques .....	25
1) Généralités.....	25
a- Définition.....	25
b- Classification .....	26
c- Auto-anticorps .....	28
e- Traitement .....	30
2) Evaluation de l'activité et des dommages .....	31
a- Examens cliniques.....	31
b- Dosages biochimiques et biomarqueurs d'activité .....	32
B. Myopathies nécrosantes auto-immunes.....	32

1) Aspect clinique .....	32
a- Examen clinique et histologique .....	32
b- Auto-anticorps .....	34
2) Physiopathologie .....	36
3) Importance d'un diagnostic précoce.....	38
<b>III. Macrophages et fibrose .....</b>	<b>39</b>
A. Macrophages .....	39
1) Classification des macrophages.....	39
a- Historique .....	39
b- Macrophages M1 et M2.....	41
c- Revue de la classification .....	41
2) Macrophages et régénération musculaire .....	42
a- Processus de régénération musculaire orchestrée par les macrophages .....	42
b- Limites de l'effet bénéfique de la régénération .....	43
B. Fibrose.....	44
1) Définition générale de la fibrose .....	44
2) Acteurs majeurs de la fibrose : les FAPs et leur interaction avec les macrophages.....	45
a- Définition des FAPs .....	45
b- Rôle des FAPs et du système immunitaire dans la fibrose lors d'un dommage aigu ....	47
c- Rôle des FAPs et du système immunitaire dans la fibrose lors d'un dommage chronique	48
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>55</b>
<b>Résultats 1:</b> Myostatin In Idiopathic Inflammatory Myopathies: Serum Assessment And Disease Activity.....	55
<b>Résultats 2:</b> Exploring immune-mediated necrotizing myopathy pathogenesis using spatial transcriptomics .....	79
<b>RESULTATS ADDITIONNELS .....</b>	109
2D <i>in vitro</i> model design for IMNM.....	109
3D <i>in vitro</i> model design for IMNM.....	119
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>141</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>157</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>159</b>

## Table des figures

Figure 1 : Structure du muscle squelettique .....	8
Figure 2 : La cellule satellite et sa niche .....	11
Figure 3 : Matrice extracellulaire musculaire.....	12
Figure 4 : Organisation des sarcomères.....	14
Figure 5 : Jonction neuromusculaire .....	15
Figure 6 : Myokines .....	16
Figure 7 : Différenciation des cellules satellites.....	18
Figure 8 : Régénération musculaire.....	21
Figure 9 : Voies participant à l'atrophie ou à l'hypertrophie musculaire.....	23
Figure 10 : Classification des principaux groupes de MII en fonction de leurs auto-anticorps et de leurs caractéristiques cliniques.....	28
Figure 11 : Signes histologiques musculaires chez les patients MNAI.....	34
Figure 12 : Représentation de la protéine SRP et de la protéine HMGCR.....	35
Figure 13 : Mécanisme pathologique des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR dans la MNAI....	38
Figure 14 : Macrophages résidents et monocytes dans le tissu musculaire.....	40
Figure 15 : Représentation des clusters du MoMac-VERSE .....	42
Figure 16 : Régénération musculaire lors d'un dommage aigu ou chronique.....	45
Figure 17 : Interactions cellulaires lors de la régénération musculaire .....	48
Figure 18 : Interactions cellulaires lors de dommages chroniques.....	50

## Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des auto-anticorps spécifiques des sous-groupes de MII.....	29
Tableau 2 : Principaux gènes marqueurs des différentes populations de FAPs identifiées en analyses <i>single cell</i> .....	47



## Abbréviations

CK : créatine kinase

DM : dermatomyosite

DMD : dystrophie musculaire de Duchenne

FAP : *fibro-adipogenic progenitor*, progéniteurs fibro-adipeux

HMGCR : *3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase*

IBM : *inclusion body myositis*, myosite à inclusion

IFN : interféron

IGF : *insulin growth factor*

IL: interleukine

IRM : imagerie par resonance magnétique

MEC : matrice extracellulaire

MEndR : *muscle endogenous repair*

MHC : *myosin heavy chain*

MII : myopathie inflammatoire idiopathique

MMP : *matrix metallo protease*

MMT8 : *manual muscle testing of 8 muscles*

MNAI : myopathie nécrosante auto-immune

NK : *natural killer*

PGA : *physician global assessment*

PM : polymyosite

SAS : syndrome des anti-synthétases

SRP : *signal recognition protein*

TGF- $\beta$  : *Transforming growth factor beta*

TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor alpha*

# INTRODUCTION

## I- Homéostasie musculaire

### A. Le muscle squelettique

Il existe 3 types de muscles chez l'humain : le muscle cardiaque se contractant de manière involontaire afin de réguler les flux sanguins arrivant au cœur, le muscle lisse présent autour des viscères et des vaisseaux se contractant également de manière involontaire pour produire une pression continue et le muscle squelettique responsable des mouvements. Le muscle squelettique se contracte de manière volontaire et représente environ 40% de la masse du corps humain (Frontera and Ochala, 2015).

La fonction principale du muscle squelettique est la fonction motrice. Pour cela il possède 4 caractéristiques principales : l'excitabilité, la contractilité, l'élasticité et l'extensibilité. Il a également un rôle de réserve métabolique en servant de réserve de glucose et d'acides aminés ainsi que de régulateur de l'homéostasie thermique (Frontera and Ochala, 2015; Wolfe, 2006).

Dans cette thèse, je vais me concentrer sur les caractéristiques du muscle squelettique.

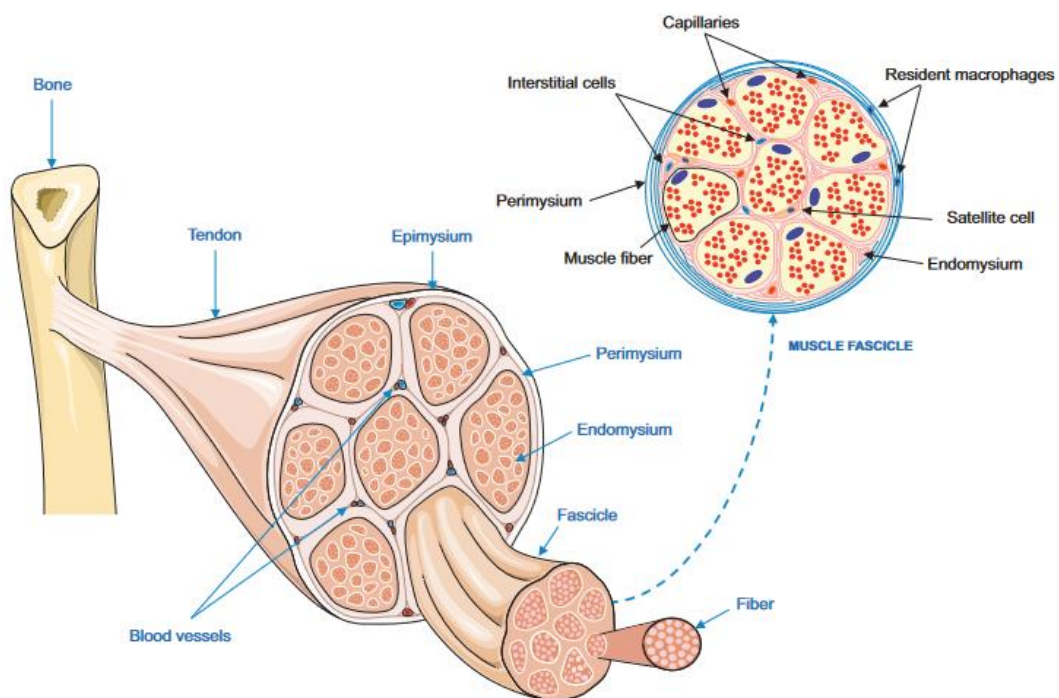
#### 1) Description du muscle squelettique

Le corps humain compte plus de 600 muscles squelettiques. Leurs fonctions sont hétérogènes et permettent de répondre à différents types de besoins, par exemple : les muscles oculomoteurs feront des mouvements brefs et rapides, le diaphragme des mouvements constants et rythmiques et d'autres comme le masseter des mouvements puissants.

##### *a- Structure musculaire*

Le muscle squelettique est relié à l'os par un tendon formant la jonction myotendineuse permettant la transmission du mouvement. Chaque muscle est séparé en plusieurs sous-unités musculaires recouvertes par du tissu conjonctif (**Figure 1**). Le muscle est tout d'abord entouré par une gaine dense de tissu

conjonctif appelée épimysium et faisant la jonction avec le tendon. Le muscle est ensuite séparé en fascicules entourés de pérémysium qui permet la transmission des contractions et est aussi le lieu de dépôt du tissu adipeux intra-musculaire (Purslow, 2020). Chaque fascicule contient l'unité cellulaire du muscle qui est la fibre musculaire. Chaque fibre musculaire est entourée d'une dernière couche de tissu conjonctif appelée l'endomysium. L'endomysium contient les principaux vaisseaux sanguins formés de cellules endothéliales qui irriguent le muscle et permettent de lui apporter son oxygénation. Il contient également les plaques motrices des terminaisons neuro-musculaires permettant le passage de l'influx nerveux du nerf au muscle et sa contraction. Sous l'endomysium se situe la membrane plasmique des fibres musculaires, le sarcolemme, doublé d'une lame basale (Sciorati et al., 2016). Sous la lame basale se trouvent les cellules satellites, les cellules souches musculaires. D'autres types cellulaires comme les péricytes présents autour des capillaires, les progéniteurs fibro-adipeux (FAPs) et les macrophages résidents sont également retrouvés dans le fascicule.



**Figure 1 : Structure du muscle squelettique**

*Représentation du muscle squelettique. Le muscle est relié à l'os par le tendon et entouré d'une membrane rigide d'épimysium. Au cœur du muscle, les fibres musculaires, l'unité principale du muscle sont organisées en fascicules entourés de pérémysium. Chaque fibre musculaire est ensuite recouverte d'endomysium. Au niveau de l'endomysium se trouvent les capillaires et les cellules interstitielles (d'après Sciorati et al. 2016).*

### *b- Fibres musculaires*

Les fibres musculaires sont l'unité de base du muscle squelettique. Elles font partie des plus grandes cellules du corps humain avec une taille pouvant aller de 0,5 à 42 cm (Arnold and Delp, 2011). Elles sont multinucléées et leur multinucléation est unique, pouvant comprendre des centaines à des milliers de noyaux. Les fibres musculaires et leurs noyaux proviennent de la fusion de cellules mononucléées appelées myoblastes qui correspondent aux cellules satellites activées. Les noyaux sont localisés en périphérie de la fibre sous le sarcolemme. Ce sont des cellules post-mitotiques qui ne vont plus se diviser.

Les fibres sont elles-mêmes composées de cytoplasme, appelé sarcoplasme dans lequel se trouvent des milliers de sous-unités protéiques organisées et contractiles appelées myofibrilles. Chaque myofibrille contient des unités sarcomériques constituées de filaments épais de myosine et fins d'actine.

Il existe plusieurs isoformes de myosines qui vont donner différents types de fibres (Schiaffino and Reggiani, 2011; Scott et al., 2001). Les fibres dites lentes ou de type I sont des fibres exprimant l'isoforme MyHC-I (*myosin heavy chain 1*) de myosine. Ces fibres sont caractérisées par un métabolisme oxydatif et sont plus résistantes à la fatigue. Elles sont également plus vascularisées et sont sollicitées lors d'exercices d'une durée prolongée de faible intensité (comme le maintien de la posture). Les fibres de type II dites rapides possèdent un métabolisme glycolytique et sont séparées en type IIa et IIb exprimant respectivement MyHC-2A et MyHC-2B. Il existe un troisième type de fibre rapide, les fibres 2x qui expriment MyHC-2x. Les fibres rapides sont fatigables mais puissantes et sollicitées lors d'exercices de forte intensité. Chez l'homme, la myosine MyHC-2B n'est pas exprimée (Schiaffino and Reggiani, 2011). Les muscles comportent souvent un mélange de ces fibres leur permettant d'assurer différentes fonctions.

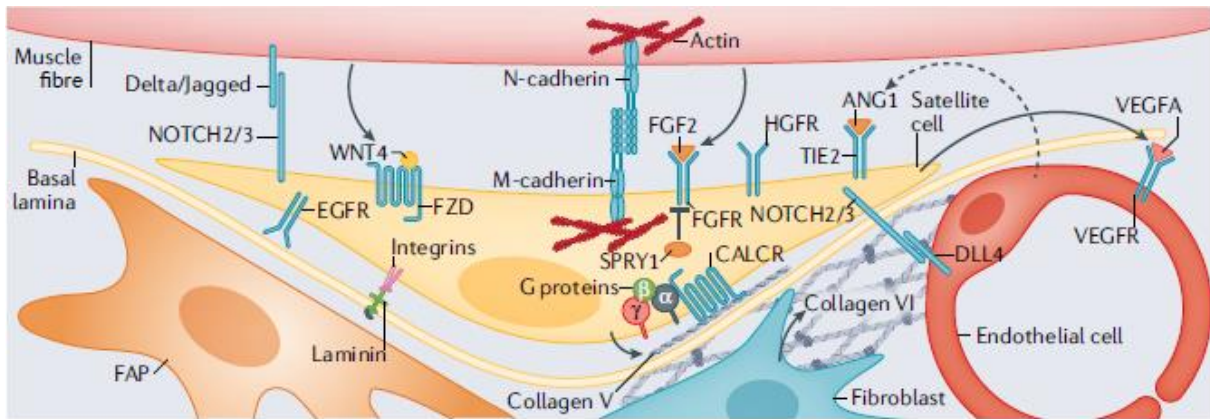
La répartition des différents types de fibres est différente pour chaque muscle et n'est pas fixée dans le temps. Elle peut être modifiée suite à un dommage, une immobilisation ou encore avec l'âge (Andersen, 2003).

D'autres isoformes de myosines existent comme MYH3 et MYH8 exprimées lors du développement et réexprimées dans un muscle en régénération (Schiaffino et al., 2015). Elles sont définies comme myosines embryonnaires.

#### *c- Cellules satellites*

Les cellules satellites sont situées entre la lame basale et le sarcolemme (Mauro, 1961). Ce sont des cellules souches monopotentes progénitrices des cellules musculaires. Ce sont donc les cellules qui vont permettre la croissance et la régénération musculaire. Elles ont une morphologie allongée, contiennent une proportion réduite de cytoplasme avec peu d'organelles et un noyau imposant composé en majorité d'hétérochromatine, signe de cellules inactives (Schultz, 1976). Elles représentent 2 à 7% des noyaux des fibres musculaires (Armand et al., 1983). Elles ne sont pas localisées de manière aléatoire et se retrouvent principalement autour des capillaires, des jonctions neuromusculaires, des noyaux musculaires et à l'extrémité des fibres (Allouh et al., 2008; Christov et al., 2007; Hawke and Garry, 2001).

Elles sont localisées dans une niche cellulaire spécifique créant un micro-environnement particulier. La niche est composée de la cellule satellite, de matrice extracellulaire, des réseaux neuronaux et vasculaires, des cellules environnantes et de diverses molécules sécrétées (**Figure 2**)(Sousa-Victor et al., 2022). Le maintien en quiescence ou l'activation des cellules satellites dépendent de signaux structurels ou biochimiques émanant de ce microenvironnement. Les cellules satellites activées sont appelées myoblastes. Les signaux structurels peuvent venir par exemple d'une modification de la rigidité de la matrice extracellulaire due à des changements de sa composition ou encore d'un dommage direct de la fibre musculaire adjacente. Les signaux biochimiques quant à eux proviennent de la sécrétion de facteurs autocrines ou paracrines par les cellules elles-mêmes ou les cellules environnantes (Yin et al., 2013).



**Figure 2 : La cellule satellite et sa niche**

Les cellules satellites se situent sous la lame basale. Elles sont reliées à la fibre musculaire adjacente par des récepteurs (notamment cadhérine) et sont au contact des cellules interstitielles présentes dans la niche (cellules endothéliales, fibroblastes, progéniteurs fibro-adipeux). Cette position particulière va leur permettre de répondre aux différents stimuli (d'après Sousa-Victor et al., 2022).

Les cellules souches ont tout d'abord été caractérisées par l'expression du facteur de transcription Pax7 (*protein paired box 7*) (Seale et al., 2000). Ce facteur est essentiel et son absence conduit à une altération importante de la régénération musculaire (Oustanina 2004, Sambavisan 2011). D'autres marqueurs ont par la suite été identifiés comme c-met, NCAM, la caveoline-1, les intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha 7$ , les lamines A/C, l'émérine (revu dans Yin et al., 2013).

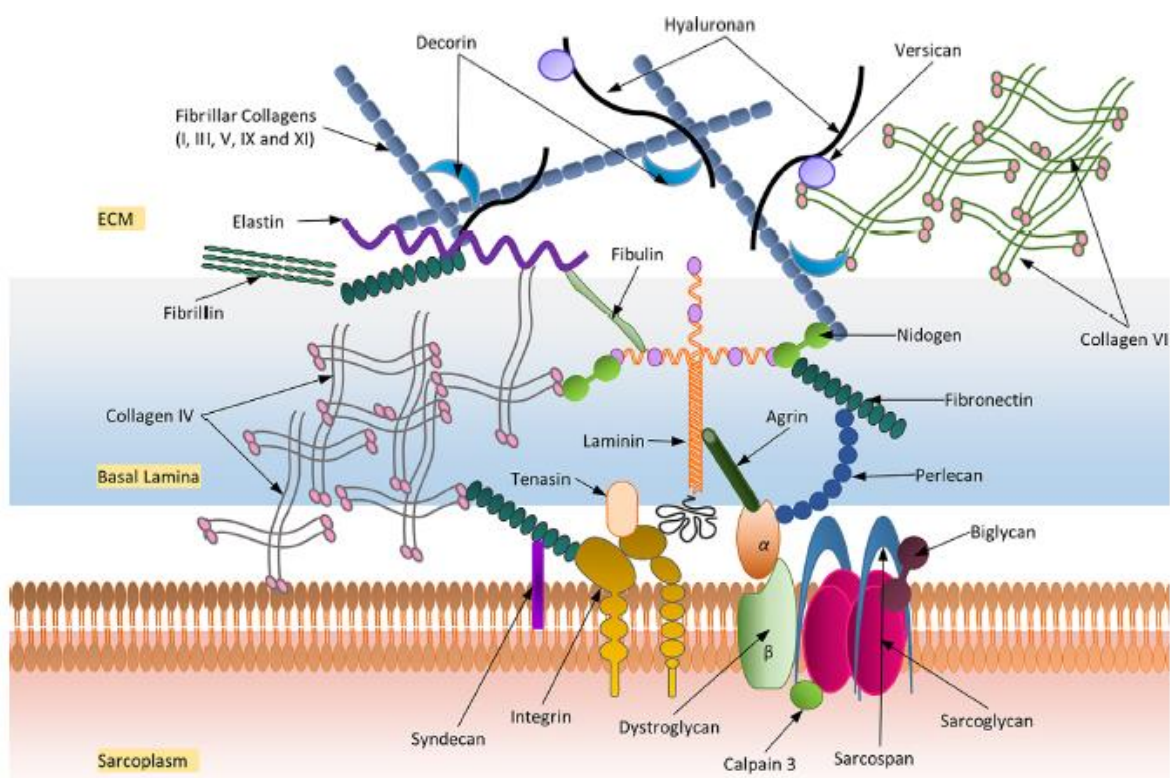
#### d- Matrice extracellulaire

Les fibres musculaires sont organisées dans une matrice extracellulaire (MEC) qui est une structure de protéines participant au soutien de l'architecture musculaire. L'épimysium, le péri-mysium et l'endomysium sont des subdivisions de la MEC dans le muscle.

La MEC est constituée principalement de collagènes, en majorité des collagènes I et III capables de s'assembler pour former des fibrilles et de se lier aux autres protéines de la matrice afin de former un maillage résistant (Purslow, 2008). Elle contient également des protéoglycanes comme la decorine, le biglycan, la fibromoduline et le lumican qui peuvent se lier à la membrane plasmique des fibres permettant ainsi les interactions MEC-cellules. Elle se compose aussi de glycoprotéines comme la laminine et la fibronectine permettant l'adhérence cellulaire ainsi que de protéines fibreuses comme l'élastine et la fibrilline ayant des propriétés élastiques permettant au muscle de résister aux

déformations (**Figure 3**). Elle contient aussi des enzymes, les métalloprotéases, qui vont lyser les protéines de la MEC, participant ainsi à leur renouvellement.

La MEC joue un rôle principal de soutien dans l'architecture de la fibre musculaire. Elle assure également un rôle d'adhésion. En effet, les intégrines peuvent se lier à la fibronectine, au collagène qui possèdent un domaine RGD (arginine-glycine-aspartate) ou encore à des récepteurs présents sur les cellules comme VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) assurant ainsi la liaison entre les cellules et leur adhérence aux autres protéines de la matrice. Un changement de composition de la MEC entraîne des changements de ses propriétés mécaniques et modifie sa rigidité. Cela va entraîner une modification de la différenciation des cellules satellites et affecter leur migration ainsi que celle des cellules immunitaires (Wolf and Friedl, 2011).



**Figure 3 : Matrice extracellulaire musculaire**

Représentation de la matrice extracellulaire, ses différents composants et les liaisons qu'elle établit avec la lame basale et la fibre musculaire (d'après Mukund and Subramaniam, 2020).

La MEC joue aussi un rôle dans la signalisation cellulaire. En effet, les protéoglycanes notamment ont la capacité de se lier à différentes cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou le TGF- $\beta$  pouvant moduler leur

disponibilité aux autres cellules de l'environnement musculaire (Mundhenke et al., 2002; Muramatsu et al., 2006).

Les protéines de la MEC sont majoritairement produites par les fibroblastes (Kühl et al., 1984). En cas de dommages musculaires cependant, les cellules satellites peuvent produire des métalloprotéases pour faciliter leur migration sur le site endommagé. Certains composants de la MEC peuvent également être produits par les fibres musculaires et même par les macrophages (Guérin and Holland, 1995; Schnoor et al., 2008; Simões et al., 2020; Weitkamp et al., 1999).

## 2) Fonctions du muscle squelettique

La fonction motrice et la fonction sécrétrice du muscle sont celles qui vont être discutées dans cette thèse. En effet, la partie expérimentale des résultats est axée sur ces deux fonctions avec notamment l'étude d'une myokine sécrétée par le muscle, la myostatine, et l'étude de la contraction et des sarcomères dans les modèles de muscle 3D.

### *a- Contraction musculaire*

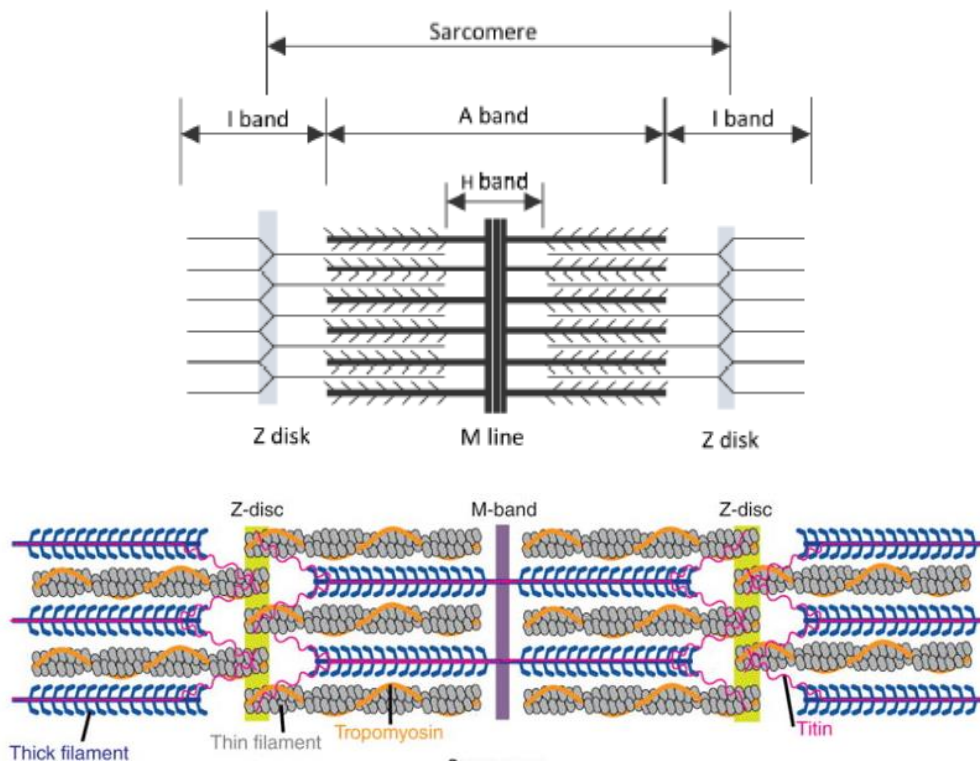
Une des principales fonctions du muscle squelettique est la fonction motrice.

Ce sont les myofibrilles organisées en unités répétées de sarcomères qui sont responsables de la contraction musculaire. Les sarcomères contiennent des filaments épais de myosine et fins d'actine (**Figure 4**). Les filaments épais sont constitués de 2 chaînes légères de myosine et une chaîne lourde qui viennent s'enrouler pour former une tête de myosine qui va interagir avec l'actine. Les filaments fins sont composés d'actine, de tropomyosine et de troponine. L'actine est polymérisée sous forme de deux chaînes qui s'enroulent et forment l'actine filamenteuse ou actine F. L'actine contient des zones de fixation à la myosine réparties le long de ses chaînes et masquées par la troponine lorsque le muscle est au repos (Squire, 2019).

Ces différents filaments créent une variété de zones visibles au microscope électronique. La bande A est localisée au milieu de chaque sarcomère et contient les filaments épais se chevauchant avec les



filaments fins, la zone H qui contient seulement la myosine et comprenant la ligne M au milieu de la zone, la bande I contenant les filaments fins et la ligne Z qui sépare chaque sarcomère (Henderson et al., 2017).



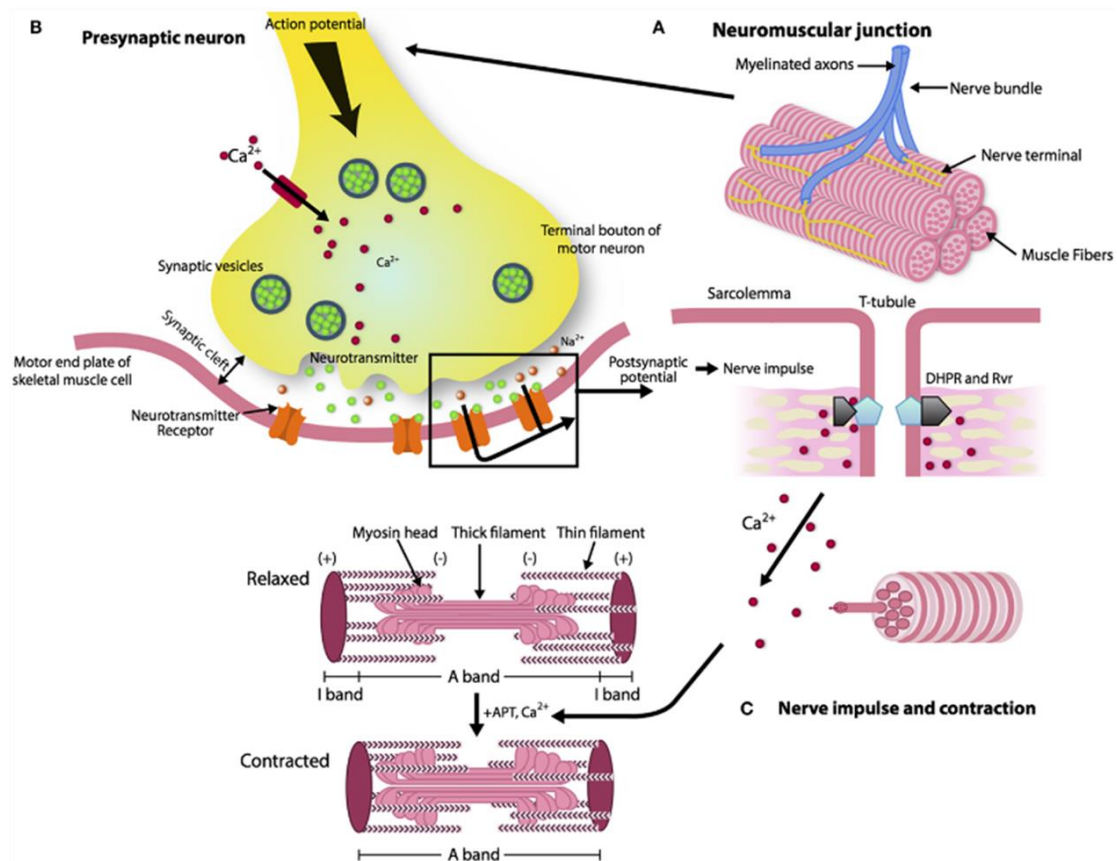
**Figure 4 : Organisation des sarcomères**

*Les sarcomères sont composés de filaments épais de myosine et fins d'actine. Ces protéines forment des structures visibles au microscope électronique : les bandes I contenant les filaments fins et traversées par le disque Z et les bandes A où se chevauchent les deux types de filaments comprenant en leur centre la bande H contenant seulement de la myosine traversée par la ligne M (d'après Mukund and Subramaniam, 2020).*

La transmission du signal nerveux initiant la contraction se fait au niveau de la jonction neuromusculaire qui est une synapse composée de la fibre musculaire et du motoneurone l'innervant (**Figure 5**). Un même motoneurone peut innervé une ou plusieurs fibres et forme plusieurs jonctions neuromusculaires sur une même fibre (Engel, 2008). La contraction commence par la propagation d'un potentiel d'action conduisant au relargage d'acétylcholine par le motoneurone et sa fixation sur son récepteur initiant le potentiel d'action musculaire (Pham and Puckett, 2022). Cela conduit à l'ouverture des récepteurs de la ryanodine et au relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Le calcium va se lier à la troponine C conduisant à son changement conformationnel et au déplacement de la tropomyosine

libérant ainsi les sites de liaison de la myosine sur l'actine F et le raccourcissement des sarcomères (Santulli et al., 2017).

La relaxation aura ensuite lieu quand le calcium sera à nouveau séquestré dans le réticulum sarcoplasmique grâce à l'action de la pompe calcique SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase).



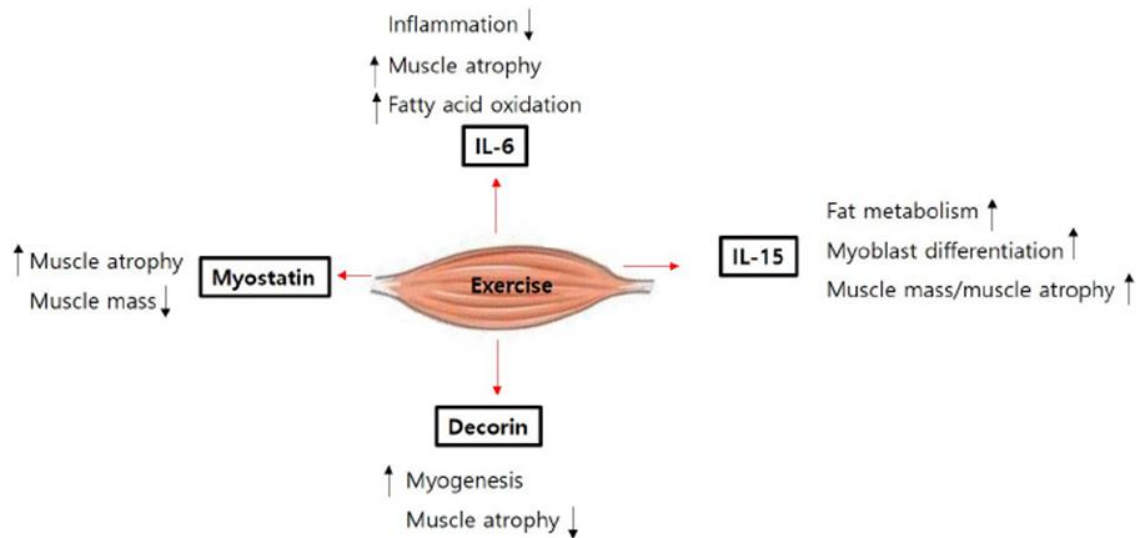
**Figure 5 : Jonction neuromusculaire**

La jonction musculaire fait intervenir deux acteurs : le motoneurone et la fibre musculaire (A). Au niveau de la synapse, quand le potentiel d'action atteint la zone terminale du motoneurone, les récepteurs calciques s'ouvrent et entrent dans le neurone permettant la libération de l'acétylcholine au niveau de l'espace synaptique (B). L'acétylcholine se fixe sur ses récepteurs et entraîne l'ouverture des récepteurs ryanodine permettant l'entrée du calcium au niveau de la fibre et sa fixation à la troponine C conduisant au raccourcissement des sarcomères et à la contraction (d'après Gonzalez-Freire et al., 2014).

#### *b- Fonction sécrétrice : les myokines*

Le muscle a également une fonction sécrétrice en produisant des cytokines et peptides capables d'agir de manière autocrine, endocrine et paracrine. Ces cytokines produites et sécrétées par le muscle sont

appelées des myokines (Pedersen et al., 2003). La première à avoir été décrite est la myostatine en 1997 (McPherron et al., 1997). Aujourd'hui, plus de 600 myokines existent mais leur rôle reste peu étudié. Dans cette partie nous allons nous concentrer sur les myokines les plus étudiées agissant sur le muscle, les cellules immunitaires, le tissu adipeux et les os (**Figure 6**). Cependant, les myokines peuvent aussi agir d'autres organes comme le cerveau, le foie, le pancréas, l'intestin, et les glandes surrénales (revu en détail dans Severinsen and Pedersen, 2020).



**Figure 6 : Myokines**

Représentation des différentes myokines et leurs actions sur le muscle (adapté de Lee and Jun, 2019).

L'interleukine 6 (IL-6) est la myokine la plus étudiée. L'IL-6 est augmentée lors d'un exercice ponctuel et est présente à un niveau basal chez les personnes entraînées (Keller et al., 2005). De manière paracrine, elle augmente également la lipolyse et induit la différenciation d'ostéoclastes réduisant ainsi la résorption osseuse (De Benedetti et al., 2006; Pedersen and Febbraio, 2008). L'IL-6 a également un rôle dans l'inflammation, notamment lors d'un exercice physique régulier. Elle régule aussi la production d'autres cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-10 produits par les lymphocytes ou les monocytes (Mizuhara et al., 1994; Steensberg et al., 2003).

La myostatine (ou *growth differentiation factor 8*) fait partie de la famille du TGF- $\beta$ . Elle est majoritairement produite par le muscle et plus faiblement par le cœur et le tissu adipeux (Deng et al., 2017). Elle inhibe le développement de la masse musculaire. En effet, des animaux ou des humains

possédant des mutations dans son gène développent une augmentation significative de la masse musculaire (Grobet et al., 1997; Mosher et al., 2007; Schuelke et al., 2004). Elle induit une atrophie du muscle en stimulant les gènes d'atrophie *TRIM63* (Murf1) et *FBXO32* (atrogin1) et une inhibition de la synthèse des protéines en inhibant la voie Akt-mTOR. La decorine est un antagoniste de la myostatine se liant directement à la protéine produite notamment pendant l'exercice et réduisant l'expression de *TRIM63* et *FBXO32* (El Shafey et al., 2016).

L'*insulin growth factor 1* (IGF-1) est une myokine régulant positivement la synthèse protéique dans le muscle par l'activation de la voie Akt-mTOR promouvant ainsi l'hypertrophie musculaire (Yoshida and Delafontaine, 2020). IGF-1 influence également positivement la formation des os (Yakar et al., 2002).

L'IL-15 promeut la différenciation des myoblastes et joue un rôle de régulateur positif de la masse musculaire (Quinn et al., 1995, 2002). Cependant, une diffusion continue d'IL-15 à des rats en bonne santé a au contraire un effet atrophique (Pistilli and Alway, 2008). Malgré tout, les animaux présentaient une meilleure endurance et une augmentation des lipides. L'IL-15 intervient également fortement dans la régulation de la réponse immunitaire (Steel et al., 2012). En effet, cette cytokine induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, B et des *natural killer* (NK).

## B. Maintien de l'homéostasie musculaire

Le muscle squelettique est un muscle fait pour la mobilité et doit s'adapter constamment aux changements mécaniques et physiologiques. Cependant, il peut être soumis à des dommages que ce soit quotidiennement lors des déplacements ou des dommages aigus lors de blessures. La régénération musculaire doit alors avoir lieu.

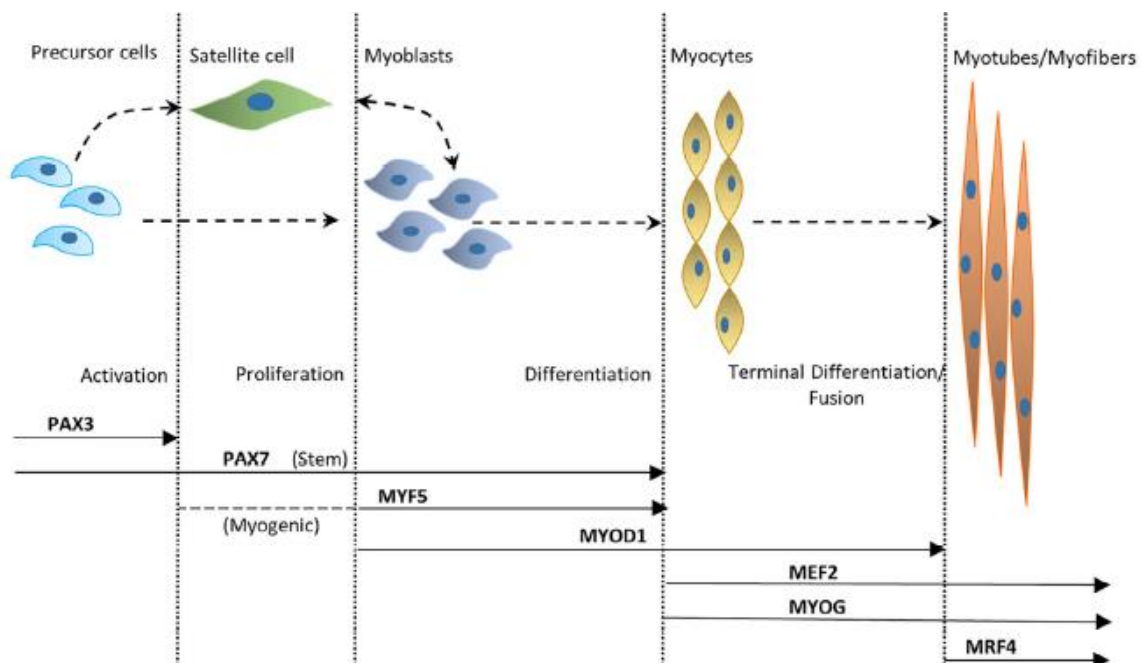
## 1) Mécanismes de régénération

### a- Rôle des cellules souches dans la régénération

Le muscle endommagé peut régénérer grâce à l'activation des cellules souches musculaires, les cellules satellites, qui vont venir remplacer les cellules musculaires lésées.

Lors d'un dommage, toutes les cellules satellites de la fibre musculaire abimée et même des fibres adjacentes vont être activées (Schultz et al., 1985).

Le processus de régénération se décompose en plusieurs phases : l'activation des cellules satellites, leur prolifération, leur différenciation, leur fusion et leur auto-renouvellement suivi par un retour à l'état de quiescence. Pour se faire, différents gènes sont exprimés par les cellules satellites au cours de ces différents stades. A l'état de quiescence, les cellules satellites expriment *PAX7*, *MYF5* et Notch. Leur activation va entraîner l'activation de *MYOD* puis de la myogénine lors de la différenciation avec l'absence d'expression de *PAX7* et *MYF5* (**Figure 7**). Les cellules satellites activées sont appelées myoblastes.



**Figure 7 : Différenciation des cellules satellites**

Les cellules satellites activées vont proliférer et expriment *MYF5*. Elles se différencient ensuite en myoblastes exprimant également *MYOD1*. Lors de la différenciation et de la fusion, elles perdent l'expression de *PAX7* et de *MYF5* et vont exprimer *MEF2* et *MYOG*. Enfin, lorsque les myotubes sont formés, elles perdent l'expression de *MYOD* et expriment *MRF4* (d'après Mukund and Subramaniam, 2020).

Plusieurs signaux peuvent activer la sortie de quiescence des cellules satellites. Ces signaux peuvent être physiques avec une perturbation de l'environnement des cellules satellites dans leur niche. Cela peut être par exemple une modification de l'interaction des cellules satellites à la fibre musculaire par les cadhérines (Goel et al., 2017), une modification de l'attachement à la MEC par les intégrines (Rozo et al., 2016) ou encore la présence de motoneurone en régénération à proximité des cellules satellites (Liu et al., 2015).

Les signaux peuvent également être biochimiques grâce à l'action de cytokines. Les cellules endothéliales régénérant après un dommage participent notamment à cette réponse en sécrétant des facteurs de croissance, du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de l'HGF (*hepatocyte growth factor*), ayant une action directe sur les cellules satellites (Christov et al., 2007). Les progéniteurs fibro-adipeux (FAPs) sont également activés et prolifèrent suite à un dommage et participent au remodelage de la MEC. Ces cellules activées produisent différents signaux comme l'IGF-1, l'IL-6 et différents Wnt connus pour augmenter la différenciation des cellules satellites (Bodine et al., 2001; Brack et al., 2007; Serrano et al., 2008).

Afin que les cellules satellites puissent migrer vers le site de la lésion, la MEC a besoin d'être remodelée grâce à l'action de protéases, les MMP (*matrix metallo proteinase*) qui vont dégrader la matrice et leurs inhibiteurs les TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*).

Une fois activés et différenciés, les myoblastes vont s'aligner puis fusionner ensemble et avec les myotubes naissants (Hindi et al., 2013).

Lors de la régénération, une partie des cellules satellites va donc se différencier afin de réparer les dommages mais une autre partie va s'auto-renouveler et retourner à un état de quiescence afin de garder un pool de cellules satellites disponibles (Dumont et al., 2015; Kuang et al., 2007). Les cellules satellites ont la capacité de se diviser de manière asymétrique pour générer ces deux types de cellules ou de manière symétrique pour générer deux nouvelles cellules souches. Les détails menant à cette décision ne sont pas encore totalement connus.

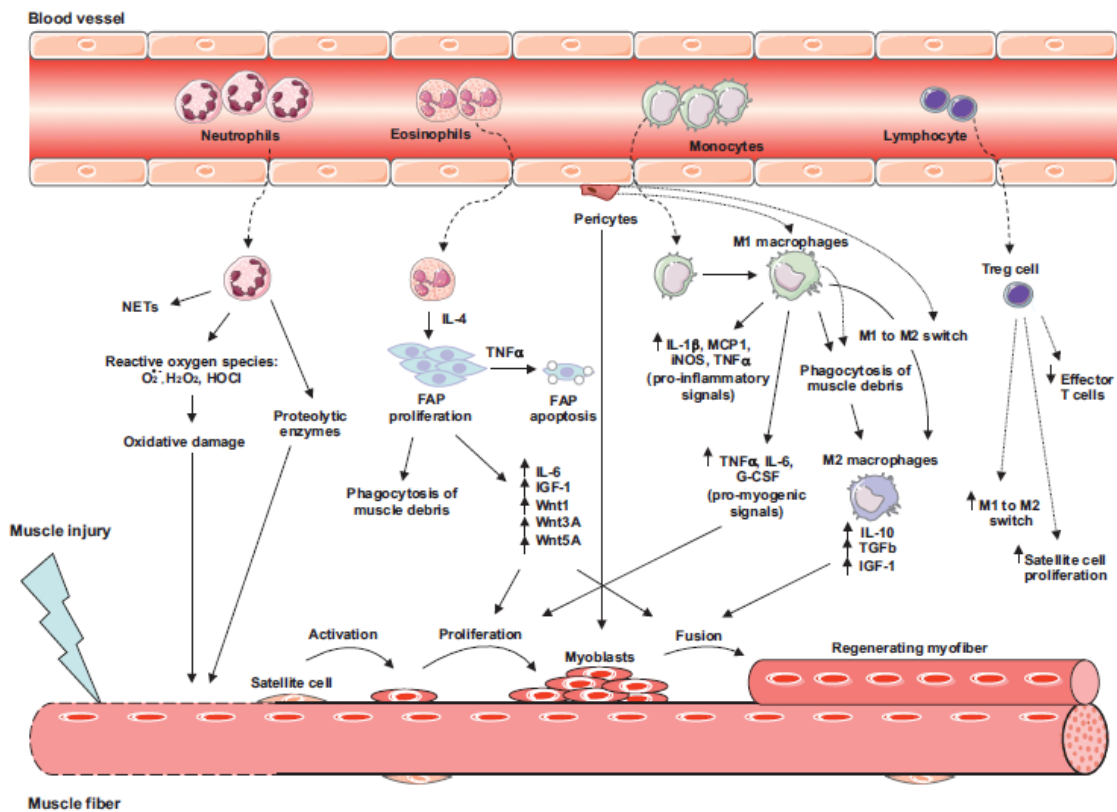
### *b- Implication de l'immunité et des cytokines*

Les cellules immunitaires font également partie de la niche et ont un rôle primordial dans le mécanisme de régénération. Le muscle étant un tissu vascularisé, lors d'un dommage, les cellules immunitaires vont arriver sur le site de la blessure, participer au nettoyage des débris et au mécanisme régénératif. Un dommage musculaire est considéré comme une inflammation stérile, sans implication de pathogène, les mécanismes immunitaires sont donc différents.

Lors d'un dommage, les cellules présentes sur le site du dommage peuvent également relarguer des chimiokines et cytokines comme CXCL1 et CXCL5 attirant ainsi des cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les monocytes (De Micheli et al., 2020a; Nedachi et al., 2009). Les macrophages résidents localisés dans l'épimysium ont également un emplacement privilégié leur permettant de répondre rapidement à un dommage musculaire en sécrétant eux aussi des chimiokines comme CCL2 (Brigitte et al., 2010a). Leur rôle reste cependant peu étudié jusqu'à présent. La protéine C3 de la voie du complément est également impliquée dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires sur le site du dommage (Zhang et al., 2017). Un dommage va également entraîner la libération de différentes molécules pouvant activer la voie du complément comme des protéines de la chromatine, de l'ATP ou des fragments de la MEC pouvant être reconnus comme signaux de danger et activer le complément (Bours et al., 2006; Scaffidi et al., 2002; Scheibner et al., 2006).

Les neutrophiles sont les premières cellules de la circulation à arriver sur le site du dommage suivis des monocytes (**Figure 8**). Les lymphocytes T sont également recrutés sur le site du dommage. Les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T-régulateurs participent à la régénération en sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , de l'amphireguline et MCP-1 (Burzyn et al., 2013; Castiglioni et al., 2015; Zhang et al., 2014). Sur le site du dommage, l'environnement riche en TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  pouvant être produits par les fibres ou les cellules immunitaires convertit les monocytes en macrophages pro-inflammatoires produisant de l'oxyde nitrique participant également au dommage musculaire (Cheng et al., 2008; Nguyen and Tidball, 2003). Ces macrophages pro-inflammatoires vont stimuler la prolifération des cellules satellites mais

inhiber leur fusion (Saclier et al., 2013). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  va avoir un effet sur les cellules environnantes comme les FAPs, les activant et permettant ainsi la sécrétion de protéines de la MEC pour contribuer à son remodelage (les rôles des FAPs et des macrophages sera vu plus en détails dans la partie III). Les macrophages pro-inflammatoires vont également phagocyter les débris cellulaires lors du mécanisme d'efférocytose (Watanabe et al., 2019). Ce phénomène va entraîner la conversion des macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires (Arnold et al., 2007). Ces macrophages vont exprimer différentes cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- $\beta$  pour participer à la résolution de l'inflammation. Ils stimulent la différenciation et la fusion des cellules satellites activées (Arnold et al., 2007; Saclier et al., 2013). Ce changement phénotypique et la résolution de l'inflammation sont importants pour permettre au muscle de revenir dans un état homéostatique.



**Figure 8 : Régénération musculaire**

Lors d'un dommage musculaire les cellules immunitaires vont être recrutées sur le site lésé et participer à la régénération en sécrétant des cytokines. La première partie de la régénération est pro-inflammatoire avec la présence de macrophages M1 afin d'activer les cellules satellites et phagocyter les débris alors que la deuxième phase est anti-inflammatoire pour permettre de résoudre l'inflammation et aider la réparation et la fusion des myotubes (d'après Sciorati et al., 2016).



## 2) Régulation de la masse musculaire

### a- Maintien de la balance protéique

Les fibres musculaires étant post-mitotiques, elles ne se divisent pas mais peuvent subir des changements de taille importants. Un équilibre doit se faire entre la synthèse de nouvelles protéines, l'anabolisme, et la dégradation des anciennes, le catabolisme. Lorsque cette balance est déséquilibrée et que le taux de protéines produites dépasse celui des protéines dégradées, on parle d'hypertrophie et d'atrophie quand le phénomène est inversé.

- *Voies promouvant la croissance musculaire*

L'hypertrophie est caractérisée par une augmentation du volume des cellules musculaires. IGF-1 est un des facteurs principaux impliqué dans la croissance musculaire (Schiaffino and Mammucari, 2011). Il est synthétisé majoritairement par le foie et agit comme un facteur de croissance systémique.

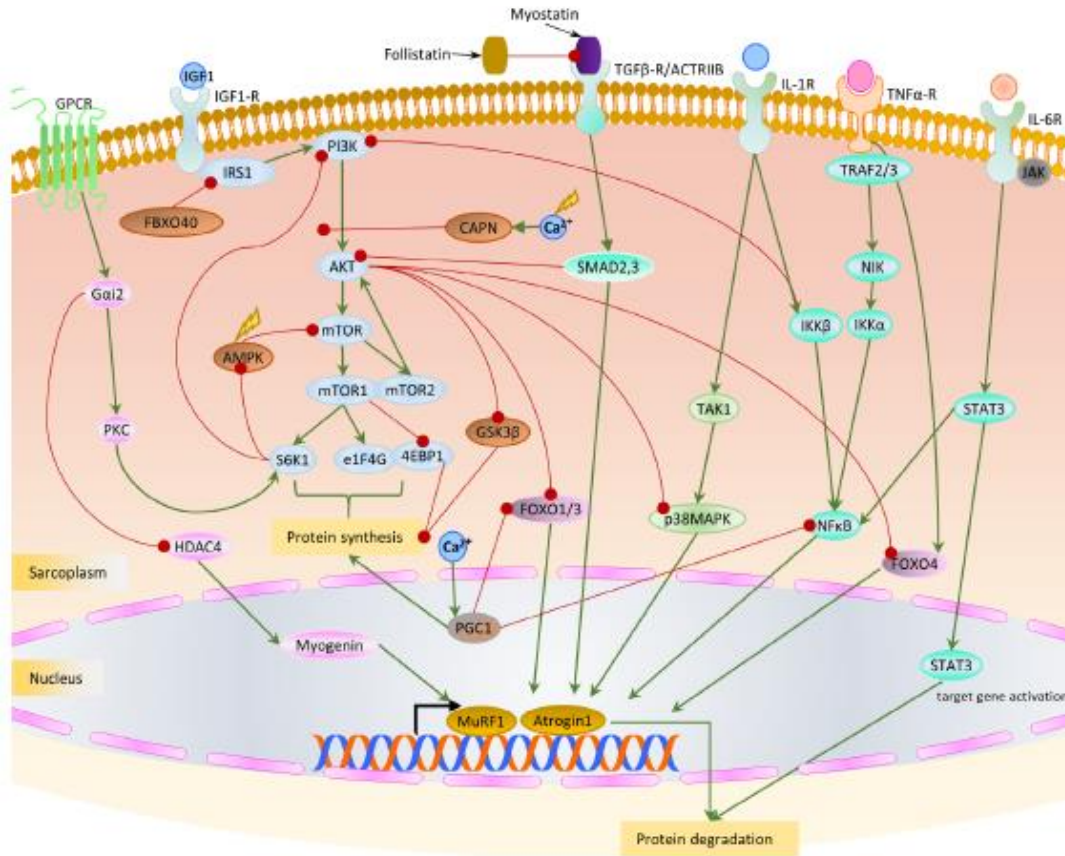
IGF-1 se fixe sur son récepteur IGF1R et va activer Akt conduisant par la suite à l'activation de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) augmentant ainsi la synthèse protéique (**Figure 9**).

- *Voies impliquées dans l'atrophie musculaire*

L'atrophie musculaire se caractérise par une perte de masse musculaire accompagnée par une diminution du volume du muscle et de la quantité de protéines (Jackman and Kandarian, 2004). Elle peut survenir suite à une longue période d'immobilisation, une maladie, un traitement ou encore un dommage musculaire.

Différentes cytokines et voies de signalisation interviennent dans l'atrophie. On retrouve tout d'abord la myostatine, un inhibiteur de la masse musculaire. La myostatine, une protéine de la famille du TGF- $\beta$ , va se fixer sur son récepteur, ActRIIB et activer la voie de signalisation SMAD2/3 conduisant à l'expression de TRIM63 et FBXO32 (Sartori et al., 2009). Ce sont deux ubiquitines ligases qui vont participer à l'ubiquitination des protéines permettant ainsi leur dégradation par le protéasome. La myostatine bloque également la voie Akt induisant une diminution de la synthèse protéique (Trendelenburg et al., 2009).

L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent aussi l'expression de TRIM63 et FBXO32 par l'activation de p38MAPK et NF $\kappa$ B ou FoxO4. La présence de l'IL-6 à faible dose et de manière continue active STAT3 activant ainsi la voie JAK/STAT jouant sur la dégradation des protéines et NF $\kappa$ B (Ma et al., 2017).



**Figure 9 : Voies participant à l'atrophie ou à l'hypertrophie musculaire**

Les voies de la myostatine, de la follistatine, de l'IL-1, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 participent à l'atrophie musculaire en activant les voies de signalisation médiées par FoxO et NF $\kappa$ B. Les signaux médiés par l'IGF-1 au contraire vont venir inhiber ces signaux et participent à l'hypertrophie (d'après Mukund and Subramaniam, 2020).

### *b- Vieillesse musculaire et sarcopénie*

Le muscle est un organe très plastique et peut se régénérer lors de dommages mais cette capacité est impactée lors du vieillissement. La masse musculaire diminue avec l'âge et est associée à une perte de fonction. Ce syndrome est appelé sarcopénie (Cruz-Jentoft et al., 2019). On estime qu'environ 10% de la population est atteinte de sarcopénie et que cette proportion va augmenter.

Plusieurs changements métaboliques interviennent lors du vieillissement et sont associés à la sarcopénie.

Ces changements affectent la fibre musculaire mais aussi son environnement.

Le vieillissement musculaire entraîne tout d'abord une diminution du potentiel régénératif des cellules satellites. Cela peut être dû à la production augmentée de FGF2 par les fibres musculaires âgées et à une activation chronique de la voie mTORC1 entraînant ainsi une sortie de quiescence et un épuisement des cellules satellites (Chakkalakal et al., 2012; Haller et al., 2017). Les cellules satellites peuvent également se retrouver déplétées suite à l'activation de la voie JAK/STAT dans les cellules satellites âgées empêchant les divisions symétriques ou au dysfonctionnement mitochondrial avec une augmentation des réactifs dérivés de l'oxygène (Chabi et al., 2008; Price et al., 2014). La jonction neuro-musculaire dégénère également avec l'âge et affecte les capacités régénératrices du muscle (Deschenes et al., 2010). Une résistance aux stimulateurs anaboliques de croissance musculaire comme l'IGF-1 est également retrouvée empêchant la croissance musculaire (Cuthbertson et al., 2005). La proportion de type de fibres change également avec l'âge avec une diminution des fibres rapides de type II et change donc le métabolisme musculaire vers un mécanisme glycolytique pouvant entraîner une diminution de la capacité à produire des mouvements puissants (Brunner et al., 2007; Nilwik et al., 2013; Wang and Pessin, 2013).

Le vieillissement des autres cellules dans l'environnement musculaire contribue aussi au développement de la sarcopénie (Nelke et al., 2019). L'environnement cytokinique est modifié avec l'âge et induit un environnement pro-inflammatoire. Les cellules endothéliales et épithéliales sénescents s'accumulent avec l'âge et vont exprimer des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (Watanabe et al., 2017). Les FAPs sont également moins nombreux et sécrètent moins d'IL-33 diminuant la prolifération des lymphocytes T régulateurs qui régulent l'inflammation lors de la régénération. L'inflammation va alors être moins contrôlée, promouvant son effet catabolique sur le muscle. Les macrophages quant à eux lors de la régénération dans un muscle âgé vont avoir majoritairement un profil anti-inflammatoire participant à l'établissement d'une fibrose musculaire (Tidball et al., 2021). Ce processus sera détaillé en partie III.

## II. Muscle et auto-immunité

L'homéostasie musculaire est un état d'équilibre entre les différentes cellules et molécules présentes dans le muscle (cellules musculaires, cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes, cytokines etc). Cet équilibre peut être rompu à l'occasion d'un dommage musculaire.

C'est le cas au cours des myopathies inflammatoires idiopathiques (MII) (ou myosites). Ces maladies acquises auto-immunes rares sont responsables de lésions musculaires.

### A. Myopathies inflammatoires idiopathiques

#### 1) Généralités

##### *a- Définition*

Les MII sont des maladies auto-immunes affectant le muscle dont la cause n'est pas connue.

Les MII sont rares avec une prévalence moyenne de 14/100 000 pouvant aller de 2,4 à 33,8 (Meyer et al., 2015). Quatre groupes homogènes principaux sont identifiés à l'heure actuelle : les dermatomyosites (DM), le syndrome des anti-synthétases (SAS), les myosites à inclusion (IBM) et les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) (Mariampillai et al., 2018; Pinal-Fernandez et al., 2020).

Elles peuvent affecter tous les groupes d'âge et touchent plus souvent les femmes que les hommes (ratio de 2 :1) (Bernatsky et al., 2009; Dobloug et al., 2015a; Svensson et al., 2017) à l'exception des IBM où les hommes sont plus touchés que les femmes et les patients plus âgés (Badrising et al., 2000; Dobloug et al., 2015b; Molberg and Dobloug, 2016).

Si la cause des MII n'est pas connue, plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sont associés à leur apparition. On retrouve notamment l'exposition aux UV avec la production de dérivés réactifs de l'oxygène chez les DM (Love et al., 2009; Thompson et al., 2018), le tabagisme chez les SAS (Chinoy et al., 2012), l'exposition aux statines chez les patients MNAI ainsi qu'une faible association avec les infections virales comme l'exposition à l'Epstein Barr virus, le VIH, l'influenza responsable de la grippe ou les enterovirus (Dalakas et al., 2007; Johnson et al., 2003). La saisonnalité de la survenue de la

maladie chez certains sous-groupes appuie également ce lien environnemental avec les infections (Szabó et al., 2018; Toquet et al., 2021). Les facteurs génétiques associés sont la présence de certains haplotypes HLA (*human leucocyte antigene*) (Chinoy et al., 2009; O’Hanlon et al., 2006; Rojana-Udomsart et al., 2012; Rothwell et al., 2016).

Le dénominateur commun des MII est la faiblesse musculaire. L’atteinte musculaire est symétrique et généralement proximale chez les MNAI, les DM et les SAS avec une atteinte des deltoïdes, des triceps, des biceps et quadriceps. Chez les IBM en revanche l’atteinte est asymétrique et distale avec une atteinte des quadriceps et des muscles fléchisseurs des doigts (Lundberg et al., 2021).

Les patients atteints de MII peuvent également avoir des atteintes extra-musculaires. Les patients DM peuvent avoir une atteinte cutanée avec l’apparition de rash sur les paupières, de papules de Gottron sur les mains, du signe en V sur la partie supérieure de la poitrine, du signe du châle sur le haut du dos, les épaules et le cou ainsi que des mains de mécaniciens (Mammen et al., 2020). Les manifestations peuvent également être cardiaques, avec des arythmies ou des insuffisances cardiaques (Gupta et al., 2011). Les atteintes pulmonaires avec des pneumopathies interstitielles sont également courantes, notamment chez les SAS ou certaines DM (Long and Danoff, 2019; Shappley et al., 2019). Les patients MII peuvent aussi avoir un risque plus élevé de cancer, c’est particulièrement le cas pour les DM (Tiniakou and Mammen, 2017). Les articulations peuvent aussi être touchées, cela est particulièrement le cas chez les SAS (Klein et al., 2014).

La mortalité est plus élevée chez les patients MII que dans la population générale avec un taux de mortalité de 10% un an après le diagnostic (Dobloug et al., 2018). Les causes de mortalité sont principalement dues aux atteintes périphériques cardiaques, pulmonaires et aux cancers.

#### *b- Classification*

Les myosites ont été décrites pour la première fois en en Allemagne en 1863 par Wagner comme une entité ressemblant aujourd’hui aux polymyosites (PM). Vient ensuite une première séparation entre DM et PM mais sans prendre en compte l’atteinte dermatologique des DM. La première classification la plus

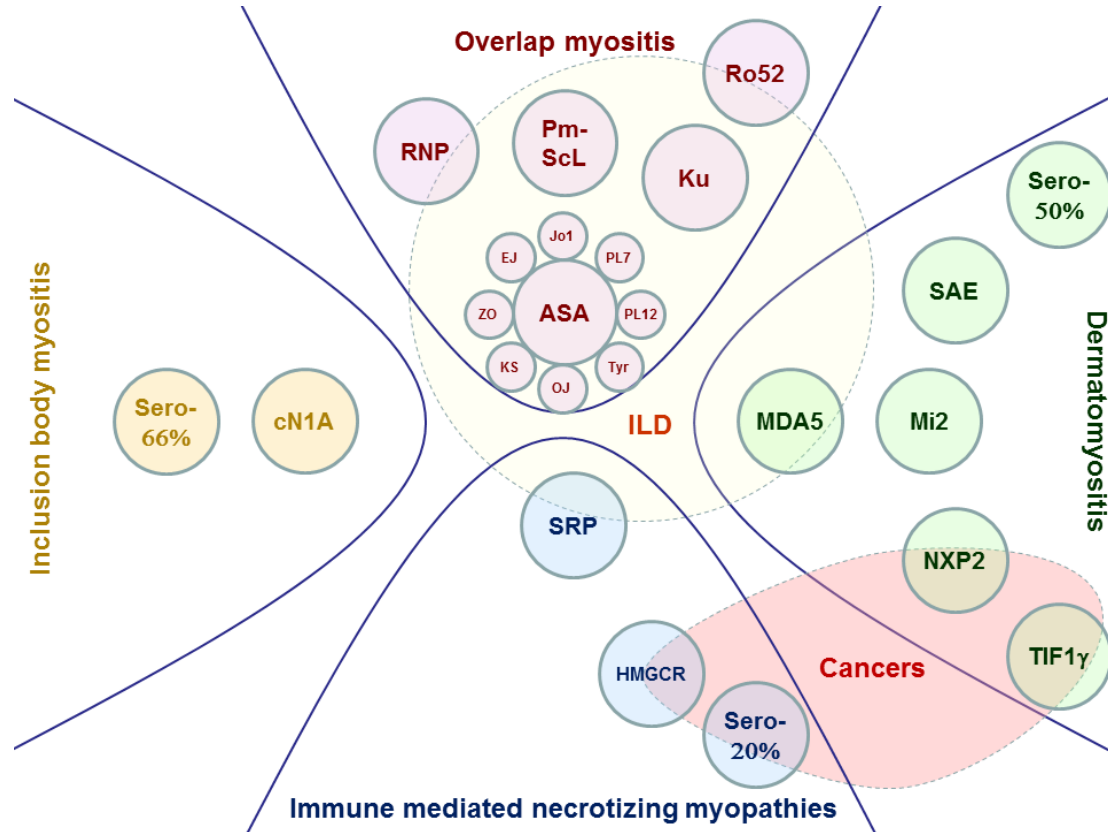
utilisée et partagée dans le monde est celle de Bohan et Peter en 1975 (Bohan and Peter, 1975). Les myosites sont définies par une inflammation venant seulement du muscle, une faiblesse musculaire proximale et symétrique, une élévation des enzymes musculaires et un électromyogramme classique. Les patients doivent présenter 4 de ces critères pour être considéré certainement avec une myosite. S'ils présentent une atteinte cutanée ils sont diagnostiqués comme ayant une DM ou une PM si ce n'est pas le cas.

Les IBM sont le groupe suivant à avoir été défini par les critères de Griggs en 1995 (Griggs et al., 1995). Les IBM sont définies par une durée de la maladie supérieure à 6 mois, un début de la maladie chez des patients de plus de 30 ans, une atteinte musculaire proximale et distale avec notamment l'atteinte des fléchisseurs des doigts et du poignet, des CK élevés et un EMG typique avec un syndrome myogène. Les IBM sont plus tard redéfinies par les critères de Lloyd reprenant les différentes classifications des IBM de 5 études (Benveniste and Hilton-Jones, 2010; Griggs et al., 1995; Hilton-Jones et al., 2010; Lloyd et al., 2014; Rose and ENMC IBM Working Group, 2013; Verschuuren et al., 1997). Les IBM peuvent alors être définies comme telles si les patients présentent: une faiblesse des muscles fléchisseurs des doigts ou des quadriceps, une inflammation endomysiale et une invasion par les cellules immunitaires de fibres non nécrotiques ou des vacuoles bordées (Lloyd et al., 2014).

Vient ensuite la séparation des MNAI, premièrement évoquées lors du congrès ENMC (*European neuromuscular centre*) de 2003 (Hoogendijk et al., 2004). Cette proposition d'un nouveau sous-groupe se fonde sur plusieurs études montrant la présence caractéristique de fibres nécrotiques et peu d'inflammation chez certains patients ainsi que la présence d'auto-anticorps anti-SRP (*signal recognition particle*). La reclassification et la révision des critères de Bohan et Peter par l'ACR/EULAR en 2017 donne les critères diagnostiques pour les PM (incluant les MNAI et les SAS), les IBM et les DM (Lundberg et al., 2017).

Les DM sont également redéfinies lors du congrès ENMC de 2018 (Mammen et al., 2020).

Par la suite, des études de RNA-seq ou bio-informatiques séparent 4 groupes qui sont les sous-groupes les plus utilisés actuellement même si le terme PM continue d'être utilisé et regroupe les SAS et les MNAI (Mariampillai et al., 2018; Pinal-Fernandez et al., 2020)(**Figure 10**).



**Figure 10 : Classification des principaux groupes de MII en fonction de leurs auto-anticorps et de leurs caractéristiques cliniques**  
*D'après Benveniste et al., 2016*

### *c- Auto-anticorps*

Les myosites étant auto-immunes, la présence d'auto-anticorps spécifiques ou associés aux myosites est devenue un outil de diagnostic et de classification.

Ils peuvent être spécifiques des myosites (**Tableau 1**) et ne sont alors pas présents dans d'autres pathologies, ou associés aux myosites (anti-RNP, anti-Pm-ScL, anti-Ku, anti-Ros52, anti-cN1A), c'est-à-dire présents au cours d'autres connectivites. 80% des patients possèdent des auto-anticorps (Betteridge et al., 2019). Ces auto-anticorps sont le plus souvent dirigés contre des protéines ubiquitaires.

**Tableau 1 : Liste des auto-anticorps spécifiques des sous-groupes de MII (d'après Benveniste et al., 2016)**

<b>Sous-groupe</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Cible</b>
<b>IMNM</b>	Anti-HMGCR	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl CoenzymeA reductase</i>
	Anti-SRP	<i>Signal recognition particle</i>
<b>DM</b>	Anti-Mi2	<i>Nucleosome remodeling deacetylase complex</i>
	Anti-TIF1 $\gamma$	<i>Transcriptional intermediary factor 1 gamma</i>
	Anti-NXP2	<i>Nuclear matrix protein 2</i>
	Anti-SAE	<i>Small ubiquitin-like modifier activating enzyme A and B subunits</i>
	Anti MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
<b>SAS</b>	Anti-Jo1	<i>Histidyl-tRNA synthetase</i>
	Anti-PL7	<i>Threonyl- tRNA synthetase</i>
	Anti-PL12	<i>2 Alanyl- tRNA synthetase</i>
	Anti-EJ	<i>Glycyl- tRNA synthetase</i>
	Anti-OJ	<i>Isoleucyl- tRNA synthetase</i>
	Anti-KS	<i>Asparginyl- tRNA synthetase</i>
	Anti-ZO	<i>Phenylalanyl-tRNA synthetase</i>
	Anti-YRS	<i>Tyrosyl- tRNA synthetase</i>

La biopsie musculaire est le meilleur outil pour poser le diagnostic des myosites mais elle est invasive et nécessite une expertise. Dans certains cas, quand les patients présentent un tableau clinique typique, la présence supplémentaire d'un type d'auto-anticorps spécifique suffit à poser le diagnostic de la maladie et la biopsie n'est plus nécessaire. C'est le cas pour la MNAI avec les anti-SRP et anti-HMGCR (Allenbach et al., 2018a), pour les DM avec les anti-TIF1 $\gamma$ , anti-NXP2, anti-Mi2, anti-MDA5 ou anti-SAE (Mammen et al., 2020) et pour les SAS avec les anti-Jo1 (Cavagna et al., 2019).

Certains phénotypes cliniques sont également associés à certains auto-anticorps spécifiques. C'est le cas des cancers chez les DM associés aux anti-TIF1 $\gamma$  et NXP2 (Chinoy et al., 2007). Les patients DM ayant des anticorps anti-MDA5 sont quant à eux associés à un risque élevé de développer une pneumopathie interstitielle (Wu et al., 2021). La connaissance des auto-anticorps des patients permet alors dans ce cas de proposer une meilleure prise en charge thérapeutique.

Un rôle pathogène de ces anticorps est également envisagé dans certains sous-groupes de MII, notamment chez les patients MNAI.



Le diagnostic des patients repose sur la présence de signes cliniques typiques renforcés par des dosages biochimiques d'enzymes et d'auto-anticorps ainsi que de signes histopathologiques caractéristiques si une biopsie doit être réalisée.

#### *d- Traitement*

La quantité et la qualité des essais randomisés contrôlés dévolus aux myosites sont faibles<sup>1</sup>. Il n'y a donc pas à ce jour de recommandations claires pour le traitement des myosites. Le nombre de patients étant faible dû à la rareté de ces maladies et les sous-groupes répondant de manière différente aux traitements, peu d'essais cliniques ont été jusqu'ici mis en place et la plupart des données validant les traitements sont obtenues grâce à des études rétrospectives et l'avis des experts.

La première ligne de traitement proposée aux patients est un traitement par glucocorticoïdes excepté chez les IBM, ce traitement aggravant les patients (Benveniste et al., 2011a). Ils permettent de contrôler l'activité de la maladie en réduisant l'inflammation. Les enzymes musculaires se normalisent et la force s'améliore (Joffe et al., 1993). Les patients répondent généralement assez bien au traitement mais l'effet est dose-dépendant, l'arrêt du traitement ou la diminution de la dose s'accompagnent fréquemment de rechutes et les effets secondaires sont nombreux. Ainsi il est nécessaire d'associer les glucocorticoïdes à un autre traitement pour permettre la rémission prolongée et limiter les effets indésirables.

Le deuxième traitement proposé en association aux glucocorticoïdes est un traitement immunosuppresseur (Gordon et al., 2012).

Des cures d'immunoglobulines intra-veineuses sont également proposées pour les patients les plus sévères (Aggarwal et al., 2021; Dalakas et al., 1993).

Enfin d'autres biothérapies comme le Rituximab, permettant de dépléter les lymphocytes B sont parfois utilisées chez les patients réfractaires aux immunosuppresseurs conventionnels (Oddis et al., 2013).

---

<sup>1</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=e&type=Intr&cond=Idiopathic+Inflammatory+Myopathies>

## 2) Evaluation de l'activité et des dommages

La faiblesse musculaire observée chez les patients peut être due à l'activité de la maladie mais également à une perte de masse musculaire (atrophie) ou un remplacement fibro-adipeux causés par les dommages musculaires (séquelles). La différence entre les deux est cependant difficile à distinguer.

### *a- Examens cliniques*

Les examens cliniques permettent de mesurer un déficit de force mais leur capacité à discriminer l'activité de la maladie et les dommages musculaires reste limitée.

Le MMT8 ou *manual muscle testing of 8 muscles* est utilisé afin d'évaluer l'atteinte et la faiblesse musculaire des patients (Rider et al., 2011). Huit muscles sont testés par le médecin et un score est établi. Ce test est cependant opérateur-dépendant. Un score évoluant favorablement ou défavorablement rapidement est un signe d'efficacité thérapeutique ou de maladie active. Au contraire, un score restant bas ou diminuant progressivement est un signe évocateur de dommage musculaire.

Le PGA ou *physician global assessment* permet également d'évaluer l'activité de la maladie. Il se base sur un score donné par le médecin sur une échelle de 0 à 10, 0 correspondant à une maladie inactive. C'est un score global intégratif dont les critères pris en compte sont notamment les résultats de l'examen physique du patient, les résultats des dosages biochimiques et le traitement de sortie.

L'IRM musculaire reste le meilleur examen objectif pour différencier l'activité des séquelles. Il permet de caractériser l'aspect des tissus sans avoir recours à une biopsie musculaire. Un œdème (visualisable en séquence T2) est un signe d'inflammation et de maladie active alors que l'atrophie, la fibrose et le remplacement adipeux (visualisables en séquence T1) sont des signes de dommages musculaires (Rider and Miller, 2011).

D'une manière générale, il est important de bien définir l'activité et de diagnostiquer tôt la maladie pour éviter les séquelles.

### *b- Dosages biochimiques et biomarqueurs d'activité*

L'activité de la maladie peut être évaluée à l'aide de marqueurs protéiques dosables dans le sang.

Lors d'un dommage musculaire, différentes protéines sont relarguées dans la circulation. C'est notamment le cas de la créatine kinase (CK), de l'aspartate aminotransférase, de l'alanine aminotransférase, de la lactate deshydrogénase et de l'aldolase. Ces enzymes sont toutes dosées au début de la maladie et leur évolution est surveillée. Les CK sont le marqueur le plus utilisé. Le niveau de CK ne corrèle pas très bien avec l'activité de la maladie chez les DM et les IBM car il peut être à un niveau quasi normal même si la maladie est active (Allenbach et al., 2016a; Benveniste et al., 2011a; Hoshino et al., 2010). En revanche, la corrélation est bonne pour les patients SAS et les MNAI (Allenbach et al., 2014; Benveniste et al., 2011b; Stone et al., 2007).

Le niveau de protéine c-réactive et de ferritine est rarement augmenté, l'inflammation dans les MII n'étant pas systémique, à l'exception des SAS et des DM à anti-MDA5.

L'activité de la maladie étant difficile à évaluer, la recherche de biomarqueurs simples fonctionnant pour tous les sous-groupes est d'un grand intérêt pour le suivi et la prise en charge thérapeutique des patients.

## **B. Myopathies nécrosantes auto-immunes**

Dans cette thèse, je vais surtout m'intéresser au sous-groupe des MNAI. Les myopathies nécrosantes auto-immunes sont un des derniers sous-groupes de MII à avoir été séparé suite à la présence de deux anticorps spécifiques, les anti-SRP et les anti-HMGCR et des caractéristiques cliniques propres.

### **1) Aspect clinique**

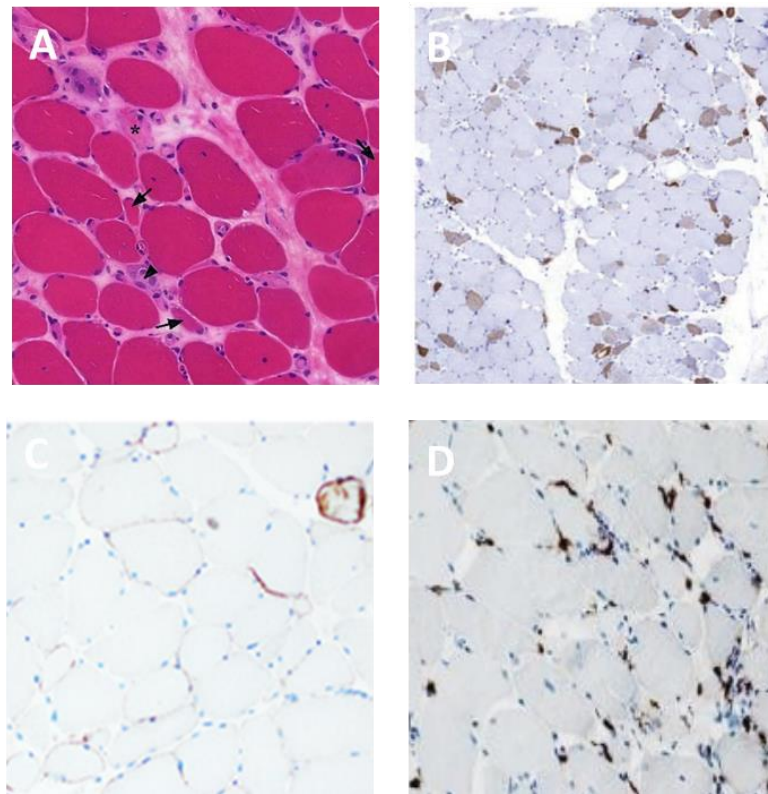
#### *a- Examen clinique et histologique*

Les patients atteints de myopathie nécrosante auto-immune présentent une atteinte musculaire proximale symétrique avec une atteinte principale des membres inférieurs (Allenbach et al., 2014; Pinal-Fernandez et al., 2017a; Suzuki et al., 2015). Les patients ne présentent pour la plupart pas d'atteintes extra-

musculaires, excepté chez les patients anti-SRP qui peuvent présenter régulièrement des pneumopathies interstitielles, le plus souvent asymptomatiques (Suzuki et al., 2015). Les patients présentent une faiblesse musculaire souvent sévère accompagnée de myalgies (Allenbach et al., 2014; Mariampillai et al., 2018; Pinal-Fernandez et al., 2017a; Tiniakou et al., 2017). L'apparition des symptômes est souvent sub-aiguë, allant de quelques semaines à quelques mois (Allenbach et al., 2016b). Les patients ont un niveau élevé de CK (en moyenne 5000 UI/L) dû à la nécrose et à la rupture des fibres qui corrèle avec l'activité de la maladie.

Les patients avec des anticorps anti-SRP ont souvent une forme plus sévère de la maladie avec une faiblesse musculaire et une atrophie plus importantes (Watanabe et al., 2016). Ces patients récupèrent également moins bien, seulement la moitié d'entre eux récupérant une force musculaire proche de la normale après traitement (Pinal-Fernandez et al., 2017a).

Au niveau histologique, les biopsies des muscles de patients présentent des fibres nécrotiques et d'autres en régénération représentant entre 1 et 20% des fibres (Allenbach et al., 2018b)(**Figure 11**). Un infiltrat inflammatoire discret principalement composé de macrophages est présent entre les fibres et au niveau de la myophagocytose. Quelques lymphocytes T, B et plasmocytes peuvent également être présents ponctuellement. Les fibres non nécrotiques peuvent être entourées de dépôts de protéines du complément C5b-9. Ces critères histologiques ne permettent cependant pas de distinguer les anti-SRP des anti-HMGCR.



**Figure 11 : Signes histologiques musculaires chez les patients MNAI**

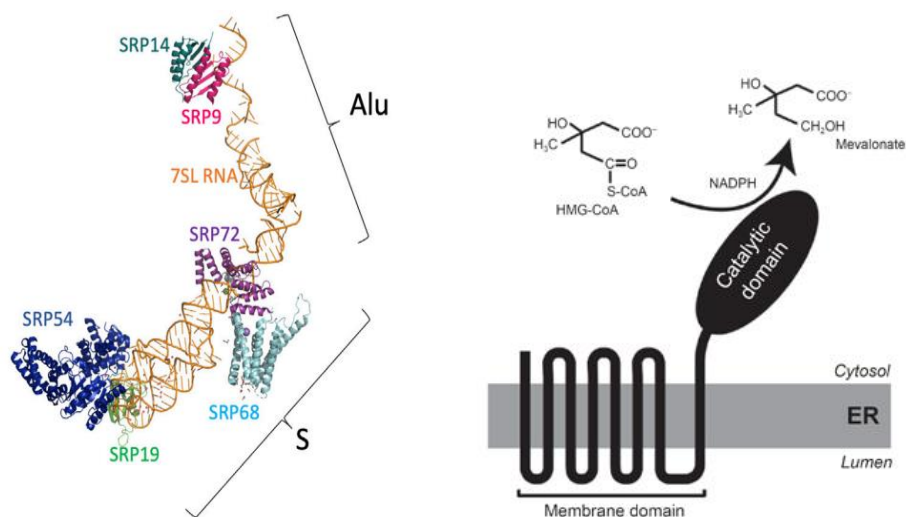
*Marquage hématoxyline et éosine montrant des fibres en nécrose \*, des fibres en régénération ▶ et des fibres atrophiées ∇ (A), marquage CD56 montrant les fibres en régénération (B), marquage C5b-9 autour de fibres non-nécrotiques (C), marquage CD68 de macrophages (D) (d'après Allenbach et al., 2018 et Ladislau et al., 2018).*

#### *b- Auto-anticorps*

Comme vu précédemment, les patients MNAI peuvent être séronégatifs, ou séropositifs (65% à 72% des patients) avec la présence d'auto-anticorps anti-HMGCR ou anti-SRP (Pinal-Fernandez and Mammen, 2016; Watanabe et al., 2016).

L'anti-SRP est le premier des deux anticorps à avoir été découvert chez un patient atteint de PM (Reeves et al., 1986) et s'en est suivie la description d'une série de 13 patients en 1990 (Targoff et al., 1990). La protéine SRP est un complexe ubiquitaire formé d'une chaîne d'ARN 7SL et de 6 protéines : SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 et SRP72 (**Figure 12**). Le nombre accolé à ces sous-unités correspond à leur poids en kilodaltons. Lors de la traduction certaines protéines notamment membranaires et sécrétées possèdent une séquence signal qui va être reconnue par la SRP54 qui va permettre la translocation du polypeptide nouvellement synthétisé vers le réticulum endoplasmique. Les anticorps

anti-SRP vont reconnaître principalement la SRP54 mais peuvent avoir d'autres cibles (Suzuki et al., 2015; Valiyil et al., 2010). Ces anticorps sont principalement des IgG1, présents dans 71% des sérums ou des IgG4 présents dans 29% des sérums (Benveniste et al., 2011b). *In vitro*, les auto-anticorps altèrent l'adressage des protéines au réticulum endoplasmique (Römisch et al., 2006). Une perte de fonction associée à une mutation dans le gène de la SRP54 entraîne une neutropénie congénitale chez l'homme et un défaut de migration et de chimiotactisme des neutrophiles chez le poisson-zèbre (Bellanné-Chantelot et al., 2018; Carapito et al., 2017). Dans des lignées cellulaires de neutrophiles, l'absence de SRP54 induit une augmentation du stress du réticulum et une augmentation de l'apoptose (Bellanné-Chantelot et al., 2018).



**Figure 12 : Représentation de la protéine SRP et de la protéine HMGCR**  
D'après Kellogg et al., 2022 et DeBose-Boyd, 2008

Les anticorps anti-HMGCR ont été décrits pour la première fois en 2010. Des immunoprécipitations de sérums de patients MNAI avec nécrose musculaire ont montré la reconnaissance de protéines à 100 et 200 kDa (Christopher-Stine et al., 2010). Chez ces patients, 63% avaient reçu un traitement par statines. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que l'apparition de ces auto-anticorps était liée au traitement. Les statines inhibent l'enzyme HMGCR qui intervient dans la biosynthèse du cholestérol en réduisant l'HMG-CoA en mévalonate (**Figure 12**). Après traitement, les cellules vont surexprimer cette protéine induisant possiblement une réponse immunitaire contre celle-ci. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que les anti-HMGCR reconnaissent la partie C-terminale de

l'enzyme. La reconnaissance de l'HMGCR pesant 97kDa explique la présence de la bande de 100kDa et celle de 200kDa a été proposée comme un dimère (Mammen et al., 2011). Les anti-HMGCR sont des IgG1 (Drouot et al., 2014) et une perte de fonction de la protéine HMGCR entraîne une rhabdomyolyse chez la souris (Osaki et al., 2015).

## 2) Physiopathologie

Des éléments indirects suggèrent un rôle pathogénique des anti-SRP et anti-HMGCR. En effet, il existe une corrélation positive entre le titre d'auto-anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR et l'activité de maladie, particulièrement avec le niveau de CK et la force musculaire (Allenbach et al., 2014; Benveniste et al., 2011b; Tiniakou et al., 2017).

De récentes études ont permis de mettre en évidence un rôle pathologique des anti-SRP et anti-HMGCR sur le muscle, tant *in vitro* qu'*in vivo* (Allenbach et al., 2018b; Arouche-Delaperche et al., 2017; Bergua et al., 2019).

*In vitro*, des myoblastes traités au moment de la différenciation avec des IgG totales extraites de patients MNAI avec des anti-SRP ou des anti-HMGCR ainsi que du plasma de ces patients montrent un défaut de fusion des fibres obtenues associé à la diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-13) (Arouche-Delaperche et al., 2017). Un traitement sur des myotubes déjà formés montre une induction de l'atrophie musculaire, confirmée par l'expression des atrogènes *FBXO32* et *TRIM63*. Une modification de la sécrétion moléculaire est également observée avec une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6) et de dérivés réactifs de l'oxygène.

En marquage immunofluorescent, la SRP et l'HMGCR sont retrouvées exprimées à la membrane des fibres et peuvent ainsi être reconnues par les auto-anticorps (Allenbach et al., 2018b). Les protéines étant normalement intra-cytoplasmiques, leur localisation pourrait se trouver modifiée lors des cycles de nécrose/régénération entraînant la fusion des fibres. Les auto-anticorps sont également retrouvés à la membrane des fibres. Des dépôts de protéines du complément C1q et C5b-9 sont aussi retrouvés à la

surface des fibres. Le système du complément reconnaît les complexes immuns anticorps-antigène et peut venir opsoniser les fibres.

*In vivo*, des souris immuno-déficientes ont été traitées avec les auto-anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR (Bergua et al., 2019). Ces souris ont une force diminuée et présentent des fibres en nécrose. Chez des souris déficientes en protéines du complément, cet effet est accentué par l'ajout du complément humain démontrant également son implication dans la pathogénicité de la maladie.

Suite à ces deux études montrant l'implication du complément, un essai clinique avec un anti-C5 a été démarré chez des patients MNAI. La molécule va bloquer le clivage du C5 en C5a et C5b empêchant ainsi l'activation des voies du complément. Cependant, les résultats n'ont pas été concluants pour traiter la maladie<sup>2</sup>.

Les macrophages pourraient également avoir un rôle dans la pathogénicité de la maladie. En effet, ils sont également capables de reconnaître les complexes immuns formés par les auto-anticorps et leur cible et peuvent venir détruire les cellules recouvertes par ces complexes immuns.

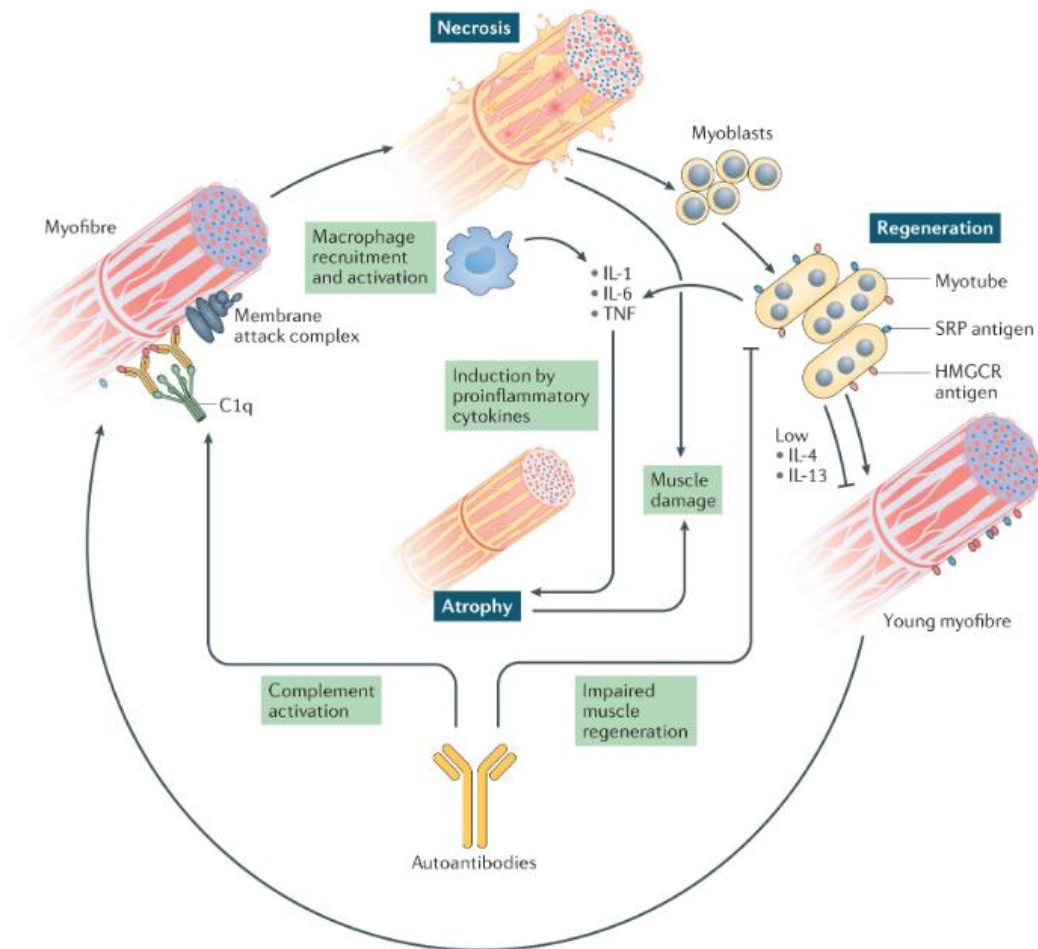
Le processus pathologique proposé jusqu'à maintenant est qu'une lésion musculaire avec un processus régénératif ou un traitement aux statines entraînent une expression de la SRP et/ou de l'HMGCR à la surface des fibres musculaires. La tolérance immunitaire est alors rompue et ces antigènes vont être reconnus par des auto-anticorps. La formation de complexes immuns antigène-anticorps à la surface des fibres entraîne leur reconnaissance par les protéines du complément et la formation de complexes d'attaque membranaire entraînant la nécrose des cellules. Les macrophages attirés par les signaux nécrotiques vont venir phagocyter les fibres musculaires et sécréter des cytokines participant à l'atrophie musculaire. Suite à la nécrose les cellules satellites vont être activées et proliférer pour fusionner et

---

<sup>2</sup> UCB's zilucoplan shows no relevant effect in immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) | UCB  
<https://www.ucb.com/stories-media/Press-Releases/article/UCB-s-zilucoplan-shows-no-relevant-effect-in-immune-mediated-necrotizing-myopathy-IMNM>



donner naissance à de nouvelles fibres musculaires. Cependant, cette fusion est altérée par la présence des auto-anticorps et les niveaux en baisse d'IL-4 et d'IL-13 (**Figure 13**)(Allenbach et al., 2020).



**Figure 13 : Mécanisme pathologique des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR dans la MNAI**  
D'après Allenbach et al., 2020

### 3) Importance d'un diagnostic précoce

Chez les patients MNAI le muscle est le principal organe affecté avec peu d'atteintes extra-musculaires. Il est important de diagnostiquer la maladie le plus tôt possible pour traiter les patients de manière adéquate et éviter l'installation au long terme de séquelles. La durée de la maladie est en effet un facteur prédictif du dommage musculaire (Landon-Cardinal et al., 2020).

Les patients présentent de manière précoce des dommages musculaires et les patients avec anti-SRP ont plus d'atrophie et de remplacement fibro-adipeux que les patients avec des anti-HMGCR (Pinal-Fernandez et al., 2017b).

Ce remplacement fibro-adipeux important peut expliquer la mauvaise récupération des patients. En effet, seulement 50% des patients anti-SRP récupèrent une force musculaire quasi-normale après 4 ans de traitement. Les patients les plus jeunes sont également plus sévèrement atteints (Pinal-Fernandez et al., 2017a).

### **III. Macrophages et fibrose**

La rupture de l'homéostasie musculaire peut être due à différents facteurs comme une blessure, un exercice physique intense, la sarcopénie ou encore des maladies génétiques ou inflammatoires comme les myosites. Lors de ces différents changements, une réaction immunitaire intervient avec comme principaux acteurs les macrophages. Les macrophages interviennent dans la régulation immunitaire mais ont également d'autres rôles et interviennent notamment dans le mécanisme de régénération. Cependant, quand les dommages musculaires et l'inflammation sont chroniques comme cela est le cas dans les myosites et plus particulièrement dans les MNAI avec la nécrose, le rôle bénéfique des macrophages peut alors devenir délétère.

#### **A. Macrophages**

##### **1) Classification des macrophages**

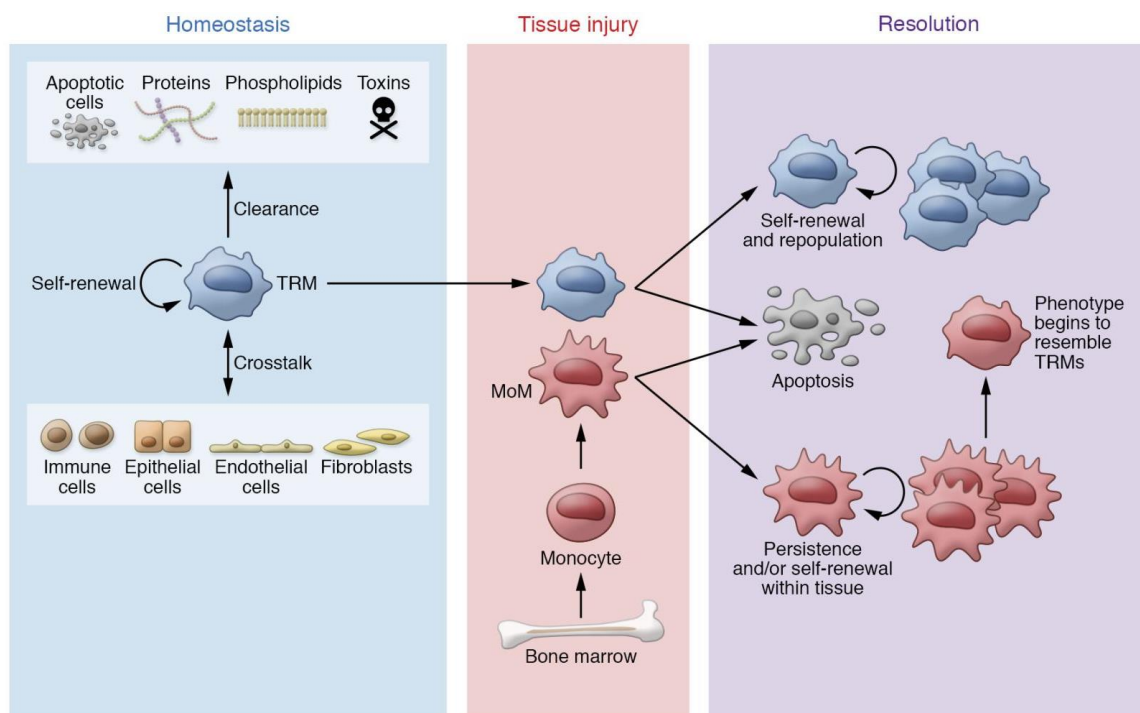
###### *a- Historique*

Metchnikoff en 1892 est le premier à établir l'idée d'une immunité cellulaire avec ce qu'il appelle les macrophages et les microphages. Plus tard, Ebert et Florey montrent la migration des monocytes du sang au site de l'inflammation et Volkman et Gowans que ces monocytes sont issus de la moelle osseuse (Ebert and Florey, 1939; Volkman and Gowans, 1965). Un système de phagocytes mononucléaires est ensuite instauré dans les années 60 permettant de regrouper les monocytes et les macrophages suivi de l'inclusion des cellules dendritiques dans les années 70 (van Furth, 1981; van Furth et al., 1972). Les monocytes sont alors définis comme des cellules phagocytaires mononucléées, les macrophages comme des cellules plus larges et éliminant les cellules apoptotiques, les débris et les pathogènes et les cellules

dendritiques comme des cellules présentatrices des antigènes aux lymphocytes T. Il était alors acquis que les monocytes et macrophages proviennent du sang.

Les monocytes proviennent de progéniteurs dans la moelle osseuse. Dans des conditions d'homéostasie, ils restent sous forme de monocytes dans la circulation et peuvent être recrutés dans les tissus lors d'un dommage ou d'une infection (**Figure 14**). Leur phénotype va alors changer et ils deviennent des macrophages dérivés de monocytes.

Il existe également des macrophages résidents qui participent à l'homéostasie du tissu dans lequel ils se trouvent (revu dans Hoeffel and Ginhoux, 2018). Ces macrophages sont capables de s'auto-renouveler indépendamment de l'hématopoïèse. Ils peuvent être d'origine embryonnaire en étant issus du sac vitellin ou du foie fœtal. Cependant, ils peuvent également être dérivés de macrophages issus de monocytes qui vont acquérir un phénotype résident une fois dans le tissu.



**Figure 14 : Macrophages résidents et monocytes dans le tissu musculaire**

*Dans une situation d'homéostasie, les macrophages résidents s'auto-renouvellent, envoient des signaux aux cellules voisines et participent à l'élimination des cellules apoptotiques, protéines, phospholipides et toxines. Lors d'un dommage, les macrophages résidents s'activent et les monocytes circulants issus de la moelle osseuse arrivent sur le site du dommage et acquièrent un phénotype macrophagique. Lors de la résolution du dommage, les macrophages vont entrer en apoptose ou persister dans le tissu. Les macrophages issus de monocytes vont alors acquérir la capacité de s'auto-renouveler et développer un phénotype ressemblant aux macrophages résidents (d'après Watanabe et al., 2019).*

### *b- Macrophages M1 et M2*

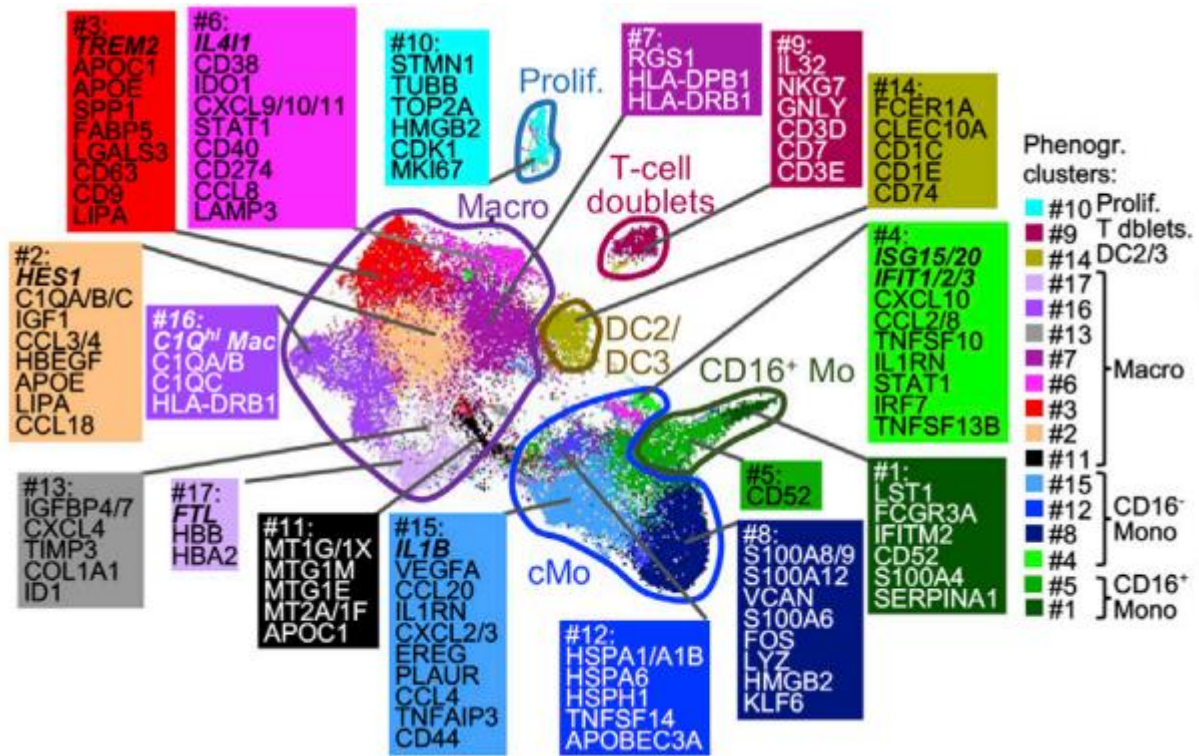
Les macrophages ont initialement été étudiés *in vitro*. Ils ont tout d'abord été classés en macrophages M1 ou M2 du fait de leurs réponses spécifiques (Mills et al., 2000). Les macrophages M1 ont été définis comme activés classiquement par le LPS et/ou l'interféron gamma (Martinez and Gordon, 2014; Stein et al., 1992). Les M2 ont été définis comme activés alternativement par l'IL-4. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires et soutiennent une réponse Th1 et les macrophages M2 sont anti-inflammatoires et soutiennent une réponse Th2. La terminologie M1/M2 est simple et a été facilement et mondialement adoptée. Cependant, elle est réductrice et n'est pas vraiment le reflet de ce qu'il se passe *in vivo* dans un contexte tissulaire. Pour exemple, 29 types de stimulations de macrophages ont donné autant de signatures d'activation (Xue et al., 2014). Les experts ont ainsi fait plusieurs appels pour que cette nomenclature ne soit plus utilisée mais que les macrophages soient plutôt définis selon leur origine (résidents ou issus de monocytes circulants) et leur type d'activation (IL-4, interferon etc)(Murray et al., 2014). Cette nomenclature reste cependant encore largement utilisée.

### *c- Revue de la classification*

Avec le développement de méthodes de plus en plus résolutive comme la spectrométrie de masse ou les analyses en *single cell*, les populations cellulaires peuvent être décrites plus finement. Cependant, cela peut amener à une hétérogénéité entre les différentes études, les équipes ne donnant pas forcément les mêmes noms aux différents types cellulaires observés. Afin d'unifier ces analyses et de clarifier les spécificités des macrophages et des monocytes, Florent Ginhoux et son équipe ont récemment réalisé une méta-analyse de 41 études transcriptomiques de *single cell* et généré ce qu'ils appellent un MoMac-VERSE (Mo pour monocytes et Mac pour macrophages) (Mulder et al., 2021). Reprenant les gènes exprimés par les monocytes et macrophages issus de différents tissus sains ou pathologiques, cet outil permet d'avoir des signatures spécifiques et unifiées.

Cette étude a ainsi pu séparer des signatures de macrophages et de monocytes. Les macrophages sont séparés en 7 clusters distingués par l'expression de gènes différents dont un cluster HES1 (#2), un cluster

TREM2 (#3) et un cluster FTL (#17). Deux populations de monocytes sont également séparées en CD16+ ou CD16-. Les monocytes CD16+ sont séparés en 2 clusters et les CD16- sont séparés en 5 clusters comprenant notamment un cluster identifié par une réponse à l'interféron (#4) et un cluster IL1B (#15)(Figure 15).



**Figure 15 : Représentation des clusters du MoMac-VERSE**  
*Les gènes différenciellement exprimés caractéristiques des clusters sont représentés (d'après Mulder et al., 2021).*

## 2) Macrophages et régénération musculaire

### a- Processus de régénération musculaire orchestrée par les macrophages

Cette partie est particulièrement orientée sur les particularités des macrophages dans le contexte de la régénération musculaire qui est un contexte d'inflammation stérile où les pathogènes n'interviennent pas. Bien que souvent identifiée comme délétère, l'inflammation est cependant nécessaire pour une bonne régénération.

Un dommage musculaire active tout d'abord les macrophages résidents du tissu concerné qui vont produire des cytokines et chimiokines permettant le recrutement depuis le sang de monocytes (Brigitte

et al., 2010b). Ces monocytes dans l'environnement immunitaire spécifique vont se polariser en macrophages.

La majorité des connaissances acquises se base sur des modèles murins de régénération après induction d'un dommage musculaire toxique (injection de cardiotoxine ou BaCl<sub>2</sub>). La nécessité des macrophages dérivés de monocytes a été mise en évidence dans plusieurs modèles murins de déplétion des cellules CD11b<sup>+</sup> ou de souris *knock-out* pour les récepteurs CCL2 ou CCR2 (Arnold et al., 2007; Martinez et al., 2010; Ochoa et al., 2007). Dans ces différents modèles, la régénération musculaire est très altérée. Le modèle CCR2 KO a notamment montré que l'entrée des monocytes sur le site du dommage se fait par l'axe CCR2-CCL2. L'activation de la voie alterne du complément permet également le recrutement des monocytes *via* l'axe C3a-C3aR (Zhang et al., 2017).

La première phase de la régénération est pro-inflammatoire. Les macrophages sont polarisés par l'environnement riche en TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  relargués par les autres cellules inflammatoires et les fibres musculaires. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-12 ou l'IL-1 $\beta$ . Ces cytokines vont notamment stimuler la prolifération des cellules satellites (Bencze et al., 2012). Les macrophages pro-inflammatoires vont également phagocyter les débris cellulaires (Saclier et al., 2013). Cette phagocytose en condition stérile est appelée efferocytose et est nécessaire pour permettre la conversion des macrophages en macrophages anti-inflammatoires (Arnold et al., 2007; Watanabe et al., 2019).

La seconde phase de la régénération est anti-inflammatoire. Les macrophages développent alors des capacités prolifératives et sécrètent des facteurs aidant à la réparation tissulaire comme le TGF- $\beta$  (Varga et al., 2016). Les macrophages peuvent aussi exprimer des gènes de la MEC et régulateurs de la MEC et ainsi participer à sa synthèse et son organisation (Varga et al., 2016).

#### *b- Limites de l'effet bénéfique de la régénération*

Le processus inflammatoire de régénération orchestré par les macrophages est très ordonné. Si ce timing est perturbé, la résolution de l'inflammation n'est alors pas complète et peut entraîner des dommages.

Les modèles d'études de la régénération sont caractérisés par de gros dommages impliquant une partie non négligeable du tissu musculaire. Il y a donc un manque de connaissances sur les événements intervenant lors d'une inflammation modérée mais chronique, comme c'est le cas chez les myosites.

## B. Fibrose

Le maillage protéique de la MEC a un rôle structurel permettant de maintenir en place les fibres musculaires, les vaisseaux et les nerfs. La MEC agit également dans la transmission de la force et envoie des signaux spécifiques aux cellules satellites lors de la régénération. Une altération de la MEC peut entraîner son accumulation excessive et le développement de fibrose dans les tissus. Cette partie se focalise sur la définition de la fibrose, ses acteurs et le rôle des signaux extérieurs dans son développement, notamment par les macrophages.

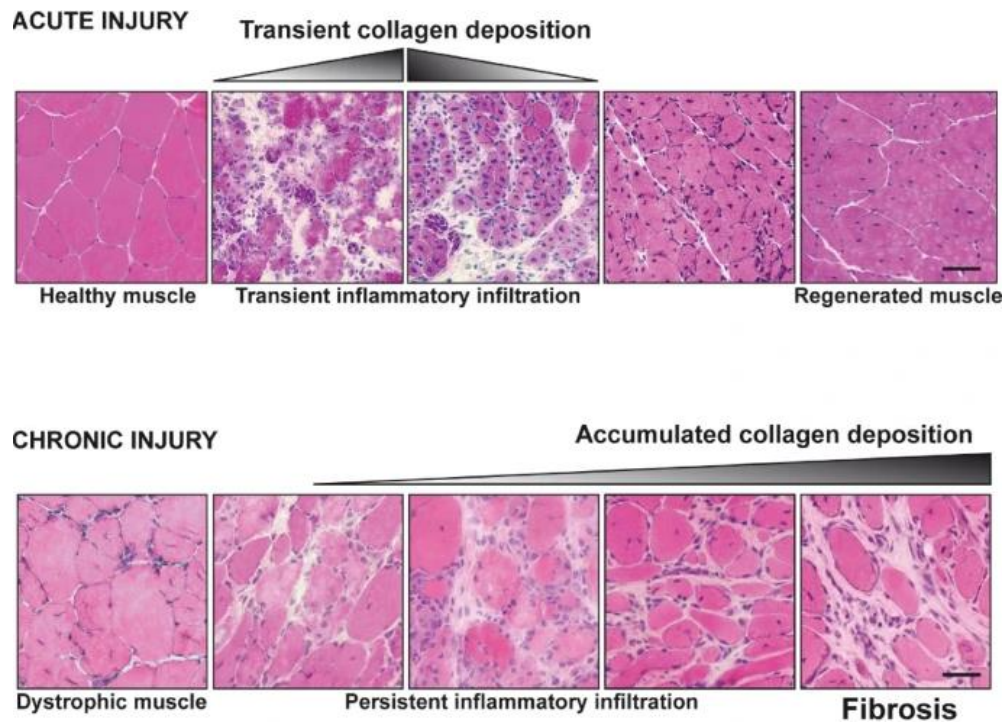
### 1) Définition générale de la fibrose

La fibrose est définie comme une accumulation excessive de MEC (principalement collagène et fibronectine) qui va peu à peu remplacer le tissu dans lequel elle se développe et pouvant ainsi entraîner une perte de fonction de ce tissu et la mort des patients. Elle peut être causée par une production excessive de protéines de la MEC ou bien à un défaut de sa dégradation. La fibrose peut se développer dans différents organes et est impliquée dans le processus pathologique de nombreuses maladies comme la fibrose pulmonaire idiopathique, la cirrhose, l'insuffisance rénale chronique (Wynn, 2007). Bien qu'impliquée dans plusieurs organes, les mécanismes conduisant à la fibrose peuvent être communs et restent mal compris (Wynn, 2004).

Dans le muscle squelettique, l'accumulation de la MEC se produit principalement dans l'endomysium et le perimysium (Gillies and Lieber, 2011). La fibrose musculaire affecte la fonction et la structure des fibres ainsi que la régénération après une blessure (Delaney et al., 2017). Elle apparaît dans le muscle suite à des dommages chroniques, à une immobilisation, lors du vieillissement ou encore lors de maladies génétiques, comme la dystrophie de Duchenne, ou auto-immunes comme les myosites (Serrano and Muñoz-Cánoves, 2010; Serrano et al., 2011).



Dans le cas d'un dommage aigu, le muscle va dégénérer et connaître une phase inflammatoire transitoire accompagnée d'un dépôt de collagène puis va se régénérer et aboutir à un retour à une physiologie musculaire normale. Lors d'un dommage musculaire chronique, l'inflammation et les dépôts de collagène sont persistants conduisant à la fibrose musculaire (**Figure 16**)(Mann et al., 2011).



**Figure 16 : Régénération musculaire lors d'un dommage aigu ou chronique**

*Lors d'un dommage aigu, les fibres musculaires vont dégénérer et un dépôt collagène temporaire va s'établir. Les fibres régénèrent ensuite et le muscle revient à son état initial. Lors d'un dommage chronique avec une inflammation persistante, le collagène s'accumule entre les fibres et la fibrose s'installe (d'après Mann et al., 2011).*

## 2) Acteurs majeurs de la fibrose : les FAPs et leur interaction avec les macrophages

### a- Définition des FAPs

Les FAPs sont des progéniteurs mésenchymateux résidents du muscle squelettique identifiés pour la première fois chez la souris parallèlement par deux équipes en 2010 (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010). Ils sont capables de se différencier en adipocytes, en fibroblastes, en ostéocytes ou en



chondrocytes selon l'environnement dans lequel ils se trouvent mais ne sont pas myogéniques (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010).

Dans ces premières études, les FAPs sont caractérisés par l'expression de PDGFRA, Sca1 et CD34 et l'expression négative de CD45 (marqueur hématopoïétique), de CD31 (marqueur endothélial) et d'ITGA7 (marqueur myogénique). Chez l'homme cependant, *Sca1* n'existe pas.

Des études en *single cell* ont été réalisées sur du muscle sain humain et ont permis de mieux caractériser les cellules mononucléées du tissu, dont les FAPs (**Tableau 2**). Dans une première étude, 2 clusters de FAPs sont identifiés, un cluster fibrillin 1+ (*FBNI*) et un cluster lumican+ (*LUM*) qui expriment tous les deux les marqueurs canoniques des FAPs : *PDGFRA* et *CD34* (Rubenstein et al., 2020). Les deux clusters expriment les collagènes de type I, III et VI mais le cluster LUM+ a une surexpression des collagènes IV et XV associés à l'endomysium (Kjaer, 2004) et le cluster FBNI+ une surexpression du collagène XIV associé à une expression périnysiale (Gillies and Lieber, 2011). Le top 3 des gènes différenciant le cluster LUM+ sont *APOD*, *LUM* et *DCN* et les 3 gènes différenciant le cluster FBNI+ des autres sont *FBNI*, *PRG4* et *PCOLCE2*.

Une deuxième étude de *single cell* a étudié les cellules mononucléées de 10 muscles différents (De Micheli et al., 2020b). Trois clusters de fibroblastes pouvant être désignés comme des FAPs sont retrouvés. La première population est caractérisée par l'expression de *COL1A1*, *SFRP4*, *SERPINE1* et *CCL2*, la deuxième population par l'expression de *FBNI*, *MFAP5* et *CD55* et la troisième *SMOC2*.

Les FAPs sont localisés majoritairement dans l'épimysium et le périnysium et sont souvent localisés autour des vaisseaux en dehors de la lame basale (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010). Ils représentent 5 à 15% des noyaux totaux dans le muscle squelettique et seraient identiques aux fibroblastes (Contreras et al., 2019a, 2019b).

**Tableau 2 : Principaux gènes marqueurs des différentes populations de FAPs identifiées en analyses *single cell* (modifié d'après Contreras et al., 2021)**

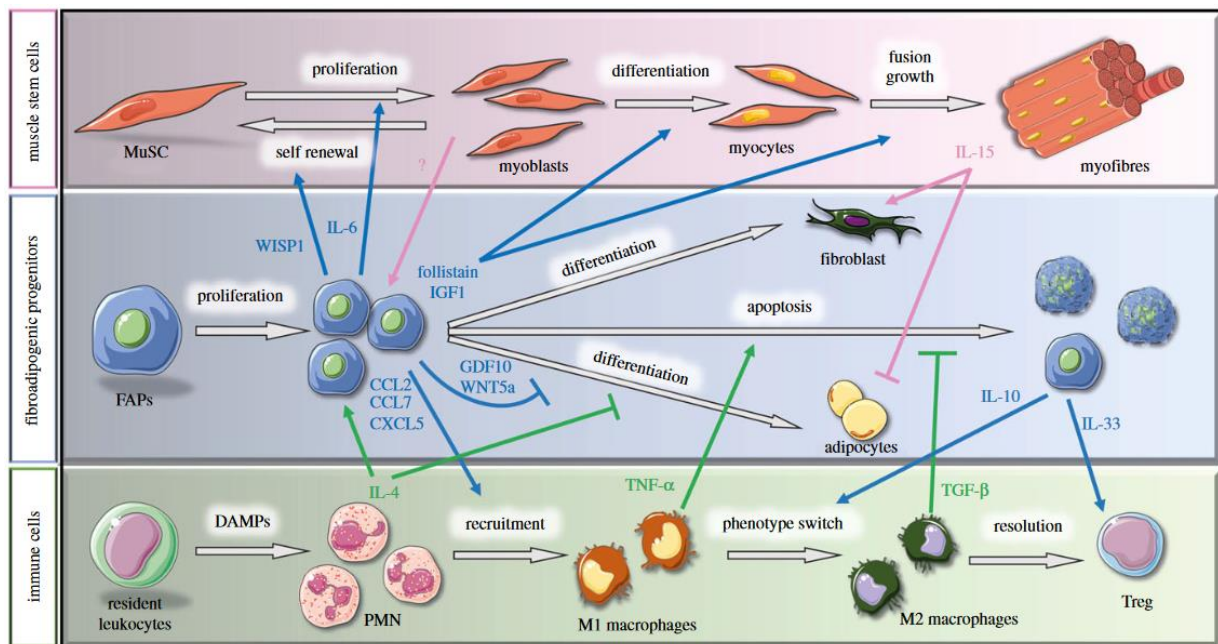
Gènes/marqueurs	Sous-populations FAPs	Espèce	Référence
<i>SCA1, CD34, PDGFRA</i>	SubFAPs: Tie2(low), Vcam(low) SubFAPs: Tie2(high), Vcam(high)	Souris	(Malecova et al., 2018)
<i>SCA1, LY6E, PDGFRA, DCN</i>	Non déterminé	Souris	(Giordani et al., 2019)
<i>PDGFRA, SCA1, HIC1</i>	FAP1: <i>Cxcl14, Col4, Col6, Col15, Lum, Sparcl1, Podn, Smoc2, Mgp, Bgn</i> FAP2: <i>Dpp4, Sfrp4, Igfbp5, Sema3c, Tgfr2, Wnt2</i>	Souris	(Scott et al., 2019)
<i>PDGFRA, SCA1, DCN, CD34</i>	Non déterminé	Souris	(Pawlikowski et al. 2019)
<i>PDGFRA, COL3A1, DCN, GSN</i>	Non déterminé	Souris	(De Micheli et al., 2020a)
<i>PDGFRA, SCA1, CD34</i>	FAP1: <i>Cxcl14, Enpp2, Crisp1d2, Hsd11b1, Smoc2, Ccl11, Gsn, Dcn</i> FAP2: <i>Ddp4, Pi16, Wnt2, Igfbp5, Igfbp6, Fbn1, Ugdh</i>	Souris	(Oprescu et al., 2020)
<i>PDGFRA, CD34, COL1, COL3, COL6</i>	Lumican (LUM): <i>LUM, DCN, CXCL14, COL4, COL15, SMOC2, GSN</i> Fibrillin (FBN1): <i>FBN1, MFAP5, LOXL1, PRG4, ELN, IGGFBP5, FSTL1</i>	Humain et souris	(Rubenstein et al., 2020)
<i>PDGFRA</i>	FAP1 (fibroblast1): <i>COL1A1, SFRP4, SERPINE1, CCL2</i> FAP2 (fibroblast2): <i>FBN1, MFAP5, CD55</i> FAP3 (fibroblast3): <i>SMOC2, ADH1B, ABC18</i>	Humain	(De Micheli et al., 2020b)
<i>PDGFRA, CD34, COL1A1</i>	FAP1: <i>SEMAC3C, DEFB1, FBN1, PRG4, IGGFBP5</i> FAP2: <i>PLA2G2A, IGFBP6</i> FAP3: <i>SFRP2, CCL2, MGP, DPT, LUM, GSN</i> FAP4: <i>IGF1, MME, COL6A3, PTGDS, COL15A1, SMOC2, COL6A3, APOD, CD90</i>	Humain	(Farup et al., 2021)
<i>PDGFRA, DCN, CD34</i>	FAP1 (CD55+): <i>TNxB, MFAP5, 145 PCOLCE2, FBN1, CD55, PRG4</i> FAP2 (MME+): <i>MME (CD10), PTGDS, CXCL14, SMOC2</i> FAP3 (GPC3+): <i>GPC3, SFRP2</i>	Humain	(Fitzgerald et al., 2022)

### *b- Rôle des FAPs et du système immunitaire dans la fibrose lors d'un dommage aigu*

Les FAPs sont des acteurs majeurs dans le développement de la fibrose et de l'infiltration adipeuse pathogénique dans le muscle squelettique. Des souris injectées avec des cellules PDGFRA+ dans le cadre d'un dommage musculaire développent une fibrose (Hamilton et al., 2003; Uezumi et al., 2011). Dans un contexte de dommage aigu et de régénération, les FAPs vont sécréter des chimiokines (CCL2, CXCL15, CCL7) attirant les monocytes et les neutrophiles sur le site du dommage (**Figure 17**) (De Micheli et al., 2020a; Oprescu et al., 2020). Les FAPs activés vont également produire de l'IL-10 favorisant le phénotype anti-inflammatoire des macrophages (Lemos et al., 2012). Les éosinophiles vont produire de l'IL-4 activant la prolifération des FAPs mais inhibant leur différenciation en adipocytes (Heredia et al., 2013). Les macrophages régulent le renouvellement des FAPs. Chez des souris *knock-*

out pour Ccr2 pour lesquelles les monocytes ne peuvent pas migrer vers le site du dommage, les FAPs s'accumulent et conduisent à de la fibrose (Lemos et al., 2015). Le TNF- $\alpha$  sécrété par les macrophages pro-inflammatoires va conduire à l'apoptose des FAPs. Lors de la phase de régénération, les macrophages produisent du TGF- $\beta$  qui va promouvoir la survie, la prolifération et la différenciation des FAPs en fibroblastes (Contreras et al., 2019a; Davies et al., 2016) en induisant leur production de collagène I, de fibronectine et du facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF et en inhibant leur expression de métalloprotéases (Gosselin et al., 2004; Mann et al., 2011; Smith and Barton, 2018).

En condition de dommage aigu, les FAPs expriment de l'IL-6 permettant la bonne différenciation des myoblastes. Ils expriment également de l'IGF-1 et de la follistatine favorisant la croissance musculaire (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010).



**Figure 17 : Interactions cellulaires lors de la régénération musculaire**

Les flèches bleues indiquent l'effet des FAPs sur les autres cellules, les roses celui des cellules musculaires et les vertes celui des cellules immunitaires (d'après Molina et al., 2021).

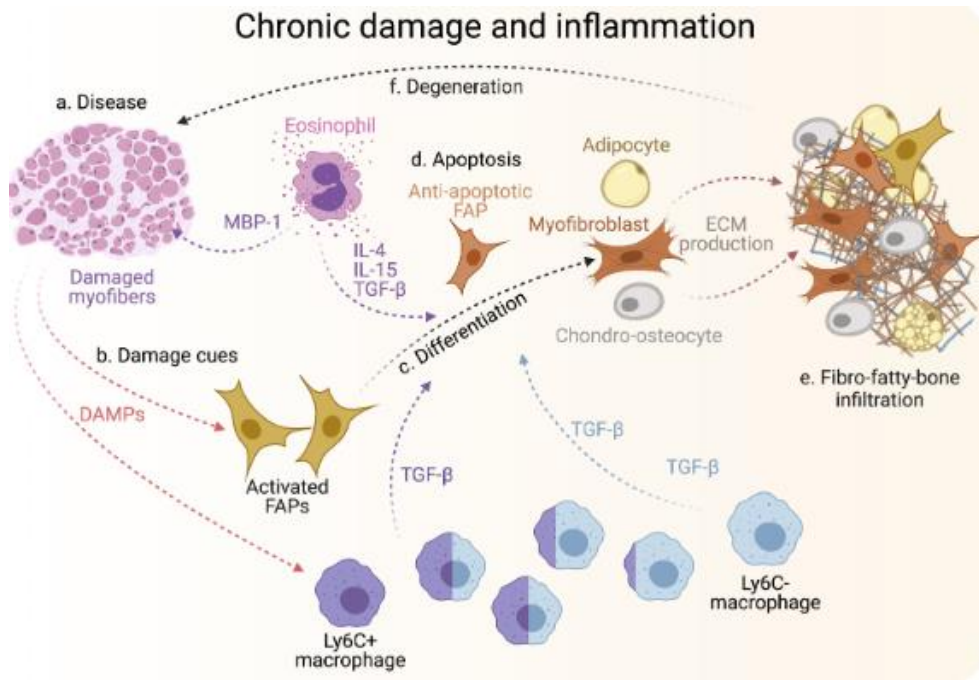
### c- Rôle des FAPs et du système immunitaire dans la fibrose lors d'un dommage chronique

La fibrose musculaire la plus décrite est celle impliquée dans la dystrophie de Duchenne (DMD) compte tenu de sa prévalence élevée comparée aux autres maladies musculaires (1 garçon/3500). Elle provient d'une mutation dans le gène de la dystrophine, une protéine sub-sarcolemmique servant au maintien de

l'architecture musculaire en faisant le lien entre les filaments d'actine et les fibres (Constantin, 2014; Hoffman et al., 1987). La mutation entraîne l'absence de cette protéine et entraîne une fragilisation de la fibre qui va se casser au moindre choc entraînant ainsi des cycles de nécrose/régénération et une inflammation constante (Carpenter and Karpati, 1979). Certaines caractéristiques comme l'inflammation et la faiblesse musculaire sont communes avec les MII.

Dans la DMD et d'autres maladies neuro-musculaires, afin de régénérer le muscle abimé par la nécrose, les cellules satellites vont s'activer. Les cycles chroniques de nécrose et régénération vont finir par épuiser la réserve de cellules satellites (Serrano et al., 2011). Les cellules satellites peuvent également contrôler les fibroblastes en régulant leur production de protéines de la MEC (Fry et al., 2017). Il a été montré que les cellules satellites sécrètent des exosomes contenant un micro-ARN, miR-206, capable de réprimer Rrbp1 intervenant dans la synthèse du collagène (Fry et al., 2017). Dans un contexte de dommage chronique, un épuisement des cellules satellites entraînerait alors l'absence de ce contrôle.

Les dommages chroniques et la nécrose induisent également la présence d'une inflammation continue. Dans le cadre d'un dommage chronique comme lors de la DMD, la production de TGF- $\beta$  est continue et son expression est retrouvée dans le sang et le muscle des patients et corrèle avec le degré de fibrose (**Figure 18**)(Ishitobi et al., 2000; Song et al., 2017). Le TGF- $\beta$  est également surexprimé dans le muscle des patients MII (Lundberg et al., 1997). Les cycles de régénération asynchrones comme lors des cycles de nécrose/régénération induisent également la fibrose par le TGF- $\beta$  (Dadgar 2014). Dans la DMD, les macrophages peuvent également avoir un phénotype particulier en exprimant à la fois du TNF- $\alpha$  et du TGF- $\beta$  (Lemos et al., 2015). Cette surexpression de TGF- $\beta$  peut alors conduire à une fibrose due à la persistance des FAPs et à la production continue de protéines de la MEC. Les FAPs ont aussi un phénotype particulier lors de dommages chroniques. Dans un modèle de myopathie inflammatoire chronique chez des souris immunisées à la myosine (CIM), les FAPs développent un phénotype anti-apoptotique pouvant expliquer leur accumulation (Saito et al., 2020).



**Figure 18 : Interactions cellulaires lors de dommages chroniques**

*Les dommages chroniques conduisent à une suractivation des macrophages sécrétant du TGF-β et des FAPs sécrétant la matrice extracellulaire (d'après Theret et al., 2021).*

Les FAPs et les macrophages sont également localisés proches les uns des autres après un dommage musculaire et dans la DMD potentialisant leurs actions les uns sur les autres (Contreras et al., 2016; Juban et al., 2018; Lemos et al., 2015; Moratal et al., 2018).

En condition de dommage chronique il a été montré que lors d'une dénervation, la production d'IL-6 par les FAPs est continue et délétère en favorisant le dépôt de MEC (Madaro et al., 2018).

L'augmentation de la production de MEC par des FAPs constamment activés a également un effet délétère. La rigidité de la MEC se retrouve changée influençant les cellules satellites et pouvant modifier l'accessibilité des cellules à différents facteurs (Wolf and Friedl, 2011).

L'interféron peut également avoir une implication dans l'établissement de la fibrose et son action n'a encore jamais été regardée dans un contexte de dommage chronique sur les FAPs. Des faibles doses d'interféron sont normalement nécessaires pour la régénération (Cheng et al., 2008) mais lors de dommages chroniques, il peut être produit en plus grandes quantités et entraîner des défauts de

myogénèse et de la fibrose dans un environnement riche en TGF- $\beta$  (Haag et al., 2008; Kalovidouris et al., 1993).

En plus de la DMD, les FAPs ont été identifiés dans différentes pathologies neuro-musculaires. C'est le cas chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique où ils ont été identifiés par un marquage CD90 au lieu de PDGFRA, après avoir montré que chez la souris les cellules Sca-1+ sont aussi CD90+ (Madaro et al., 2018). Les patients diabétiques ont également une augmentation de FAPs CD90+ (Farup et al., 2021). Les FAPs ont été décrits comme impliqués dans d'autres modèles animaux de maladies neuro-musculaires comme la dystrophie facio-scapulo-humérale et les dystrophies musculaires des ceintures (Bosnakovski et al., 2017; Hogarth et al., 2019).

Les FAPs ont également été caractérisés dans le cadre d'une arthroplastie de la hanche due à une arthrose pour caractériser leur potentiel adipogénique (Fitzgerald et al., 2022). Trois populations de FAPs ont été retrouvées dans cette étude exprimant toutes les 3 les gènes *PDGFRA*, *CD34* et *DCN*. La première population est CD55+, la deuxième PRG4+ et la troisième MME+. Ces trois populations ressemblent fortement aux populations retrouvées dans les deux études *single cell* sur muscle sain (De Micheli et al., 2020b; Rubenstein et al., 2020). Les cellules MME+ ont un haut potentiel adipogénique en culture.

---

Le muscle est un organe complexe composé de cellules différentes interagissant ensemble afin de maintenir l'équilibre homéostatique. Cet équilibre peut se rompre ponctuellement par exemple lors d'un dommage musculaire mais il est vite rétabli. Lorsque le dommage perdure, comme c'est le cas lors de certaines pathologies comme les MII, et plus particulièrement les MNAI, l'état d'équilibre est dépassé et un dommage chronique s'installe. Ce dommage chronique crée un environnement inflammatoire continu et est à l'origine de l'établissement de la fibrose dont les acteurs principaux sont les macrophages et les FAPs.

---



## OBJECTIFS

La physiopathologie des myopathies inflammatoires idiopathiques n'est pas encore entièrement connue. L'activité de la maladie en particulier est difficile à évaluer. Certains marqueurs existent mais ne sont pas applicables de la même manière à tous les sous-groupes. La myostatine, une protéine inhibitrice de la croissance musculaire est étudiée dans les maladies neuromusculaires et dans certaines MII mais les résultats des études sont divergents. Au cours de cette thèse, mon premier objectif était donc :

- **Etudier la myostatine chez les MII** et voir si elle peut être un biomarqueur d'activité de la maladie. Pour cela, des dosages protéiques sériques et des analyses transcriptomiques de biopsies musculaires ont été réalisés.

Je me suis ensuite intéressée plus particulièrement au groupe des myopathies nécrosantes auto-immunes. Les patients présentent une atteinte musculaire proximale avec une infiltration fibro-adipeuse participant à l'établissement d'une faiblesse musculaire ainsi que la présence de fibres nécrotiques, une infiltration macrophagique, et la présence d'auto-anticorps. La physiopathologie exacte de la maladie, incluant les mécanismes de nécroses et de remplacement fibro-adipeux, n'est pas encore totalement comprise. Pour mieux comprendre la physiopathologie des MNAI, mes objectifs étaient de:

- **Etudier la nécrose dans les MNAI**
- **Etudier l'origine du remplacement fibro-adipeux**
- **Etudier la pathogénicité des anti-SRP et anti-HMGCR**

Pour cela deux approches ont été mises en place. La première a été de regarder en transcriptomique *in situ* les différences entre des muscles MNAI et des muscles HD. La deuxième a été de réaliser des modèles de culture cellulaire de la maladie en 2 ou 3 dimensions.





# RESULTATS

## Résultats 1: Myostatin In Idiopathic Inflammatory Myopathies: Serum Assessment And Disease Activity

### *Résumé de l'étude*

Les patients atteints de MII présentent des dommages musculaires plus ou moins importants, c'est particulièrement le cas des patients MNAI et/ou ceux atteints d'IBM (Landon-Cardinal et al., 2020). Certains patients répondent bien aux traitements mais peuvent toujours avoir une activité résiduelle de la maladie nécessitant une utilisation prolongée des traitements.

L'activité de la maladie est particulièrement difficile à évaluer dans les MII. En effet, certains marqueurs existent comme le dosage de la créatine kinase mais ne sont pas applicables de la même manière à tous les sous-groupes de myosites (Allenbach et al., 2018b; Mathur et al., 2014). L'activité de la maladie peut également être évaluée par un examen clinique standardisé du patient en suivant les recommandations de l'IMACS (Rider et al., 2011).

Dans cette étude, j'ai voulu savoir si la myostatine, un inhibiteur de masse musculaire de la famille du TGF- $\beta$  pouvait être un marqueur d'activité de la maladie. La myostatine a déjà été étudiée dans quelques maladies neuro-musculaires et dans quelques sous-groupes de myosites mais les résultats divergent (Kersch-Schindl et al., 2021; Mariot et al., 2017; de Sordi et al., 2022; Vernerová et al., 2020).

Un dosage de la myostatine sérique a ici été réalisé par ELISA chez 300 patients et 59 contrôles et l'expression de la myostatine et de sa voie de signalisation ont été étudiées dans le muscle au niveau transcriptomique chez 18 patients et 6 contrôles.

Les résultats montrent une diminution de la myostatine sérique dans les 4 sous-groupes de myosites comparés aux contrôles. Cette diminution est associée à une diminution de l'expression transcriptomique de la myostatine dans le muscle. Les patients ont ensuite été séparés selon l'activité de leur maladie en patients actifs ou inactifs à l'aide du PGA (*Physician Global Assessment*). Les patients inactifs SAS et DM ont un niveau de myostatine plus élevé que ceux étant actifs et ont donc tendance à revenir au niveau des contrôles. Les patients MNAI se distinguent avec un niveau bas de myostatine

comparable entre les patients actifs et inactifs. Le résultat d'analyses multivariées montre que le taux de myostatine est associé au PGA et à l'atteinte musculaire représentée par le MMT8 (*Manual muscle testing of 8 muscles*).

Le taux de myostatine pourrait alors être un marqueur d'activité pour les DM et les SAS. Le taux de myostatine ne variant pas chez les patients actifs et inactifs MNAI pourrait s'expliquer par une diminution de la masse musculaire des patients ou une activité de la maladie résiduelle de faible intensité.

Pour valider ces résultats, une étude de suivi de l'évolution des patients à travers le temps aurait cependant besoin d'être réalisée.

Ces résultats ont donné lieu à un article accepté pour publication dans le journal *Neurology and Applied Neurobiology*.

## **Myostatin In Idiopathic Inflammatory Myopathies: Serum Assessment And Disease Activity**

Alexandrine Mahoudeau<sup>1</sup>, Céline Anquetil<sup>1,2</sup>, Nozomu Tawara<sup>1</sup>, Hossein Khademian<sup>1</sup>, Damien Amelin<sup>3</sup>, Loïs Bolko<sup>2</sup>, Marco Silvestro<sup>2</sup>, Julian Dal Cin<sup>1</sup>, Bérénice Tendrel<sup>1</sup>, Virginie Tardif<sup>1</sup>, Kubéraka Mariampillai<sup>2,3</sup>, Gillian Butler-Browne<sup>1</sup>, Olivier Benveniste<sup>1,2#</sup>, Yves Allenbach<sup>1,2#</sup>

Corresponding author : Alexandrine Mahoudeau, Equipe 8 Centre de Recherche en Myologie UMRS 974 105 boulevard de l'Hôpital 75651 Paris Cedex 13 – France, alexandrine.mahoudeau@gmail.com

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, Center of Research in Myology, UMRS 974, 75013 Paris, France

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

<sup>3</sup>Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Center of Research in Myology, UMRS 974, 75013 Paris, France

#These authors share senior authorship and jointly supervised this work

Key points:

- Circulating myostatin level is decreased in idiopathic inflammatory myopathies
- Myostatin pathway expression is decreased at the transcriptomic level in patients' muscle biopsies
- Circulating myostatin levels could be a disease activity marker for antisynthetase syndrome and dermatomyositis patients
- Circulating myostatin levels do not correlate with disease activity for immune-mediated necrotizing myopathies patients indicating a new disease mechanism

**ABSTRACT**

**Aims:** In Idiopathic Inflammatory Myopathies (IIM) disease activity is difficult to assess, and IIM may induce severe muscle damage, especially in immune-mediated necrotizing myopathies (IMNM) and inclusion body myositis (IBM). We hypothesize that myostatin, a negative regulator of muscle mass, could be a new biomarker of disease activity and/or muscle damage.

**Methods:** Prospective assessment of myostatin protein level in 447 IIM serum samples (dermatomyositis (DM), n=157; IBM, n=72; IMNM, n=125; antisynthetase syndrome (ASyS), n=93) and 59 healthy donors (HD) was performed by ELISA. A gene transcript analysis was also carried out on 18 IIM muscle biopsies and 6 controls to analyse myostatin and myostatin pathway-related gene expression.

**Results:** IIM patients had lower myostatin circulating protein levels and gene expression compared to HD (2379 [1490; 3678] pg/ml vs 4281 [3169; 5787] pg/ml;  $p < 0.0001$  and  $\log_2FC = -1.83$ ;  $p = 0.0005$  respectively). Myostatin-related gene expression varied accordingly. Based on the Physician Global Assessment, inactive IIM patients showed higher myostatin levels than active ones. This was the case for all IIM subgroups, except IMNM where low myostatin levels were maintained (2186 [1235; 3815] vs 2349 [1518; 3922] pg/ml;  $p = 0.4$ ).

**Conclusions:** Myostatin protein and RNA levels are decreased in all IIM patients, and protein levels correlate with disease activity. Inactive ASyS and DM patients have higher myostatin levels than active patients. Myostatin could be a marker of disease activity in these subgroups. However, IMNM patients do not have significant increase in myostatin levels after disease remission. This may highlight a new pathological disease mechanism in IMNM patients.

**Keywords:** idiopathic inflammatory myopathies, myostatin, muscle, biomarker, disease activity

## LIST OF ABBREVIATIONS

ASyS: Antisynthetase syndrome

CK: Creatine kinase

DCN: Decorin

DM: Dermatomyositis

FBXO32: F-box Protein 32

FST: Follistatin

GC: Glucocorticoids

HD: Healthy donors

IBM: Inclusion body myositis

IIM: Idiopathic inflammatory myopathies

IL-1: Interleukin-1

IMACS: Myositis assessment and clinical studies group

IMNM: Immune-mediated necrotizing myopathy

INHBA: Inhibin subunit beta A

MMT8: Manual muscle testing-8

MSTN: Myostatin

MYF5: Myogenic factor 5

MYOG: Myogenin

PGA: Physician global assessment

PM: Polymyositis

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha

TRIM63: Tripartite motif containing 63

## INTRODUCTION

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) are a group of rare autoimmune diseases that can be divided into four subgroups: antisynthetase syndrome (ASyS), dermatomyositis (DM), immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM), and inclusion body myositis (IBM) [1,2]. These subgroups differ in terms of pathogenesis, phenotype and prognosis [3–5].

The major characteristic of IIM is muscle weakness with different degrees of severity being observed between subgroups. ASyS and DM patients have mild to moderate muscle involvement whereas IMNM patients display the most severe muscle weakness with poor recovery of muscle strength after remission [6,7]. While most DM, IMNM, and ASyS patients present with an acute onset of symptoms, IBM is characterised by slowly progressing muscle weakness.

Muscle weakness can be a consequence of both muscle injury due to active inflammation and/or muscle damage with fibrosis, fatty replacement or muscle atrophy [8].

Currently, the International Myositis Assessment and Clinical Studies Group (IMACS) has established core set measures which allow the assessment of disease activity and damage in IIM [9]. However, no easy biomarker is available to identify and evaluate disease activity along with muscle damage. At present, muscle enzymes, such as creatine kinase (CK), are routinely used as surrogate biomarkers, and while their level correlates well with activity in IMNM [7], it lacks accuracy for the other subgroups [10].

Myostatin is a protein from the transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )-1 family, mainly secreted by skeletal muscle, which acts as a negative regulator of muscle mass [11,12]. It has already been shown to be correlated with clinical evaluation of disease activity in IIM [13] and decreased in muscle-wasting diseases [14].

In this study, our aim is first to determine whether the myostatin level could be an appropriate marker to assess disease activity and secondly if it can be used to distinguish disease activity from muscle damage.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

A total of 300 patients with IIM and 59 healthy donors (HD) were enrolled in the study. IIM patients were prospectively enrolled between 2013 and 2019 in a tertiary centre of IIM (Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France). They fulfilled the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for myositis [15]. Patients were classified into the four IIM categories: IBM patients following Lloyd's criteria [3], IMNM patients following the European Neuromuscular Centre criteria [4], DM following the European Neuromuscular Centre criteria [5], and ASyS patients based on the presence of antisynthetase autoantibodies.

Sera were collected at diagnosis or during follow-up and kept in our biobank MASC (Myositis, DNA, Serum, Cells, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04637672). Ninety-six patients had two or more serum samples at different time points, giving a total of 447 samples for the 300 patients.

Healthy donor samples were obtained from a French blood bank (Etablissement Français du Sang ref: C CPSL UNT- N°18/EFS/033).

### **Disease Activity**

IMACS core set measures, Manual Muscle Testing 8 (MMT8) and Physician Global Assessment (PGA) were assessed [16]. Disease activity was evaluated at the time of blood collection, and the results were represented on a numeric scale (from 0 to 10; 0 corresponding to remission without treatment and 10 the maximum disease activity). We arbitrarily defined patients as active when their  $PGA > 5$ . The PGA assessment was performed by two expert physicians independently on 40 patients with a 92.1% concordance. The rest of the cohort was assessed by one or the other.

### **Myostatin, creatinine and creatine kinase measurements**

Sera were quickly frozen after centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysed. Samples were thawed only once to avoid freeze and thaw cycles. Myostatin serum levels were assessed using a commercially available ELISA kit (R&D Systems DGDF80, Minneapolis, USA) following the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 450 nm using a Spark plate reader (Tecan, Switzerland).

Creatinine and creatine kinase measurements were performed at the time of blood collection for IIM patients by the clinical biochemical laboratory as a routine procedure at the Pitié



Salpêtrière Hospital. For HD, creatinine was measured at the time of serum myostatin on thawed serum samples. One patient with kidney dysfunction was excluded from the creatinine analysis (n=1).

### **Transcriptomic analysis of the myostatin pathway signature**

Twenty-four muscle samples were collected for diagnostic purposes: 18 IIM patients (6 DM, 6 IMNM, and 6 IBM), and 6 patients with normal muscle histopathology. Muscle samples were frozen in pre-cooled isopentane. RNA was extracted from 20 frozen sections (20 µm) using QIAzol Lysis reagent and RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's protocol. Non-strand-oriented libraries were prepared following the NEBNext single cell/Low input RNA library prep kit protocol from NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), starting from 20 ng of high-quality total RNA. Paired-end (2×75 bp) sequencing was performed on an Illumina Nextseq 500 platform.

A myostatin pathway signature was defined based on articles and reviews [17–20]. We looked at the myostatin gene (*MSTN*) along with genes that can be 1) regulated by myostatin (*MYOG*: *myogenin* and *MYF5*: *myogenic factor 5*, two genes involved in the myogenesis and downregulated by myostatin, or *TRIM63*: *Tripartite Motif Containing 63* and *FBXO32*: *F-box Protein 32*, two atrogenes upregulated by myostatin) or 2) regulators of myostatin (*FST*: *follistatin*, *INHBA*: *inhibin subunit beta A*, *DCN*: *decorin*).

### **Statistical analyses**

Data are expressed as median with the interquartile range. The Mann-Whitney test was used to compare two groups. Three or more groups were compared using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Correlation analyses were done using Spearman's rank correlation coefficient. For correlations, *r* between 0.2 and 0.39 was considered a weak correlation, *r* between 0.4 and 0.59 a moderate one, and *r* more than 0.6 a strong one. *P*<0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA).

Multivariate linear regression analyses were performed to determine the association of myostatin, CK levels, creatinine, age, or treatment (binary outcome: treated or non-treated) with MMT8 or PGA at the first time-point of blood sampling. Myostatin, creatinine, and CK values were standardized prior to analysis. Data were then analysed using R program version 4.0.2 and are expressed as Estimate [IC 95%].

RNA-sequencing analyses were performed using STAR program version 2.7.1a for sequence alignment. Data were then analysed using R program version 4.0.2 and are expressed as log2

fold change (Log2FC), adjusted p-value. A cut-off at  $p < 0.05$  was applied. Data are represented using GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## RESULTS

### Concentration of myostatin in the serum of IIM patients vs controls

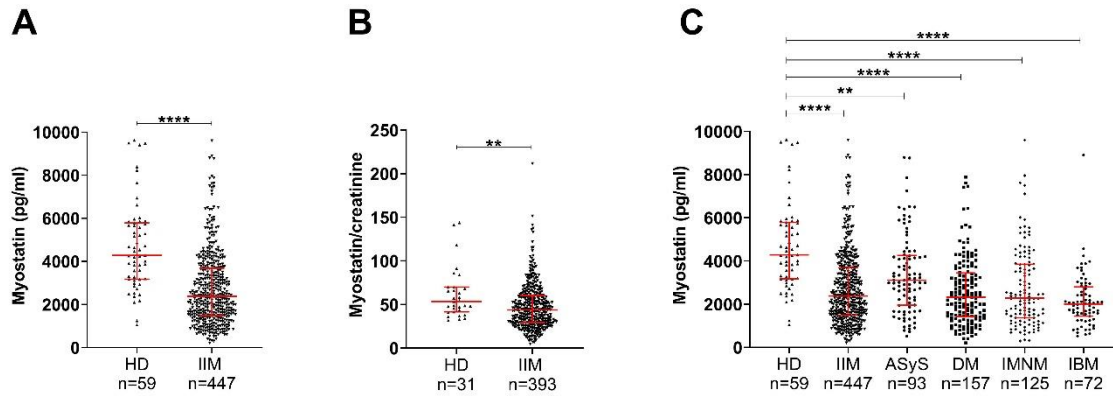
Age, sex and clinical characteristics of each subgroup and HD are provided in **Table 1**.

**Table 1: Patients' and HD characteristics at the first time-point of blood sampling**

	ASyS	IMNM	DM	IBM	HD
<b>N</b>	64	85	87	64	59
<b>Age (year)</b>	48 [34.25; 60]	51 [35.5; 63]	53 [42; 66]	65.5 [59; 74]	45 [34; 54]
<b>Sex M/F</b>	20/44	23/62	20/67	32/32	41/18
<b>Treatment GC (treated/non-treated)</b>	38/24	47/32	56/21	4/45	NA
<b>Dose GC (mg/day)</b>	15 [5.5; 40]	7.5 [5; 20]	15 [7; 42.5]	8 [5.5; 17.25]	NA
<b>CK (UI/L)</b>	394 [126.3; 1483] n=60	908 [310.5; 3311] n=81	126 [55.75; 380] n=82	408.5 [263.3; 661] n=60	NA
<b>PGA (min 0-max 10)</b>	6 [3; 7] n=61	6 [5; 7] n=83	6 [3; 7] n=87	ND	NA
<b>MMT8 (min 0-max 150)</b>	150 [142; 150] n=59	141 [122; 148] n=77	142 [130; 150] n=76	138 [131.5; 146] n=53	NA
<b>Creatinine (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	62 [49; 71] n=55	46 [35; 55] n=74	56.5 [44.25; 68.75] n=80	51 [39; 66] n=53	84 [71; 89] n=31

GC: glucocorticoids, M/F: male/female, CK: creatine kinase, MMT8: manual muscle testing 8, PGA: physician global assessment, ASyS: anti-synthetase syndrome, IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy, DM: dermatomyositis, IBM: inclusion body myositis, HD: healthy donors, ND: not done, NA: not available

Myostatin was assessed in the 447 serum samples from 300 IIM patients and compared to 59 HD. At the protein level, the amount of myostatin was significantly decreased in IIM patients compared to HD (2379 [1490; 3678] pg/ml vs 4281 [3169; 5787] pg/ml;  $p < 0.0001$ ) (**Fig 1A**). It should be noted that patients were slightly younger in the HD group compared to IIM (age: 45 [34; 54] vs 56 [42; 66.75]  $p < 0.0001$ ) and the sex ratio was different (sex ratio male 32% IIM vs 69% HD;  $p < 0.0001$ ). We observed that myostatin did not correlate with age in IIM ( $r = -0.03$ ;  $p = 0.49$ ) (**Supp Fig1A**). There was however a weak positive correlation between myostatin and age for HD (**Supp Fig 1B**). Our IIM patients were slightly older than HD but myostatin levels were decreased. In IIM, myostatin levels were slightly decreased in women compared to men (2192 [1367; 3440] pg/ml vs 2658 [1664; 3967] pg/ml;  $p = 0.0175$ ) (**Supp Fig1C**). There was however no difference between men and women in the HD population (**Supp Fig1D**).



### Figure 1: Quantification of circulating myostatin in IIM compared to HD

Circulating myostatin levels measured in HD and IIM patients sera (A), normalization of myostatin to creatinine levels (B) and circulating myostatin levels in the 4 IIM patients subgroups sera (C).

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

HD: healthy donors, IIM: idiopathic inflammatory myopathies, ASyS: antisynthetase syndrome, IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy, DM: dermatomyositis, IBM: inclusion body myositis

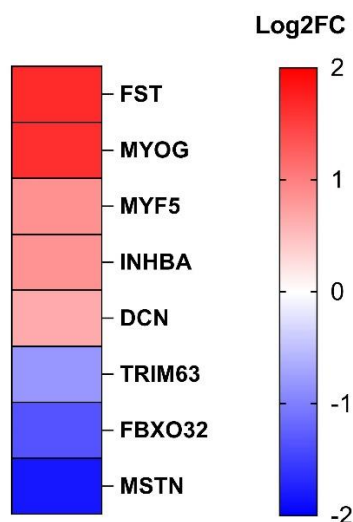
Since myostatin is a protein mainly secreted by skeletal muscle [11,12], in order to confirm that this decrease in myostatin did not reflect a difference in muscle mass due to other factors such as age, sex and/or physical training of the patients, the results were normalized to creatinine. In healthy individuals with stable kidney function, serum creatinine levels correlate with muscle mass [21–24]. Thus, it was used in our study as a surrogate marker of muscle mass. A moderate correlation was found between myostatin and serum creatinine levels ( $r=0.51$ ;  $p < 0.0001$ ; data not shown). After normalization, the level of myostatin was still statistically significantly lower in IIM patients compared to HD (43.73 [29.25; 60.24] vs 53.51 [41.64; 69.97];  $p=0.002$ ) (Fig 1B).

The level of myostatin was also assessed in each of the 4 myositis subgroups and again compared to HD (ASyS  $n=93$ , DM  $n=157$ , IMNM  $n=125$ , IBM  $n=72$ ). Myostatin levels were lower in ASyS (3109 [1952; 4258] pg/ml;  $p=0.001$ ), DM (2327 [1431; 3446] pg/ml;  $p < 0.0001$ ), IMNM (2285 [1371; 3851] pg/ml;  $p < 0.0001$ ) and IBM (2005 [1449; 2803] pg/ml;  $p < 0.0001$ ) compared to HD (4281 [3169; 5787] pg/ml) (Fig1C).

### Transcriptomic analysis of the myostatin pathway

Because myostatin is mainly produced by skeletal muscle, the decrease in blood might be consequent to a drop in myostatin production and subsequently be linked to the downregulation of pathways related to its expression in muscle tissue. In order to test this hypothesis, transcriptomic analysis was carried out on muscle biopsies from 18 IIM patients (6

DM, 6 IMNM, and 6 IBM) and 6 healthy controls (**Fig2**). Analysis of the differentially expressed genes showed downregulation of myostatin (*MSTN*) in all IIM patient biopsies compared to healthy controls ( $\log_2FC=-1.83$ ;  $p=0.0005$ ). The expression of several genes, related to the myostatin pathway varied in accordance with this down-regulation. We observed an upregulation of the myogenesis proteins, myogenin (*MYOG*) ( $\log_2FC=1.62$ ;  $p<0.0001$ ) and myogenic factor 5 (*MYF5*) ( $\log_2FC=0.86$ ;  $p=0.04$ ), normally downregulated by myostatin. We also show a downregulation of the atrophy genes F-box only protein 32 (*FBXO32*) ( $\log_2FC=-1.35$ ;  $p<0.0001$ ) coding for the protein atrogin, along with E3 ubiquitin-protein ligase *TRIM63* ( $\log_2FC=-0.82$ ;  $p=0.02$ ) coding for the protein MuRF1. These two genes are usually activated by myostatin. Moreover, follistatin (*FST*) ( $\log_2FC=1.66$ ;  $p<0.0001$ ), inhibin subunit beta A (*INHBA*) ( $\log_2FC=0.84$ ;  $p=0.04$ ) coding the activin A subunit inhibin  $\beta A$  and decorin (*DCN*) ( $\log_2FC=0.65$ ;  $p=0.03$ ), all of which are inhibitors or agonists of myostatin, were found to be upregulated.



**Figure 2: Myostatin gene pathway expression in IIM vs HD**

Transcriptomic analysis of myostatin pathway when comparing 18 IIM muscle biopsies (6 DM, 6 IBM, 6 IMNM) vs 6 controls. Data are expressed as  $\log_2FC$ .

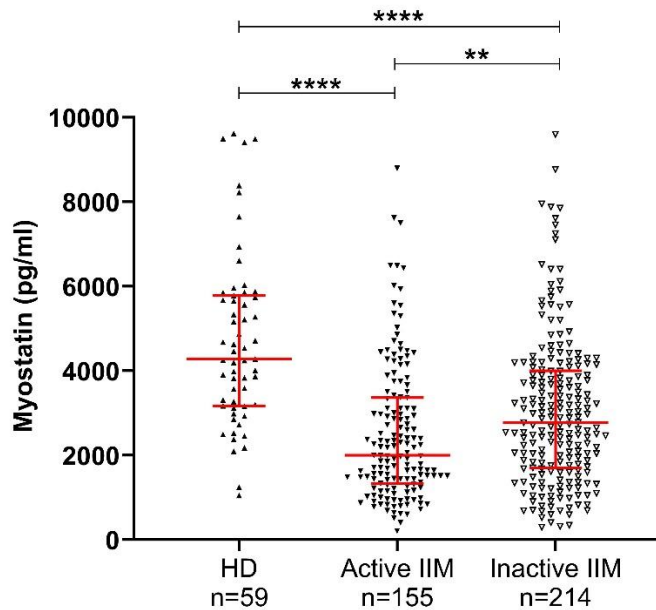
*FST*: follistatin, *MYOG*: myogenin, *MYF5*: myogenic factor 5, *INHBA*: inhibin subunit beta A, *DCN*: decorin, *TRIM63*: Tripartite Motif Containing 63, *FBXO32*: F-box Protein 32, *MSTN*: myostatin

Among the 18 patients used for the muscle biopsy study, 7 had myostatin measurements at the same time: 2 DM, 2 IBM, and 3 IMNM. Circulating myostatin levels in these 7 patients were significantly decreased compared to HD (1539 [800.7;3877] pg/ml vs 4281 [3169;5787] pg/ml;  $p<0.005$ ; data not shown).

Altogether, these results support a downregulation of the myostatin pathway in the muscle, which shows that the decreased level of myostatin detected in the serum mirrors its activity within the muscle compartment.

### Myostatin and IIM disease activity

Based on the Physician Global Assessment, IIM patients were divided into active and inactive patients. IBM patients were excluded from this analysis since their PGA cannot be established. Inactive IIM patients were found to have higher myostatin levels compared to active ones (2778 [1701; 4005] pg/ml vs 2003 [1338; 3366] pg/ml;  $p=0.006$ ) but were consistently lower than HD myostatin levels (4281 [3169; 5787] pg/ml;  $p<0.0001$ ) (**Fig 3**).



**Figure 3: Myostatin levels in active and inactive IIM patients compared to HD**

Circulating myostatin levels measured in HD and in inactive or active IIM patients. Patients with a PGA >5 were considered active.

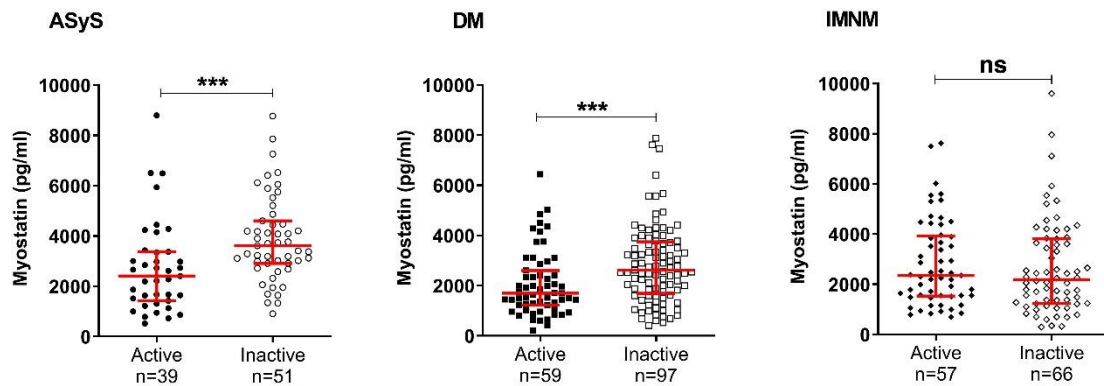
\*\* $p<0.01$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$

HD: healthy donors, IIM: idiopathic inflammatory myopathies

The myostatin gene promoter contains glucocorticoid response elements that can induce myostatin expression [25,26]. Disease control in inactive patients may have been achieved using glucocorticoids. Thus, we wanted to check if there was a correlation between myostatin levels and glucocorticoid doses. No correlation between the two was observed ( $r=-0.1883$   $p=0.0032$ ) (**Supp Fig 2**).

The comparison between subgroups showed that ASyS and DM inactive patients had higher myostatin levels compared to their active counterparts (3611 [2910; 4603] pg/ml vs 2407 [1420; 3366] pg/ml;  $p=0.0004$ , and 2618 [1690; 3749] pg/ml vs 1697 [1227; 2606] pg/ml;  $p=0.0005$  respectively) (**Fig 4**). ASyS inactive patients even reached the myostatin level of HD (3611 [2910; 4603] pg/ml vs 4281 [3169; 5787] pg/ml;  $p=0.54$ ). However, the myostatin levels

in IMNM patients did not show any difference between inactive and active patients (2186 [1235; 3815] vs 2349 [1518; 3922] pg/ml;  $p=0.4$ )(**Fig 4**).



**Figure 4: Myostatin levels in active vs inactive IIM patients**

Circulating myostatin level measured in inactive or active IIM patients subgroups. Patients with a PGA >5 were considered active.

\*\*\*  $p < 0.001$ , ns: not-significant

ASyS: anti-synthetase syndrome, DM: dermatomyositis, IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy

Following this notable difference in the IMNM subgroups, we wondered if there would be a difference between IMNM patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies. We only had 8 seronegative patients in our cohort so we did not include these patients in the analysis. We did not find a difference between anti-SRP and anti-HMGCR patients (**Supp Fig 3A**) nor between active and inactive patients (**Supp Fig 3B**).

Following univariate analysis, the PGA and myostatin levels showed a weak negative correlation in all IIM patients ( $r=-0.28$ ;  $p < 0.0001$ ) (**Table 2**). By subgroup analysis, a moderate negative correlation was found between myostatin and the PGA for ASyS ( $r=-0.40$ ;  $p < 0.0001$ ), and DM patients ( $r=-0.46$ ;  $p < 0.0001$ ), but no correlation for IMNM patients ( $r=0.0009$ ;  $p=0.99$ ). The MMT8 and myostatin levels had a moderate positive correlation ( $r=0.47$ ;  $p < 0.0001$ ) in IIM patients. By subgroups, there was a weak positive correlation between myostatin and the MMT8 for ASyS ( $r=0.35$ ;  $p=0.0009$ ) and IBM ( $r=0.32$ ;  $p=0.01$ ) patients, and a moderate positive one for DM ( $r=0.5$ ;  $p < 0.0001$ ) and IMNM patients ( $r=0.43$ ;  $p < 0.0001$ ).

**Table 2: Myostatin association with clinical parameters in IIM patients**

		IIM	ASyS	DM	IMNM	IBM
Myostatin	PGA	r=-0.28 p<0.0001	r=-0.40 p<0.0001	r=-0.46 p<0.0001	r=0.0009 p=0.99	NA
	MMT8	r=0.47 p<0.0001	r=0.35 p=0.0009	r=0.5 p<0.0001	r=0.43 p<0.0001	r=0.32 p=0.01

*Univariate correlation analysis between myostatin and PGA or MMT8 in IIM and IIM subgroups*  
MMT8: manual muscle testing of 8 muscles, PGA: physician global assessment, ASyS: antisynthetase syndrome, IIM: idiopathic inflammatory myopathies, IMNM: immune-mediated necrotizing myopathy, DM: dermatomyositis, IBM: inclusion body myositis

Several predictive factors were used in a linear multivariate regression model: CK level, myostatin levels, creatinine levels, treatment, and age at the time of the first sample. For all IIM patients, CK (0.77 [0.53; 1.02]; p<0.0001) and, to a lesser extent, myostatin (-0.46 [-0.77; -0.15]; p=0.003), and age (0.02 [0.004; 0.04]; p=0.01) were independent factors associated with disease activity. Myostatin (2.91 [0.32; 5.5]; p=0.03) and creatinine (7.82 [5.26; 10.39]; p<0.0001) were the two independent factors associated with MMT8 scores (**Table 3**). Only myostatin was a significant independent factor in both models.

**Table 3: Association of CK levels, myostatin, creatinine, age, or glucocorticoid treatment with MMT8 or PGA in IIM patients**

	Myostatin	Creatinine	CK	Age	Treatment
PGA	-0.46 [-0.77;-0.15] p=0.003	-0.08 [-0.4;0.23] p=0.6	0.77 [0.53;1.02] p<0.0001	0.02 [0.004;0.04] p=0.01	-0.53 [-1.08;0.03] p=0.06
MMT8	2.91 [0.32;5.5] p=0.03	7.82 [5.26;10.39] p<0.0001	-1.42 [-3.70;0.87] p=0.22	-0.12 [-0.25;0.007] p=0.06	-0.47 [-4.8;3.87] p=0.83

*Multivariate analysis estimating the association of CK levels, myostatin, creatinine, age, or glucocorticoid treatment (binary outcome: treated or non-treated) with MMT8 or PGA in all IIM patients at their first time-point of blood sampling*  
CK: creatine kinase, MMT8: manual muscle testing of 8 muscles, PGA: physician global assessment

## DISCUSSION

In this study, the level of myostatin was assessed in a large and well-characterized cohort of IIM patients. We showed that myostatin was decreased at the protein level in serum and at the transcriptomic level in muscle biopsies of all IIM patients. Myostatin was also correlated with the PGA and the MMT8. Moreover, myostatin level was higher in inactive IIM patients compared to active ones, except for IMNM patients where it remained unchanged.

Only a few studies have previously examined myostatin in IIM and they are often contradictory [13,14,27–30]. Some results are concordant with our studies [13,14] while others are not [27–30], but the comparison is difficult since there are significant variations in the studied populations (patients number, clinical status and IIM classification).

Among our study's strengths: (i) we had the chance to analyse the largest cohort of patients, (ii) that allowed us to classify patients using the most recent IIM subclassification (4 subgroups) and (iii) we correlated the disease activity with myostatin levels.

Only 2 studies have enrolled more than 1 IIM subgroup. The first one included Polymyositis (PM), DM and IMNM patients and showed decreased circulating myostatin levels as we observed [13]. They however did not observe a decrease at the transcriptomic level but only a dysregulation of the myostatin pathway in general. In the second study, circulating myostatin levels were the same in IIM subgroups (DM and PM) compared to controls [27].

Concerning IIM subgroups, one study found a borderline decrease of myostatin in IBM serum [14]. That might be due to the small number of controls. The decrease was however significant at the transcriptomic level in muscle biopsies, as we observed. Another study found an increase of myostatin protein in IBM muscle but it was trapped in the A $\beta$  peptide aggregates as shown also in another study [29]. For DM patients, a tendency for a decrease in myostatin in the serum was observed, as we demonstrated [13]. However, one other study found upregulation in DM whereas De Sordi *et al.* found no difference at all [27,28]. It should be noted that they studied inactive DM patients whereas we enrolled a high proportion of DM patients with active disease. Regarding IMNM, Vernerová *et al.* observed a tendency to a decrease in circulating myostatin levels, in line with our results [13]. Finally, in PM circulating myostatin levels were also observed to be decreased in 2 studies [13,27]. PM is a heterogenous subgroup composed of both IMNM and ASyS patients consequently, we were not able to compare these results with our study.

The differences in circulating myostatin levels in IIM patients compared to controls and in active compared to inactive patients could have several explanations. We first looked at the effect of glucocorticoid treatment since myostatin might be induced by glucocorticoids [25,26]. However, we did not see any effect of glucocorticoid treatment on myostatin levels, in line with previous studies [13] [27].

Myostatin levels could also depend on muscle mass. This is why we normalized myostatin levels to creatinine levels, as creatinine has been proposed to be a biomarker of muscle mass [21–24]. Circulating myostatin levels were still decreased even after this normalization.



However, creatinine normalization has some limitations, as it is also a biomarker of kidney clearance and function. Other studies have normalized circulating myostatin levels to either the body mass index or dual-energy x-ray absorptiometry results, but using this approach, no significant association between myostatin levels and lean muscle mass was observed [13,27]. The association of myostatin and muscle mass has not yet been clearly demonstrated, probably because muscle mass is difficult to assess. Sex and age correlations with myostatin levels are also still debated since they may also influence muscle mass [31].

Myostatin levels can be modified by inflammation. The decrease in circulating myostatin levels we observed could be due to an increase in follistatin, antagonizing its action [32]. Follistatin can be upregulated during inflammation by activin as well as by other cytokines, such as IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  [19]. These cytokines are indeed increased in IIM, especially during the active phase of the disease [33,34], suggesting a link between myostatin level and disease activity.

Interestingly, in our study, IMNM patients showed a distinct profile with the same circulating myostatin levels in patients with active or inactive disease. IMNM patients have the most severe muscle damage and the worst recovery among the IIM, with only half of them recovering after treatment [6,35,36]. This difference with the other IIMs, as discussed above, could be due, to a reduced muscle mass due to fibro-fatty replacement but we cannot rule out a persistent low disease activity.

There is a critical need to distinguish disease activity from muscle damage, and myostatin individual variations would have to be studied in more depth for this purpose.

Myostatin has already been used to monitor disease progression and treatment efficacy in Duchenne muscular dystrophy and Myotubular myopathy [37,38]. Myostatin was decreased at baseline in these two diseases and increased in treated animal models [37,38].

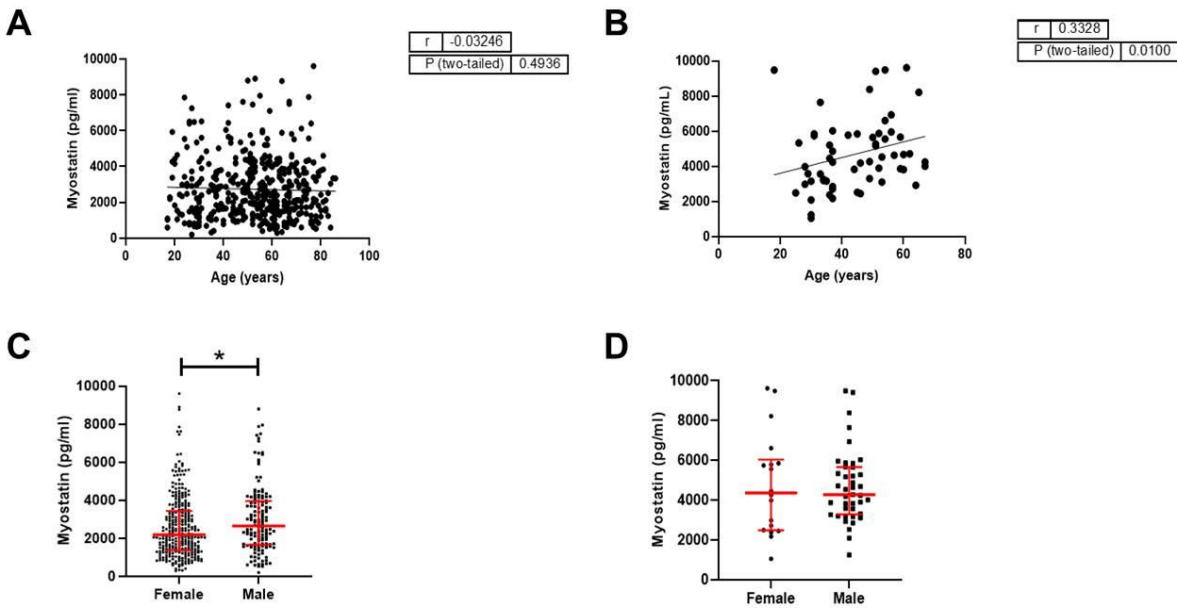
Our study has limitations. We are limited by the retrospective aspect of our study, especially with no sampling calendar and no systematic follow-up. We have also only used the PGA, MMT8 and CK levels to assess disease activity and not all core set measures of IMACS. The PGA in particular can be subjective, but we made sure of the concordance between different assessors and selected a cut-off at 5 to make sure the disease was active.

## **CONCLUSION**

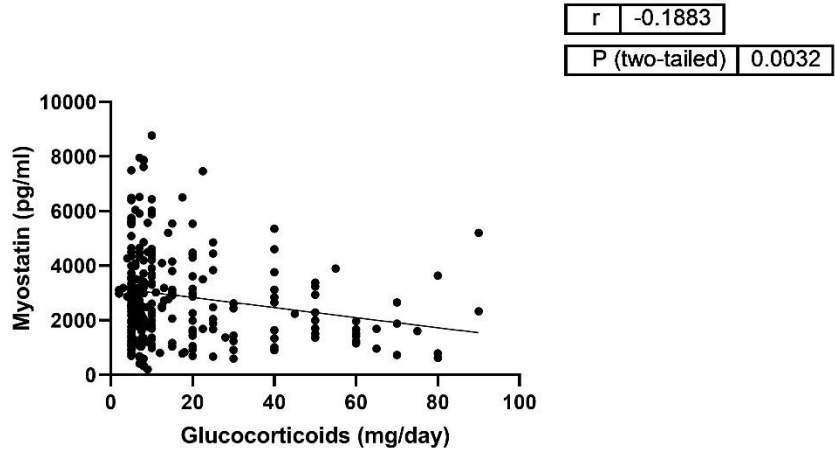
To conclude, in a large cohort of IIM patients, this study shows a decrease in the level of circulating myostatin and muscle myostatin RNA. Circulating myostatin levels are lower in

active ASyS and DM patients and increase when the disease is controlled. Myostatin could therefore be used as a biomarker of disease activity in these subgroups. However, in IMNM patients, myostatin levels did not change with disease activity, suggesting specific underlying pathomechanisms in IMNM explaining the poor outcome of these patients. Further prospective studies are needed to validate the usefulness of myostatin in the follow-up of myositis patients.

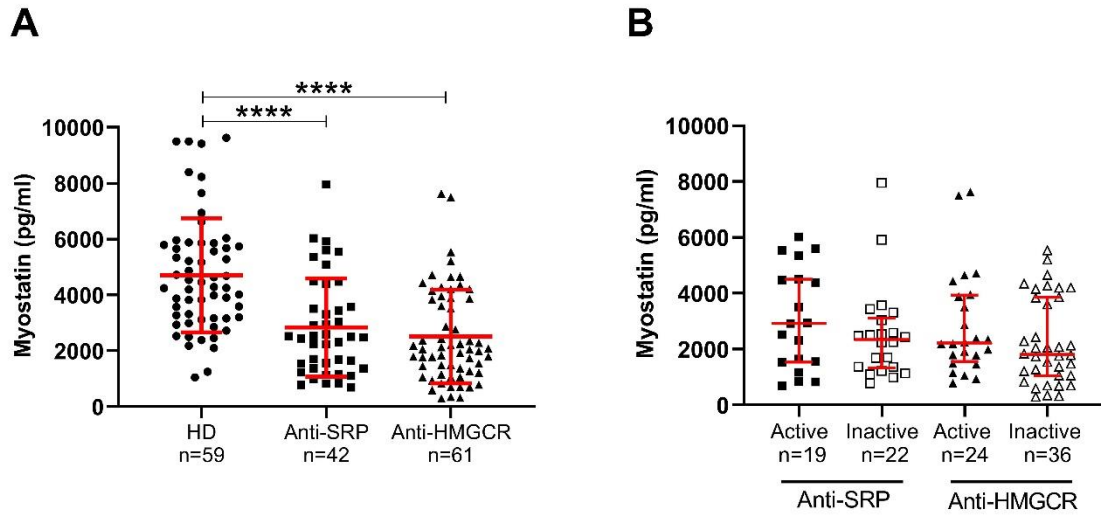
**Supplemental Figures:**



**Supplemental Figure 1: Effects of age and sex on myostatin levels**  
 Correlation between circulating myostatin levels and age for IIM patients (A) and HD (B) and myostatin circulating levels difference between female and men for IIM (C) and HD (D). \*p<0.05



**Supplemental Figure 2: Myostatin and glucocorticoids levels correlation**  
 Correlation between circulating myostatin levels and glucocorticoids for IIM patients.



**Supplemental Figure 3: Myostatin circulating levels in anti-SRP and anti-HMGCR IMNM patients**

Circulating myostatin levels in IMNM patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies compared to controls (A) and in active or inactive patients (B). Patients with a PGA >5 were considered active.

\*\*\*\* $p < 0.0001$

**Acknowledgements:** We would like to thank Franck Letourneur and Benjamin Saintpierre at GENOM'IC facility Core for their help with the RNA-seq experiment and analysis, the Myobank for samples preservation, Pr Dominique Rousselot and Dr Rana Alkhouri from the Metabolic biochemistry service of Pitié Salpêtrière for their help with creatinine dosage and Vincent Mouly for his advice and fruitful discussions. We thank the Association Française contre les Myopathies (AFM) for supporting this work.

**Competing Interests:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** No funding was obtained for this work.

**Ethical statement:** Written informed consent from each patient and approval by the local Ethics Committee (CPP Ile de France VI (2013-12-19), by the Ministry of Research (CCTIRS N°14.323), and from the National Commission on Informatics and Liberties (AR158656) were obtained.

We also received research authorization for the database from the National Commission on Informatics and Liberties (authorization number 915139).

**Contributors:** AM, YA, and OB contributed to the study design; AM did the ELISA experiments; AM, CA, and HK performed data analysis; CA performed the RNA bulk experiment assay; DA, CA, NT, and AM contributed to the samples banking; LB, MS, AM retrieved patients information from their clinical files; AM, YA, OB drafted the manuscript, all authors revised and approved the final version of the manuscript.

## BIBLIOGRAPHY

1. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, 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
2. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, et al. Machine learning algorithms reveal unique gene expression profiles in muscle biopsies from patients with different types of myositis. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(9):1234-1242. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216599
3. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology.* 2014;83(5):426-433. doi:10.1212/WNL.0000000000000642
4. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(1):87-99. doi:10.1016/j.nmd.2017.09.016
5. Mammen AL, Allenbach Y, Stenzel W, et al. 239th ENMC International Workshop: Classification of dermatomyositis, Amsterdam, the Netherlands, 14–16 December 2018. *Neuromuscular Disorders.* 2020;30(1):70-92. doi:10.1016/j.nmd.2019.10.005
6. Tiniakou E, Pinal-Fernandez I, Lloyd TE, et al. More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(5):787-794. doi:10.1093/rheumatology/kew470
7. Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Preusse C, et al. Necrosis in anti-SRP+and anti-HMGCR+myopathies: Role of autoantibodies and complement. *Neurology.* 2018;90(6):e507-e517. doi:10.1212/WNL.0000000000004923
8. Landon-Cardinal O, Koumako C, Hardouin G, et al. Severe axial and pelvifemoral muscle damage in immune-mediated necrotizing myopathy evaluated by whole-body MRI. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(6):1437-1440. doi:10.1016/j.semarthrit.2020.02.009
9. Rider LG, Werth VP, Huber AM, et al. Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ), Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS), Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT), Disease Activity Score (DAS), Short Form 36 (SF-36), Child Health Questionnaire (CHQ), physician global damage, Myositis Damage Index (MDI), Quantitative Muscle Testing (QMT), Myositis Functional Index-2 (FI-2), Myositis Activities Profile (MAP), Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS), Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), Cutaneous Assessment Tool (CAT), Dermatomyositis Skin Severity Index (DSSI), Skindex, and Dermatology Life Quality Index (DLQI). *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63 Suppl 11:S118-157. doi:10.1002/acr.20532
10. Mathur T, Manadan AM, Thiagarajan S, Hota B, Block JA. The utility of serum aldolase in normal creatine kinase dermatomyositis. *J Clin Rheumatol.* 2014;20(1):47-48. doi:10.1097/RHU.0000000000000062

11. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12457-12461. doi:10.1073/pnas.94.23.12457
12. Deng B, Zhang F, Wen J, et al. The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:29. doi:10.1186/s12986-017-0179-1
13. Vernerová L, Horváthová V, Kropáčková T, et al. Alterations in activin A–myostatin–follistatin system associate with disease activity in inflammatory myopathies. *Rheumatology*. 2020;59(9):2491-2501. doi:10.1093/rheumatology/kez651
14. Mariot V, Joubert R, Hourdé C, et al. Downregulation of myostatin pathway in neuromuscular diseases may explain challenges of anti-myostatin therapeutic approaches. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/s41467-017-01486-4
15. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):1955-1964. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211468
16. Rider LG, Aggarwal R, Machado PM, et al. Update on outcome assessment in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(5):303-318. doi:10.1038/nrrheum.2018.33
17. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9306-9311. doi:10.1073/pnas.151270098
18. Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, et al. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011;301(6):C1316-C1324. doi:10.1152/ajpcell.00114.2011
19. Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity. In: *Vitamins & Hormones*. Vol 85. Elsevier; 2011:255-297. doi:10.1016/B978-0-12-385961-7.00013-5
20. Verzola D, Barisione C, Picciotto D, Garibotto G, Koppe L. Emerging role of myostatin and its inhibition in the setting of chronic kidney disease. *Kidney International*. 2019;95(3):506-517. doi:10.1016/j.kint.2018.10.010
21. Baxmann AC, Ahmed MS, Marques NC, et al. Influence of Muscle Mass and Physical Activity on Serum and Urinary Creatinine and Serum Cystatin C. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(2):348-354. doi:10.2215/CJN.02870707
22. Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, Smith J, Moffitt S. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr*. 1983;37(3):478-494. doi:10.1093/ajcn/37.3.478
23. Keshaviah PR, Nolph KD, Moore HL, et al. Lean body mass estimation by creatinine kinetics. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4(7):1475-1485.
24. Patel SS, Molnar MZ, Tayek JA, et al. Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4(1):19-29. doi:10.1007/s13539-012-0079-1
25. Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(6):E1128-1136. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1128

26. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003;285(2):E363-E371. doi:10.1152/ajpendo.00487.2002
27. de Sordi CM, dos Reis-Neto ET, Keppeke GD, Shinjo SK, Sato EI. Serum Myostatin and Follistatin Levels in Patients With Dermatomyositis and Polymyositis. *J Clin Rheumatol*. 2022;28(1):33-37. doi:10.1097/RHU.0000000000001806
28. Kerschman-Schindl K, Gruther W, Föger-Samwald U, Bangert C, Kudlacek S, Pietschmann P. Myostatin and markers of bone metabolism in dermatomyositis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2021;22(1):150. doi:10.1186/s12891-021-04030-0
29. Sachdev R, Kappes-Horn K, Paulsen L, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Myostatin High Molecular Weight Aggregates and Impairs Mature Myostatin Secretion. *Mol Neurobiol*. 2018;55(11):8355-8373. doi:10.1007/s12035-018-0997-9
30. Wójcik S, Engel WK, McFerrin J, Askanas V. Myostatin is increased and complexes with amyloid- $\beta$  within sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Acta Neuropathol*. 2005;110(2):173-177. doi:10.1007/s00401-005-1035-3
31. Baczek J, Silkiewicz M, Wojszel ZB. Myostatin as a Biomarker of Muscle Wasting and other Pathologies-State of the Art and Knowledge Gaps. *Nutrients*. 2020;12(8). doi:10.3390/nu12082401
32. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, et al. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol*. 2004;270(1):19-30. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.046
33. De Bleecker JL, Meire VI, Declercq W, Van Aken EH. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies1This paper was presented at the 50th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Minneapolis, MN, USA, April 1998.1. *Neuromuscular Disorders*. 1999;9(4):239-246. doi:10.1016/S0960-8966(98)00126-6
34. Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis & Rheumatism*. 1997;40(5):865-874. doi:10.1002/art.1780400514
35. Pinal-Fernandez I, Parks C, Werner JL, et al. Longitudinal Course of Disease in a Large Cohort of Myositis Patients With Autoantibodies Recognizing the Signal Recognition Particle. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(2):263-270. doi:10.1002/acr.22920
36. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Carrino JA, et al. Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(4):681-687. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210198
37. Mariot V, Le Guiner C, Barthélémy I, et al. Myostatin Is a Quantifiable Biomarker for Monitoring Pharmaco-gene Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;18:415-421. doi:10.1016/j.omtm.2020.06.016
38. Koch C, Buono S, Menuet A, et al. Myostatin: a Circulating Biomarker Correlating with Disease in Myotubular Myopathy Mice and Patients. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;17:1178-1189. doi:10.1016/j.omtm.2020.04.022





## **Résultats 2: Exploring immune-mediated necrotizing myopathy pathogenesis using spatial transcriptomics**

### *Résumé de l'étude*

La physiopathologie des patients atteints de MNAI est caractérisée par une nécrose des fibres musculaires répartie de manière aléatoire, des dépôts de protéines du complément sur des fibres non-nécrotiques et un infiltrat inflammatoire modéré composé principalement de macrophages (Allenbach et al., 2018b). Les patients ont également une infiltration fibro-adipeuse importante, surtout si la maladie n'a pas été traitée dès le début des symptômes (Landon-Cardinal et al., 2020; Pinal-Fernandez et al., 2017b). A cause de cette infiltration fibro-adipeuse notamment, les patients MNAI récupèrent moins bien que les autres patients atteints de MII (Pinal-Fernandez et al., 2017a; Tiniakou et al., 2017).

Une analyse de RNAseq a été réalisée et a caractérisé les patients MNAI seulement sur la présence d'une signature de régénération, que les autres MII présentaient aussi, et l'absence d'une signature inflammatoire contrairement aux autres MII (Pinal-Fernandez et al., 2020). Les MNAI n'avaient donc pas de signature transcriptomique spécifique.

Le but de cette étude était de mieux comprendre la physiopathologie des MNAI et plus particulièrement de décrire la nécrose et de comprendre l'origine du remplacement fibro-adipeux.

Pour cela, la technique de la transcriptomique spatiale a été utilisée. Cette technique permet d'obtenir le transcriptome de domaines tissulaires de 55µm pouvant contenir jusqu'à une dizaine de cellules et de les visualiser sur les coupes de biopsie. En comparaison des contrôles et d'autres MII, les gènes enrichis chez les MNAI correspondent à des signatures immunitaires avec des gènes de réponse à l'interféron et de macrophages ainsi qu'une signature de régénération avec l'expression de gènes de la MEC. Les zones nécrotiques sur les biopsies ont ensuite été sélectionnées. Les zones nécrotiques des MNAI étaient différentes de celles des autres myosites et présentaient une surexpression de gènes de régénération, macrophagiques, de protéines du complément et de réponse à l'interféron. La particularité transcriptomique des MNAI serait donc leur nécrose. Afin d'étudier plus en détails ces signatures caractéristiques, les biopsies MNAI ont été comparées aux contrôles. La signature macrophagique a révélé deux types de macrophages distincts, des M1 et des M2 et les signaux de régénération la présence

de progéniteurs fibro-adipeux (FAPs). Ces progéniteurs peuvent être dérégulés et participer à la fibrose dans un environnement inflammatoire riche en TGF- $\beta$  comme c'est le cas chez les MNAI. Les FAPs ont alors été étudiés dans les MNAI comparé aux contrôles. Les coupes musculaires de patients MNAI présentaient plus de fibrose et également plus de FAPs. *In vitro*, ces FAPs n'avaient cependant pas une signature transcriptomique différente des FAPs MNAI. Des expériences complémentaires restent cependant encore à être menées. Les protéines du complément sont également exprimées dans les clusters macrophagiques et fibrotique.

Le dommage chronique causé par la nécrose entraînerait alors un environnement inflammatoire continu avec des macrophages pro-inflammatoires participant au dommage musculaire et des macrophages anti-inflammatoires participant à l'activation des FAPs et au remplacement fibro-adipeux.

Ce travail donnera lieu à un article et sera soumis au journal *Acta Neuropathologica*.

## **Exploring immune-mediated necrotizing myopathy pathogenesis using spatial transcriptomics**

Alexandrine Mahoudeau<sup>1#</sup>, Julian Dal Cin<sup>1#</sup>, Mona Bensalah<sup>1</sup>, Laura Muraine<sup>1</sup>, Céline Anquetil<sup>1</sup>, Damien Amelin<sup>3</sup>, Lois Bolko<sup>2</sup>, Bérénice Tendrel<sup>1</sup>, Virginie Tardif<sup>1</sup>, Kubéraka Mariampillai<sup>2,3</sup>, Angéline Madelaine<sup>4</sup>, Sarah Léonard-Louis<sup>4</sup>, Elisa Negroni<sup>1</sup>, Capucine Trollet<sup>1</sup>, Olivier Benveniste<sup>1,2</sup>, Yves Allenbach<sup>1,2</sup>

Corresponding author: yves.allenbach@aphp.fr

# co-first authors

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, Center of Research in Myology, UMRS 974, 75013 Paris, France

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

<sup>3</sup>Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Center of Research in Myology, UMRS 974, 75013 Paris, France

<sup>4</sup>Reference Center for Neuromuscular Disorders, APHP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

## ABSTRACT

Immune-mediated necrotizing myopathies (IMNM) are characterized by muscle fibers necrosis, complement deposits on non-necrotic muscle fibers and few macrophagic inflammatory infiltrates. Frequently patients exhibit muscle damage with fibro-fatty replacement explaining the poor muscle strength recovery. The pathogenesis of IMNM is not well understood.

To decipher IMNM pathogenesis we performed spatial transcriptomics analysis. This method allows the obtention of tissular domains gene expression and their localization on muscle biopsies.

A regenerative and inflammatory gene expression profile emerged in IMNM with the expression of extracellular matrix, interferon, and macrophages genes compared to healthy donor (HD) and other myositis biopsies. IMNM necrotic domains also presented a characteristic signature with the expression of extracellular matrix, interferon, complement and macrophages genes.

To better characterize this signature, IMNM muscle was compared to HD. The immune signature was composed of pro and anti-inflammatory macrophages and, from the regeneration signature, emerged a population of fibro-adipogenic progenitors. IMNM muscles displayed more fibro-adipogenic progenitors and more fibrosis than HD. When cultured *in vitro* however, the progenitors did not show specificities compared to HD ones.

The necrotic muscle domains are associated with an immune and regenerative environment where the presence of complement, interferon and macrophages could activate fibro-adipogenic progenitors leading to the fibro-fatty replacement in case of uncontrolled IMNM disease activity.

## INTRODUCTION

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) are characterized by skeletal muscle autoimmune involvement. Immune-mediated necrotizing myopathies (IMNM) have the most severe and rapidly disabling muscle involvement among IIM subgroups. IMNM patients have a poor outcome with difficulties to recover muscle strength after remission [1,2]. Muscle involvement with fibro-fatty replacement and atrophy is particularly visible in MRI and depends on the time before treatment and disease duration [3,4].

Other IIM subgroups are characterized by important extra-muscular manifestations: the skin in dermatomyositis (DM) and the lung in anti-synthetase syndrome (ASyS). Inclusion body myositis (IBM) are a particular subgroup, characterized by an isolated and slowly progressive muscle involvement with inflammatory and regenerative mechanisms.

IMNM are histologically characterized by the predominance of necrotic and regenerative muscle fibers, associated with few inflammatory infiltrates mostly composed of macrophages and complement deposits on non-necrotic fibers whereas other IIM combine lymphocytic and macrophagic muscle infiltrates with muscle fiber damages [5]. However, necrotic muscle fibers are sparse in IMNM (low frequency of 2-4%) but regenerative features are more frequent (14-17%) [5].

Accordingly, bulk transcriptomic analysis in IMNM only showed an over-expression of muscle fiber regenerative genes and failed to identify an inflammatory gene profile (compared to IIM subgroups) [6].

IMNM patients are also characterized by the presence of anti-SRP and anti-HMGCR specific auto-antibodies [7]. These auto-antibodies have a potential pathogenic role by inducing muscle fiber atrophy and fusion defects *in vitro* and a loss of muscle strength and necrosis *in vivo* in the presence of complement [8,9]. Their titer also correlates with the disease activity [10,11].

To clarify the pathomechanism of muscle damages (muscle fibers necrosis and fibro-fatty replacement) in IMNM, we analyzed different muscular domains transcriptomic profiles according to their morphological characteristics (muscle necrosis).

## MATERIAL AND METHODS

### *Patients and samples*

IIM patients were prospectively enrolled between 2013 and 2021 in a tertiary center of IIM (Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France). They fulfilled the American College of Rheumatology /European League Against Rheumatism classification criteria for myositis [12]. Patients were classified into the four IIM categories: IBM patients following Lloyd's criteria [13], IMNM patients following the European Neuromuscular Centre criteria [7], DM following the European Neuromuscular Centre criteria [14], and ASyS patients based on the presence of antisynthetase autoantibodies criteria. Muscle biopsies were performed for diagnosis purpose.

Sera were collected at diagnosis or during follow-up and kept in our biobank MASC (Myositis, DNA, Serum, Cells, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04637672). Healthy donor blood samples were obtained from a French blood bank (Etablissement Français du Sang ref: C CPSL UNT-N°18/EFS/033).

Human muscle biopsies used in this study to obtain myoblasts for cell cultures were obtained via Myobank-AFM (affiliated with EuroBioBank, in accordance with European recommendations and French legislation (authorization AC-2019-3502)), for muscle diagnosis in Pitié Salpêtrière hospital or Henri Mondor hospital (kindly donated by François-Jérôme Authier's team).

### *Spatial transcriptomics*

IMNM (n=4), HD (n=5) and other myositis (ASyS n=2, DM n=3, IBM n=3) muscle biopsies were used. Optimal parameters for tissue permeabilization of 6 minutes for skeletal muscle tissue were determined with Visium Spatial Tissue Optimization kit according to the manufacturer's instructions (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA). Sections from frozen muscle samples (10µm) were stained with hematoxylin and eosin and processed following the manufacturer's recommendations using the Visium Spatial Gene Expression kit (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA). Visium libraries were sequenced four samples at a time on the GENOM'IC platform using a NextSeq Illumina sequencer at a sequencing depth going from 40M to 100M read-pairs per sample depending on the section size.

H&E staining images were performed on a Nikon Eclipse Ti2 at 20X magnification as recommended by the manufacturer. After image acquisition, image tiles were stitched together with the microscope's native software (NIS-Elements).

### *Immunostaining*

IMNM (n=7) and HD (n=7) 10 µm slices were stained. Frozen sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and blocked in PBS +2% FBS +0.2% triton for 30 min. They were then incubated for 1 hour in PBS with the primary antibodies (CD90 mouse IgG1 BD Pharmingen 555593 1/50, laminin rabbit Dako Z0097 1/400, CD68 mouse IgG3 Dako M0876 1/200). After 3 washes of 5 min in PBS the slices were incubated with an anti-IgG3 biotinylated at 1/200 for 45 minutes in PBS. Secondary antibodies (streptavidin-555, goat anti-mouse 488, goat anti-rabbit 647, Alexa fluor Life Technologies) were then incubated for 45 minutes at 1/400. Finally, Dapi 1/1000 was applied at the end for 5 minutes and the sections were mounted using fluoromount (Dako).

Images were acquired at 20X on an inverted microscope (Zeiss Axio Observer Apotome) doing a mosaic. FAPs CD90 positive cells were counted as cells not in blood vessel (pericytes) and not contoured with laminin (pax7 positive cells). The whole muscle slice was analyzed and the results are reported as the number of FAPs CD90+ cells for 100 muscle fibers.

#### *Sirius red staining*

IMNM (n=7) and HD (n=8) 10µm frozen sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 10min. After 3 washes in water they were put in 100% ethanol for 5 min and dried at room temperature for 20 minutes. They were then stained for 1h in sirius red solution (0.3%). They were rinsed quickly with water and put in 2 baths of acetic acid 0.5 % for 5 min, dehydrated in 3 ethanol bathes of 10min and clarified in 2 xylene baths for 2 min. Finally, they were mounted using Eukitt mounting media.

Three images of each slice were acquired using an inverted microscope (Nikon Ti-2) at 10X magnification by taking 3 images/slice. Sirius red staining was quantified using ImageJ threshold.

#### *Cell culture*

Cells were isolated by explant culture method: muscle biopsies were minced, and explants were plated onto dishes coated with fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen). Isolated cells were resuspended in FBS containing 10% DMSO and transferred into cryogenic storage vials, frozen at 80°C using a freezing container. Cell thawing was performed quickly using pre-warmed growth medium. Next day, medium was removed to get rid of the DMSO, and cells were trypsinized, counted, and replated at 37°C in growth medium consisting of 199 medium (Life Technologies) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) at a 1:4 ratio supplemented with 20% FBS, 25 µg/mL fetuin (Life Technologies), 0.5 ng/ mL bFGF (Life Technologies), 5 ng/mL EGF (Life Technologies), 5 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich), and



50 µg/mL gentamycin (Life Technologies) in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cells were labelled with CD56 antibody-coupled microbeads (130-050-401, Miltenyi Biotec), and CD56+ and CD56- cell fractions were separated using magnetic activated cell sorting (MACS) according to the manufacturer's instructions. The myogenic purity was monitored throughout the whole study and for each experiment by immunocytochemistry after fixation 10 min with pure ethanol using an antibody against desmin (clone D33, Dako), which is exclusively expressed in myogenic cells. At least 500 cells per condition were counted. Lifespan and proliferative status of cells used in this study have been carefully monitored to make sure cells did not reach pre-senescence for any of the conditions.

#### *Adipogenic differentiation*

Semiconfluent CD56- cell cultures were shifted from growth medium to adipogenic medium (DMEM 1 g/L glucose, 10% FBS, 0.5 mmol/L isobutyl-methylxanthine (Sigma), 60 µM indomethacin (Sigma), 10<sup>-6</sup> M dexamethasone (Merck) and 5 µg/mL insulin). The medium was replaced every 3–4 days for 21 days. The cells were then fixed for 15 min in Baker's buffer and stained with Oil red O for 15 min at 37°C.

#### *qPCR*

RNA from CD56- cells pellets was extracted from 3 IMNM cell pellets obtained from deltoid muscles and 4 HD cell pellets (1 deltoid, 1 paravertebral, 1 quadriceps, and 1 sternocleidomastoidian) using the RNeasy® plus mini kit (Qiagen, 74134, Germany) following the manufacturer's instructions. The concentration was assessed with a Nanodrop® (ThermoFisher, USA).

The One-Step RT-qPCR was performed with the SuperScript® III Platinum® SYBR® green (Invitrogen, 11736-059) following the manufacturer's instructions and performed on a LightCycler 480 (Roche, Switzerland). The following genes were analyzed: *COL1A1*, *COL1A2*, *MMP2*, *TGFB1*, *TGFBR2* and *FN1*. *RPLP0* was used as the housekeeping gene. The results were analyzed using the Pfaffl method that takes into account the primers efficiency for each gene.

#### *Interferon dosage*

Sera collected at diagnosis and/or during follow-up were quickly frozen and kept at -80°C until measurement. IFN-γ serum concentrations of 33 HD and 32 IMNM patients were measured

using the high sensitivity Simoa® technology (Digital ELISA technology) (Quanterix Simoa™ IFN $\gamma$  Reagent Kit, Lexington, MA, USA) according to the manufacturer protocols. The limit of detection (LOD) was 0.026 pg/ml and the positivity threshold was defined as the mean plus three times the standard deviation of the HD and was 1.97 pg/ml.

### *Cytokines dosage*

A total of 48 cytokines/chemokines (sCD40L, EGF, Eotaxin, FGF-2, FLT-3L, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO $\alpha$ , IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IP-10, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MDC, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, TGF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , VEGF-A) were dosed in the serum of 10 IMNM patients and 10 HD using HCYTA-60K-PX48 (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and following the manufacturer's protocol. Data are expressed as median fluorescence intensity (MFI).

### *Biostatistics*

Data were tested for normal distribution and expressed as mean  $\pm$  standard deviation if they followed a normal distribution or median + interquartile range if they did not. A t-test or a Mann-Whitney were used to compare two groups.  $P < 0.05$  was considered significant.

### *Spatial transcriptomic analysis*

Alignment and mapping were done according to the manufacturer's recommendations using SpaceRanger v1.0.0 (10X Genomics) using GRCH38 v93 reference genome. Following the alignment, the analysis pipeline used R (v4.1.0) as well as the Seurat package (v4.0.4) and its dependencies ggplot2 (v3.3.5), dplyr (1.0.7) and patchwork (v1.1.1) [15,16].

Datasets were filtered to keep spots with a minimum of 200 genes. Normalization was done using the SCTransform function and merged using the merge function. The resulting dataset was then integrated using SCTransform function using a regression on batch parameter. All spots were clusterized using RunPCA, FindNeighbors with a resolution of 0.6, FindClusters, and RunUMAP functions. Composite clusters were separated using FindSubClusters with a resolution of 0.3. Differentially expressed genes were isolated using FindAllMarkers function. Spots number was normalized on HD spots number for visualization purpose in UMAP representation when comparing to other IIM.

Spots from clusters 2, 4 and 10 specific to IMNM patients vs HD were isolated and clustered again using the same functions with a resolution of 1.1.

Manual annotation of histologically specific spots used STUtility (0.1.0). When comparing necrotic spots, hemoglobin genes were not taken into account.

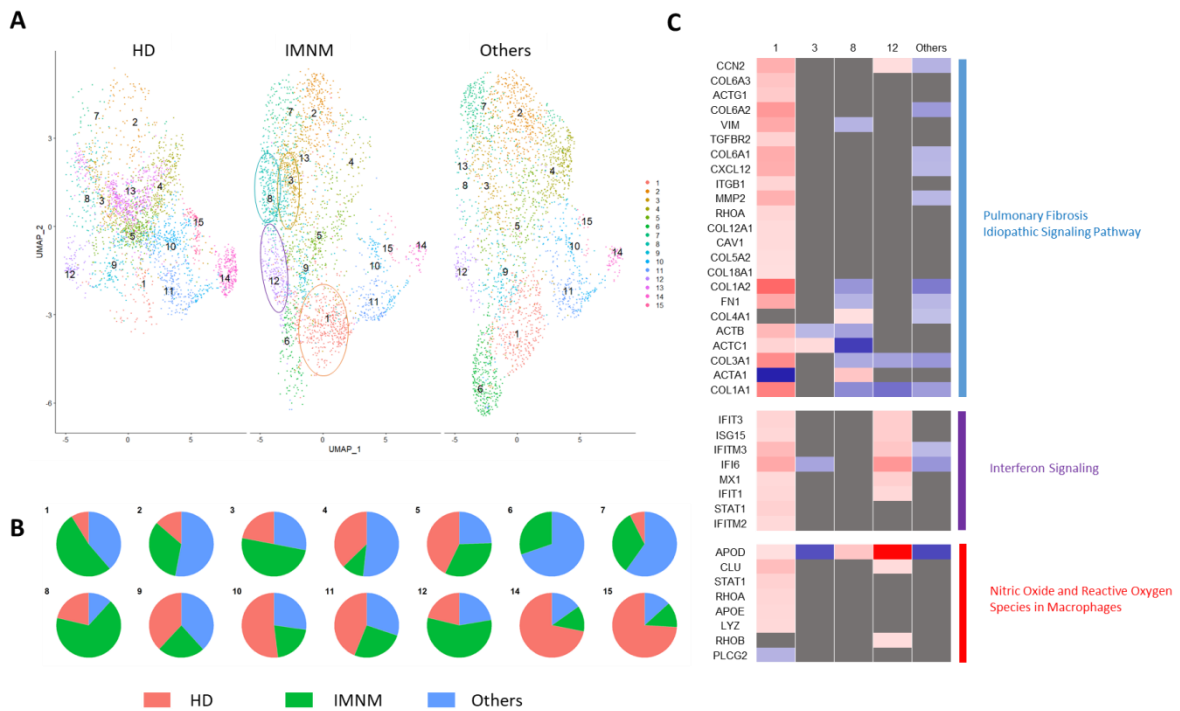
Enrichment pathway analyses were performed using Ingenuity pathway analysis (Qiagen, Germany). We included the differentially expressed genes defined with a  $\log_2FC \geq |0.25|$  and with a  $\text{min.pct} \geq 0.25$ .

## RESULTS

### A characteristic gene profile in IMNM muscle compared to HD and other IIM

Spatial transcriptomics was performed on muscle biopsies from IMNM (n=4), HD (n=5) and other myositis (ASyS n=2, DM n=3, IBM n=3). Patients' characteristics are displayed in Supplementary Table 1. A total of 15724 spots were generated and kept after filtering. 15 clusters were identified (**Fig. 1A**). The top five gene expression Heatmap of the 15 clusters obtained by unsupervised clustering analysis is available in supplemental Figure 1.

Clusters 1, 3, 8 and 12 are enriched in IMNM compared to IIM and HD (**Fig. 1B**). Ingenuity Pathway Analysis was used to find dysregulated pathways in the 4 characteristic IMNM clusters compared to a pool of the other clusters. Pathways with few genes or linked to inflammatory conditions (ex: lupus) were filtered out. Three interesting pathways stood out: Pulmonary Fibrosis Idiopathic Signaling Pathway, Interferon Signaling and Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages. These 3 pathways were enriched in cluster 1 and interferon signaling was enriched in cluster 12 also. Of note, Cluster 3 and Cluster 8 are mostly composed of muscle genes (see **Supp Fig. 1**).



**Figure 1: Spatial transcriptomics landscape of IIM and characterization of enriched IMNM features**

A. Uniform manifold approximation and projection (UMAP) visualization of normalized number of spatial RNA-seq barcoded spots clustered by gene expression and split by group ( $n=2923$  spots per group with 5 normal muscle biopsies, 4 IMNM biopsies and 8 other myositis including 3 IBM, 3 DM and 2 ASyS). Four clusters made with more than 50% spots from IMNM are circled (1, 3, 8 and 12).

B. Pie charts representation of the proportion of each cluster for each represented group in 1A.

C. Enrichment pathway analysis visualization of IMNM enriched clusters compared to other clusters using Ingenuity Pathway Analysis.

One of IMNM main difference compared to other IIM is the presence of necrosis. Muscle fiber necrosis is both an inducer of inflammation and regeneration so we wondered if the characteristics of IMNM in our analysis could be related to the muscle fiber necrosis.

### The characteristic IMNM gene profile is associated with muscle necrotic domains

Using STUtility, spots with muscle fiber necrosis were selected in IMNM and in IIM biopsies as well as spots with histologically normal muscle in IMNM biopsies and HD (**Fig. 2A**).

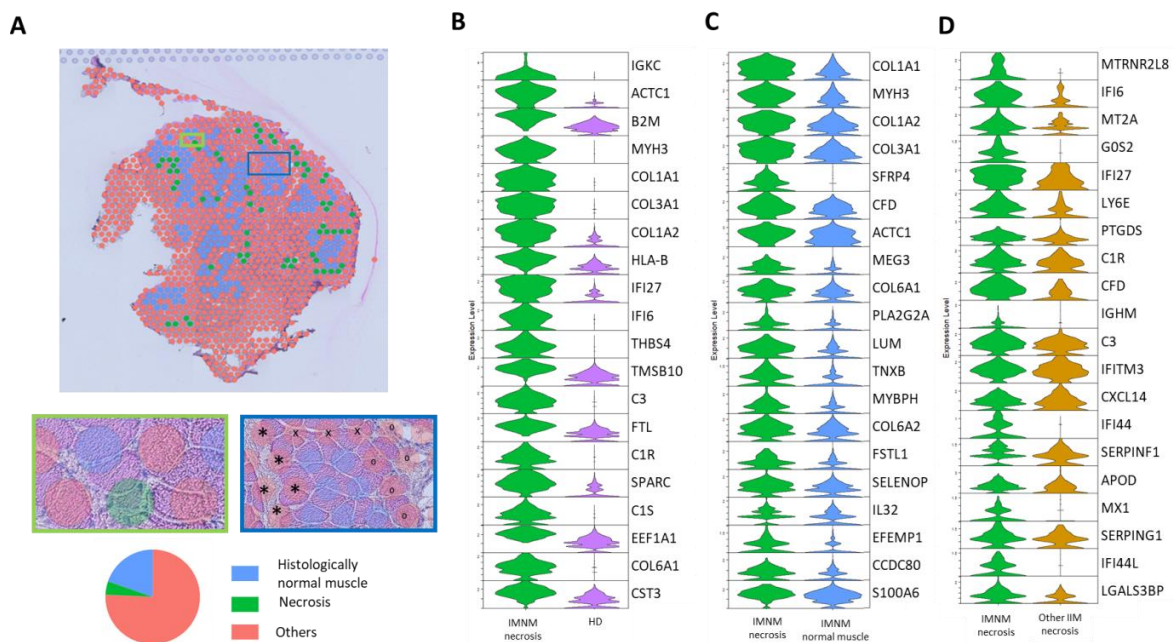
IMNM presented  $4.8\% \pm 5.24$  of necrotic muscle fiber spots compared to  $2.7\% \pm 2.567$  in other IIM and  $0\% \pm 0$  in HD (data not shown). The difference between IMNM and other IIM was not significant.

IMNM necrotic muscle fiber spots were first compared with HD normal muscle fiber spots. The top 20 upregulated genes were linked to regeneration including muscle fibers regeneration

and extracellular matrix remodeling (*ACTC1*, *MYH3*, *EEF1A1*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL1A2*, *COL6A1*, *SPARC*, *THBS4*), inflammation with interferon stimulated genes (*IFI27*, *IFI6*), complement (*C3*, *C1R*, *C1S*) and macrophages (*FTL*, *TMSB10*, *CST3*) (**Fig. 2B**).

IMNM necrotic muscle fiber spots were then compared to IMNM histologically normal muscle fiber spots. Still, mostly regenerative (*MYH3*, *ACTC1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *SFRP4*, *MEG3*, *COL6A1*, *PLA2G2A*, *LUM*, *TNXB*, *MYBPH*, *COL6A2*, *FSTL1*, *EFEMP1*, *CCDC80*, *S100A6*), macrophages (*IL32*, *SELENOP*) and complement (*CFD*) genes were overexpressed in necrotic domains (**Fig. 2C**).

IMNM necrotic muscle fiber spots were also compared to necrotic muscle fiber spots in other IIM (Fig. 2D). There was again an overexpression of regeneration genes (*MTRNR2L8*, *GOS2*, *CXCL14*, *SERPINF1*, *APOD*, *LGALS3BP*), interferon (*IFI6*, *IFI27*, *IFITM3*, *IFI44*, *MX1*, *IFI44L*), macrophages (*LY6E*, *PTGDS*), and complement (*C1R*, *CFD*, *C3*, *SERPINF1*) showing a characteristic gene profile in IMNM necrotic muscle areas compared to other IIM.



**Figure 2: Histological annotations of necrosis and skeletal muscle spots on spatial transcriptome**

*A. Up: Representation of manual annotation of histological spots showing an example of chosen and non-chosen spots. Necrotic spots are in green, histologically normal muscle spots in blue and other spots not-considered in pink. These spots were not considered because they could be close to conjunctive tissue (\*), close to vessels (°) or because the fibers were small (x). Down: Visualization of the spots proportion in IMNM biopsies.*

*B. Violin plot overview of the top 20 genes expressed in IMNM necrotic muscle fibers spots compared to healthy donor skeletal muscle spots.*

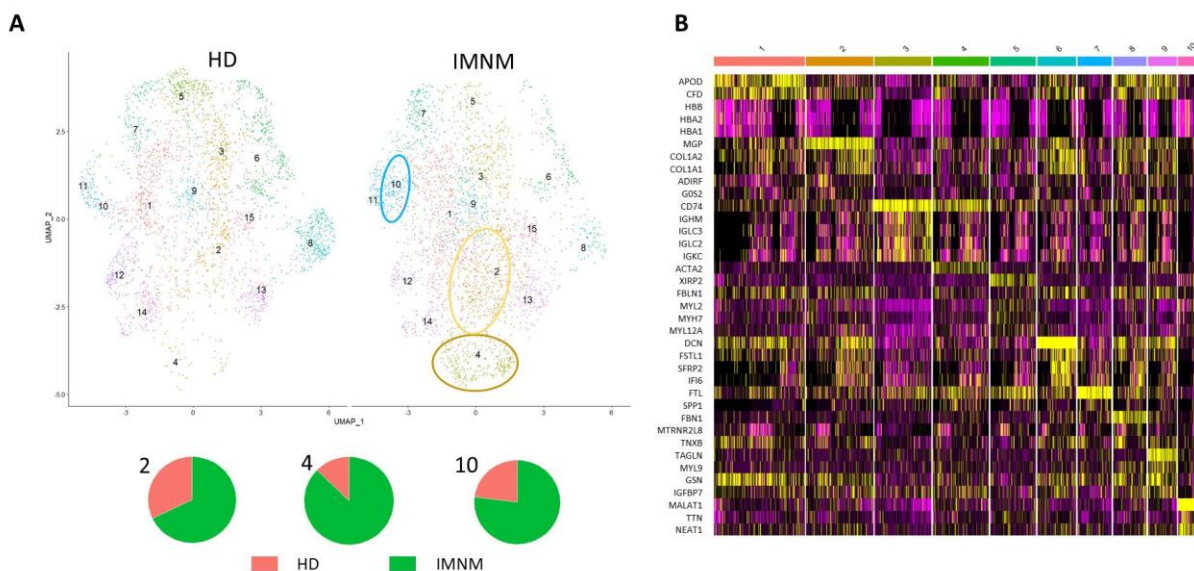
*C. Violin plot overview of the top 20 genes expressed in IMNM necrotic muscle fibers spots compared to IMNM histologically normal spots.*

*D. Violin plot overview of the top 20 genes expressed in IMNM necrotic muscle fibers spots compared to other myositis necrotic muscle fibers spots.*

## Characterization of IMNM macrophages

To describe more deeply IMNM characteristics, IMNM patients were compared to HD. Of note, IMNM patients' biopsies expressed mostly macrophages and a few B lymphocytes genes (**Sup Fig. 2**). T lymphocytes, dendritic cells and polymorphonuclear neutrophils genes were not detected.

A total of 2923 HD spots and 4304 IMNM spots were generated. First, using a threshold of 0.6, 15 clusters were identified. Clusters 2, 4 and 10 are enriched for IMNM patients (**Fig. 3A**) (see **Sup Fig. 3** for Heatmap). These 3 clusters were then re-clusterized generating a total of 1395 spots and 10 clusters were identified. Looking at the reclusterized heatmap, cluster 3, 6 and 7 seems of particular interest with inflammatory (*CD74*, *FTL*) extracellular matrix/fibroblast (*DCN*, *FSTL1*) and interferon genes (*IFI6*) (**Fig. 3B**). The other clusters displayed damaged muscle fibers, blood vessels genes or presented only a few set of genes.



**Figure 3: Spatial transcriptomics landscape of IMNM biopsies compared to healthy donor**

A. UMAP visualization of spatial RNA-seq barcoded spots clustered by gene expression split by group ( $n=2923$  spots per group with 5 normal muscle biopsies and 4 IMNM biopsies). 3 clusters made with more than 70% spots (represented by pie charts) from IMNM are circled (2, 4 and 10).

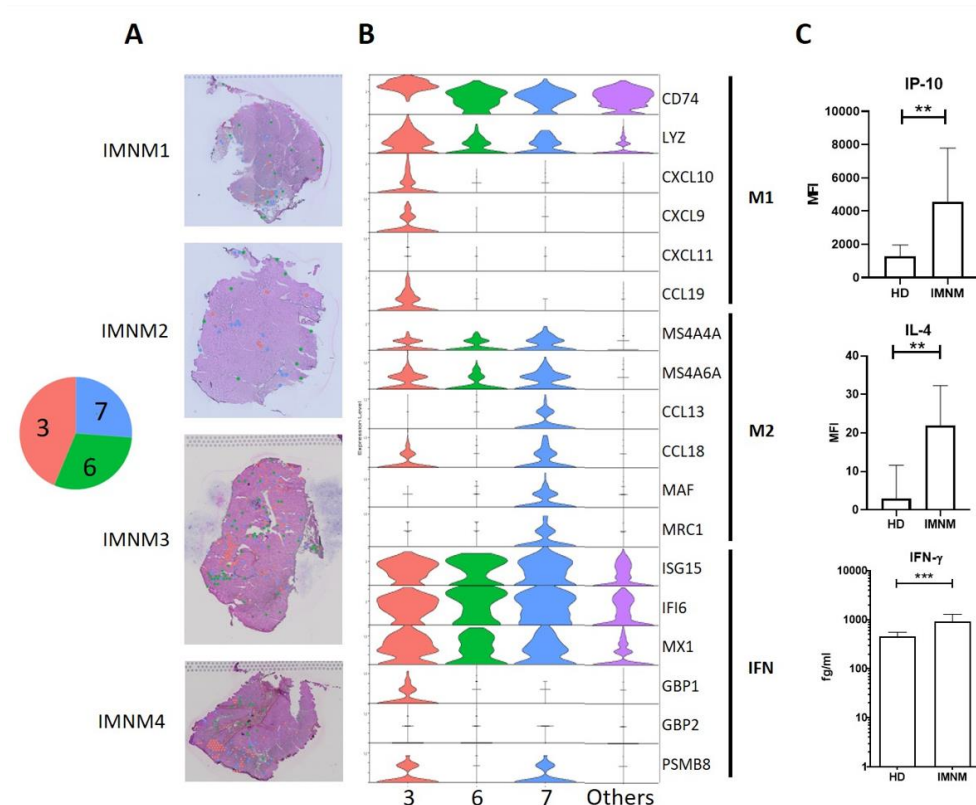
B. Top five gene expression heatmap of IMNM specific dataset obtained from reclusterizing circled clusters specific to IMNM from 3A.

Cluster 3 and 7 presented many macrophages genes. Using a list of genes characteristic of M1 and M2 macrophages [17], cluster 3 presented several genes specific to M1 macrophages subtype (*CD74*, *LYZ*, *CXCL10*, *CXCL9*, *CXCL11*, *CCL19*) and cluster 7 to M2 subtype (*MS4A4A*, *MS4A6A*, *CCL13*, *CCL18*, *MAF*, *MRC1*) (**Fig. 4B**).

Interestingly there was also an activation of the interferon pathway in clusters 3, 6 and 7 with a predominant activation of type I interferon pathway (*MX1*, *ISG15*, *IFI6*) [18–20] and few type II interferon (*GBP4*, *GBP5*, *PSMB8*) [21,22].



IFN- $\gamma$  serum levels were higher in IMNM patients serum compared to controls (913.7 [406.8;1294] vs 457.2 [284.2;557.1] fg/ml;  $p < 0.001$ ) (**Fig. 4C**). Others cytokines involved in macrophages activation or homing were also tested in IMNM and HD serum. IL-4 (22 [12.25;32.25] vs 3 [0;11.63] MFI;  $p < 0.01$ ) and IP-10 (4577 [1602;7794] 1293 [1035;1964] MFI;  $p < 0.01$ ) were upregulated in IMNM patients compared to HD (**Fig. 4C**). IP-10 sustains M1 activation and IL-4 supports the macrophages transition from M1 to M2 [23,24]. Of note, the other cytokines were not detected or were not increased in IMNM patients' serum.



**Figure 4: IMNM characteristic clusters phenotyping of M1 and M2 macrophages**

A. UMAP visualization of three IMNM-characteristic clusters of interest mapped onto IMNM tissue slices with a representation of proportions in the biopsies.

B. Violin plot overview of M1, M2 macrophages and IFN stimulated genes expressed in IMNM-characteristic clusters of interest compared to other clusters.

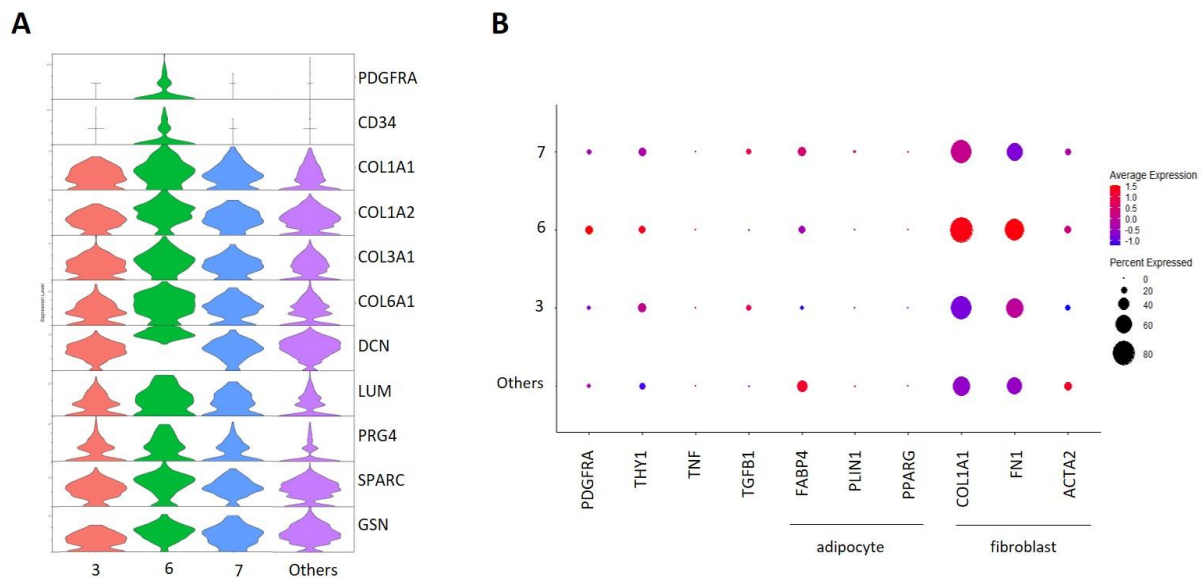
C. Serum protein expression of IP-10, IL-4 and IFN- $\gamma$

## Characterization of IMNM fibro-adipogenic progenitors

Fibro-fatty infiltration being a feature in IMNM, we wanted to study the fibroblasts and regenerative signatures more deeply.

Cluster 6 is characterized by extracellular matrix genes. The principal producers of ECM are fibroblasts and especially fibro-adipogenic progenitors (FAP). We thus looked at the

expression of FAPs specific genes in cluster 6. Cluster 6 is indeed characterized by a high expression of FAPs markers (*PDGFRA*, *CD34*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL6A1*, *DCN*, *LUM*, *PRG4*, *SPARC*, *GSN*) (**Fig. 5A**). Some markers show if FAPs are more inclined to differentiate into fibroblasts or adipocytes [25]. IMNM FAPs cluster showed pro-fibroblastic characteristics (**Fig. 5B**).



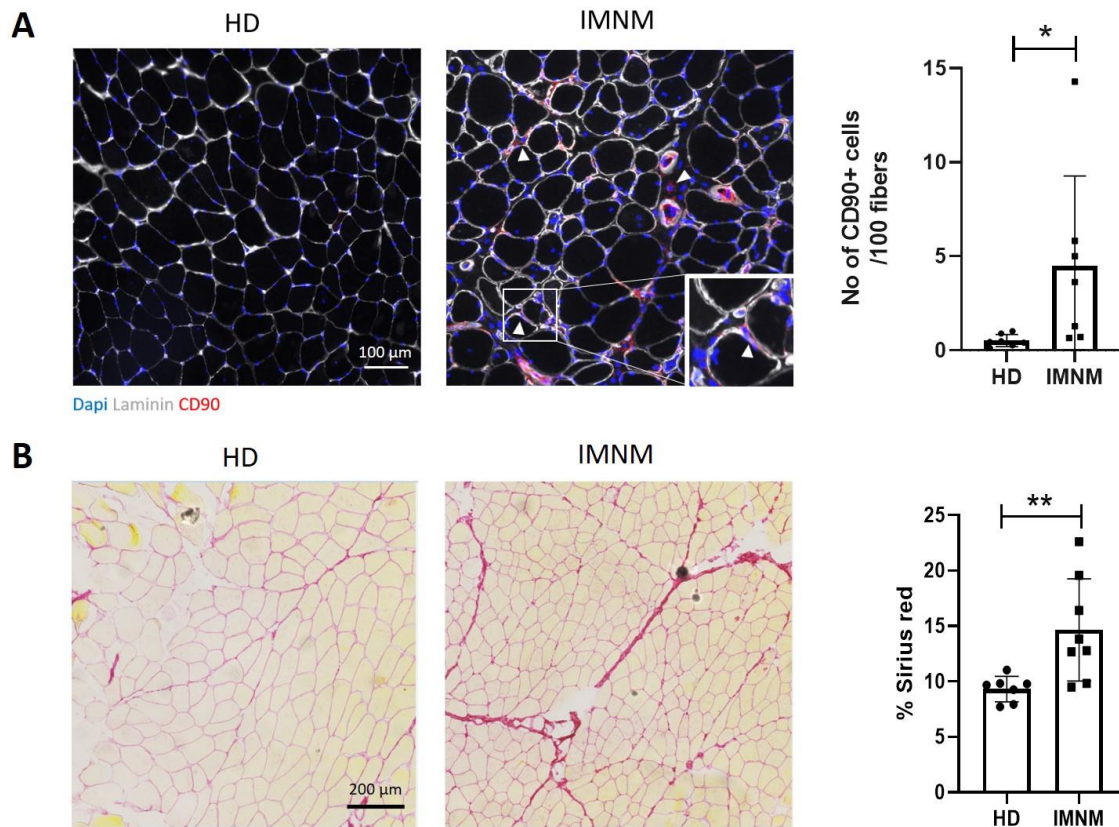
**Figure 5: IMNM characteristic clusters phenotyping of FAPs**

*A. Violin plot overview of FAPs genes expressed in IMNM-characteristic clusters of interest compared to other clusters.*

*B. Dot plot overview of adipogenesis and fibrosis genes expressed in IMNM-characteristic clusters of interest compared to others clusters.*

Since FAPs have never been described before in IMNM, to confirm their presence, we performed an immunostaining. IMNM biopsies displayed CD90 positive cells (FAPs marker) that were more frequent compared to controls ( $4.48\% \pm 4.79$  vs  $0.32\% \pm 0.52$ ;  $p < 0.05$ ) (**Fig. 6A**). In addition, IMNM patients harbored increased muscle fibrosis compared to HD attested by Sirius red staining ( $14.65\% \pm 4.61$  vs  $9.32\% \pm 1.16$ ;  $p < 0.01$ ) (**Fig. 6B**).





**Figure 6: FAPs and fibrosis analysis**

A. Immunostaining (blue dapi, grey laminin, red CD90) of IMNM and HD muscle biopsies and representation of the number of CD90+ cells for 100 muscle fibers. Scale bar = 100 $\mu$ m \* $p$ <0.05

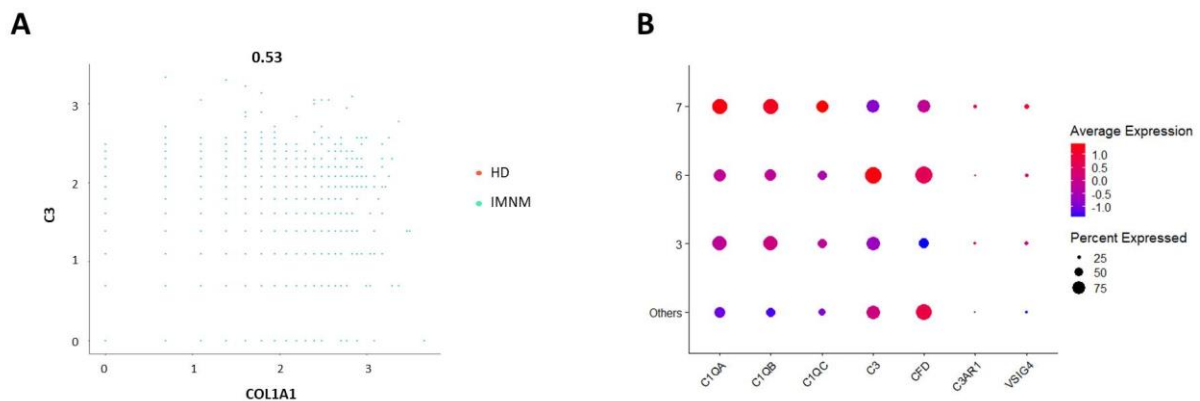
B. Sirius red staining of IMNM and HD muscle biopsies (red collagen, yellow cytoplasm) and representation of the covered area. Scale bar = 200  $\mu$ m \*\* $p$ <0.01

However, *in vitro*, FAPs culture did not show a difference between HD and IMNM. First, CD56-cells collected from IMNM and HD muscle biopsies showed the ability to differentiate into adipocytes confirming the FAPs collection (**Supp Fig. 4A**). No difference was noted in the differentiation or the cells aspect (**Supp Fig. 4B**). Along that line, levels of *COL1A1*, *COL1A2* and *TGFB1* expression were not different in FAP collected from IMNM patients and from HD (**Supp Fig. 4C**). Only *FN1* and *MMP2* tended to a decrease and *TGFBR2* to an increase in IMNM.

### FAP and macrophages cross talk

We then wanted to study the crosstalk between FAPs, macrophages and muscle cells. Interestingly, looking at the heatmap, the fibrosis cluster 6 presented some complement genes like *CFD*. It was also the case for the necrotic muscle fiber spots. C3 has been demonstrated implicated in macrophages homing and can induce extracellular matrix genes production

[26,27]. A medium correlation was found between *COL1A1* gene and *C3* ( $r=0.53$ ) (**Fig. 7A**). Of note, all the spots expressing the two genes are from IMNM biopsies. Looking at other complement pathway genes that could be locally produced by macrophages or other cell types, *C1QA*, *C1QB* and *C1QC* were overexpressed in the M2 macrophages cluster 7, *C3* by the FAPs cluster 6 as well as *CFD* but it was also present in the “others” cluster (**Fig. 7B**). *C3AR1* and *VSIG4*, two *C3* complement receptors were expressed in the two macrophages clusters 3 and 7.



**Figure 7: Complement pathway activation**

A. *C3* and *COL1A1* correlation in HD and IMNM spots

B. DotPlot overview of complement pathway genes in IMNM reclustrized characteristic clusters

## DISCUSSION

In this study, using spatial transcriptomics for the first time, we identified a characteristic immune gene signature in IMNM associated with muscle fiber necrosis that displays a gene profile distinct from other IIM, even in necrotic domains. This signature was enriched in macrophages, complement, interferon and fibrosis genes.

Transcriptomic data in IMNM are limited and did not previously find a specific IMNM immune signature [6]. Inflammatory genes were indeed underexpressed compared to other IIM, whereas, as expected, high levels of muscle regeneration genes were detected but this was also the case for other IIM [6]. Using spatial transcriptomics, permitting to have transcriptional data of specific domains, we were able to have a better definition allowing to describe the immune profile in IMNM.

Our work sheds light on IMNM pathogenesis, one of the most disabling IIM, combining both muscle fiber necrosis and fibro-fatty replacement.

Muscle fiber necrosis is an unexpected event and does not rely on regulated gene expression. However, other cell death mechanisms exist and are regulated [28]. Among them necroptosis has been identified in another subgroup of IIM (polymyositis) [29]. We looked at the necroptosis genes but did not find any overexpression in IMNM (data not shown). However, necroptosis signaling depends also on protein cascade activation by phosphorylation [30]. Proteic changes like phosphorylation are not detected in transcriptomic analyses. This is one limit of our transcriptomic study and we cannot rule out that other mechanisms of cell death occur in IMNM. Nevertheless, we could identify pathways in IMNM muscle necrotic-regenerative domains.

No or few transcripts related to cytotoxic cells (T lymphocytes, natural killer cells, polymorphonuclear neutrophils) were observed, in accordance with previous immunohistological analyses [5,31]. In line with pathological studies, we found that over-expressed immune genes were related to macrophages. Our data complete the previous studies by characterizing macrophages population, including M1. Indeed, M1 pro-inflammatory macrophages were identified and are known to produce pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$  and iNOS which have a deleterious role and participate to muscle damage [32,33]. Although cytotoxic, M1 macrophages could also have a beneficial role in regeneration since they activate satellite cells proliferation [34]. However, their continuous and uncontrolled proliferation could be deleterious.

According to the M1 polarization, we observed an interferon gene signature. We did not find any gene characteristic of IFN producer cells (T lymphocytes, natural killer or plasmacytoid dendritic cells) suggesting that the source of IFN are macrophages and/or muscle fibers [35,36]. In addition to promoting pro-inflammatory macrophages polarization, IFN has been also shown to (at low doses) promote muscle repair but continuous over-expression can be detrimental by inducing muscle fibrosis [37–39]. The interferon signature in IMNM is quite new and has been little to not reported in IMNM as it usually is associated to the other IIM subgroups [40]. IFN- $\gamma$  can also be an inducer of complement production [41,42].

In addition, a complement signature was also identified suggesting its role in muscle fiber necrosis. The expression of C3 and C1Q suggest an activation of the classical pathway. C1q and C5b-9 were also previously detected on non-necrotic muscle fibers by immunofluorescence staining [5,43]. A complement inhibitor of C5b-9 has been recently tested in a mouse model of IMNM. Zilucoplan was efficient to prevent the development of the disease [44]. In human, Zilucoplan failed to meet clinical trial endpoints<sup>1</sup> suggesting that additional mechanisms are involved in muscle fiber necrosis.

<sup>1</sup><https://www.ucb.com/stories-media/Press-Releases/article/UCB-s-zilucoplan-shows-no-relevant-effect-in-immune-mediated-necrotizing-myopathy-IMNM>

Another function of the complement pathway, which does not exclude the cytotoxic one, is a pro-regenerative action with an activation of the alternative pathway as shown by the expression of *CFD*. C3a in the alternative pathway can in fact participate in macrophage homing and contribute to muscle fiber regeneration [26].

Nevertheless, if only regenerative processes could explain complement pathway activation, there would not be a different necrotic signature between IMNM and other IIM.

Concerning muscle damages, complement activation can also induce extracellular matrix production, especially by fibroblasts, and participate in fibrosis in muscle and other tissues [27,42,45]. For the first time we shed light on FAPs that can be involved in both muscle fibrosis and regeneration. FAPs are mesenchymal progenitors able to differentiate into adipocytes, fibroblasts, osteocytes or chondrocytes [46,47]. During muscle regeneration, FAPs will secrete cytokines and chemokines to attract immune cells, especially macrophages, and extracellular matrix components that were overexpressed in our study, to help tissue remodeling [48–51]. IMNM muscle biopsies displayed more FAPs than HD but they did not seem to have a different function *in vitro*.

In a regenerative process, M2 anti-inflammatory macrophages are important for muscle repair by expressing anti-inflammatory cytokines involved in muscle regeneration [52]. One of these cytokines is TGF- $\beta$ , which also participates in the activation of FAPs and extracellular matrix deposits [53]. M2 macrophages markers and *TGFB1* were characteristic of IMNM in our study.

In a chronic muscle damage environment, as it is the case in IMNM, C3 and TGF- $\beta$  would be overexpressed and participate to fibro-fatty replacement. IMNM patients' muscles present the most fibro-fatty infiltration over the disease course which is particularly visible in MRI and have difficulties to recover muscle strength after treatment [1–4]. However, these mechanisms might not be IMNM-specific and could occur in other diseases with sustained active damage such as Duchenne muscular dystrophy where fibro-fatty replacement is also observed [54].

To conclude, we bring new data on (i) IMNM immune intramuscular responses with the presence of pro and anti-inflammatory macrophages, interferon and complement pathways and (ii) FAPs' implication. This study opens new research perspectives on the complex interactions between these actors, needing targeted studies to better understand IMNM pathogenesis.

## SUPPLEMENTAL DATA

**Supplemental Table 1: Patients' characteristics showing the experiments they were used for (cytokines dosage, spatial transcriptomic, Sirius red staining or interferon dosage)**

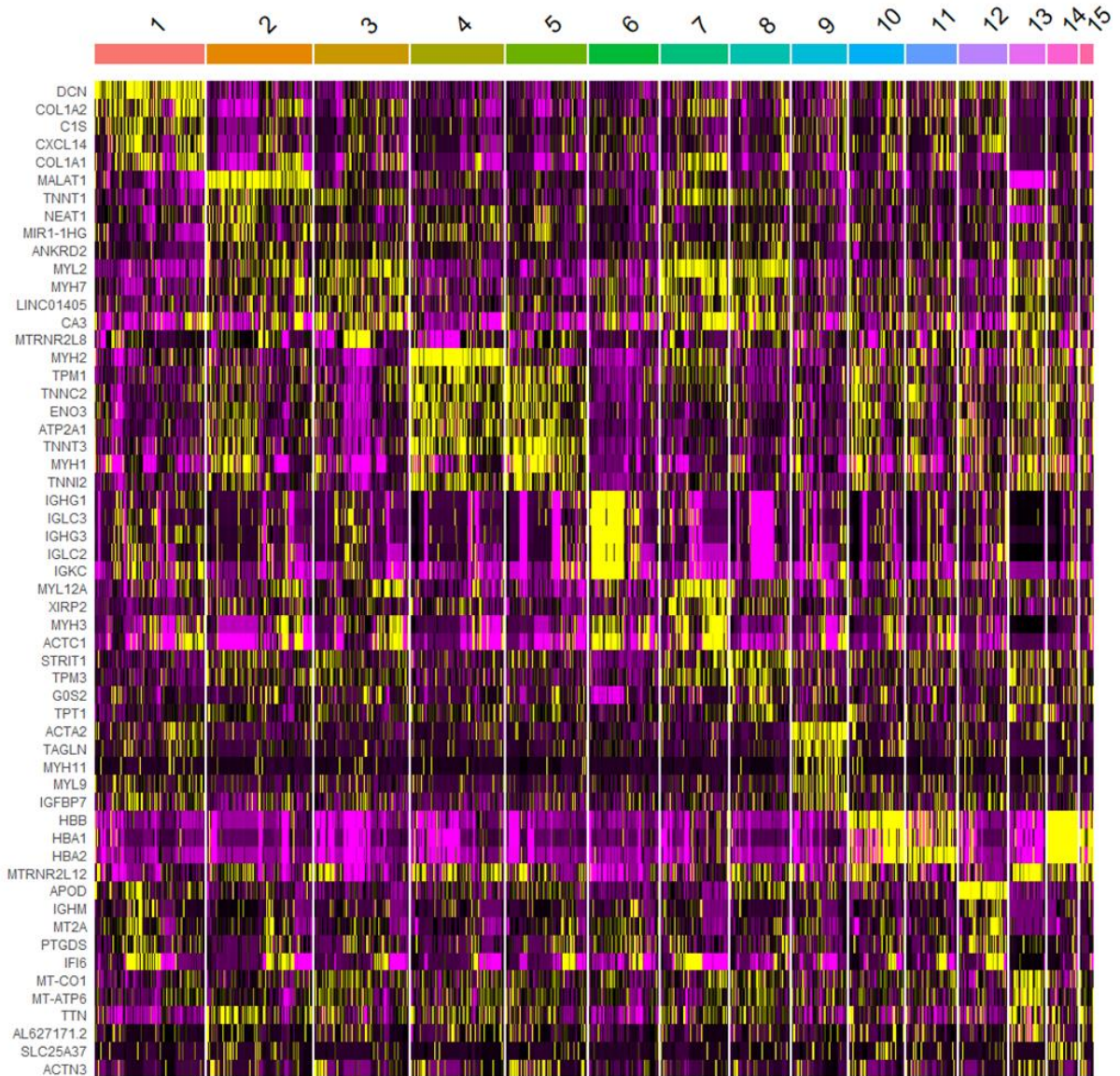
Patient	Sex	Age	Pathology	Symptoms duration (months)	Corticoids	Immunosuppressants	Cytokines	Spatial	Sirius red	Interferon
IMNM1	F	69	IMNM	10	No	No	Yes	No	No	No
IMNM2	M	23	IMNM	13	No	No	Yes	No	No	No
IMNM3	F	33	IMNM	240	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes
IMNM4	F	66	IMNM	3	No	No	Yes	No	No	No
IMNM5	F	64	IMNM	84	No	No	Yes	No	No	No
IMNM6	F	76	IMNM	2	No	No	Yes	No	No	No
IMNM7	F	56	IMNM	44	No	No	Yes	No	No	No
IMNM8	F	83	IMNM	4	No	No	Yes	No	No	Yes
IMNM9	F	69	IMNM	4	No	No	Yes	No	No	No
IMNM10	F	19	IMNM	2	No	No	Yes	No	No	No
IMNM11	F	52	IMNM	6	No	No	No	Yes	Yes	Yes
IMNM12	M	45	IMNM	12	No	No	No	Yes	Yes	No
IMNM13	F	70	IMNM	4	No	No	No	Yes	Yes	No
IMNM14	F	68	IMNM	60	No	No	No	Yes	Yes	No
IMNM15	F	44	IMNM	9	No	No	No	Yes	Yes	No
IMNM16	M	78	IMNM	6	No	No	No	No	Yes	No
IMNM17	M	66	IMNM	8	No	No	No	No	Yes	No
IMNM18	M	18	IMNM	24	No	No	No	No	No	Yes
IMNM19	F	51	IMNM	4	No	No	No	No	No	Yes
IMNM20	F	60	IMNM	84	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM21	F	44	IMNM	48	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM22	F	80	IMNM	84	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM23	F	27	IMNM	11	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM24	F	22	IMNM	9	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM25	F	47	IMNM	360	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM26	F	69	IMNM	108	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM27	F	30	IMNM	84	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM28	F	33	IMNM	216	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM29	F	62	IMNM	72	No	No	No	No	No	Yes
IMNM30	F	34	IMNM	300	No	No	No	No	No	Yes
IMNM31	F	37	IMNM	132	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM32	F	62	IMNM	168	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM33	M	19	IMNM	55	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM34	M	54	IMNM	22	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM35	M	57	IMNM	1	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM36	M	73	IMNM	228	No	No	No	No	No	Yes
IMNM37	M	56	IMNM	3	No	No	No	No	No	Yes
IMNM38	F	68	IMNM	7	No	Yes	No	No	No	Yes
IMNM39	M	50	IMNM	40	Yes	Yes	No	No	No	Yes

IMNM40	F	68	IMNM	48	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM41	M	65	IMNM	72	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM42	F	25	IMNM	66	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM43	F	59	IMNM	84	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM44	F	71	IMNM	108	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM45	F	20	IMNM	132	No	Yes	No	No	No	Yes
IMNM46	F	30	IMNM	168	No	Yes	No	No	No	Yes
IMNM47	F	62	IMNM	144	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IMNM48	M	67	IMNM	8	Yes	No	No	No	No	Yes
IMNM49	M	55	IMNM	33	Yes	Yes	No	No	No	Yes
IBM1	F	71	IBM	276	Yes	No	No	Yes	No	No
DM4	M	67	DM	18	Yes	No	No	Yes	No	No
DM1	F	44	DM	7	No	No	No	Yes	No	No
DM2	F	52	DM	5	No	No	No	Yes	No	No
ASyS1	F	73	ASyS	48	Yes	No	No	Yes	No	No
ASyS2	M	31	ASyS	9	No	No	No	Yes	No	No
IBM2	F	66	IBM	36	No	No	No	Yes	No	No
DM3	F	46	DM	9	No	No	No	Yes	No	No
HD1	M	67	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD2	F	37	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD3	M	37	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD4	M	51	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD5	M	60	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD6	M	62	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD7	M	49	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD8	F	42	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD9	M	37	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD10	M	31	HD	NA	NA	NA	Yes	No	No	No
HD11	M	56	HD	NA	NA	NA	No	Yes	Yes	No
HD12	F	58	HD	NA	NA	NA	No	Yes	Yes	No
HD13	F	71	HD	NA	NA	NA	No	Yes	Yes	No
HD14	M	15	HD	NA	NA	NA	No	Yes	Yes	No
HD15	F	27	HD	NA	NA	NA	No	Yes	Yes	No
HD16	F	39	HD	NA	NA	NA	No	No	Yes	No
HD17	F	26	HD	NA	NA	NA	No	No	Yes	No
HD18	F	32	HD	NA	NA	NA	No	No	Yes	No
HD19	M	53	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD20	F	45	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD21	M	68	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD22	M	59	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD23	F	65	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD24	F	55	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD25	F	55	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD26	M	42	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
HD27	M	46	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes

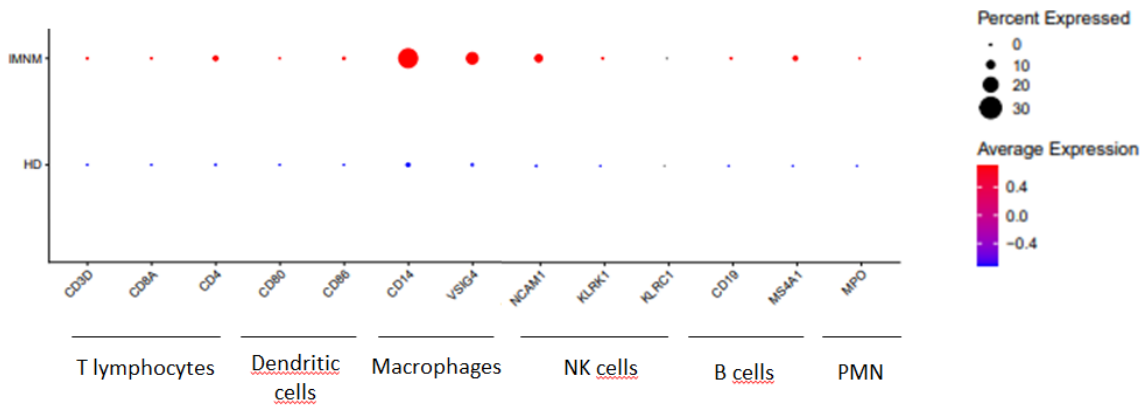
<b>HD28</b>	M	61	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD29</b>	F	40	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD30</b>	M	53	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD31</b>	F	37	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD32</b>	F	28	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD33</b>	F	50	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD34</b>	M	60	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD35</b>	F	39	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD36</b>	M	53	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD37</b>	M	65	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD38</b>	F	54	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD39</b>	F	54	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD40</b>	M	46	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD41</b>	M	59	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD42</b>	M	57	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD43</b>	M	42	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD44</b>	M	54	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD45</b>	M	51	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD46</b>	M	41	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD47</b>	M	59	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD48</b>	M	55	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD49</b>	M	54	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes
<b>HD50</b>	F	61	HD	NA	NA	NA	No	No	No	Yes

*NA : not applicable*





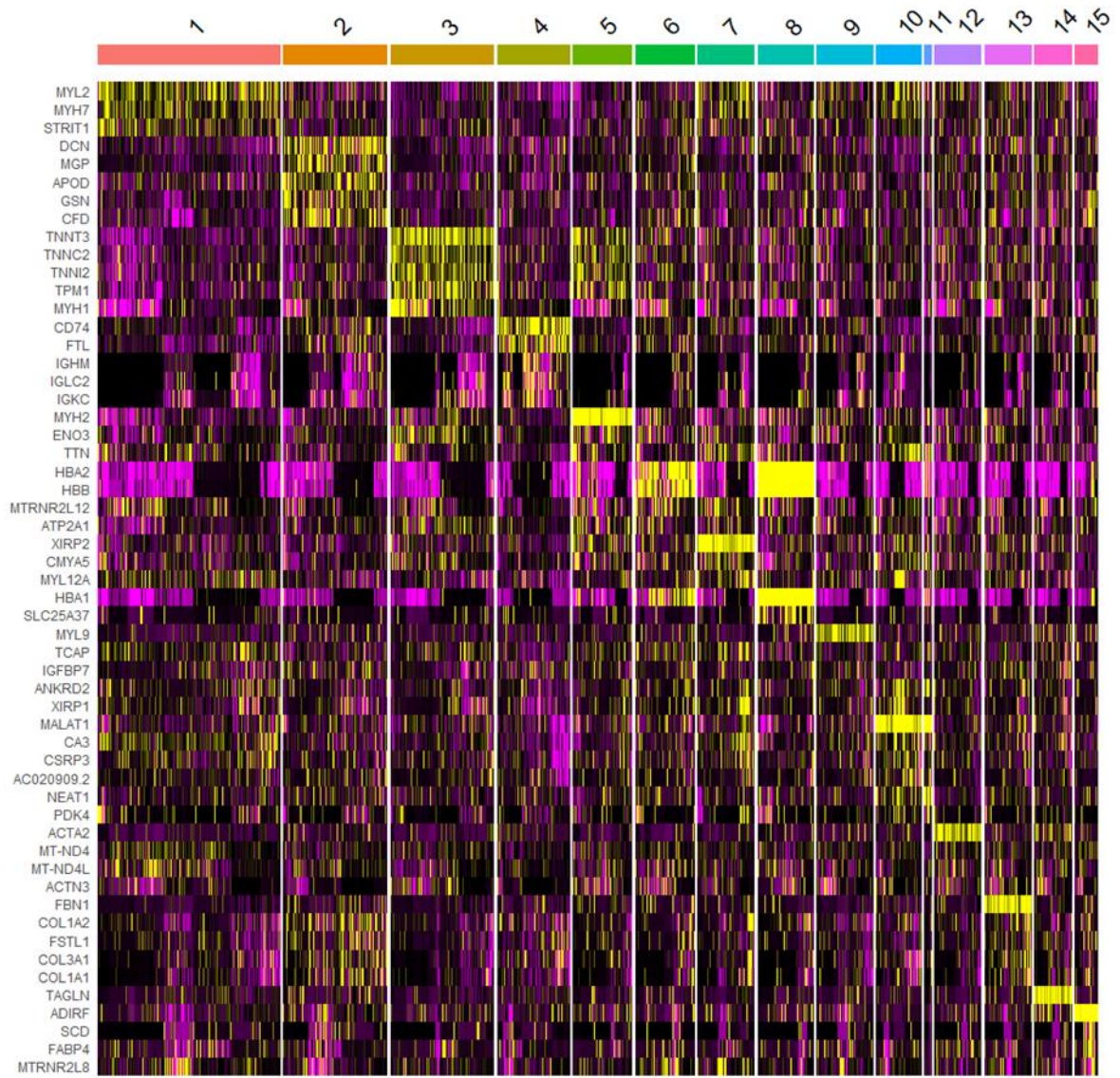
Supplemental Figure 1: HD, IMNM and other IIM top 5 genes heatmap



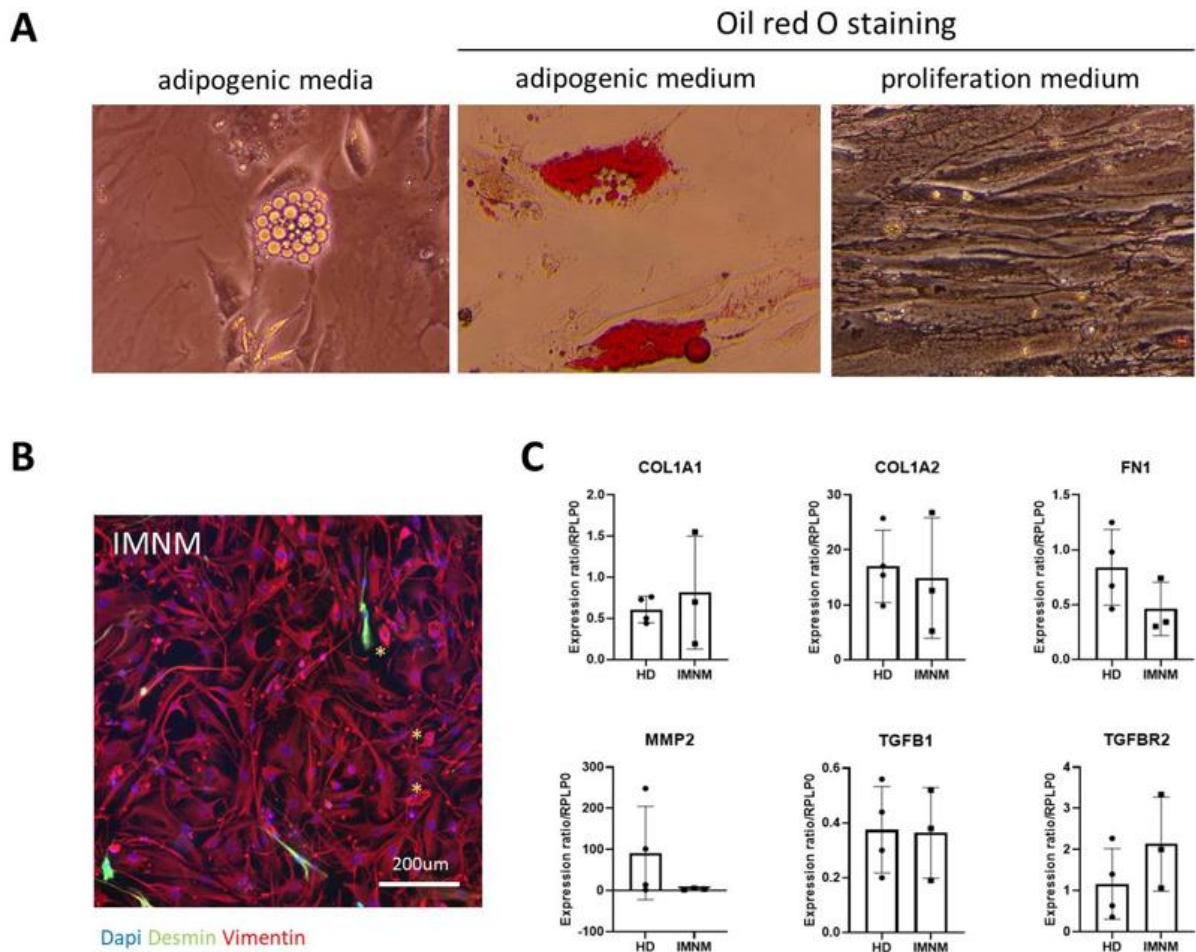
Supplemental Figure 2: IMNM vs HD cell types

PMN: polymorphonuclear neutrophils





Supplemental Figure 3: HD and IMNM top 5 genes heatmap



**Supplemental Figure 4: IMNM FAPs characteristics *in vitro***

A. Oil red O staining of FAPs from IMNM muscle biopsies in adipogenic differentiation or proliferation media

B. Immunostaining of FAPs obtained from IMNM muscle biopsies. Scale bar 200µm

C. qPCR of collagen and TGF-β pathway of IMNM and HD FAPs

## BIBLIOGRAPHY

1. Pinal-Fernandez I, Parks C, Werner JL, et al. Longitudinal Course of Disease in a Large Cohort of Myositis Patients With Autoantibodies Recognizing the Signal Recognition Particle. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(2):263-270. doi:10.1002/acr.22920
2. Tiniakou E, Pinal-Fernandez I, Lloyd TE, et al. More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(5):787-794. doi:10.1093/rheumatology/kew470
3. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Carrino JA, et al. Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(4):681-687. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210198
4. Landon-Cardinal O, Koumako C, Hardouin G, et al. Severe axial and pelvifemoral muscle damage in immune-mediated necrotizing myopathy evaluated by whole-body MRI. *Semin Arthritis Rheum*. 2020;50(6):1437-1440. doi:10.1016/j.semarthrit.2020.02.009
5. Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Preusse C, et al. Necrosis in anti-SRP+and anti-HMGCR+myopathies: Role of autoantibodies and complement. *Neurology*. 2018;90(6):e507-e517. doi:10.1212/WNL.0000000000004923
6. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, et al. Machine learning algorithms reveal unique gene expression profiles in muscle biopsies from patients with different types of myositis. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(9):1234-1242. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216599
7. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(1):87-99. doi:10.1016/j.nmd.2017.09.016
8. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann Neurol*. 2017;81(4):538-548. doi:10.1002/ana.24902
9. Bergua C, Chiavelli H, Allenbach Y, et al. In vivo pathogenicity of IgG from patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies in immune-mediated necrotising myopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019;78(1):131-139. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213518
10. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, et al. Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(3):150-157. doi:10.1097/MD.0000000000000028
11. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):1961-1971. doi:10.1002/art.30344
12. Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, et al. 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic

inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):1955-1964. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211468

13. Lloyd TE, Mammen AL, Amato AA, Weiss MD, Needham M, Greenberg SA. Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology*. 2014;83(5):426-433. doi:10.1212/WNL.0000000000000642

14. Mammen AL, Allenbach Y, Stenzel W, Benveniste O, ENMC 239th Workshop Study Group. 239th ENMC International Workshop: Classification of dermatomyositis, Amsterdam, the Netherlands, 14-16 December 2018. *Neuromuscul Disord*. 2020;30(1):70-92. doi:10.1016/j.nmd.2019.10.005

15. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):495-502. doi:10.1038/nbt.3192

16. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 2021;184(13):3573-3587.e29. doi:10.1016/j.cell.2021.04.048

17. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-7311. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303

18. Zhang D, Zhang DE. Interferon-Stimulated Gene 15 and the Protein ISGylation System. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011;31(1):119-130. doi:10.1089/jir.2010.0110

19. Kelly JM, Porter AC, Chernajovsky Y, Gilbert CS, Stark GR, Kerr IM. Characterization of a human gene inducible by alpha- and beta-interferons and its expression in mouse cells. *The EMBO Journal*. 1986;5(7):1601-1606. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04402.x

20. Holzinger D, Jorns C, Stertz S, et al. Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III Interferon Signaling. *J Virol*. 2007;81(14):7776-7785. doi:10.1128/JVI.00546-06

21. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17609-17614. doi:10.1073/pnas.1209724109

22. Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(4):1807-1816. doi:10.1084/jem.183.4.1807

23. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084

24. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;13(3):272-280. doi:10.1016/j.autrev.2013.10.010

25. Moratal C, Raffort J, Arrighi N, et al. IL-1 $\beta$ - and IL-4-polarized macrophages have opposite effects on adipogenesis of intramuscular fibro-adipogenic progenitors in humans. *Sci Rep*. 2018;8(1):17005. doi:10.1038/s41598-018-35429-w

26. Zhang C, Wang C, Li Y, et al. Complement C3a signaling facilitates skeletal muscle regeneration by regulating monocyte function and trafficking. *Nat Commun*. 2017;8(1):2078. doi:10.1038/s41467-017-01526-z
27. Naito AT, Sumida T, Nomura S, et al. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 2012;149(6):1298-1313. doi:10.1016/j.cell.2012.03.047
28. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137
29. Kamiya M, Mizoguchi F, Kawahata K, et al. Targeting necroptosis in muscle fibers ameliorates inflammatory myopathies. *Nat Commun*. 2022;13:166. doi:10.1038/s41467-021-27875-4
30. Liu X, Xie X, Ren Y, et al. The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm*. 2021;2(4):730-755. doi:10.1002/mco2.108
31. Chung T, Christopher-Stine L, Paik JJ, Corse A, Mammen AL. The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. *Muscle Nerve*. 2015;52(2):189-195. doi:10.1002/mus.24642
32. Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the Role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLOS ONE*. 2016;11(6):e0153289. doi:10.1371/journal.pone.0153289
33. Singh VK, Mehrotra S, Narayan P, Pandey CM, Agarwal SS. Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide. *Immunol Res*. 2000;22(1):1-19. doi:10.1385/IR:22:1:1
34. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 2013;31(2):384-396. doi:10.1002/stem.1288
35. Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, Koh TJ. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(5):C1183-1191. doi:10.1152/ajpcell.00568.2007
36. Darwich L, Coma G, Peña R, et al. Secretion of interferon- $\gamma$  by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology*. 2009;126(3):386-393. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x
37. Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN- $\gamma$  Promotes Muscle Damage in the *mdx* Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy by Suppressing M2 Macrophage Activation and Inhibiting Muscle Cell Proliferation. *Jl*. 2011;187(10):5419-5428. doi:10.4049/jimmunol.1101267
38. Haag SM, Hauck EW, Eickelberg O, Szardening-Kirchner C, Diemer T, Weidner W. Investigation of the antifibrotic effect of IFN-gamma on fibroblasts in a cell culture model of Peyronie's disease. *Eur Urol*. 2008;53(2):425-430. doi:10.1016/j.eururo.2007.06.036
39. Kalovidouris AE, Plotkin Z, Graesser D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. *J Rheumatol*. 1993;20(10):1718-1723.

40. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, et al. Identification of distinctive interferon gene signatures in different types of myositis. *Neurology*. 2019;93(12):e1193-e1204. doi:10.1212/WNL.00000000000008128
41. Legoedec J, Gasque P, Jeanne JF, Fontaine M. Expression of the complement alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I. *Eur J Immunol*. 1995;25(12):3460-3466. doi:10.1002/eji.1830251238
42. Xavier S, Sahu RK, Bontha SV, et al. Complement C1r serine protease contributes to kidney fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;317(5):F1293-F1304. doi:10.1152/ajprenal.00357.2019
43. Cong L, Pu CQ, Shi Q, Wang Q, Lu XH. Complement membrane attack complex is related with immune-mediated necrotizing myopathy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):4143-4149.
44. Julien S, Vadysirisack D, Sayegh C, et al. Prevention of Anti-HMGCR Immune-Mediated Necrotising Myopathy by C5 Complement Inhibition in a Humanised Mouse Model. *Biomedicines*. 2022;10(8):2036. doi:10.3390/biomedicines10082036
45. Tang Z, Lu B, Hatch E, Sacks SH, Sheerin NS. C3a Mediates Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Proteinuric Nephropathy. *JASN*. 2009;20(3):593-603. doi:10.1681/ASN.2008040434
46. Joe AWB, Yi L, Natarajan A, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):153-163. doi:10.1038/ncb2015
47. Uezumi A, Fukada S ichiro, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):143-152. doi:10.1038/ncb2014
48. De Micheli AJ, Laurilliard EJ, Heinke CL, et al. Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Reports*. 2020;30(10):3583-3595.e5. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.067
49. Opreescu SN, Yue F, Qiu J, Brito LF, Kuang S. Temporal Dynamics and Heterogeneity of Cell Populations during Skeletal Muscle Regeneration. *iScience*. 2020;23(4):100993. doi:10.1016/j.isci.2020.100993
50. Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*. 2004;30(5):645-653. doi:10.1002/mus.20150
51. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle*. 2011;1(1):21. doi:10.1186/2044-5040-1-21
52. Varga T, Mounier R, Patsalos A, et al. Macrophage PPAR $\gamma$ , 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
53. Theret M, Saclier M, Messina G, Rossi FMV. Macrophages in Skeletal Muscle Dystrophies, An Entangled Partner. *J Neuromuscul Dis*. 2022;9(1):1-23. doi:10.3233/JND-210737
54. Klingler W, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Schleip R. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*. 2012;31(3):184-195





## RESULTATS ADDITIONNELS

### 2D *in vitro* model design for IMNM

#### *Résumé de l'étude :*

La physiopathologie des myopathies nécrosantes auto-immunes est encore mal connue. Histologiquement, les muscles des patients présentent un faible infiltrat inflammatoire principalement composé de macrophages, des fibres nécrotiques et des dépôts de complément à la surface de fibres non-nécrotiques (Allenbach et al., 2018b). Environ 80% des patients ont également des auto-anticorps, des anti-HMGCR ou des anti-SRP. Plusieurs arguments directs ou indirects sont en faveur d'un rôle pathogène des auto-anticorps : les patients répondent bien aux traitements immunosuppresseurs et par IgIV, *in vitro* les myoblastes présentent des défauts de fusion et les myotubes une atrophie en présence des auto-anticorps et enfin, *in vivo*, un traitement avec les auto-anticorps entraîne une diminution de la force et l'apparition de fibres nécrotiques chez des souris (Arouche-Delaperche et al., 2017; Bergua et al., 2019). L'effet pathogène dans les MNAI pourrait alors être dû aux anticorps eux-mêmes mais également aux protéines du complément qui reconnaîtraient les complexes immuns à la surface des fibres entraînant l'activation de la voie classique ou encore aux macrophages qui reconnaîtraient également les complexes immuns et entraîneraient une toxicité cellulaire médiée.

Par le développement de nouveaux modèles *in vitro*, j'ai voulu mieux comprendre la physiopathologie des MNAI.

Cette étude s'intéresse aux acteurs cellulaires et biologiques impliqués dans l'induction des mécanismes de nécrose musculaire. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de mise au point de coculture de cellules musculaires, protéines du complément, macrophages et auto-anticorps dont j'ai essayé d'évaluer la nécrose à l'aide de plusieurs marqueurs.

Pour cela, j'ai tout d'abord dosé les enzymes musculaires dans le surnageant mais les quantités détectées étaient faibles et les résultats non reproductibles. J'ai par la suite testé plusieurs marqueurs de nécrose et regardé l'apparition de la nécrose par *live imaging* pour détecter les cellules qui se décollaient. Malheureusement la plupart des marqueurs étaient phototoxiques ou pas assez précis. Seul l'iodure de



propidium semblait avoir l'effet désiré. Le dernier point a été d'utiliser des cellules transfectées GFP et d'observer la diminution du marquage des cellules musculaires et l'apparition du marquage nécrose. Malheureusement l'iodure de propidium s'est révélé toxique dans cette expérience.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Human samples**

Patients' plasma was collected during plasmapheresis and kept in our biobank MASC (Myositis, DNA, Serum, Cells, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04637672).

Healthy donor samples were obtained from a French blood bank (Etablissement Français du Sang ref: C CPSL UNT- N°18/EFS/033).

### **Human immortalized myoblast cell culture**

Human immortalized myoblast cell lines used in this study were established at the Myoline platform at the Institut de Myologie (Paris, France) as previously described (Mamchaoui et al., 2011).

Cells were cultured in a myoblast growth culture consisting of 199 medium (Life Technologies) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) at a 1:4 ratio supplemented with 20% FBS, 25 µg/mL fetuin (Life Technologies), 0.5 ng/mL bFGF (Life Technologies), 5 ng/mL EGF (Life Technologies), 5 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL gentamycin (Life Technologies) and 0.2µg/ml dexamethasone. Myoblast cultures were kept in a cell culture incubator at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until 70-80% confluency. Following a mild dissociation with trypsin-EDTA (0.05%; Thermo Fisher Scientific), they were seeded at 18 750 cells in 48 well plates or 70 000 in 24 well plates in growth media. Differentiation media was added after 1 or 2 days when the cells reached at least 90% confluency.

### **Complement and serum**

Dry tubes from control patients with AB blood type were obtained from the French blood bank (EFS). All the following steps are at 4°C. The tubes were centrifuged at 1000g for 5 min. The supernatant was kept and depleted in IgG using protein G spin columns (ThermoFisher 89957) following the manufacturer instructions. The column retains IgG so we kept the flow-through. This is what we call "complement" (depleted serum containing complement protein). A portion of the serum was heat inactivated at 56°C for 30 minutes to inactivate complement as a control.

### **Total IgG extraction**

Total IgG were extracted from thawed plasmapheresis using protein G spin columns (ThermoFisher 89957) following the manufacturer instructions. Prior extraction, samples were diluted in binding buffer (1:1) and centrifuged 20 min at 3200g to equilibrate pH and avoid

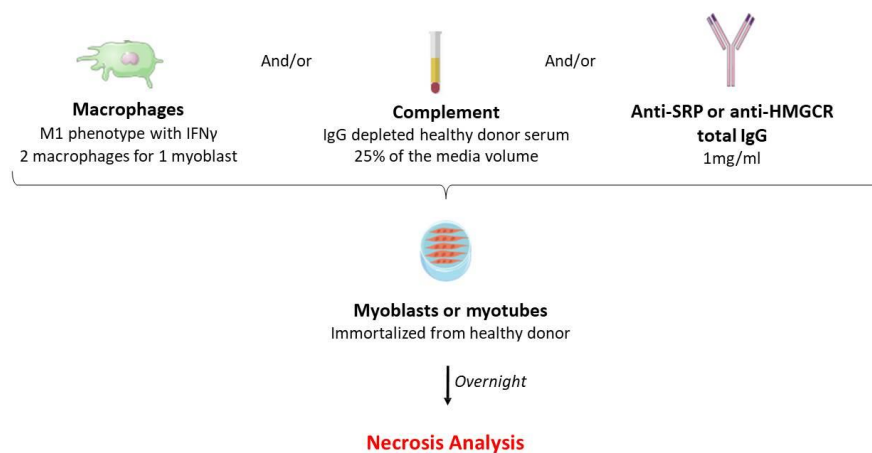
column blockade. After extraction, total IgG eluates were concentrated using 30kDa Amicon filters (Millipore UFC9030), dialyzed one time with PBS and concentrated again to obtain a stock concentration between 45 and 55 mg/ml. Total IgG concentration was quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher) before being aliquoted and kept at -20°C until use. Antibodies recognition of their antigene target was tested using a kit for anti-SRP (D-tek, PMS12DIV-24) or an automate machine for anti-HMGCR (Inova Diagnostics, 701333) following the supplier instructions in Dr Charuel's lab in Pitié Salpêtrière's hospital immunology laboratory.

### **Macrophages extraction and culture**

Buffy coats were obtained from the French blood bank. PBS was added to the blood in a 75cm<sup>2</sup> flask up to 100 ml. The diluted blood was divided into 3 Ficoll tubes and centrifuged at 1000g for 15min without break. The rings containing blood cells were collected in a 50 ml tube and diluted with cold PBS containing 0.3mM EDTA and centrifuged 5 min at 850g at 4°C. The pellet was diluted in 50ml of PBS+EDTA and let 10 min on ice. Cells were then centrifuged at 250g at 4°C for 10 min. The pellet was washed with 50ml of PBS, cells were counted and centrifuged for 10min at 250g and at 4°C. Cells were homogenized in complete RPMI medium (containing 95% of RPMI (Gibco 61870), 1% of Penicilline streptavidin (Gibco 11360), 1% of Sodium Pyruvate (Gibco 11360), 1% of Hepes (Gibco 15630), 1% of MEM vitamins (Gibco 11120), 1% of AANE (Gibco 11140) and 0.1% of 2-mercaptoethanol at 50mM (Gibco 31350)) supplemented with 2% of human AB serum (Sigma) at  $0.8 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>, plated in flasks and incubated at 37°C for one hour. The flasks were then washed 3 times with PBS to discard floating cells. Adherent cells were then put in complete RPMI+10% human AB serum overnight at 37°C. The next day the flasks were incubated one hour at 4°C. Flasks were then vortexed and cells scrapped. Cells were recovered in PBS and centrifuged at 300g for 10min. Complete RPMI+15% human AB serum was added to the pellet and the cells were counted. Ten millions monocytes were then divided into 4 Teflon bags (Merk Millicell 03050) and seeded in complete RPMI medium supplemented with 15% of human AB serum (Sigma). After 7 days without changing the media, the macrophages were polarized for 2 days with 10 ng/ml of interferon gamma in complete advanced RPMI medium (composed of 96% of Advanced RPMI (Gibco 12633), 1% of Glutamax (Gibco 35050), 1% of Penicillin streptavidin (Gibco 15140), 1% of Hepes (Gibco 15630), 1% of MEM vitamins (11120) and 0.1% of 2-mercaptoethanol at 50mM (Gibco 31350)) supplemented with 0.5% of heat inactivated FBS (Thermofisher).

## Coculture

After 1 or 3 days of muscle cells differentiation, the coculture was performed. Macrophages plates were placed for 30min at 4°C and cells were detached by gentle medium aspiration and release pipetting. Macrophages and medium were placed into a 50ml Falcon tube and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. They were then resuspended in 2 ml of medium and counted using Trypan blue. For coculture, muscle cells differentiation media was replaced by macrophages media (complete advanced RPMI + 0.5% heat inactivated FBS) with 2 macrophages for 1 myoblast, 1:4 of complement or heat inactivated serum and/or 1mg/ml of total IgG depending of the condition. The coculture was performed overnight (**Fig. 1**)



**Figure 1: Coculture experimental set-up**

*Myoblasts at 1 day of differentiation or myotubes at 3 days of differentiation are cultivated with macrophages from healthy donor, complement obtained from healthy donor serum and/or patients auto-antibodies overnight. Necrosis is analyzed on the following day.*

## Necrosis analysis

Muscle cells at 1 or 3 days of differentiation were treated or not with staurosporine at 3  $\mu$ M (Sigma). Different necrosis stainings were used for necrosis tracking. Evans blue (Thermofisher A16774.18) 50 $\mu$ M, trypan blue (Gibco 15250061) 1/500e, propidium iodide (Thermofisher P1304MP) 500ng/ml, mitotracker (Invitrogen M22425) 1nM, 7-AAD (necrosis/apoptosis staining kit Abcam ab176750). The necrosis was followed using live imaging in a humidifier chamber at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and taking 1 picture every 20 minutes overnight. Pictures were acquired using Nikon Ti or Nikon Ti-2 inverted microscopes. Movies were analyzed using Metamorph. GFP-transfected cells were also used for these experiments.

## **Supernatant biomolecular dosages**

Supernatants were taken before and after muscle cells treatment and dosed at the biochemistry laboratory in La Pitie Salpêtrière by Dr Rana Al Khouri in the team of Pr Dominique Rousselot.

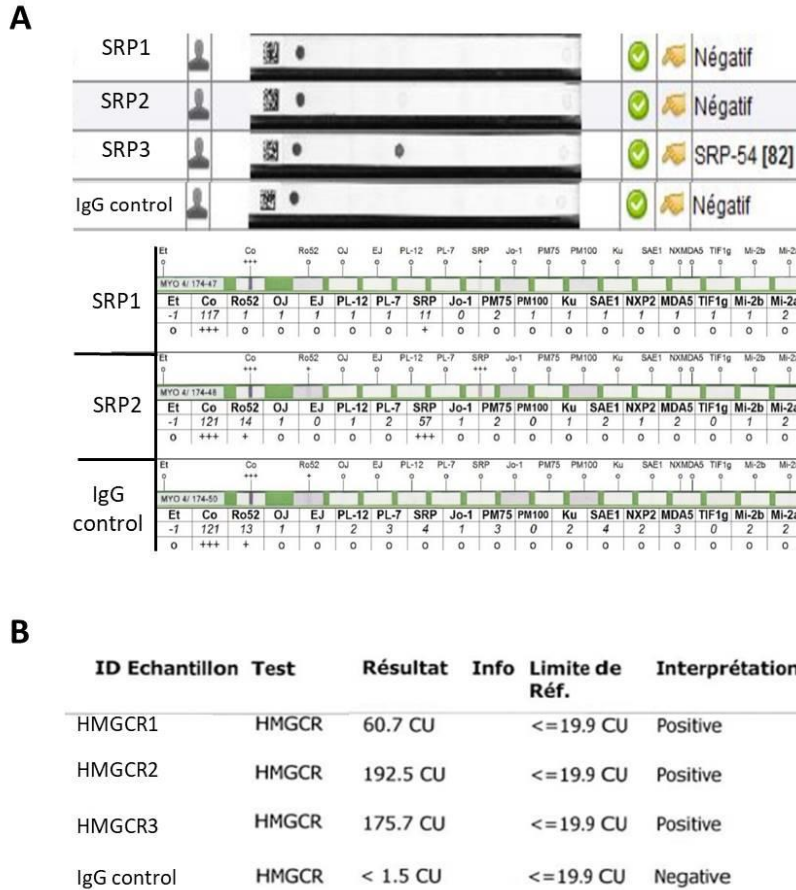
## **Statistical analysis**

The presented experiments were only performed once or twice on 2 or 3 biological replicates so statistical tests were not performed.

## **RESULTS**

### **Preliminary tests**

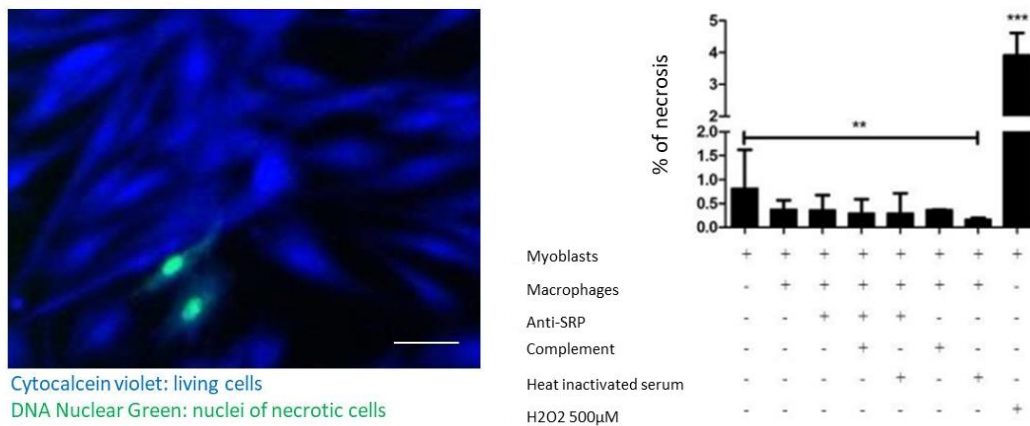
We first checked that the total IgG extracted from patients' plasmapheresis recognized their target. Anti-SRP3 had the highest recognition of the SRP protein. SRP1 and SRP2 had to be 3 times more concentrated to recognize it (**Fig. 2A**). SRP3 was used for our experiments and was the one used in the laboratory before. The 3 anti-HMGCR tested from 3 different patients recognized the HMGCR protein, 2 of them having a highest recognition (**Fig. 2B**). Anti-HMGCR2 was the one used for the experiments since it was the one used for previous experiments in the laboratory.



**Figure 2: Patients auto-antibodies target recognition**

Anti-SRP (A) and anti-HMGCR (B) auto-antibodies are tested for their respective target recognition. SRP1 and SRP2 are 3 times more concentrated on the lower part of figure A.

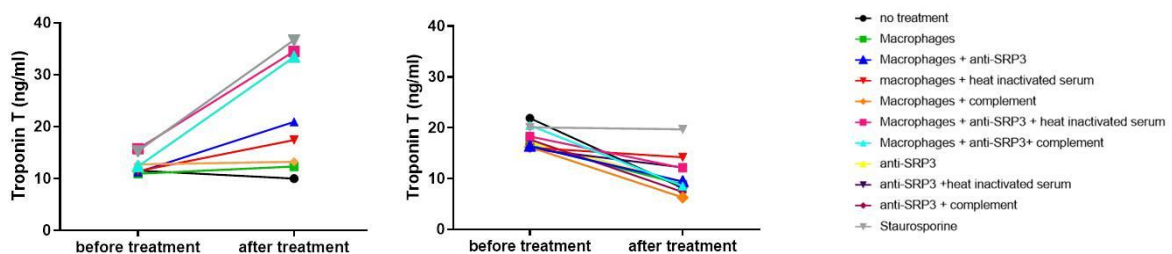
For the first results obtained in the lab before my arrival, cells were stained using Abcam kit that required a lot of washes on living cells before analyzing necrosis. The necrosis percentage was really low, usually less than 1%, and coculture conditions even led to less necrosis (**Fig. 3**). This could be due to necrotic cells detachment caused by the washes.



**Figure 3: Necrosis quantification in coculture using Abcam kit**  
 Coculture was performed overnight and necrosis quantified on the following day. Scale bar 100µm, n=3 experiments with 2 wells/condition

### Biomolecular dosages are not accurate to evaluate necrosis

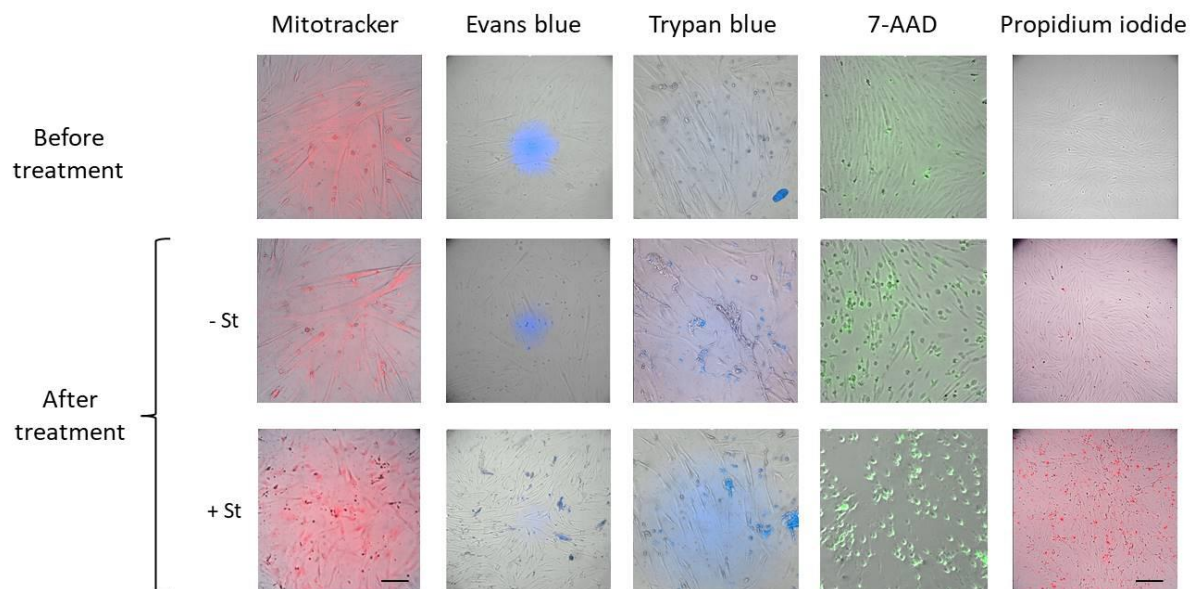
As necrotic cells detachment could cause bias, we thus measured enzymes in the supernatant. We measured creatine kinase, lactate dehydrogenase and ultrasensitive troponin T, 3 enzymes and proteins released during muscle necrosis. We added staurosporine, a protein kinase inhibitor inducing cell necrosis, as a control. Only troponin T was detectable in the supernatant. The first experiment reported a higher concentration of troponin T after treatment in all the conditions except the non-treated ones, macrophages alone and macrophages + complement. This was very promising. However, in the following ones, troponin T levels were decreasing, even with the staurosporine treatment (**Fig. 4**).



**Figure 4: Troponin T dosage of coculture supernatant**  
 Supernatant from triplicate coculture conditions are pooled and dosed for troponin T. n=1 experiment

## Necrosis markers in live imaging are phototoxic or not accurate

We then moved to live-imaging with one picture taken every 20 minutes in order to follow cell death and capture any cell that would detach. We tried once without any staining but the necrosis was hard to follow in brightfield imaging (results not shown). We then tried different necrosis or dead cells markers. Evans blue and trypan blue are azo dyes, 7-AAD and propidium iodide are nucleic acids intercalants and these 4 molecules only enter a cell when the membrane is disrupted. Those stainings can not distinguish necrosis from late apoptosis stages but we hypothesized that necrosis would be the first cause of cell death. Mitotracker stains mitochondria in living cells. Without staurosporine, trypan blue and 7-AAD were toxic for the cells as some cells detached and became rounded (**Fig. 5**). Mitotracker, Evans blue and Propidium iodide did not seem toxic. With staurosporine treatment, using mitotracker, it was really hard to distinguish necrotic cells from normal ones as the staining was present in all the cells. With Evans blue, the staining was not really accurate and the cells were stained really late. Propidium iodide gave the best results but there was also a delay between the cell death and the staining.

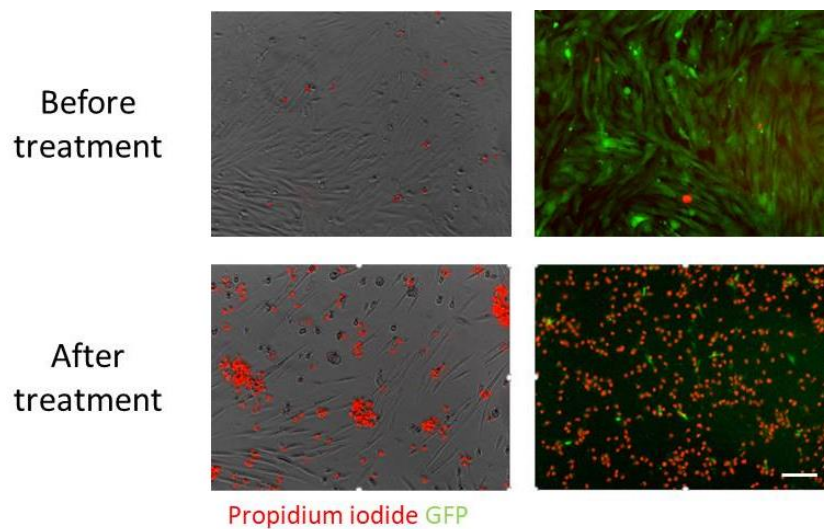


**Figure 5: Necrosis stainings tests**

*Myoblasts or myotubes are let overnight with different necrosis markers and treated with or without staurosporine (St) as a positive control. Pictures were taken every 20 minutes. Left scale bar 100 $\mu$ m, right scale bar 200 $\mu$ m*

Finally, we tried to analyze necrosis using GFP-transfected cells and propidium iodide. We thought that it would be easier to quantify the necrosis as a disappearance of the green fluorescence and appearance of the propidium iodide staining. However, propidium iodide was cytotoxic this time and, even without staurosporine treatment, the cells died (**Fig. 6**).





**Figure 6: GFP-transfected cells necrosis test**

*Cells were stably transfected with a GFP lentivirus and let with propidium iodide overnight with 1 picture taken every 20 minutes. Scale bar 200 $\mu$ m*

## DISCUSSION/CONCLUSION:

In this study, muscle necrosis assessment was difficult, the reagents used to quantify it being phototoxic or not sensitive enough.

Supernatant protein dosage was interesting and could be improved. The measurements performed at the hospital biochemistry lab were maybe not sensitive enough and could be performed by ELISA. Culture supernatants could also be concentrated before dosage.

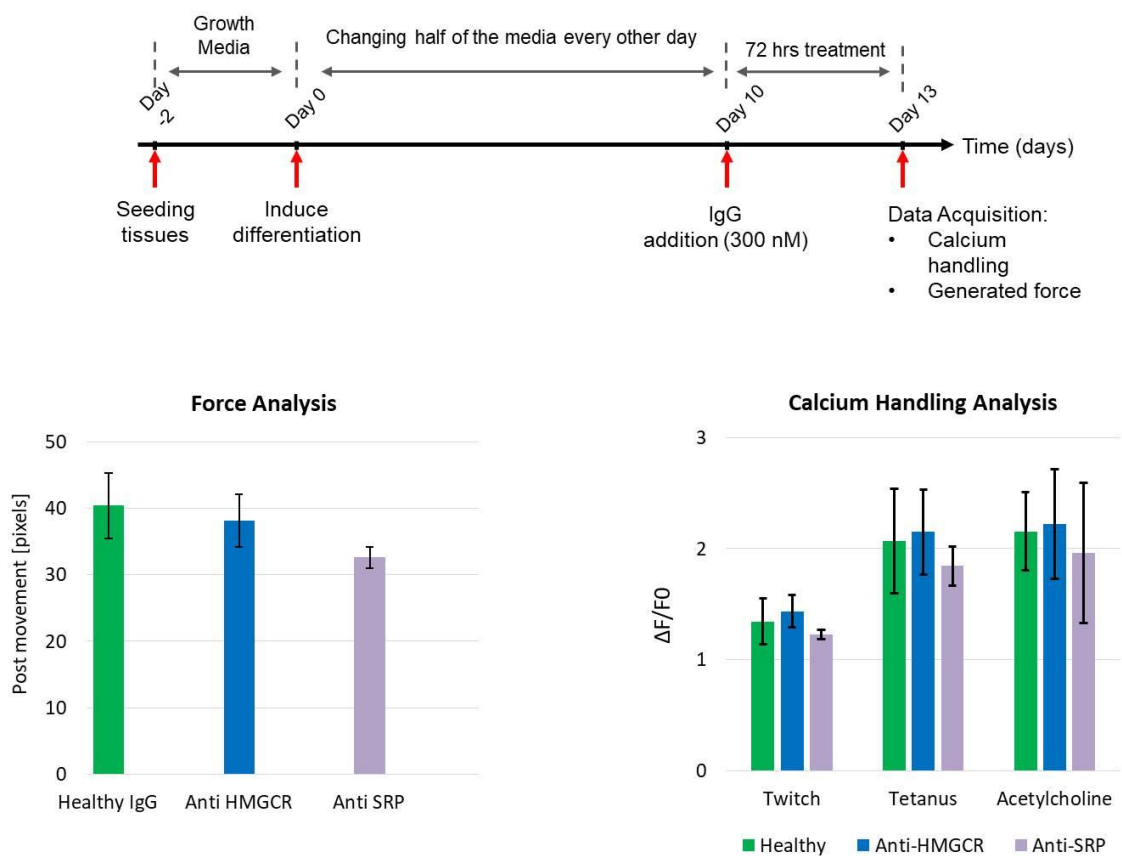
The Incucyte technology could also be used here. This technology is like a microscope in an incubator. The microscope part moves to take pictures at determined time-points. The company also sells a cell death marker only entering the cells when the membrane is permeabilized. Co-culture experiments could then be performed with the GFP-transfected cells and a red cell death marker. Only cells double stained would then be analyzed to avoid counting macrophages.

However, these methods would not allow distinguishing necrosis from late apoptosis. We would have to use also annexin V to evaluate the apoptosis or a capase inhibitor to inhibit it.

### 3D *in vitro* model design for IMNM

#### Résumé de l'étude :

Le but de ce deuxième modèle était d'étudier l'effet pathogène des auto-anticorps sur les fibres musculaires. Voulant étudier cela d'une manière plus physiologique qu'avec le précédent modèle 2D utilisé au laboratoire (Arouche-Delaperche et al., 2017), une collaboration a été établie avec le Dr Penney Gilbert à Toronto au Canada dont l'équipe est spécialisée dans les modèles musculaires 3D. Une première expérience test a été réalisée par l'équipe canadienne. Le traitement des tissus 3D montre une légère diminution de la force et de la gestion du calcium indiquant une capacité de contraction diminuée par les tissus traités avec les anticorps anti-SRP.



#### Figure préliminaire : Première expérience sur microtissus réalisée à Toronto

Après ensemencement, les tissus restent 2 jours dans du milieu de croissance avant d'être passés en différenciation. Les tissus ont été traités du jour 10 au jour 13 de différenciation et leur force et la gestion du calcium ont été analysées.

Lors de ma troisième année de thèse, je suis partie 9 mois dans l'équipe du Dr Gilbert afin d'apprendre la culture des muscles en 3D et pour mettre au point un modèle 3D d'étude du rôle des auto-anticorps au cours des MNAI. J'ai tout d'abord appris la technique de culture de macrotissus, celle-ci étant plus simple pour se former. Ces tissus ont été traités avec les IgG ou les plasmas d'un patient à anti-SRP et un patient à anti-HMGCR. Sur une première expérience, les IgG des patients anti-SRP semblent entraîner une atrophie des fibres et une diminution de la force des tissus et le plasma anti-SRP une diminution de la maturation des fibres.

Chaque tissu nécessitant un million de cellules, j'ai ensuite appris un modèle de culture de microtissus nécessitant 150 000 cellules. Lors des premières expériences, les tissus avaient une bonne morphologie mais ils ont par la suite commencé à se remodeler asymétriquement ou à produire des fibres dysmorphiques. Sur la seule expérience réalisée, les traitements ne changent pas l'aspect des fibres mais le plasma des patients diminue la force des tissus.

J'ai ensuite appris un dernier modèle où les cellules étaientensemencées sur du papier à thé en cellulose leur servant de structure 3D. Sur ce modèle j'ai seulement eu le temps de réaliser des mises au point.

Le projet continue à Toronto avec une doctorante qui va traiter les microtissus avec les anticorps pour commencer puis en combinaison avec le complément.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Human samples**

Human samples were the same as the 2D cell culture above.

### **Human immortalized myoblast cell culture**

For 3D experiments, immortalized myoblasts were cultured in a myoblast growth culture medium consisting of PromoCell Skeletal Muscle Cell Growth Medium kit (Skeletal Muscle Cell Basal Medium + Skeletal Muscle Cell Growth Medium Supplement Mix) supplemented with 15 % fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S, Gibco). Myoblast cultures were kept in a cell culture incubator at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> until 70-80% confluency. Following a mild dissociation with trypsin-EDTA (0.25 %; Thermo Fisher Scientific) the cells were either sub-cultured into new tissue culture dishes or used to generate 3D tissues. Half of the myoblast growth media was exchanged with fresh media every other day during the culture period.

### **Total IgG extraction**

Total IgG were extracted from thawed plasmapheresis using protein G spin columns (ThermoFisher) following the manufacturer's instructions as in the 2D culture experiments.

### **Macrotissues plates fabrication**

A 500µl layer of PDMS (10 parts of elastomer 1 part of curing agent, Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning) was cast for each well of a 12 well plate and placed at 65°C overnight to cure. 800 µl of a second PDMS layer was added the following day and a laser cut, dogbone shaped piece of acrylic (middle dimensions = 14 mm by 2.75 mm; side chamber dimensions = 5.7 mm by 2.5 mm) was placed in the middle of the wells. The plate was placed at 60°C overnight. Dogbones were removed and 3 velcro hooks were placed at each dogbone ends using a drop of PDMS to stick it. The plates were placed again at 60°C. For sterilization, the wells were rinsed with PBS and anhydrous ethanol was added for 20 min. Ethanol was removed, and the wells were let to dry for 30 minutes before 2 last washes with PBS. PBS was removed and the plates were stocked.

### **MyoTACTIC culture device fabrication**

3D human muscle microtissues were fabricated within the polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning) MyoTACTIC culture device. The fabrication process of the MyoTACTIC 96-well device can be found in previous publications (Afshar et al., 2020; Lad et al., 2021). The plates were sterilized in an autoclave.

### **Microtissues and macrotissues fabrication**

PDMS culture plates were coated for at least 1h30 with a 5 % Pluronic® F-127 (Sigma, Cat# P2443) solution in dH<sub>2</sub>O (100 µL/well) at 4 °C.

3D microtissues fabrication has been previously described (Afshar et al., 2020; Bakooshli et al., 2019; Lad et al., 2021). The first steps are the same for the macro and microtissues. Tissues were generated using human immortalized myoblast cell line from healthy patient. Myoblasts were released from culture dishes via mild trypsinization and then resuspended in a hydrogel mixture containing 4 mg/mL fibrinogen (40 % v/v; Sigma) and Geltrex (20 % v/v; Thermo Fisher Scientific) in DMEM (40 % v/v; Gibco) at  $1.5 \times 10^5$  cells/tissue for microtissues and  $1 \times 10^6$  cells/tissues for macrotissues ( $1.0 \times 10^7$  cells/mL). Just prior to seeding, 0.2 units of thrombin (Sigma) per each mg of fibrinogen were added to the solution. The tissues were then seeded and placed for 5 min in an incubator at 37°C to expediate thrombin-mediated fibrin gel formation. Following gelation, the resulting tissues were incubated with growth medium consisting of Skeletal Muscle Cell Basal Medium (PromoCell) supplemented with 20 % FBS, 1 % P/S and 1.5 mg/mL 6-aminocaproic acid (3 % v/v; ACA; Sigma). After 2 days of incubation in the growth medium, the culture medium was replaced with a differentiation medium consisting of DMEM supplemented with 2 % horse serum (Gibco), 1 % P/S, 10 µg/mL human recombinant insulin (Sigma, Cat# 91077C) and 2 mg/mL ACA (4 % v/v) to induce myoblast differentiation. The tissues were maintained in differentiation medium for 10 days, and half of the culture medium was replaced with fresh media every other day during this period.

### **Mini-MEndR device**

Five-millimeter diameter circles were cut out of tea bag paper using a biopsy punch. Papers were then sterilized in the autoclave. Pluronic acid was added in a 96 well plate and left for at least 1h30 at 4°C. Pluronic acid was aspirated and the plate was left to dry. When the wells were dry, one tea bag paper circle was added at the center of the wells, humidified with 4µl of

PBS+thrombin (0.8U/ml) and let dry. Tissues were generated using human immortalized myoblast lines from healthy patient. Myoblasts were released from culture dishes via mild trypsinization and then resuspended in a hydrogel mixture containing 4 mg/mL fibrinogen (40 % v/v; Sigma) and Geltrex (20 % v/v; Thermo Fisher Scientific) in DMEM (40 % v/v; Gibco) counting 50 000 or 70 000 cells/tissue in 4µl of hydrogel. The tissues were then placed for 5 min in an incubator at 37°C to expediate thrombin-mediated fibrin gel formation. Following gelation, the resulting tissues were incubated with growth medium identical to the one used for microtissues. After 2 days of incubation in the growth medium, the culture medium was replaced with a differentiation medium identical to one one of microtissues. The tissues were maintained in differentiation medium for 10 days, and half of the culture medium was replaced with fresh medium every other day during this period.

### **Plasma obtention for 3D tissues treatment**

Eluates of plasmapheresis were collected from 3 anti-HMGCR patients and 3 anti-SRP patients and aliquoted into 50ml samples before freezing. Antibodies presence was tested in the biochemistry lab in Pitie Salpêtrière's hospital. Replacement plasma (Octaplas) was used as a control. For plasma use, samples were thawed and filtered with 0.22µm filters and heat-inactivated 30 min at 56°C. Thrombin was added at 0.5U/ml (Sigma T6884), the samples were incubated at 37°C 5 min and centrifuged at 3200g 20 min. The supernatant was then kept to remove any clotting factors.

### **3D tissue treatment**

Tissues were treated after 6 days in differentiation media. Differentiation media in the wells was fully exchanged for all conditions. From day 6 and onward, the 2% horse serum was replaced by 2% heat-inactivated horse serum to avoid any potential interaction between IgG and the complement protein. To test the pathogenic effect of anti-SRP and anti-HMGCR antibodies, tissues were treated with patients' plasma or total IgG. Patients and control plasma were used as horse serum replacement at 2% of total differentiation media volume. Total IgG were added at 1mg/ml. Cerivastatin at 25nM or dexamethasone at 20µg/ml were used as positive atrophy control.

Half of the differentiation media was exchanged at day 8 and the analysis were performed at day 10.

### **3D tissue compaction and tissue remodeling analysis**

As readout of tissue remodeling and self-organization, the compaction of microtissues was examined by evaluating 3D tissues width over the treatment period. Phase contrast images (4x magnification) were acquired at differentiation days 6 and 10 using an inverted microscope (Olympus) to measure microtissues compaction. Using Fiji software (ImageJ), the width of each microtissue was measured at different locations across the tissue length and then averaged. The average diameter was captured as an indication of tissue remodeling and health. Data are represented as percentage of absolute tissue width change. Tissues remodeling in a non-uniform way (remodeling more towards one side of the tissue or towards the middle) were excluded from the analysis.

### **3D tissue pre-tension analysis**

Microtissues pre-tension was examined by evaluating the distance between the two Myotactic posts over the treatment period. Phase contrast images (4x magnification) were acquired at differentiation days 6 and 10 using an inverted microscope (Olympus). Using Fiji software (ImageJ), the post distance of each microtissue was measured at 3 different locations and then averaged.

### **Tissues staining**

To visualize myotubes immunostaining was performed. Following aspiration of culture media and 3 washes with D-PBS, tissues were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA, Alfa Aesar) in D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) for 15 min at room temperature (RT). Following three washes with D-PBS, samples were permeabilized and blocked with a blocking solution consisting of 10 % goat serum (Life Technologies) and 0.3 % Triton X-100 (BioShop) in D-PBS for 30 min at RT. Subsequently, samples were incubated with a mouse anti-sarcomeric  $\alpha$ -actinin antibody (1:800; Sigma) diluted in the blocking solution overnight at 4 °C. After washing with D-PBS three times, samples were then incubated for 60 min at RT with goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (1:500), Alexa Fluor 568 phalloidin antibodies (1:500; Life Technologies, Cat# A12380) and Hoechst 33342 or Draq5 (Cell Signalling technology) (1:1000) diluted in the blocking solution. To examine myotube formation, confocal fluorescent images were acquired using Fluoview-10 imaging software (FV-10; Olympus) and an IX83 inverted microscope (Olympus).

## **Myotubes width analysis**

Myotube width was analyzed at differentiation day 10 by assessing 40x magnification confocal images. Fiji software (ImageJ, NIH) was used to facilitate measurement of myotube diameter in z-stack confocal images.

For micro and macrotissues: Non-damaged myotubes, which were visible across the length of 40x image, were considered for width analysis. ROI (region of interest) boxes, 50  $\mu\text{m}$  length and same width of image, were designed and overlaid on each image (one located at each end of the image and one located in the center) to define the locations for making three measurements in similar positions across all images. Then, three width measurements across the length of each myotube were assessed inside the ROI boxes and results were averaged to indicate width per myotube. Subsequently, average width of myotube was calculated in a total of 5 images per each tissue.

## **Automated analysis of sarcomere z-disks post electrical stimulation**

Tissues Z-line architecture was analyzed by assessing 40x magnification confocal images from sarcomeric alpha-actinin and phalloidin immunostained tissues at differentiation day 10. Z-line architecture in each image was analyzed using a computational structural assay in MATLAB as previously described (Morris et al., 2020a). In brief, this program performs a binary skeletonization of images immunostained to visualize SAA and f-actin to identify z-line architecture. Off target identification is eliminated from the analysis through the use of an f-actin vector threshold limit in comparison to the SAA vector. To facilitate execution, ImageJ was first used to generate z-stack confocal images projected over maximum intensity for each 40x magnification image. Subsequently, sarcomeric alpha-actinin and phalloidin channels were each saved as TIFF files. The program “ZlineDetection” was launched and all author recommended settings were selected aside from the following modifications:

- Dot product threshold for continuous z-line lengths = 0.77 (~40 degrees)
- Actin segmentation grid size = 150 pix.
- Actin segmentation threshold = 0.88 (~30 degrees).
- Noise removal area = 16 sq. pix.
- Skeletonization branch size removal = 5 pixels.

The program was run using each image to identify z-line architecture for each microtissue, and then the data was organized into matrices for evaluation.



## **Microtissues electrical stimulation and contractile force measurement**

To evaluate contractile function of microtissues, electrical stimulation was applied on day 10 of differentiation as previously described (Afshar et al., 2020; Lad et al., 2021). Briefly, sterile syringe needles (25G x 5/8, BD™) were implanted behind each post of a PDMS well as electrodes to generate an electric field parallel to the length of the tissue. Then, using nickel coated copper wires (McMaster-Carr), electrodes were directly connected to a pulse generator (Rigol DG1022U). Electrical square-wave pulses with 5% duty cycle, 5 V amplitude, and 0.5 Hz (twitch contractions) or 20% duty cycle, 5 V amplitude, and 20 Hz (tetanus contractions) frequency were applied to stimulate microtissues. Video clips of post deflection under electrical stimuli were recorded using an iPhone® SE (Apple®) mounted (LabCam™ iPhone microscope mount) to an inverted microscope (Olympus; IX83 microscope) using a 10x magnification lens. Post displacement was quantified using a custom-written Python computer vision script (Afshar et al., 2020; Lad et al., 2021), which measured post deflection in pixels (detecting post displacement  $\geq 1$  pixel). Microtissues were induced to contract 7-8 times for twitch and 6 times for tetanus contractions, and subsequently the maximum post displacements were averaged to determine the average post deflection per microtissue. The post displacement values, in pixel, were then used to calculate microtissues absolute force production ( $\mu\text{N}$ ), as previously described in detail (Afshar et al., 2020; Lad et al., 2021).

## **Macro and microtissues calcium transient analysis**

Human immortalized myoblasts lines expressing a calcium reporter construct (pRRL-MHCK7-GCaMP6 was a gift from Nenad Bursac, Addgene plasmid # 65042) were established using a lentiviral system following a previously described method (Bakooshli et al., 2019). The cell line used for the transfection is the same used for the other experiment. Calcium transients were captured in response to electrical stimulation (see details above; twitch and tetanus) using an inverted microscope (Olympus IX83) with a 4x magnification lens at day 10 of differentiation. Consecutive time-lapse epi-fluorescent images were captured at 11 frames per second with a DP80 CCD camera (Olympus) outfitted with a fluorescein isothiocyanate (FITC) filter and Olympus cellSens™ imaging software. Subsequently, the fluorescent signal in the series of time-lapse images was measured in a single region of interest (ROI) within the center of each microtissue using Fiji software (ImageJ, NIH) (Schindelin et al., 2012) and relative fluctuations in the fluorescence signal were calculated and presented as  $\Delta F/F_0 = (F_{\text{immediate}} - F_{\text{baseline}})/F_{\text{baseline}}$ . The peak signal of consecutive twitch (7-8 stimuli) and tetanus (6 stimuli) contractions were averaged to determine the average relative change in fluorescence signal for each microtissue and was plotted against the time.

## **Statistical Analysis**

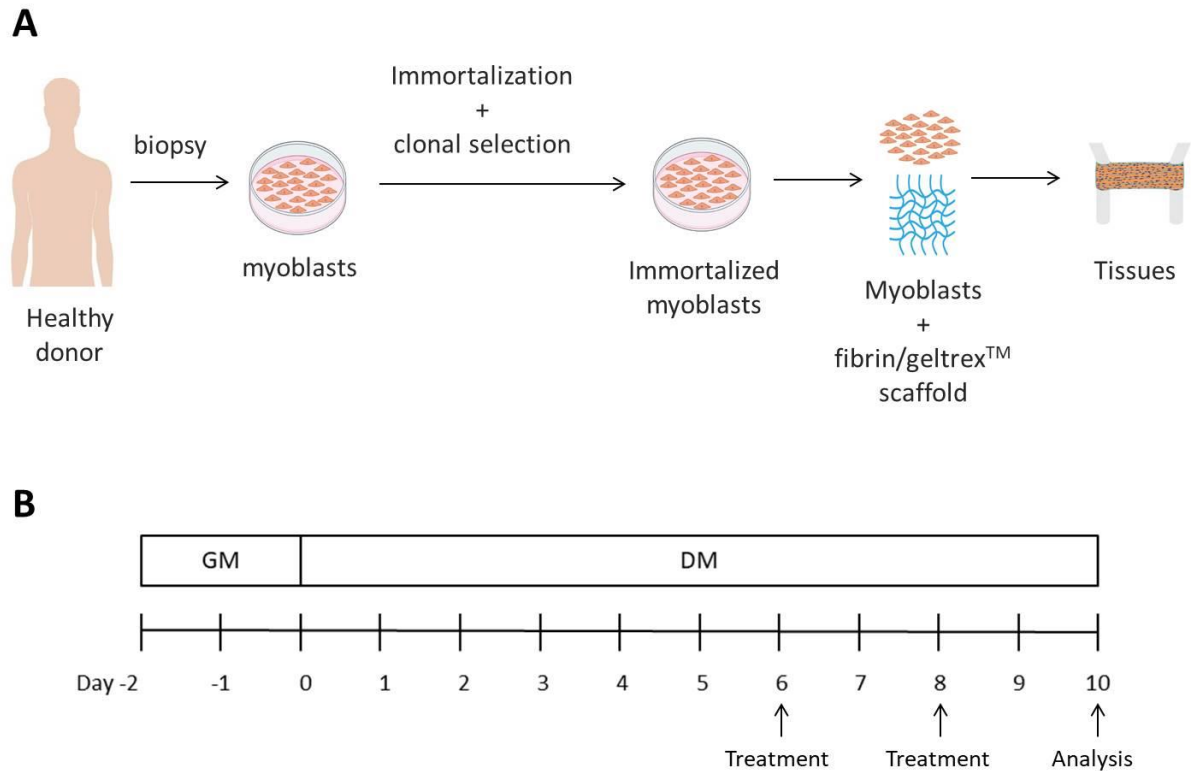
Most of the experiments presented were performed only once using 2 or 3 tissues for each condition. Data are expressed as mean+standard deviation (SD) and statistical tests were not performed.

## **RESULTS**

### **Anti-SRP and anti-HMGRC antibodies may elicit an effect on 3D macrotissues morphology**

We first sought to establish conditions to evaluate the effects of treating 3D cultures of human myotubes established from healthy immortalized myogenic progenitor with antibodies or plasma from IMNM patients.

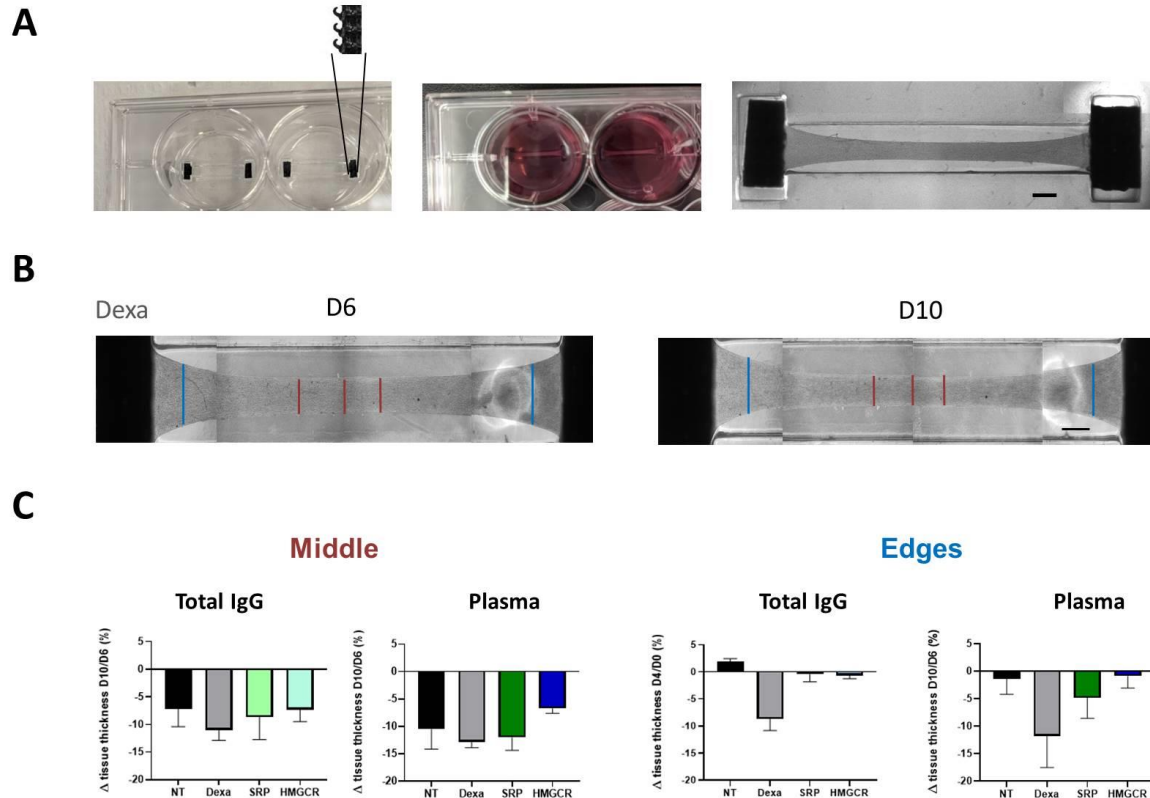
Briefly, for all the 3D models, healthy immortalized cells were used and were seeded in a fibrin/geltrex hydrogel that will serve as an extra-cellular matrix scaffold when thrombin gelation happens (**Fig. 1A**). Two days after seeding, growth medium is replaced by differentiation medium (**Fig. 1B**). The tissues were treated at day 6 when myotubes are already formed, medium was changed at day 8 and the experiment was stopped at day 10 to avoid over-remodelling of the tissues.



**Figure 1: 3D tissues experimental set up**

For all the 3D tissues models, cells were obtained and immortalized from healthy donor and the myoblasts were mixed with fibrin and geltrex to serve as a scaffold (A). The tissues were then let 2 days in growth medium (GM) before switching to differentiation medium (DM). Tissues were treated at day 6 of differentiation, the medium was half exchanged at day 8 and the experiment was stopped at day 10 (B).

Figure 2A represents a view of the macrotissues model. We first used the macrotissues model made in a 12-well plate since it is easier to learn. The tissues were treated with dexamethasone, total IgG or 2% patients' plasma. We used heat inactivated horse serum in the differentiation medium from day 6 to avoid complement presence. We captured brightfield images of the tissues and evaluated gross tissue width across the treatment period (**Fig. 2B**). Of note, the tissues remodeling overtime to form mature myotubes, it is expected that tissues thickness would decrease. From these analyses, we can see that IgG treatment did not affect the tissues middle thickness, the control IgG even being the condition with the most loss of thickness. However, the patients IgG treatment led to thinner edges. For plasma treatment, there was again no difference for the tissues middle width but SRP plasma treatment seemed to have a thinning effect on the edges.



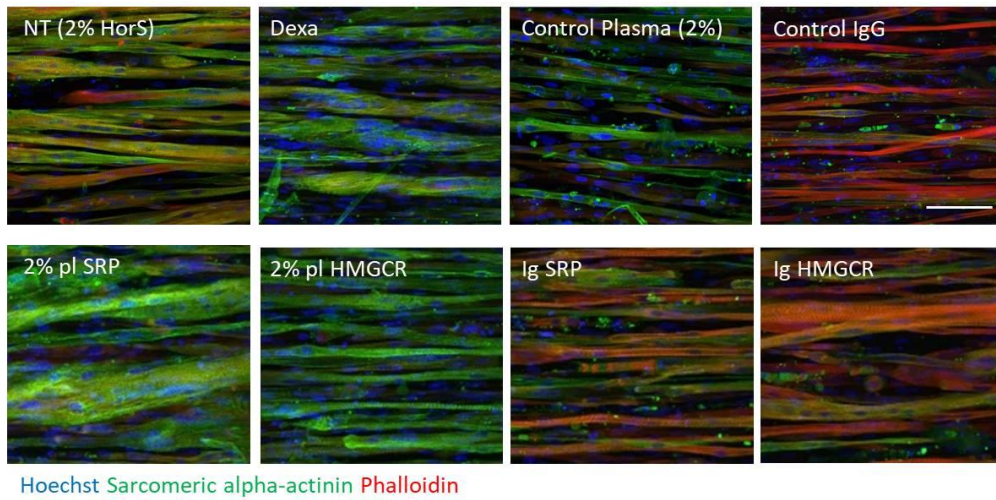
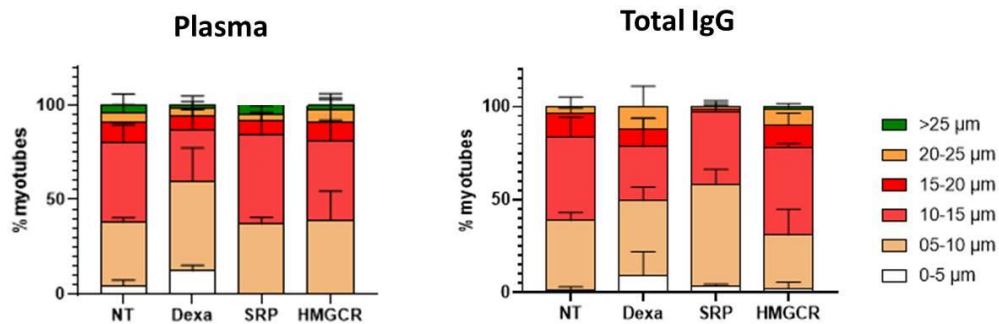
**Figure 2: Macrotissues model and remodelling over treatment time**

The macrotissues are seeded in a 12 well plate containing a dogbone shape molded in PDMS and 2 velcro hooks at each extremity (A). Tissues remodelling was assessed by taking 3 measurements in the middle of the tissue and one at each edge at day 6 (D6) and day 10 (D10) of differentiation (B). Tissues remodelling was then expressed as the absolute difference in percentage between day 10 and day 6 at the middle and at the edges (C).

Scale bars: 400 $\mu$ m Data are expressed as mean + SD, n=2 tissues/condition, NT: non-treated, Dexa: dexamethasone 20 $\mu$ M

### Anti-SRP but not anti-HMGRC antibodies may elicit an effect on 3D macrotissues myotubes

We next looked if the treatments induced alterations in myotubes development. By looking at the confocal images, we can see that dexamethasone treatment seemed to induce a myotube dysmorphism rather than the expected atrophy (Fig. 3A). Control treatments (IgG or human plasma) seem to induce atrophy when they are not supposed to. We only performed this experiment once so the following results will be compared to non-treated control. We evaluated the myotubes width for each condition and found that plasma treatments did not seem to have an effect on myotubes size (Fig3B). However, total anti-SRP treatment had a tendency to induce smaller myotubes. Anti-HMGCR on the contrary did not seem to have an effect.

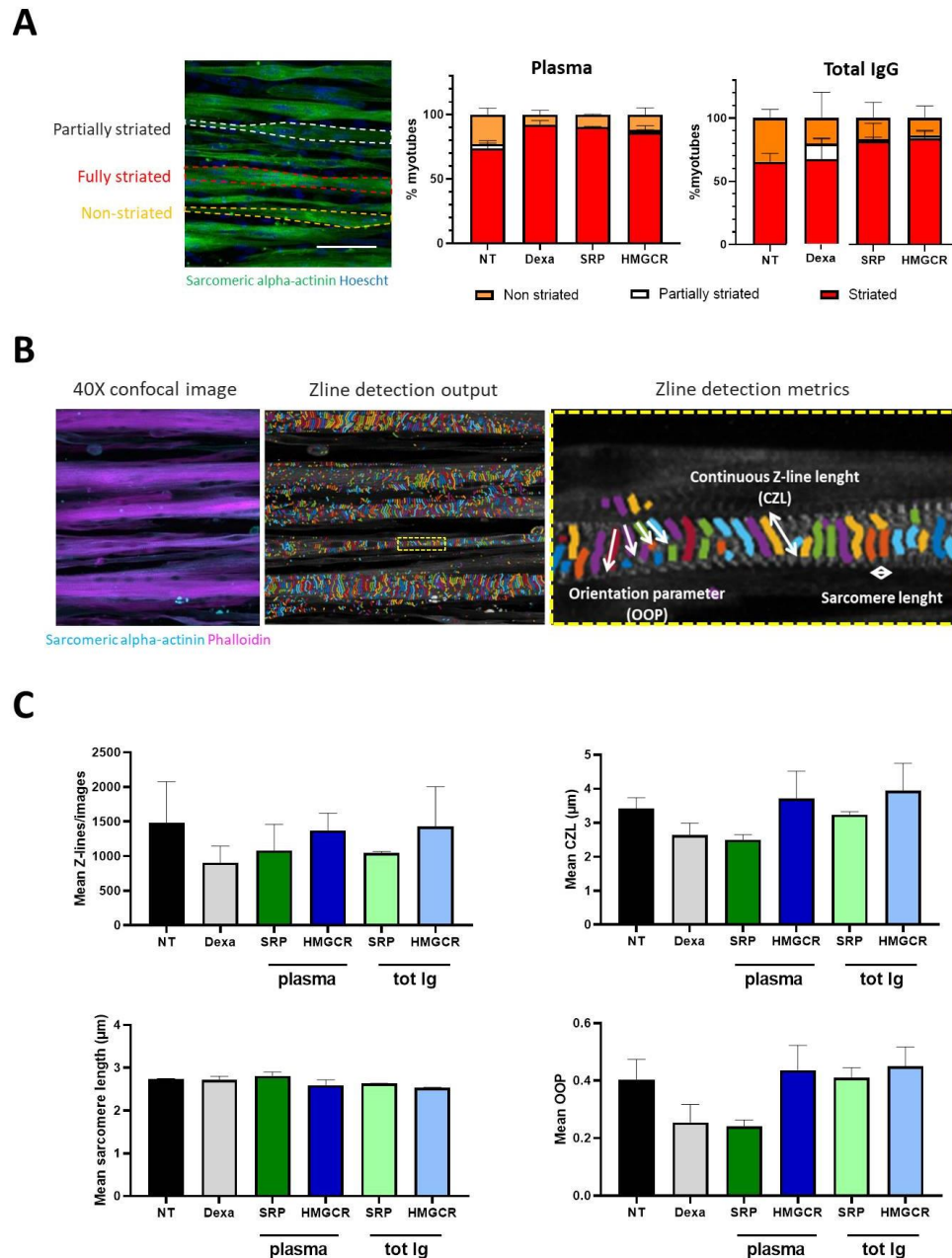
**A****B****Figure 3: Treatments effect on macrotissues myotubes**

Immunostaining of day 10 macrotissues with Hoechst (blue), sarcomeric alpha-actinin (green) and phalloidin (red) (A) and myotubes size quantification (B). Scale bar 50μm, data are expressed as mean + SD, n=2 tissues/condition, NT: non-treated, Dexa: dexamethasone

### Anti-SRP but not anti-HMGR antibodies elicit an effect on 3D macrotissues maturation

Next, to further characterize the difference between macrotissues treatments, we looked at myotube maturation and sarcomere structure. We first looked at the myotubes striation patterns and saw that neither plasma nor IgG treatment seemed to influence the overall striation pattern (**Fig. 4A**). Myotubes seemed even more striated with the treatments (including dexamethasone). Then, we used an automated Matlab program to analyze sarcomere structure (Morris et al., 2020b). The program uses the phalloidin and sarcomeric alpha actinin stainings to give a skeletonization of the sarcomeres (**Fig. 4B**). It gives us then 3 different sarcomere parameters we can analyze. The sarcomere length, which is the distance between 2 Z-lines, the shorter it is, the more mature the fiber is. The continuous Z-line length (CZL) is each Z-line length, the longer it is, the more mature the fiber is. Finally, the orientation parameter (OOP) is a coefficient giving the sarcomere orientation, the closer it is to 1, the more the fiber is. The number of Z-lines/images seemed decreased in anti-SRP plasma and total

IgG treatment (**Fig. 4C**). However, it did not change for anti-HMGCR. Only anti-SRP plasma treatment seemed to have an effect by decreasing the CZL and OOP parameters. No treatment affected the sarcomere length.



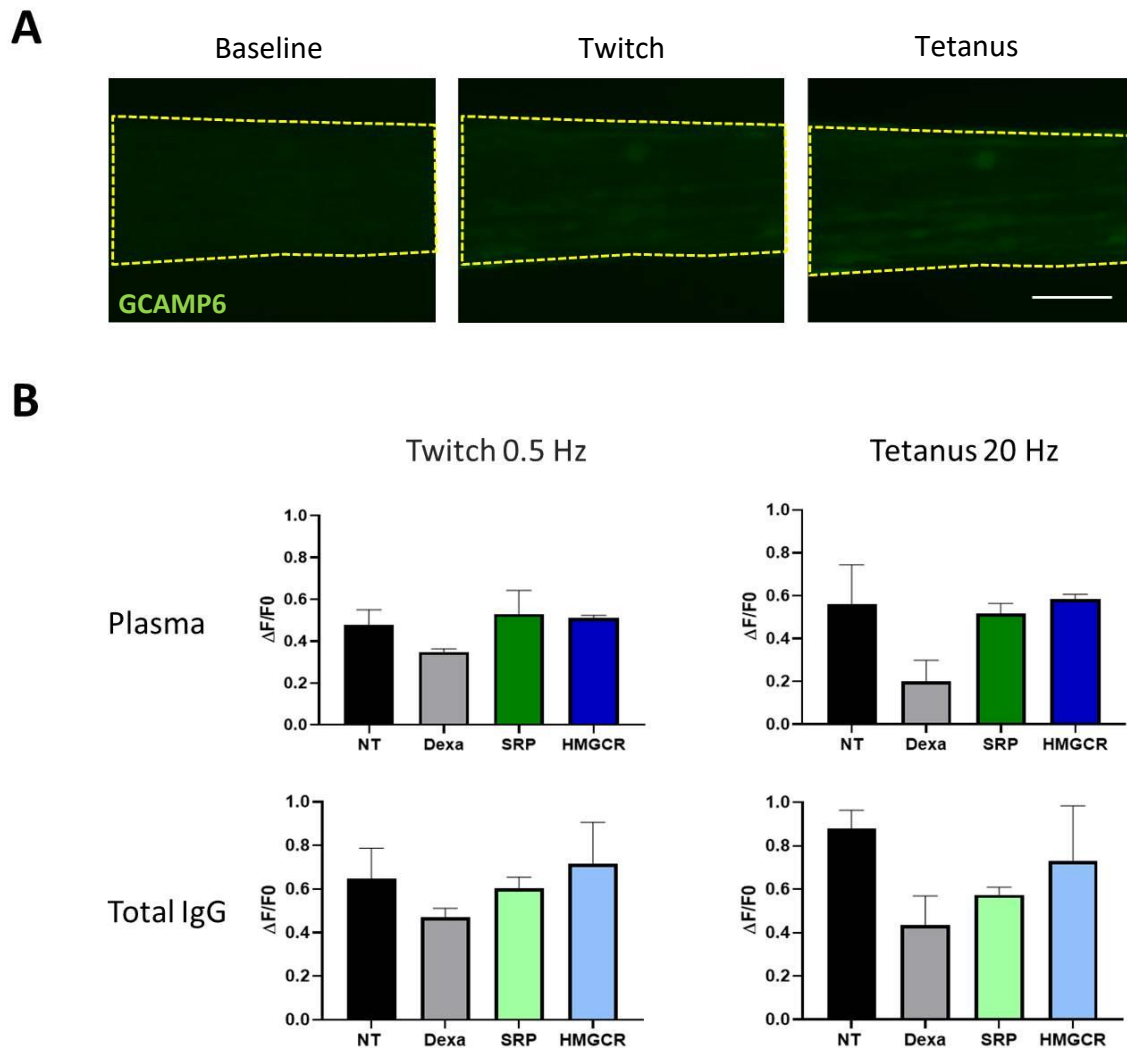
**Figure 4: Treatments effect on macro-tissues maturation and sarcomeres structure**

Immunostaining and quantification of striated myotubes (A). Sarcomeres are analyzed using a Matlab program (B) and parameters are analyzed for each condition (C). Scale bar 50µm, data are expressed as mean + SD, n=2 tissues/condition, tot Ig: total IgG, NT: non-treated, Dexa: dexamethasone

### Anti-SRP seems to elicit an effect on 3D micro-tissue calcium handling

Calcium handling properties of macro-tissues are expressed as the difference between the fluorescence calcium signal during contraction and at baseline (**Fig. 5A**). Calcium transients were decreased for the anti-SRP total IgG treatment following high intensity stimulation

indicating a decreased capacity to contract (**Fig. 5B**). Of note, calcium transients for dexamethasone treated tissues were decreased in all the conditions.



**Figure 5: Treatments effects on macrotissues calcium handling**

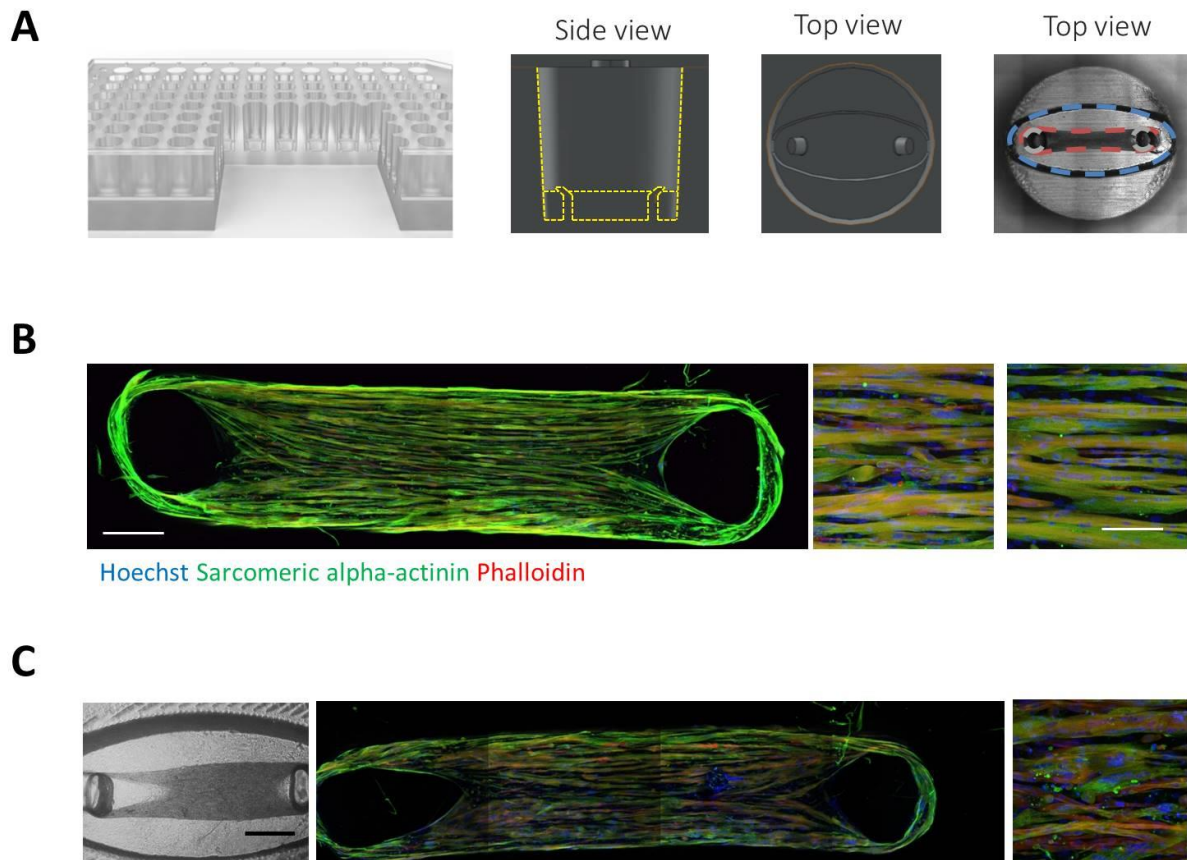
Muscle cells stably transfected with a GFP-GCAMP reporter are used to make macrotissues. Tissues are electrically stimulated and the results are expressed as the fluorescence intensity during contraction compared to baseline (A) for twitch and tetanus contractions (B). Scale bar 400 $\mu$ m, data are expressed as mean + SD, n=2 tissues/condition, NT: non-treated, Dexa: dexamethasone

### Microtissues morphology was not reproducible

Macrotissues experiments were useful for training but required 10<sup>6</sup> cells/tissues. It was then not bearable to use them for all the experiments and replicates needed. We thus used microtissues requiring 150 000 cells/tissue. Microtissues plate consists of a 96 well PDMS plate with an oval shape and two posts at the bottom of the well (**Fig. 6A**). The tissues are seeded in the oval shape and will remodel between the two posts. A first experiment treating the tissues was performed and the tissues morphology was great (**Fig. 6B**). However, the next following experiments did not show good tissue morphology and could not be analyzed (**Fig. 6C**). The tissues were remodeling towards one side and, even when the tissue morphology



was good, the myotubes were really dysmorphic. The following results are the ones obtained with the one successful experiment. Control IgG and control plasma were not optimized at that time, we later found the best controls that are plasma obtained from the company Octagam and used as replacement plasma for patients plasmapheresis and total IgG were extracted from this plasma. We had this replacement plasma only when the tissues morphology started to look bad. Dexamethasone treatment gave some dysmorphic myotubes so we used cerivastatin here as atrophy control.



**Figure 6: Microtissues model**

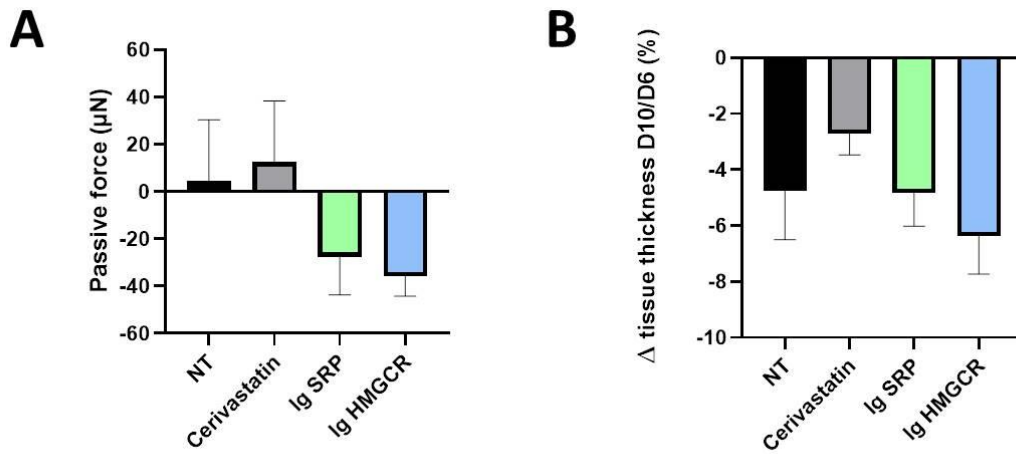
*Microtissues are seeded in the Myotactic plate conceived as a 96-well plate with an oval shape and 2 posts at the bottom of each well (A). The tissues remodelled correctly for the first experiments (B)(scale bars 400µm and 50µm), but then started remodelling towards one side or having dysmorphic myotubes (C) scale bar 500µm.*

### **Anti-SRP and anti-HMGRC antibodies elicit an effect on gross 3D microtissues morphology**

Microtissues pretension was assessed by measuring the distance between the posts at day 6 before the treatment and day 10 at the end of the experiments. If the tissues are remodelling correctly, they should have a passive force and exert a tension on the posts, pushing them closer. We can see that total anti-SRP and anti-HMGCR IgG treatment decreased the tissues pre-tension (**Fig.7A**). Looking at tissues width, it was decreased in anti-HMGCR treated



tissues compared to non-treated tissues (**Fig. 7B**). Cerivastatin used as atrophy control here however did not have an effect on the two parameters.

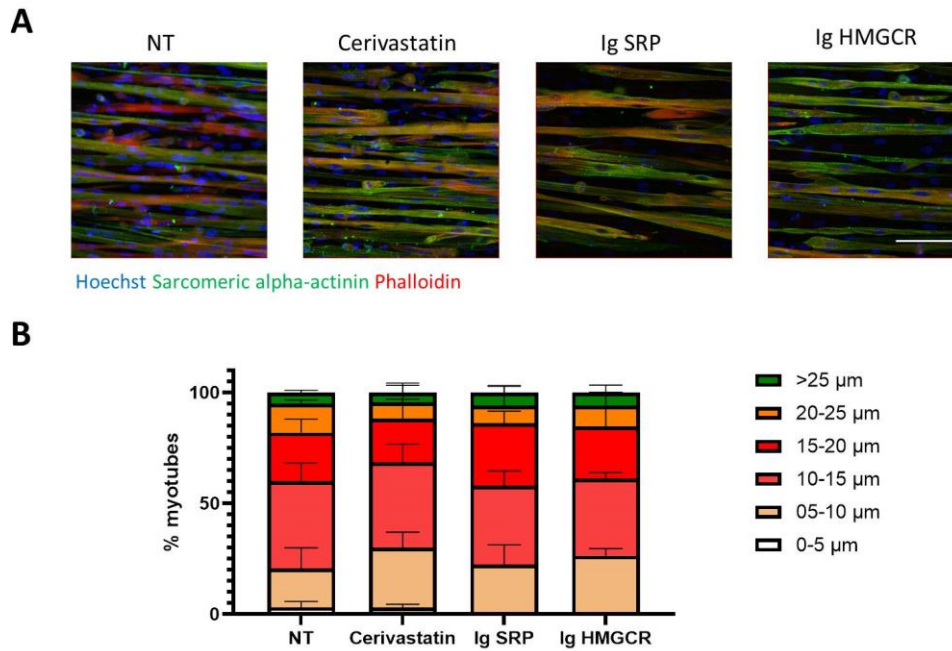


**Figure 7: Effect of treatments on microtissues morphology**

Passive force expressed in micro newtons ( $\mu\text{N}$ ) (A) and tissues thickness expressed as the absolute difference in percentage (B) comparing day 10 to day 6. Data are expressed as mean + SD,  $n=3$  tissues/condition, NT: non-treated

### Anti-SRP and anti-HMGR antibodies do not seem to elicit an effect on 3D microtissues myotubes

We next looked if the treatments induced alterations of myotubes development. By looking at the confocal images, we can see that the fibers morphology looks quite similar in all the conditions (**Fig. 8A**). We evaluated the myotubes width for each condition and found that the treatments do not seem to have an effect on myotubes size (**Fig. 8B**). However, cerivastatin treatment showed smaller myotubes.

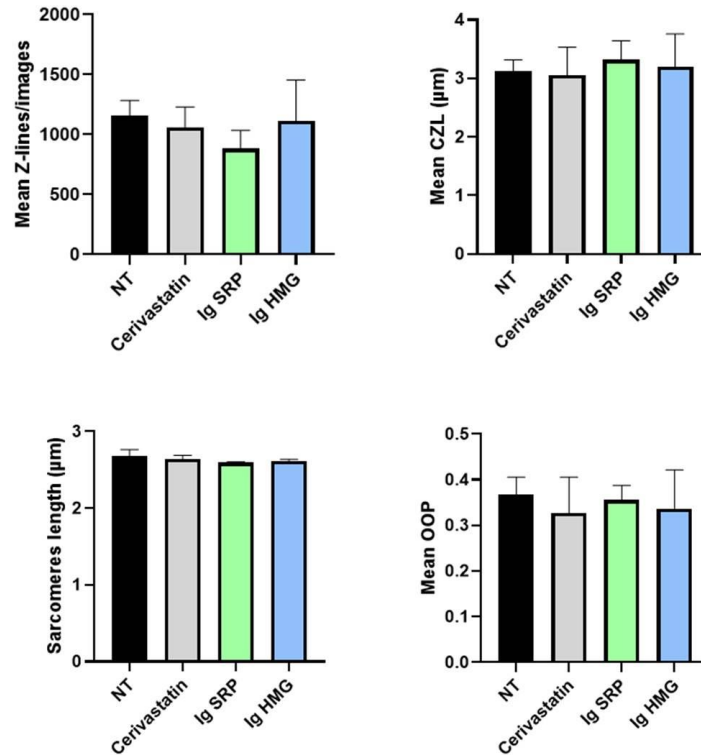


**Figure 8: Treatments effect on microtissues myotubes**

Immunostaining of day 10 microtissues with Hoechst (blue), sarcomeric alpha-actinin (green) and phalloidin (red) (A) and myotubes size quantification (B). Scale bar 50μm, data are expressed as mean + SD, n=3 tissues/condition, NT: non-treated

### Anti-SRP and anti-HMGRC antibodies do not elicit an effect on 3D microtissue maturation

Next, we looked at the sarcomeres structure. We can see that the number of Z-lines/images only seems decreased in anti-SRP total IgG treated tissues (**Fig. 9**). The CZL seems increased by the treatment. The OOP is slightly decreased in anti-HMGCR IgG treatment and the sarcomere length is similar.

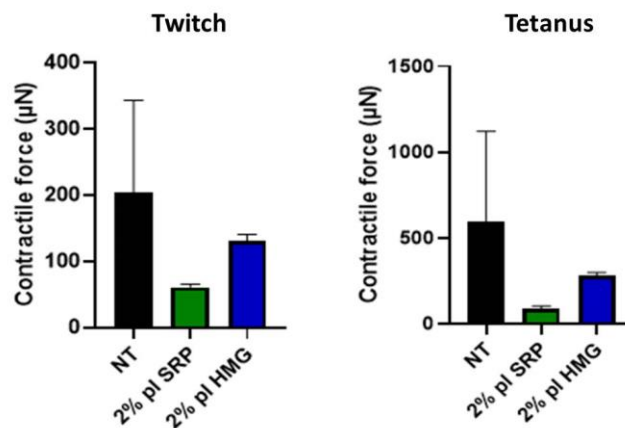


**Figure 9: Treatment effect on microtissues sarcomeres structure**

Sarcomeres parameters analysis using Matlab program,  $n=3$  tissues/condition, CZL: continuous Z-line, oop: orientation parameter, NT: non-treated

### Anti-SRP and anti-HMGCR plasma do elicit an effect on 3D microtissues force

We then quantified microtissues force generation by evaluating posts movement during electrical stimulation. The absolute force generated was decreased in treated tissues at low and high stimulation intensity (**Fig. 10**).

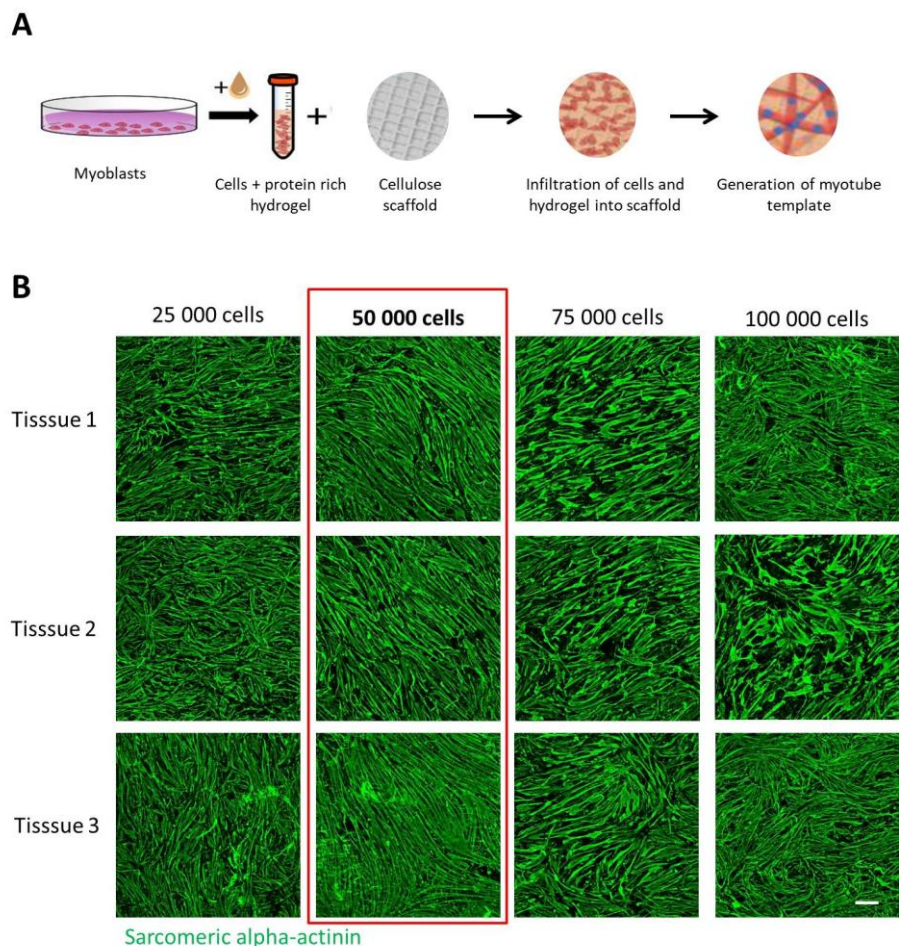


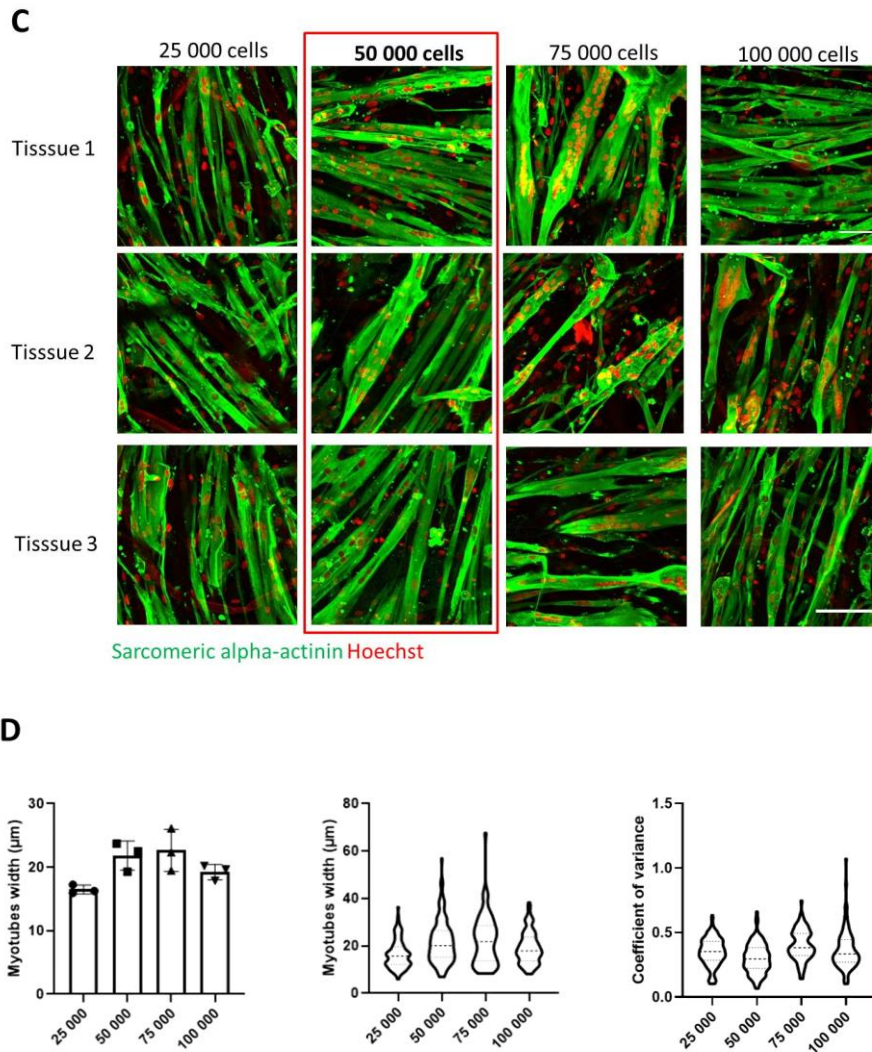
**Figure 10: Effects of treatments on microtissues absolute force**

Myotube force was acquired by analyzing the post displacement following electrical stimulation and expressed as micro newtons ( $\mu\text{N}$ ).  $n=3$  tissues/condition, 2% pl: 2% of patient plasma replaced horse serum at day 6 of differentiation

## Mini MEndR optimization

Since the microtissues morphology did not look good after the first experiments, we decided to use the mini MEndR (muscle endogenous repair) platform. This assay uses less cells and is a good way to screen for the good treatment conditions to use (control plasma, control antibodies, doses of auto-antibodies etc). For this method, the cells in the hydrogel are seeded in a circular cellulose scaffold of 45  $\mu\text{m}$  thickness allowing a 3D organization of the myotubes (**Fig. 11A**). This method needed some optimization for a use with the immortalized cells. We first tried different cells seeding concentrations (**Fig. 11B and C**). Using 25 000 cells/tissue, the myotubes were long but not thick and at 75 000 and 100 000 cells in some tissues they look dysmorphic. The best condition was the 50 000 cells where the myotubes looked elongated, bigger than the 25 000 cells condition and well-defined. When quantified, the myotube size was wider in the 50 000 cells condition and there was less variations (**Fig. 11D**).





**Figure 11: Mini MEndR model optimization**

For mini MEndR, myoblasts in the fibrin/geltrex mix were seeded on a 5mmx45µm tea bag paper circle (A). A concentration range of immortalized cells was seeded to determine the best condition. Immunostaining at 4X (B, scale bar 400µm) and 40X (C, scale bar 50µm) of the myotubes. The myotubes size was then assessed (D). n=3 tissues/condition

**DISCUSSION/CONCLUSION :**

The study on macrotissues showed that anti-SRP IgG seemed to have an atrophic effect on muscle fibers and a force decrease, and anti-SRP plasma led to fibers maturation decrease. For microtissues, treatments did not seem to have an effect on muscle fibers aspect but plasma decreased their force.

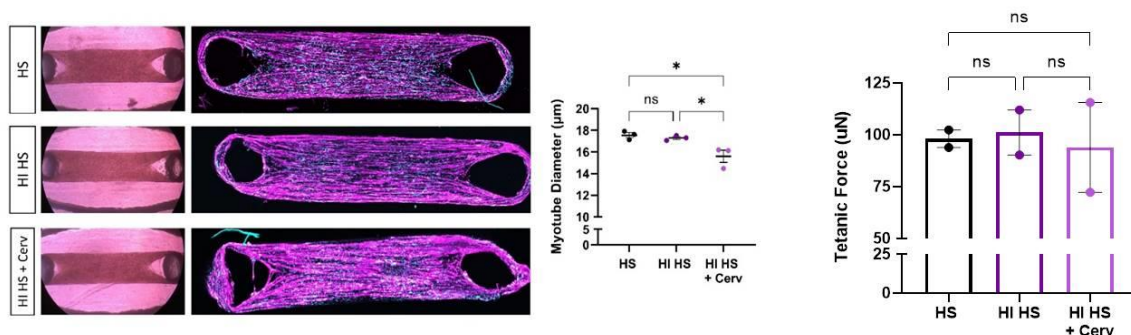
Macrotissues showed good results but it would have been difficult to test all the conditions several times with this model as it needs 1 million cells/tissue. Microtissues are a good alternative but after a few experiments they started to remodel badly. A few tests were performed to find the reason but without success. The tissues were not contaminated by



mycoplasma or other micro-organisms, several cell vials at different passages and cultivated by different people were also used. This could come from the seeding technique or not optimal cell maintenance before seeding.

Ideally, MEndR experiments should have been carried on to test a maximum of conditions. We should test the controls with different cerivastatin concentrations since the dose used on microtissues did not seem efficient. We should test also the negative controls. The closest controls are plasma used as replacement for plasmapheresis and total IgG extracted from this plasma. Several treatment times should also be tested to treat tissues for a longer time or at an earlier stage of differentiation. Several patients' samples should also be tested to see if the effects are the same with all the patients' samples.

Experiments will be continued in the Toronto's team on microtissues. A first test has been performed to see if heat-inactivated horse serum addition at the time of the treatment was detrimental and to test cerivastatin effect. Tissues were treated from day 8 to day 12 of differentiation. Tissues aspect was similar and myotubes size was comparable between tissues treated with normal horse serum during the whole experiment or replaced by heat-inactivated serum. Cerivastatin at 25nM led to smaller myotube size and a non-significant force decrease. Tissues will then be treated with heat-inactivated horse serum at the time of the treatment and with cerivastatin at 50nM to accentuate the effect.



**Supplementary figure: heat-inactivated horse serum and cerivastatin test on microtissues**

Tissues were cultivated for 8 days in differentiation medium with normal horse serum (HS). Medium was then changed or not to heat-inactivated horse serum (HI) with or without cerivastatin (cerv) at 25nM. Myotube size and tissues force were then measured.



## DISCUSSION

La physiopathologie des MII n'est pas encore entièrement comprise. De fait, (i) l'évaluation de l'activité de la maladie est difficile et (ii) le développement de traitements ciblés est laborieux. Au cours de cette thèse, j'ai étudié le potentiel de la myostatine comme biomarqueur d'activité, ainsi que la physiopathologie de la plus sévère des myosites, la MNAI. Mes principales observations concernant la myostatine sont :

- une diminution du taux de myostatine chez tous les sous-groupes de patients MII
- une normalisation du taux chez les patients DM et SAS ayant une maladie contrôlée, suggérant son intérêt comme biomarqueur d'activité dans ces sous-groupes
- un taux de myostatine stable chez les patients MNAI même lorsque la maladie est 'contrôlée' qui pourrait témoigner d'une masse musculaire moins importante chez ces patients ou d'une activité résiduelle faible de la maladie
- la diminution du taux myostatine chez les IBM n'a pas pu être comparée à l'activité de la maladie, les patients ayant une évolution continue progressive.

Concernant la physiopathologie des MNAI, l'étude *in situ* à l'aide de la transcriptomique spatiale a montré :

- une signature transcriptomique caractérisée par une expression de l'interféron, de gènes du complément, de marqueurs de cellules immunitaires (principalement des macrophages), de gènes de la matrice extracellulaire et de FAPs
- cette signature est observée dans les zones de nécrose des fibres musculaires des MNAI
- les clusters macrophagiques sont soit pro-inflammatoires soit anti-inflammatoires
- la présence de FAPs (dont le nombre est enrichi) ayant un rôle probable dans le développement de l'infiltrat fibro-adipeux chez les patients.



Des expériences de culture *in vitro* ont également été menées tout au long de la thèse pour étudier la pathogénicité des auto-anticorps, du complément et des macrophages dans les MNAI et ont montré que :

- la bonne méthode pour l'étude de la nécrose n'a pas été trouvée en culture traditionnelle 2D
- l'étude de la pathogénicité des auto-anticorps sur des modèles de culture 3D a des résultats préliminaires encourageants qui seront poursuivis par l'équipe de Toronto.

Cette thèse analyse une des principales lésions des MII, la nécrose des fibres musculaires. Quels sont ses mécanismes et ses conséquences (régénération musculaire - maintien de la masse musculaire et fibrose) ?

## **Nécrose musculaire**

La compréhension des mécanismes précis de la nécrose dans les MII est fondamentale pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

### ***Mécanismes de nécrose : non immune-médiée***

Pour commencer on peut souligner que dans notre étude de transcriptomique spatiale, le pourcentage de spots avec un aspect visuellement nécrotique rapporté au nombre de spots totaux chez les MNAI est de 4.8% ce qui est concordant avec les précédentes études montrant un pourcentage moyen de fibres nécrotiques à 1.8% chez les patients anti-HMGCR (allant de 0.1% à 10.1%) et 3.2% chez les patients anti-SRP (allant de 0.1% à 9.2%) (Allenbach et al., 2018b). Il faut cependant noter qu'il n'existe pas de marqueur de nécrose dans notre travail, celle-ci a été identifiée histologiquement, et on ne peut exclure la présence d'autres fibres musculaires 'pré-nécrotiques' non analysées.

La nécrose est un mécanisme de mort cellulaire non programmée pendant laquelle la membrane cellulaire se rompt conduisant à un relargage de son contenu dans l'environnement tissulaire (D'Arcy, 2019). Elle est causée par un choc soudain comme l'action d'une toxine, d'un traitement, une hypoxie

ou encore une agression inflammatoire. Les voies de signalisation transcriptionnelles de la nécrose ne peuvent alors pas être étudiées directement.

Chez les patients ayant des anticorps anti-HMGCR, la nécrose peut être initiée par l'exposition aux statines. En effet, 15 à 65% des patients anti-HMGCR ont reçus des traitements aux statines (Ge et al., 2015; Mammen et al., 2011) et l'exposition à cette molécule a été montrée comme entraînant le développement de nécrose chez le rat (Westwood et al., 2005). Les auteurs montrent que les statines bloquant l'enzyme HMGCR, cela entraîne une diminution du mévalonate dans les cellules conduisant à une diminution de l'ubiquinone nécessaire pour le transport d'électrons dans les mitochondries. Des anomalies mitochondriales apparaissent alors et seraient responsables de la nécrose musculaire. Cependant cette nécrose pharmaco-induite ne peut expliquer la poursuite de la nécrose immuno-induite suite à l'arrêt des statines, considérées déclencheur de la pathologie.

D'autres formes de mort cellulaire que la nécrose existent (D'Arcy, 2019). La nécroptose est une forme de nécrose contrôlée (Degterev et al., 2005). Elle implique l'activation de protéines spécifiques, les *receptor-interacting proteins* (RIP) et le récepteur cellulaire au TNF (Li et al., 2012). Secondairement, des désubiquitinations et des phosphorylations surviennent conduisant à la phosphorylation de la protéine *mixed lineage kinase domain-like pseudokinase* (MLKL) qui va migrer à la membrane cellulaire et perturber son intégrité (Wang et al., 2014). Des études protéomiques sont en cours au laboratoire pour analyser ces cascades protéiques et permettraient d'analyser le phénomène de nécrose dans les MNAI. En effet, une limite importante de mon travail est que la transcriptomique spatiale ne permet pas notamment l'exploration de la phosphorylation protéique ni l'ubiquitination. Un reflet indirect de cette activation pourrait être une augmentation de l'expression des RIP et du récepteur au TNF. Les données en transcriptomique spatiale n'ont pas montré de surexpression de ces gènes dans les MNAI (résultats non montrés).

Au cours des MNAI, les fibres nécrotiques sont réparties de manière aléatoire dans l'endomysium ne suggérant pas la participation d'un phénomène ischémique. D'autres sous-groupes de MII peuvent également présenter de la nécrose comme les ASyS ou les DM mais les fibres nécrotiques sont

majoritairement localisées en régions périfasciculaires suggérant des mécanismes distincts (Allenbach et al., 2018b; Preuße et al., 2022).

Le rôle de l'immunité reste donc déterminant dans la nécrose au cours des MNAI.

### ***Rôle des cellules immunitaires***

Les macrophages sont le principal composant de l'infiltrat inflammatoire des MNAI (Allenbach et al., 2018b; Chung et al., 2015). Quelques lymphocytes T et cellules NK sont également retrouvés mais en très faible quantité.

Les monocytes, macrophages, NK, lymphocytes T et les granulocytes peuvent reconnaître des complexes immuns anticorps-antigène à la surface des cellules *via* leur récepteur à la fraction constante des immunoglobulines (Wallace et al., 1994). Cela entraîne le phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC). Lors de leur reconnaissance du complexe immunitaire, les cellules NK vont relarguer de la perforine et de la granzyme, deux protéines cytotoxiques qui vont venir créer des trous dans la membrane des cellules et la lyser (Trapani and Smyth, 2002).

Les macrophages sont ici particulièrement intéressants. Lors de leur reconnaissance avec le complexe immunitaire, les macrophages pourraient relarguer des dérivés réactifs de l'oxygène induisant la nécrose de la cellule (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Singh et al., 2000). Dans les résultats de transcriptomique spatiale, l'analyse de voies surexprimées dans les MNAI nous indiquait que la voie de l'oxyde nitrique et des dérivés réactifs de l'oxygène était surexprimée. Cependant, *NOS2* qui est caractéristique de la voie de l'oxyde nitrique dans les macrophages ne l'était pas. Son expression a été précédemment identifiée par qPCR et immunohistochimie mais elle est difficile à identifier en transcriptomique (Allenbach et al., 2018b; Mulder et al., 2021).

Lorsqu'ils sont présents sur le site d'un dommage, les macrophages pro-inflammatoires vont produire des cytokines pouvant avoir un effet délétère sur le muscle et pouvant induire la nécrose lors d'une exposition chronique. C'est le cas notamment du TNF- $\alpha$  et du NF $\kappa$ B qui peuvent induire la nécroptose

(Horner et al., 2007; Yang et al., 2019). L'expression des deux gènes n'était cependant pas augmentée dans la transcriptomique spatiale.

Dans les MNAI, le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) est également surexprimé à la surface des fibres dans des proportions variables (Allenbach et al., 2018b). Cette surexpression peut être induite par des cytokines inflammatoires sécrétées par les cellules immunitaires comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 et peut conduire à une cytotoxicité en induisant le stress du reticulum endoplasmique (Nagaraju et al., 1998). La surexpression du CMH-I chez les MNAI corrèle également avec le taux de nécrose (Allenbach et al., 2018b).

Dans notre étude de transcriptomique spatiale nous retrouvons des macrophages pro-inflammatoires mais peu ou pas d'expression des gènes correspondant aux cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  mais d'autres cytokines pro-inflammatoires comme CXCL9, CXCL10 ou CXCL11 étaient bien exprimées. Des macrophages pro-inflammatoires produisant de l'oxyde nitrique et une expression d'IL-1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  ont cependant précédemment été observés dans les muscles des patients MNAI (Allenbach et al., 2018b).

Dans les expériences de co-culture de cellules musculaires, pour voir la nécrose, nous avons polarisé les macrophages avec de l'IFN- $\gamma$  afin d'induire un phénotype pro-inflammatoire.

### ***Rôle du complément et des anticorps***

La nécrose peut également être due à l'action des protéines du complément. Ce phénomène est appelé la cytotoxicité dépendante du complément (ou CDC). Les anticorps anti-SRP et anti-HMGCR étant principalement des IgG1, ils activent la voie classique du complément lorsqu'ils forment des complexes immuns avec leur antigène (Benveniste et al., 2011b; Drouot et al., 2014; Redpath et al., 1998). Cela conduit alors à la formation de pores dans la membrane des cellules provoquant la nécrose (Hadders et al., 2012). Des dépôts de C1q et du complexe d'attaque membranaire C5b-9 ont été montrés dans les biopsies de patients MNAI (Allenbach et al., 2018b). L'ajout de protéines du complément potentialise également l'effet pathogène des anticorps dans un modèle *in vivo* (Bergua et al., 2019). En

transcriptomique spatiale, l'expression de gènes du complément *C1Q* et *C3* a été retrouvée mais il est difficile d'évaluer en transcriptomique si ces gènes conduisent à des protéines sécrétées et surtout si l'activation de la voie complète du complément a lieu. Les autres composants de la voie du complément sont majoritairement produits par le foie et par cascades de clivages protéiques, mais une production par les monocytes et les macrophages est également possible (Lubbers et al., 2017; Morris et al., 1982).

La reconnaissance de néo-antigènes exprimés à la surface des cellules suite à un dommage peut également entraîner une reconnaissance par des IgG et participer à l'activation de la voie alterne du complément (Zhou et al., 2012)

Les dépôts de protéines du complément sur les fibres non-nécrotiques sont spécifiques des MNAI comparé aux autres types de MII. Dans les DM, des dépôts de complément peuvent être observés sur les vaisseaux entraînant une vascularite mais pas sur les fibres (Kissel et al., 1986). L'activation de la voie du complément conduisant à une nécrose cellulaire est également retrouvée dans d'autres pathologies comme la vascularite nécrosante associée aux auto-anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles (ANCA), une maladie auto-immune causant la nécrose des vaisseaux (Jennette et al., 2013).

Les auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR, en plus d'activer la cytotoxicité à médiation cellulaire et le complément peuvent également avoir d'autres effets. Ils peuvent en effet entraîner une perte de fonction de la protéine ciblée qui pourrait être une cause de nécrose comme c'est le cas chez les souris *knock-out* pour HMGCR (Osaki et al., 2015). Les anti-SRP entraînent également une perte de fonction de la protéine (Römisch et al., 2006). Le titre des auto-anticorps corrèle également avec le niveau de CK (bon indicateur du taux de nécrose) (Allenbach et al., 2018b; Benveniste et al., 2011b).

### ***Limites***

Un de mes objectifs de thèse était la réalisation d'un modèle *in vitro* de MNAI afin d'identifier les acteurs physiopathologiques clés impliqués dans la nécrose musculaire (auto-anticorps, macrophages, système du complément). Une des limites de ce modèle fut la méthode de détection de la nécrose. Les différentes solutions explorées aboutissant à des problèmes techniques tels la phototoxicité du réactif et

donc une nécrose artéfactuelle, le décollement des cellules nécrotiques au cours des lavages effectués pour le marquage ou encore la non-reproductibilité des dosages de protéines dans les surnageants.

La mise au point de modèles simples *in vitro* reste cependant une nécessité pour comprendre la nécrose dans les MNAI et pouvoir permettre des tests précliniques de nouvelles molécules thérapeutiques. Les mises au point du modèle développé pourraient continuer, notamment en utilisant l'Incucyte, en introduisant des cellules musculaires transfectées visibles en fluorescence, permettant de suivre facilement leur mort et en continuant la recherche de marqueurs de nécrose sensibles et non phototoxiques.

La mise au point d'un modèle 3D est également compliquée. Des difficultés techniques sont apparues mais la mise au point du modèle 3D de MNAI continue dans l'équipe canadienne. Ce modèle sera plus physiologique que les modèles 2D et aura l'avantage de pouvoir réaliser des analyses fonctionnelles de la force et de la capacité contractile des tissus.

## **Régénérescence**

Le dommage musculaire *via* la nécrose est chronique dans les MNAI et le muscle doit constamment se régénérer. L'environnement immunitaire cependant fait que la régénération peut être compromise. Plusieurs facteurs interviennent dans la régénération chez les MNAI.

### ***Rôle des macrophages***

Les macrophages anti-inflammatoires sont importants dans la régénération. Chez les patients MNAI, les macrophages anti-inflammatoires ont également été identifiés par l'expression de CD163 ou de STAT6 et CD206 et se localisent autour des fibres en nécrose (Arouche-Delaperche, 2016; Chung et al., 2015). Cependant, avec peu de marquages, il est difficile de vraiment qualifier l'état d'activation des macrophages, la classification des macrophages étant plus large que seulement pro ou anti-inflammatoires (ou M1/M2)(Mulder et al., 2021). Ces macrophages anti-inflammatoires produisent des

cytokines ayant un effet bénéfique sur la régénération. Les macrophages produisent notamment des facteurs de croissance comme l'IGF-1 participant à la réparation musculaire (Lu et al., 2011). Ils produisent également du TGF- $\beta$  participant au remodelage de la MEC. Cependant, une présence chronique de macrophages anti-inflammatoires sécrétant du TGF- $\beta$  est délétère pour la régénération. En effet, le TGF- $\beta$  diminue la capacité de fusion des myotubes et peut provoquer une fusion aberrante des myotubes pouvant conduire à la formation de myofibres branchées (Burks and Cohn, 2011; Girardi et al., 2021; Pichavant and Pavlath, 2014)

Les macrophages pro-inflammatoires sont nécessaires en première instance pour réaliser l'efférocytose et sécréter des cytokines nécessaires à la régénération mais leur présence au long terme peut empêcher la bonne régénération musculaire. En effet, ils produisent du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 empêchant la différenciation des myoblastes et donc la réparation musculaire (Broussard et al., 2004; Langen et al., 2004; Li, 2003). Ils favorisent également la prolifération des cellules satellites (Bencze et al., 2012).

Dans certaines circonstances, les macrophages peuvent même produire des protéines de la matrice extracellulaire et ainsi participer à son remodelage lors de la régénération (Schnoor et al., 2008).

Les analyses de transcriptomique spatiale ont montré la présence de deux profils de macrophages, l'un pro-inflammatoire et l'autre anti-inflammatoire avec le cluster des macrophages pro-inflammatoires étant le plus important. La transcriptomique spatiale nous montre l'expression de domaines tissulaires pouvant contenir plusieurs cellules différentes. L'expression dans les clusters correspond alors au mélange d'expression de ces cellules et ne permet pas d'estimer de manière plus précise le phénotype des macrophages. Cependant, le phénotype des macrophages étant dépendant du micro-environnement cytokinique, il est fort probable de ne trouver que des macrophages du même phénotype dans un micro-domaine. Il faudrait alors valider les phénotypes observés en *single cell* ou alors au niveau protéique en utilisant notamment la technique de l'Hypérioron qui permet de combiner plusieurs marqueurs protéiques sur une même coupe musculaire. Une force de la transcriptomique spatiale néanmoins est d'avoir le transcriptome du tissu sans modification du micro-environnement ce qui est un avantage assez unique, notamment pour les macrophages.

### ***Rôle du complément***

Les protéines du complément peuvent également avoir un rôle pro-régénérant. En effet, suite à une nécrose des fibres musculaires différentes molécules peuvent être sécrétées et peuvent activer la voie du complément (Bours et al., 2006; Scaffidi et al., 2002; Scheibner et al., 2006). Les macrophages et les cellules musculaires peuvent également exprimer certaines protéines de la voie comme le C3 ou le CFD (Legoedec 1995, Liu et al 2018, Xavier et al 2017). L'anaphylatoxine C3a est essentielle pour la régénération musculaire dans un modèle murin en participant au homing des macrophages sur le site du dommage et son absence altère la régénération (Zhang et al., 2017). Dans notre étude en transcriptomique spatiale, les gènes *C3* et *CFD* étaient surexprimés chez les patients MNAI. L'expression de *CFD* suggère une activation de la voie alterne du complément mais *C1Q* était également exprimé et est impliqué dans la voie classique. Des immunomarquages ont précédemment montré un marquage de C1q sur les fibres (Allenbach et al., 2018b). Des marquages du C3 ou de CFD permettraient de voir s'ils sont également exprimés au niveau protéique.

### ***Rôle des FAPs***

Les FAPs ont également un rôle important dans la régénération. En effet, lors d'un dommage, ils vont sécréter des chimiokines attirant les macrophages sur le site du dommage. Dans un environnement pro-régénératif en présence de TGF- $\beta$ , les FAPs vont proliférer et se différencier en fibroblastes et vont intervenir dans le remodelage de la MEC en produisant notamment du collagène, de la fibronectine, du facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF et en inhibant l'expression de métalloprotéases (Contreras et al., 2019a; Davies et al., 2016; Gosselin et al., 2004; Mann et al., 2011; Smith and Barton, 2018). Ils vont également produire des cytokines comme l'IL-6, l'IGF-1 et la follistatine favorisant la différenciation des myoblastes et la croissance musculaire (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010). En absence de FAPs, lors d'un dommage musculaire, des défauts de régénération apparaissent avec un retard du processus régénératif, une expansion diminuée des cellules satellites et une diminution de la taille des fibres (Wosczyzna et al., 2019).



### ***Rôle des auto-anticorps***

Le système immunitaire peut également être délétère lors de la régénération. Lors de la régénération musculaire dans le muscle des patients et sur des myotubes en début de différenciation, les protéines SRP et HMGCR peuvent se retrouver exprimées à la membrane des cellules (Allenbach et al., 2018b). Cela pourrait alors entraîner une rupture de la tolérance et la production des auto-anticorps. Certaines protéines cytoplasmiques peuvent en effet se retrouver exprimées à la membrane des cellules. C'est le cas de certaines chaperonnes du reticulum endoplasmique, comme la calnexine qui est exprimée en conditions normales sur des fibroblastes ou les splénocytes (Okazaki et al., 2000) ou dans certaines circonstances comme lors de la fusion des macrophages (McNally and Anderson, 2005). Des défauts de fusion des myoblastes ont été également observés *in vitro* lors de l'ajout d'auto-anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR (Arouche-Delaperche et al., 2017). Ces défauts de fusion sont dus à une diminution de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13. Ces deux cytokines sont normalement sécrétées par les myotubes lors de différenciation afin de recruter d'autres myoblastes pour participer à la croissance musculaire (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007).

### ***Intérêt de la modélisation***

Il est important de pouvoir modéliser la régénération afin de mieux comprendre le rôle de chacun des acteurs.

Les modèles animaux sont limités et ne récapitulent pas toutes les caractéristiques des maladies humaines. En effet, la plupart des études de régénération se font sur des animaux ayant subi des dommages musculaires aigus comme une injection de cardiotoxine ou de chlorure de baryum. Or, chez les MNAI, le dommage est chronique mais modéré. Dans la MNAI, le modèle animal le plus proche est généré par l'injection quotidienne d'auto-anticorps anti-SRP ou anti-HMGCR chez la souris pendant 8 à 21 jours (Bergua et al., 2019). Les souris ont une force diminuée et les muscles présentent des dépôts de protéines du complément et de la nécrose. Ce modèle est cependant long à mettre en place et coûteux

en anticorps. Il serait donc intéressant d'avoir des modèles miniaturisés mais tout en restant physiologiques.

La culture cellulaire 2D de muscle requiert peu de cellules et est rapide à mettre en place. Cependant elle n'est pas physiologique à cause de la forme des fibres, l'absence de MEC, d'innervation et de vascularisation des cellules musculaires.

Afin d'améliorer ces modèles, la culture 3D a été développée ces dernières années. La plupart de ces modèles se composent de cellules musculaires contenues dans un gel mimant la MEC et coulées dans un moule entre deux structures servant de tendons (Afshar et al., 2020; Maffioletti et al., 2018; Osaki et al., 2020; Rao et al., 2018). Les tissus peuvent également être bioimprimés (Ostrovidov et al., 2019). L'aspect fonctionnel des modèles 3D avec des mesures de force et d'efficacité de contraction permettent également de se rapprocher des modèles *in vivo*.

Pour rester au plus proche du muscle physiologique, il est important d'intégrer une composante de MEC comme c'est le cas dans les modèles 3D développés au Canada avec l'addition de Geltrex et de fibrinogène (Afshar et al., 2020). Cet ajout de protéines de la MEC améliore la différenciation des cellules musculaires (Chiron et al., 2012). Il serait intéressant d'inclure d'autres cellules présentes dans l'environnement musculaire pour rendre le modèle encore plus physiologique comme des fibroblastes/FAPs, des macrophages, des cellules nerveuses ou des vaisseaux dans le modèle de muscle 3D que j'ai appris au Canada. Les cocultures améliorent en effet l'aspect du muscle et rendent le modèle plus physiologique (Maffioletti et al., 2018; Bakooshli et al., 2019; Osaki et al., 2020). De la microfluidique mimant le flux sanguin et de l'optogénétique avec des cellules musculaires transfectées permettant de faire réaliser des cycles de contractions aux tissus peuvent également être utilisées pour un modèle encore plus développé mais complexifient l'expérimentation (Osaki et al., 2018).

Un bon modèle pour étudier la régénération musculaire est la plateforme MEndR (Davoudi et al., 2022). Sur un disque en cellulose servant de structure, des myoblastes sontensemencés et produisent des couches de myotubes après différenciation. Des cellules satellites sont ensuite ajoutées et un dommage musculaire est induit. Le mécanisme de réparation peut alors être étudié. Au cours de ma thèse, j'ai

également utilisé les disques en cellulose dans un format 96 puits (mini-MEndR) pour produire un modèle 3D simplifié. Pour l'étude de la pathogénicité des anticorps anti-SRP et anti-HMGCR dans un contexte de régénération, il serait intéressant d'utiliser le modèle de mini-MendR et de réaliser un dommage musculaire en ajoutant les anticorps en parallèle. On pourrait alors s'attendre à une régénération beaucoup moins optimale du tissu avec des défauts de fusion. On pourrait également ajouter les anticorps au moment de la mise en différenciation dans les différents modèles de culture 3D.

## **Masse musculaire et atrophie**

La perte de masse musculaire associée à l'atrophie et la fibrose musculaire sont des caractéristiques communes chez les patients atteints de MII. Les patients MNAI sont particulièrement touchés, c'est une des raisons pour laquelle ils récupèrent mal (Landon-Cardinal et al., 2020; Pinal-Fernandez et al., 2017a, 2017b; Tiniakou et al., 2017).

### *Signaux régulateurs de la masse musculaire : la myostatine*

Un des principaux signaux régulant la masse musculaire est la myostatine. La myostatine est majoritairement produite par le muscle. Elle fait partie de la famille du TGF- $\beta$  et est inhibitrice de la croissance musculaire en induisant une atrophie du muscle par la stimulation des gènes d'atrophie *TRIM63* (Murf1) et *FBOX32* (atrogen1) et une inhibition de la synthèse des protéines par la voie Akt-mTOR (Lee and McPherron, 2001; Lokireddy et al., 2011). A cause de l'atrophie et des faiblesses musculaires souvent observées chez les patients atteints de maladies neuromusculaires et chez les MII, on pourrait s'attendre à ce que la myostatine soit augmentée. Des inhibiteurs de myostatine ont donc vu le jour comme le bimagrumab, un anticorps monoclonal bloquant le récepteur de la myostatine. Cet inhibiteur a montré des résultats satisfaisants chez la souris (Lach-Trifilieff et al., 2014). La molécule a ensuite été testée chez l'homme pour traiter les IBM. Cependant, l'essai clinique n'a pas atteint ses objectifs (Amato et al., 2021). Une des explications est que le taux de myostatine est en réalité abaissé

chez les IBM comme dans d'autres maladies neuro-musculaires (Mariot et al., 2017). La myostatine a été étudiée dans d'autres MII avec des résultats discordants qui dépendent de l'activité de la maladie des patients (Kerschan-Schindl et al., 2021; de Sordi et al., 2022; Vernerová et al., 2020). En effet, notre étude et celle de Vernerová *et al* montrent que le taux de myostatine est corrélé positivement à l'activité de la maladie. Les études de Kerschan-Schindl et de Sordi montrent que le taux de myostatine est stable, voire augmente chez les patients DM et PM. L'activité de la maladie de leurs patients est cependant assez faible.

Nous avons montré dans notre étude de la myostatine chez les MII que le taux de protéine sérique est diminué chez les IBM, les SAS, les DM et les MNAI. Cette diminution est également observée au niveau transcriptomique dans le muscle et est accompagnée d'une augmentation des gènes normalement down-régulés par la myostatine (*MYOG* et *MYF5*) et d'une diminution des atrogènes *FBXO32* et *TRIM63* normalement up-régulés par la myostatine.

On peut alors faire l'hypothèse que la myostatine soit abaissée dans le but de favoriser une augmentation de la masse musculaire. La baisse de la myostatine peut être due à l'augmentation de l'expression de ses inhibiteurs : la follistatine et la décorine qui sont augmentés dans notre étude.

L'effet sur la masse musculaire par inhibition de la synthèse protéique et activation des atrogènes n'est pas la seule action que la myostatine peut avoir. Elle est également pro-fibrotique en activant la prolifération des FAPs (Dong et al., 2017; Li et al., 2008). Elle aurait également un rôle délétère dans la régénération en bloquant le chimiotactisme des myoblastes et des macrophages ainsi que la différenciation, la prolifération et le renouvellement des cellules satellites (McCroskery et al., 2003, 2005).

Chez les patients inactifs, le taux de myostatine remonte et se rapproche de celui des des sujets sains dans les DM et les SAS. Il reste cependant inchangé chez les MNAI. Cela pourrait être dû à une perte de masse musculaire chez les patients MNAI, ceux-ci ayant un remplacement fibro-adipeux important, ou bien à un processus inflammatoire résiduel, la maladie ayant souvent du mal à être contrôlée totalement (Allenbach et al., 2020). La masse musculaire reste néanmoins difficile à évaluer. Les études

du taux de myostatine suivant l'âge et le sexe, des paramètres pouvant faire varier la masse musculaire, sont contradictoires (Arrieta et al., 2019; Barrios-Silva et al., 2018; Delanaye et al., 2019; Hofmann et al., 2015; Loumaye et al., 2015; Moriwaki et al., 2019; Peng et al., 2018; Skladany et al., 2019; Yamada et al., 2016).

### ***Mécanismes pathologiques : fibrose et atrophie***

Lors de dommages chroniques comme c'est le cas chez les MNAI, la masse musculaire est diminuée non seulement en raison d'une atrophie des fibres musculaires (Arouche-Delaperche et al., 2017), mais aussi en raison d'une perte de tissu musculaire remplacé par des infiltrations fibro-adipeuses (Landon-Cardinal et al., 2020; Pinal-Fernandez et al., 2017b).

Dans les MNAI, l'atrophie peut être due aux auto-anticorps. En effet, *in vitro*, l'ajout d'anticorps ou de plasma anti-SRP ou anti-HMGCR induit une atrophie sur des fibres à 3 jours de différenciation donc déjà formées (Arouche-Delaperche et al., 2017). Cette atrophie s'accompagne de l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Lors des expériences sur modèles 3D, nous avons pu voir que les IgG totales anti-SRP entraînent plus de petites fibres dans les macrotissus et une moins bonne capacité à se contracter due à une diminution de la gestion du calcium. Les plasmas anti-SRP et anti-HMGCR sur les microtissus entraînent une diminution de la force. Les expériences doivent cependant être répétées pour pouvoir conclure à un effet réel des auto-anticorps. Les patients anti-SRP ont souvent des atteintes musculaires plus importantes que les patients anti-HMGCR, il ne serait donc pas étonnant de voir un effet délétère des anti-SRP préférentiellement (Tiniakou et al., 2017)

La fibrose pourrait être due aux dommages chroniques et à la nécrose subis par le muscle dans les MNAI. En effet, la nécrose crée un environnement inflammatoire avec une persistance de macrophages, du complément et une expression de cytokines par les macrophages et les fibres abimées. Une des cytokines majoritaires impliquées dans la fibrose est le TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  va stimuler la prolifération des FAPs et leur sécrétion de protéines de la MEC participant ainsi à la fibrose (Contreras et al., 2019a; Davies et al., 2016). Le complément, notamment C1q peut également entraîner une production augmentée du

collagène par les fibroblastes (Naito et al., 2012). *CIQA*, *TGFBI* et des gènes de la matrice extracellulaire (*COL1A1*, *COL1A2*...) avaient une expression augmentée dans l'étude de transcriptomique spatiale. Les caractéristiques physiques de la MEC peuvent alors changer. En effet, la MEC peut être plus dense lors de la fibrose (Georges et al., 2007; Liu et al., 2010). Ce changement peut affecter les cellules satellites, la régénération et la migration des cellules mais également la disponibilité des signaux reçus par la fibre (Wolf and Friedl, 2011). En effet, le TGF- $\beta$  peut par exemple être séquestré dans la MEC et relargué à un moment différent (Hinz, 2015).

Les FAPs peuvent également se différencier en adipocytes. Récemment, une étude a montré que les FAPs exprimant le gène MME (CD10) sont à l'origine de l'infiltrat adipeux dans le muscle (Fitzgerald et al., 2022). Dans notre étude en transcriptomique spatiale, le gène MME était très peu exprimé (résultat non montré) mais les FAPs issus de muscle MNAI avaient la capacité de se différencier en adipocytes.

---

Dans un contexte de dommage aigu, l'inflammation est ponctuelle et nécessaire pour une bonne régénération. Dans le contexte des MII et plus particulièrement des MNAI, le dommage est chronique, avec une nécrose et un environnement inflammatoire continu composé de macrophages, d'interféron, de complément et de FAPs sécrétant diverses cytokines et conduisant au remplacement fibro-adipeux.

---



## **PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse pourra se poursuivre avec les perspectives suivantes :

### ***Création d'une cohorte de suivi pour l'étude de la myostatine***

L'étude de la myostatine a montré que le taux de la protéine est plus élevé chez les patients inactifs et tend à se rapprocher du niveau des contrôles. Cette observation est cependant basée sur une cohorte de patients actifs et inactifs différents. Il sera nécessaire de doser la myostatine à intervalles de temps réguliers chez des patients actifs en début de maladie et de suivre son évolution.

### ***Poursuite des études de la pathogénicité des auto-anticorps dans la MNAI***

Les premiers résultats sur le modèle de muscle 3D montrent une potentielle pathogénicité des anti-SRP et du plasma anti-HMGCR. Plusieurs expériences devront être réalisées pour confirmer ces résultats préliminaires. Tout d'abord, des contrôles négatifs de plasma et d'IgG totales devront être approuvés puis différents temps de traitement devront être testés. L'effet du complément additionné aux anticorps pourra également être analysé.

### ***Observation du phénomène de nécrose dans la MNAI***

Le potentiel cytotoxique des auto-anticorps, du complément et des macrophages n'a pas pu être correctement analysé au cours de cette thèse. Il sera intéressant d'utiliser l'Incucyte pour suivre l'apparition de la nécrose au cours des différents traitements. La nécrose pourrait aussi être analysée dans les modèles de culture 3D lorsque la technique sera maîtrisée. Le phénomène de nécrose pourrait également être étudié par marquage immunofluorescent des protéines intervenant dans la nécroptose ou par marquage avec la technologie Hypériorion.



### *Caractérisation des FAPs dans la MNAI*

Une implication des FAPs dans le remplacement fibro-adipeux chez les MNAI a été suggérée au cours de cette étude. Leur phénotype devrait être étudié plus en détails en *single cell* et en culture cellulaire sur un plus grand nombre de biopsies. Le cluster FAPs était également caractérisé par une induction des gènes de réponse à l'interféron. Il serait intéressant de voir l'effet d'un traitement à l'interféron sur le phénotype des FAPs et leur sécrétome.

## **CONCLUSION**

Dans cette thèse, je me suis intéressée à des pathologies musculaires inflammatoires, les MII, et plus particulièrement aux MNAI caractérisées par de la fibrose et de la régénération des fibres musculaires.

Une première approche globale avec un mécanisme de régulation systémique a été utilisée et a défini un rôle potentiel de la myostatine comme marqueur d'activité pour certaines MII.

Une deuxième approche sur le tissu musculaire pour l'étude de la nécrose et du remplacement fibro-adipeux a montré l'implication de nouvelles voies physiopathologiques soulignant la complexité de ces phénomènes et du dialogue cellulaire.

Le développement de modèles *in vitro* apporte une simplification de mécanismes physiologiques complexes pour contribuer à leur meilleure compréhension. Cependant, leur mise au point est difficile, surtout si l'on veut observer un dialogue entre les cellules.

## BIBLIOGRAPHIE

Afshar, M.E., Abraha, H.Y., Bakooshli, M.A., Davoudi, S., Thavandiran, N., Tung, K., Ahn, H., Ginsberg, H.J., Zandstra, P.W., and Gilbert, P.M. (2020). A 96-well culture platform enables longitudinal analyses of engineered human skeletal muscle microtissue strength. *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62837-8>.

Aggarwal, R., Charles-Schoeman, C., Schessl, J., Dimachkie, M.M., Beckmann, I., and Levine, T. (2021). Prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled phase III study evaluating efficacy and safety of octagam 10% in patients with dermatomyositis (“ProDERM Study”). *Medicine (Baltimore)* *100*, e23677. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023677>.

Allenbach, Y., Drouot, L., Rigolet, A., Charuel, J.L., Jouen, F., Romero, N.B., Maisonobe, T., Dubourg, O., Behin, A., Laforet, P., et al. (2014). Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. *Medicine (Baltimore)* *93*, 150–157. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000028>.

Allenbach, Y., Leroux, G., Suárez-Calvet, X., Preusse, C., Gallardo, E., Hervier, B., Rigolet, A., Hie, M., Pehl, D., Limal, N., et al. (2016a). Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies: Common Interferon Signature but Distinct NOS2 Expression. *Am J Pathol* *186*, 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.010>.

Allenbach, Y., Keraen, J., Bouvier, A.-M., Jooste, V., Champtiaux, N., Hervier, B., Schoindre, Y., Rigolet, A., Gilardin, L., Musset, L., et al. (2016b). High risk of cancer in autoimmune necrotizing myopathies: usefulness of myositis specific antibody. *Brain* *139*, 2131–2135. <https://doi.org/10.1093/brain/aww054>.

Allenbach, Y., Mammen, A.L., Benveniste, O., Stenzel, W., and Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group (2018a). 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. *Neuromuscul. Disord.* *28*, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.09.016>.

Allenbach, Y., Arouche-Delaperche, L., Preusse, C., Radbruch, H., Butler-Browne, G., Champtiaux, N., Mariampillai, K., Rigolet, A., Hufnagl, P., Zerbe, N., et al. (2018b). Necrosis in anti-SRP+and anti-HMGCR+myopathies: Role of autoantibodies and complement. *Neurology* *90*, e507–e517. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004923>.

Allenbach, Y., Benveniste, O., Stenzel, W., and Boyer, O. (2020). Immune-mediated necrotizing myopathy: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* *16*, 689–701. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00515-9>.

Allouh, M.Z., Yablonka-Reuveni, Z., and Rosser, B.W.C. (2008). Pax7 reveals a greater frequency and concentration of satellite cells at the ends of growing skeletal muscle fibers. *J Histochem Cytochem* *56*, 77–87. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7301.2007>.

Amato, A.A., Hanna, M.G., Machado, P.M., Badrising, U.A., Chinoy, H., Benveniste, O., Karanam, A.K., Wu, M., Tankó, L.B., Schubert-Tennigkeit, A.A., et al. (2021). Efficacy and Safety of Bimagrumab in Sporadic Inclusion Body Myositis: Long-term Extension of RESILIENT. *Neurology* *96*, e1595–e1607. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011626>.

Andersen, J.L. (2003). Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand J Med Sci Sports* *13*, 40–47. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2003.00299.x>.

- Armand, O., Boutineau, A.M., Mauger, A., Pautou, M.P., and Kieny, M. (1983). Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 72, 163–181. .
- Arnold, E.M., and Delp, S.L. (2011). Fibre operating lengths of human lower limb muscles during walking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 1530–1539. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0345>.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057–1069. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>.
- Arouche-Delaperche, L. (2016). Effet des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR sur le muscle strié squelettique. These de doctorat. Paris 6.
- Arouche-Delaperche, L., Allenbach, Y., Amelin, D., Preusse, C., Mouly, V., Mauhin, W., Tchoupou, G.D., Drouot, L., Boyer, O., Stenzel, W., et al. (2017). Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann. Neurol.* 81, 538–548. <https://doi.org/10.1002/ana.24902>.
- Arrieta, H., Hervás, G., Rezola-Pardo, C., Ruiz-Litago, F., Iturburu, M., Yanguas, J.J., Gil, S.M., Rodriguez-Larrad, A., and Irazusta, J. (2019). Serum Myostatin Levels Are Higher in Fitter, More Active, and Non-Frail Long-Term Nursing Home Residents and Increase after a Physical Exercise Intervention. *Gerontology* 65, 229–239. <https://doi.org/10.1159/000494137>.
- Badrising, U.A., Maat-Schieman, M., van Duinen, S.G., Breedveld, F., van Doorn, P., van Engelen, B., van den Hoogen, F., Hoogendijk, J., Höweler, C., de Jager, A., et al. (2000). Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: a nationwide study. *Neurology* 55, 1385–1387. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.9.1385>.
- Bakooshli, M.A., Lippmann, E.S., Mulcahy, B., Iyer, N., Nguyen, C.T., Tung, K., Stewart, B.A., Van Den Dorpel, H., Fuehrmann, T., Shoichet, M., et al. (2019). A 3d culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *ELife* 8, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.44530>.
- Barrios-Silva, L.V., Parnell, M., Shinwari, Z.B., Chaudhary, G.A., Xenofontos, T., van Bekhoven, A., McArthur, S., and Elliott, B.T. (2018). Activin subfamily peptides predict chronological age in humans. *Physiol Rep* 6, e13823. <https://doi.org/10.14814/phy2.13823>.
- Bellanné-Chantelot, C., Schmaltz-Panneau, B., Marty, C., Fenneteau, O., Callebaut, I., Clauin, S., Docet, A., Damaj, G.-L., Leblanc, T., Pellier, I., et al. (2018). Mutations in the SRP54 gene cause severe congenital neutropenia as well as Shwachman-Diamond-like syndrome. *Blood* 132, 1318–1331. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820308>.
- Bencze, M., Negroni, E., Vallese, D., Yacoub-Youssef, H., Chaouch, S., Wolff, A., Aamiri, A., Di Santo, J.P., Chazaud, B., Butler-Browne, G., et al. (2012). Proinflammatory Macrophages Enhance the Regenerative Capacity of Human Myoblasts by Modifying Their Kinetics of Proliferation and Differentiation. *Mol Ther* 20, 2168–2179. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.189>.
- Benveniste, O., and Hilton-Jones, D. (2010). International Workshop on Inclusion Body Myositis held at the Institute of Myology, Paris, on 29 May 2009. *Neuromuscul Disord* 20, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.014>.

- Benveniste, O., Guiguet, M., Freebody, J., Dubourg, O., Squier, W., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Leite, M.I., Allenbach, Y., Herson, S., et al. (2011a). Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. *Brain* 134, 3176–3184. <https://doi.org/10.1093/brain/awr213>.
- Benveniste, O., Drouot, L., Jouen, F., Charuel, J.-L., Bloch-Queyrat, C., Behin, A., Amoura, Z., Marie, I., Guiguet, M., Eymard, B., et al. (2011b). Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* 63, 1961–1971. <https://doi.org/10.1002/art.30344>.
- Benveniste, O., Stenzel, W., and Allenbach, Y. (2016). Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Curr. Opin. Neurol.* 29, 662–673. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000376>.
- Bergua, C., Chiavelli, H., Allenbach, Y., Arouche-Delaperche, L., Arnoult, C., Bourdenet, G., Jean, L., Zoubairi, R., Guerout, N., Mahler, M., et al. (2019). In vivo pathogenicity of IgG from patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies in immune-mediated necrotising myopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 78, 131–139. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213518>.
- Bernatsky, S., Joseph, L., Pineau, C.A., Bélisle, P., Boivin, J.F., Banerjee, D., and Clarke, A.E. (2009). Estimating the prevalence of polymyositis and dermatomyositis from administrative data: age, sex and regional differences. *Ann Rheum Dis* 68, 1192–1196. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.093161>.
- Betteridge, Z., Tansley, S., Shaddick, G., Chinoy, H., Cooper, R.G., New, R.P., Lilleker, J.B., Vencovsky, J., Chazarain, L., Danko, K., et al. (2019). Frequency, mutual exclusivity and clinical associations of myositis autoantibodies in a combined European cohort of idiopathic inflammatory myopathy patients. *J Autoimmun* 101, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.001>.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3, 1014–1019. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014>.
- Bohan, A., and Peter, J.B. (1975). Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 344–347. <https://doi.org/10.1056/NEJM197502132920706>.
- Bosnakovski, D., Chan, S.S.K., Recht, O.O., Hartweck, L.M., Gustafson, C.J., Athman, L.L., Lowe, D.A., and Kyba, M. (2017). Muscle pathology from stochastic low level DUX4 expression in an FSHD mouse model. *Nat Commun* 8, 550. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00730-1>.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112, 358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., and Rando, T.A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807–810. <https://doi.org/10.1126/science.1144090>.
- Brigitte, M., Schilte, C., Plonquet, A., Baba-Amer, Y., Henri, A., Charlier, C., Tajbakhsh, S., Albert, M., Gherardi, R.K., and Chrétien, F. (2010a). Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis & Rheumatism* 62, 268–279. <https://doi.org/10.1002/art.27183>.

- Brigitte, M., Schilte, C., Plonquet, A., Baba-Amer, Y., Henri, A., Charlier, C., Tajbakhsh, S., Albert, M., Gherardi, R.K., and Chrétien, F. (2010b). Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis & Rheumatism* *62*, 268–279. <https://doi.org/10.1002/art.27183>.
- Broussard, S.R., McCusker, R.H., Novakofski, J.E., Strle, K., Shen, W.H., Johnson, R.W., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (2004). IL-1 $\beta$  impairs insulin-like growth factor i-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor i receptor in myoblasts. *J Immunol* *172*, 7713–7720. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7713>.
- Brunner, F., Schmid, A., Sheikhzadeh, A., Nordin, M., Yoon, J., and Frankel, V. (2007). Effects of Aging on Type II Muscle Fibers: A Systematic Review of the Literature. *Journal of Aging and Physical Activity* *15*, 336–348. <https://doi.org/10.1123/japa.15.3.336>.
- Burks, T.N., and Cohn, R.D. (2011). Role of TGF- $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle* *1*, 19. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-19>.
- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T.G., Wagers, A.J., Benoist, C., et al. (2013). A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* *155*, 1282–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054>.
- Carapito, R., Konantz, M., Paillard, C., Miao, Z., Pichot, A., Leduc, M.S., Yang, Y., Bergstrom, K.L., Mahoney, D.H., Shardy, D.L., et al. (2017). Mutations in signal recognition particle *SRP54* cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. *J Clin Invest* *127*, 4090–4103. <https://doi.org/10.1172/JCI92876>.
- Carpenter, S., and Karpati, G. (1979). DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY: PLASMA MEMBRANE LOSS INITIATES MUSCLE CELL NECROSIS UNLESS IT IS REPAIRED. *Brain* *102*, 147–161. <https://doi.org/10.1093/brain/102.1.147>.
- Castiglioni, A., Corna, G., Rigamonti, E., Basso, V., Vezzoli, M., Monno, A., Almada, A.E., Mondino, A., Wagers, A.J., Manfredi, A.A., et al. (2015). FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PLoS One* *10*, e0128094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128094>.
- Cavagna, L., Trallero-Araguás, E., Meloni, F., Cavazzana, I., Rojas-Serrano, J., Feist, E., Zanframundo, G., Morandi, V., Meyer, A., Pereira da Silva, J.A., et al. (2019). Influence of Antisynthetase Antibodies Specificities on Antisynthetase Syndrome Clinical Spectrum Time Course. *J Clin Med* *8*, E2013. <https://doi.org/10.3390/jcm8112013>.
- Chabi, B., Ljubicic, V., Menzies, K.J., Huang, J.H., Saleem, A., and Hood, D.A. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* *7*, 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x>.
- Chakkalakal, J.V., Jones, K.M., Basson, M.A., and Brack, A.S. (2012). The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* *490*, 355–360. <https://doi.org/10.1038/nature11438>.
- Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G., and Koh, T.J. (2008). Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* *294*, C1183–1191. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00568.2007>.

- Chinoy, H., Fertig, N., Oddis, C.V., Ollier, W.E.R., and Cooper, R.G. (2007). The diagnostic utility of myositis autoantibody testing for predicting the risk of cancer-associated myositis. *Ann Rheum Dis* 66, 1345–1349. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.068502>.
- Chinoy, H., Payne, D., Poulton, K.V., Fertig, N., Betteridge, Z., Gunawardena, H., Davidson, J.E., Oddis, C.V., McHugh, N.J., Wedderburn, L.R., et al. (2009). HLA-DPB1 associations differ between DRB1\*03 positive anti-Jo-1 and anti-PM-Scl antibody positive idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology (Oxford)* 48, 1213–1217. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep248>.
- Chinoy, H., Adimulam, S., Marriage, F., New, P., Vincze, M., Zilahi, E., Kapitány, A., Gyetvai, A., Ekholm, L., Novota, P., et al. (2012). Interaction of HLA-DRB1\*03 and smoking for the development of anti-Jo-1 antibodies in adult idiopathic inflammatory myopathies: a European-wide case study. *Ann Rheum Dis* 71, 961–965. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200182>.
- Chiron, S., Tomczak, C., Duperray, A., Lainé, J., Bonne, G., Eder, A., Hansen, A., Eschenhagen, T., Verdier, C., and Coirault, C. (2012). Complex Interactions between Human Myoblasts and the Surrounding 3D Fibrin-Based Matrix. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036173>.
- Christopher-Stine, L., Casciola-Rosen, L.A., Hong, G., Chung, T., Corse, A.M., and Mammen, A.L. (2010). A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 62, 2757–2766. <https://doi.org/10.1002/art.27572>.
- Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.-J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., et al. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 18, 1397–1409. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0693>.
- Chung, T., Christopher-Stine, L., Paik, J.J., Corse, A., and Mammen, A.L. (2015). The composition of cellular infiltrates in anti-HMG-CoA reductase-associated myopathy. *Muscle Nerve* 52, 189–195. <https://doi.org/10.1002/mus.24642>.
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.023>.
- Contreras, O., Rebolledo, D.L., Oyarzún, J.E., Olgún, H.C., and Brandan, E. (2016). Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. *Cell Tissue Res* 364, 647–660. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2343-0>.
- Contreras, O., Rossi, F.M., and Brandan, E. (2019a). Adherent muscle connective tissue fibroblasts are phenotypically and biochemically equivalent to stromal fibro/adipogenic progenitors. *Matrix Biol Plus* 2, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2019.04.003>.
- Contreras, O., Cruz-Soca, M., Theret, M., Soliman, H., Tung, L.W., Groppa, E., Rossi, F.M., and Brandan, E. (2019b). The cross-talk between TGF- $\beta$  and PDGFR $\alpha$  signaling pathways regulates stromal fibro/adipogenic progenitors' fate. *Journal of Cell Science* jcs.232157. <https://doi.org/10.1242/jcs.232157>.
- Contreras, O., Rossi, F.M.V., and Theret, M. (2021). Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors-time for new definitions. *Skelet Muscle* 11, 16. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00265-6>.

Cruz-Jentoft, A.J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A.A., et al. (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 48, 16–31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>.

Cuthbertson, D., Smith, K., Babraj, J., Leese, G., Waddell, T., Atherton, P., Wackerhage, H., Taylor, P.M., and Rennie, M.J. (2005). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* 19, 422–424. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2640fje>.

Dalakas, M.C., Illa, I., Dambrosia, J.M., Soueidan, S.A., Stein, D.P., Otero, C., Dinsmore, S.T., and McCrosky, S. (1993). A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 329, 1993–2000. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292704>.

Dalakas, M.C., Rakocevic, G., Shatunov, A., Goldfarb, L., Raju, R., and Salajegheh, M. (2007). Inclusion body myositis with human immunodeficiency virus infection: four cases with clonal expansion of viral-specific T cells. *Ann Neurol* 61, 466–475. <https://doi.org/10.1002/ana.21103>.

D’Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 43, 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.

Davies, M.R., Liu, X., Lee, L., Laron, D., Ning, A.Y., Kim, H.T., and Feeley, B.T. (2016). TGF- $\beta$  Small Molecule Inhibitor SB431542 Reduces Rotator Cuff Muscle Fibrosis and Fatty Infiltration By Promoting Fibro/Adipogenic Progenitor Apoptosis. *PLoS One* 11, e0155486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155486>.

Davoudi, S., Xu, B., Jacques, E., Cadavid, J.L., McFee, M., Chin, C.-Y., Meysami, A., Ebrahimi, M., Bakooshli, M.A., Tung, K., et al. (2022). MEndR: An In Vitro Functional Assay to Predict In Vivo Muscle Stem Cell-Mediated Repair. *Advanced Functional Materials* 32, 2106548. <https://doi.org/10.1002/adfm.202106548>.

De Benedetti, F., Rucci, N., Del Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, R., Longo, M., Vivarelli, M., Muratori, F., Berni, S., Ballanti, P., et al. (2006). Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 54, 3551–3563. <https://doi.org/10.1002/art.22175>.

De Micheli, A.J., Laurillard, E.J., Heinke, C.L., Ravichandran, H., Fraczek, P., Soueid-Baumgarten, S., De Vlaminck, I., Elemento, O., and Cosgrove, B.D. (2020a). Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Reports* 30, 3583-3595.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.067>.

De Micheli, A.J., Spector, J.A., Elemento, O., and Cosgrove, B.D. (2020b). A reference single-cell transcriptomic atlas of human skeletal muscle tissue reveals bifurcated muscle stem cell populations. *Skeletal Muscle* 10, 19. <https://doi.org/10.1186/s13395-020-00236-3>.

DeBose-Boyd, R.A. (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 18, 609–621. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.61>.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112–119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>.

Delanaye, P., Bataille, S., Quinonez, K., Buckinx, F., Warling, X., Krzesinski, J.-M., Pottel, H., Burtey, S., Bruyère, O., and Cavalier, E. (2019). Myostatin and Insulin-Like Growth Factor 1 Are Biomarkers of Muscle Strength, Muscle Mass, and Mortality in Patients on Hemodialysis. *Journal of Renal Nutrition* 29, 511–520. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2018.11.010>.

Delaney, K., Kasprzycka, P., Ciemerych, M.A., and Zimowska, M. (2017). The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int* 41, 706–715. <https://doi.org/10.1002/cbin.10725>.

Deng, B., Zhang, F., Wen, J., Ye, S., Wang, L., Yang, Y., Gong, P., and Jiang, S. (2017). The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutr Metab (Lond)* 14, 29. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0179-1>.

Deschenes, M.R., Roby, M.A., Eason, M.K., and Harris, M.B. (2010). Remodeling of the Neuromuscular Junction Precedes Sarcopenia Related Alterations in Myofibers. *Exp Gerontol* 45, 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>.

Dobloug, C., Garen, T., Bitter, H., Stjärne, J., Stenseth, G., Grøvre, L., Sem, M., Gran, J.T., and Molberg, Ø. (2015a). Prevalence and clinical characteristics of adult polymyositis and dermatomyositis; data from a large and unselected Norwegian cohort. *Ann Rheum Dis* 74, 1551–1556. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-205127>.

Dobloug, G.C., Antal, E.A., Sveberg, L., Garen, T., Bitter, H., Stjärne, J., Grøvre, L., Gran, J.T., and Molberg, Ø. (2015b). High prevalence of inclusion body myositis in Norway; a population-based clinical epidemiology study. *Eur J Neurol* 22, 672–e41. <https://doi.org/10.1111/ene.12627>.

Dobloug, G.C., Svensson, J., Lundberg, I.E., and Holmqvist, M. (2018). Mortality in idiopathic inflammatory myopathy: results from a Swedish nationwide population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* 77, 40–47. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211402>.

Dong, J., Dong, Y., Chen, Z., Mitch, W.E., and Zhang, L. (2017). The pathway to muscle fibrosis depends on myostatin stimulating the differentiation of fibro/adipogenic progenitor cells in chronic kidney disease. *Kidney Int* 91, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.07.029>.

Drouot, L., Allenbach, Y., Jouen, F., Charuel, J.-L., Martinet, J., Meyer, A., Hirschberger, O., Bader-Meunier, B., Kone-Paut, I., Campana-Salort, E., et al. (2014). Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* 16, R39. <https://doi.org/10.1186/ar4468>.

Dumont, N.A., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* 142, 1572–1581. <https://doi.org/10.1242/dev.114223>.

Ebert, R., and Florey, H. (1939). The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo. *Br J Exp Pathol* 20, 342–356. .

El Shafey, N., Guesnon, M., Simon, F., Deprez, E., Cosette, J., Stockholm, D., Scherman, D., Bigey, P., and Kichler, A. (2016). Inhibition of the myostatin/Smad signaling pathway by short decorin-derived peptides. *Exp Cell Res* 341, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.019>.

Engel, A.G. (2008). Chapter 3 The neuromuscular junction. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 103–148.

Farup, J., Just, J., de Paoli, F., Lin, L., Jensen, J.B., Billeskov, T., Roman, I.S., Cömert, C., Møller, A.B., Madaro, L., et al. (2021). Human skeletal muscle CD90+ fibro-adipogenic progenitors are associated



with muscle degeneration in type 2 diabetic patients. *Cell Metab* 33, 2201-2214.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.10.001>.

Fitzgerald, G., Turiel, G., Gorski, T., Soro-Arnaiz, I., Zhang, J., Casartelli, N.C., Masschelein, E., Maffiuletti, N.A., Sutter, R., Leunig, M., et al. (2022). MME+ fibro-adipogenic progenitors are the dominant adipogenic population during fatty infiltration in human skeletal muscle. 2022.04.22.489158. <https://doi.org/10.1101/2022.04.22.489158>.

Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.

Fry, C.S., Kirby, T.J., Kosmac, K., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2017). Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Stem Cell* 20, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.09.010>.

van Furth, R. (1981). 27 - IDENTIFICATION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES: OVERVIEW AND DEFINITIONS. In *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, D.O. Adams, P.J. Edelson, and H.S. Koren, eds. (Academic Press), pp. 243–251.

van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). [Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]. *Bull World Health Organ* 47, 651–658. .

Ge, Y., Lu, X., Peng, Q., Shu, X., and Wang, G. (2015). Clinical Characteristics of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Antibodies in Chinese Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies. *PLoS ONE* 10, e0141616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141616>.

Georges, P.C., Hui, J.-J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., and Wells, R.G. (2007). Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293, G1147–G1154. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00032.2007>.

Gillies, A.R., and Lieber, R.L. (2011). Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle & Nerve* 44, 318. <https://doi.org/10.1002/mus.22094>.

Giordani, L., He, G.J., Negroni, E., Sakai, H., Law, J.Y.C., Siu, M.M., Wan, R., Corneau, A., Tajbakhsh, S., Cheung, T.H., et al. (2019). High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. *Molecular Cell* 74, 609-621.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.026>.

Girardi, F., Taleb, A., Ebrahimi, M., Datye, A., Gamage, D.G., Peccate, C., Giordani, L., Millay, D.P., Gilbert, P.M., Cadot, B., et al. (2021). TGF $\beta$  signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. *Nat Commun* 12, 750. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20289-8>.

Goel, A.J., Rieder, M.-K., Arnold, H.-H., Radice, G.L., and Krauss, R.S. (2017). Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. *Cell Rep* 21, 2236–2250. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.102>.

Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Studenski, S.A., and Ferrucci, L. (2014). The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6. .

- Gordon, P.A., Winer, J.B., Hoogendijk, J.E., and Choy, E.H. (2012). Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003643.pub4>.
- Gosselin, L.E., Williams, J.E., Deering, M., Brazeau, D., Koury, S., and Martinez, D.A. (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* *30*, 645–653. <https://doi.org/10.1002/mus.20150>.
- Griggs, R.C., Askanas, V., DiMauro, S., Engel, A., Karpati, G., Mendell, J.R., and Rowland, L.P. (1995). Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* *38*, 705–713. <https://doi.org/10.1002/ana.410380504>.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* *17*, 71–74. <https://doi.org/10.1038/ng0997-71>.
- Guérin, C.W., and Holland, P.C. (1995). Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* *202*, 91–99. <https://doi.org/10.1002/aja.1002020109>.
- Gupta, R., Wayangankar, S.A., Targoff, I.N., and Hennebry, T.A. (2011). Clinical cardiac involvement in idiopathic inflammatory myopathies: a systematic review. *Int J Cardiol* *148*, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.013>.
- Haag, S.M., Hauck, E.W., Eickelberg, O., Szardening-Kirchner, C., Diemer, T., and Weidner, W. (2008). Investigation of the antifibrotic effect of IFN-gamma on fibroblasts in a cell culture model of Peyronie's disease. *Eur Urol* *53*, 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.06.036>.
- Hadders, M.A., Bubeck, D., Roversi, P., Hakobyan, S., Forneris, F., Morgan, B.P., Pangburn, M.K., Llorca, O., Lea, S.M., and Gros, P. (2012). Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep* *1*, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.003>.
- Haller, S., Kapuria, S., Riley, R.R., O'Leary, M.N., Schreiber, K.H., Andersen, J.K., Melov, S., Que, J., Rando, T.A., Rock, J., et al. (2017). mTORC1 Activation during Repeated Regeneration Impairs Somatic Stem Cell Maintenance. *Cell Stem Cell* *21*, 806-818.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.008>.
- Hamilton, T.G., Klinghoffer, R.A., Corrin, P.D., and Soriano, P. (2003). Evolutionary divergence of platelet-derived growth factor alpha receptor signaling mechanisms. *Mol Cell Biol* *23*, 4013–4025. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.11.4013-4025.2003>.
- Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology* *91*, 534–551. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.534>.
- Henderson, C.A., Gomez, C.G., Novak, S.M., Mi-Mi, L., and Gregorio, C.C. (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* *7*, 891–944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>.
- Heredia, J.E., Mukundan, L., Chen, F.M., Mueller, A.A., Deo, R.C., Locksley, R.M., Rando, T.A., and Chawla, A. (2013). Type 2 Innate Signals Stimulate Fibro/Adipogenic Progenitors to Facilitate Muscle Regeneration. *Cell* *153*, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053>.
- Hilton-Jones, D., Miller, A., Parton, M., Holton, J., Sewry, C., and Hanna, M.G. (2010). Inclusion body myositis: MRC Centre for Neuromuscular Diseases, IBM workshop, London, 13 June 2008. *Neuromuscul Disord* *20*, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.003>.

- Hindi, S.M., Tajrishi, M.M., and Kumar, A. (2013). Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Sci Signal* 6, re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003832>.
- Hinz, B. (2015). The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology* 47, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.006>.
- Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol* 330, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90579-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90579-4).
- Hofmann, M., Halper, B., Oesen, S., Franzke, B., Stuparits, P., Tschan, H., Bachl, N., Strasser, E.-M., Quittan, M., Ploder, M., et al. (2015). Serum concentrations of insulin-like growth factor-1, members of the TGF-beta superfamily and follistatin do not reflect different stages of dynapenia and sarcopenia in elderly women. *Exp Gerontol* 64, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.02.008>.
- Hogarth, M.W., Defour, A., Lazarski, C., Gallardo, E., Diaz Manera, J., Partridge, T.A., Nagaraju, K., and Jaiswal, J.K. (2019). Fibroadipogenic progenitors are responsible for muscle loss in limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Commun* 10, 2430. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10438-z>.
- Hoogendijk, J.E., Amato, A.A., Lecky, B.R., Choy, E.H., Lundberg, I.E., Rose, M.R., Vencovsky, J., de Visser, M., and Hughes, R.A. (2004). 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 14, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.02.006>.
- Horner, H., Frank, C., Dechant, C., Repp, R., Glennie, M., Herrmann, M., and Stockmeyer, B. (2007). Intimate Cell Conjugate Formation and Exchange of Membrane Lipids Precede Apoptosis Induction in Target Cells during Antibody-Dependent, Granulocyte-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of Immunology* 179, 337–345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.337>.
- Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483–494. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00319-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00319-2).
- Hoshino, K., Muro, Y., Sugiura, K., Tomita, Y., Nakashima, R., and Mimori, T. (2010). Anti-MDA5 and anti-TIF1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 49, 1726–1733. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq153>.
- Ishitobi, M., Haginoya, K., Zhao, Y., Ohnuma, A., Minato, J., Yanagisawa, T., Tanabu, M., Kikuchi, M., and Iinuma, K. (2000). Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. *Neuroreport* 11, 4033–4035. <https://doi.org/10.1097/00001756-200012180-00026>.
- Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C834-843. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>.
- Jacquemin, V., Butler-Browne, G.S., Furling, D., and Mouly, V. (2007). IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci* 120, 670–681. <https://doi.org/10.1242/jcs.03371>.

- Jennette, J.C., Xiao, H., and Hu, P. (2013). Complement in ANCA-Associated Vasculitis. *Semin Nephrol* 33, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.006>.
- Joe, A.W.B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A., and Rossi, F.M.V. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 12, 153–163. <https://doi.org/10.1038/ncb2015>.
- Joffe, M.M., Love, L.A., Leff, R.L., Fraser, D.D., Targoff, I.N., Hicks, J.E., Plotz, P.H., and Miller, F.W. (1993). Drug therapy of the idiopathic inflammatory myopathies: predictors of response to prednisone, azathioprine, and methotrexate and a comparison of their efficacy. *Am J Med* 94, 379–387. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90148-i](https://doi.org/10.1016/0002-9343(93)90148-i).
- Johnson, R.W., Williams, F.M., Kazi, S., Dimachkie, M.M., and Reveille, J.D. (2003). Human immunodeficiency virus-associated polymyositis: a longitudinal study of outcome. *Arthritis Rheum* 49, 172–178. <https://doi.org/10.1002/art.11002>.
- Juban, G., Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Kernou, A., Arnold, L., Boisson, C., Ben Larbi, S., Magnan, M., Cuvellier, S., Théret, M., et al. (2018). AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- $\beta$ 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Reports* 25, 2163-2176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.077>.
- Kalovidouris, A.E., Plotkin, Z., and Graesser, D. (1993). Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. *J Rheumatol* 20, 1718–1723. .
- Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A.K., Fischer, C.P., Plomgaard, P., and Pedersen, B.K. (2005). Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 99, 2075–2079. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00590.2005>.
- Kellogg, M., Tikhonova, E., and Karamyshev, A. (2022). Signal Recognition Particle in Human Diseases. *Frontiers in Genetics* 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.898083>.
- Kerschman-Schindl, K., Gruther, W., Föger-Samwald, U., Bangert, C., Kudlacek, S., and Pietschmann, P. (2021). Myostatin and markers of bone metabolism in dermatomyositis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 22, 150. <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04030-0>.
- Kissel, J.T., Mendell, J.R., and Rammohan, K.W. (1986). Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *N Engl J Med* 314, 329–334. <https://doi.org/10.1056/NEJM198602063140601>.
- Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84, 649–698. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2003>.
- Klein, M., Mann, H., Pleštilová, L., Betteridge, Z., McHugh, N., Remáková, M., Novota, P., and Vencovský, J. (2014). Arthritis in idiopathic inflammatory myopathy: clinical features and autoantibody associations. *J Rheumatol* 41, 1133–1139. <https://doi.org/10.3899/jrheum.131223>.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>.

Kühl, U., Ocalan, M., Timpl, R., Mayne, R., Hay, E., and von der Mark, K. (1984). Role of muscle fibroblasts in the deposition of type-IV collagen in the basal lamina of myotubes. *Differentiation* 28, 164–172. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1984.tb00279.x>.

Lach-Trifilieff, E., Minetti, G.C., Sheppard, K., Ibebunjo, C., Feige, J.N., Hartmann, S., Brachat, S., Rivet, H., Koelbing, C., Morvan, F., et al. (2014). An Antibody Blocking Activin Type II Receptors Induces Strong Skeletal Muscle Hypertrophy and Protects from Atrophy. *Molecular and Cellular Biology* 34, 606–618. <https://doi.org/10.1128/MCB.01307-13>.

Lad, H., Musgrave, B., Ebrahimi, M., and Gilbert, P.M. (2021). Assessing Functional Metrics of Skeletal Muscle Health in Human Skeletal Muscle Microtissues. *Journal of Visualized Experiments* <https://doi.org/10.3791/62307>.

Ladislau, L., Arouche-Delaperche, L., Allenbach, Y., and Benveniste, O. (2018). Potential Pathogenic Role of Anti-Signal Recognition Protein and Anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Antibodies in Immune-Mediated Necrotizing Myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 20, 56. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0763-z>.

Landon-Cardinal, O., Koumako, C., Hardouin, G., Granger, B., Reyngoudt, H., Boisserie, J.-M., Rigolet, A., Hervier, B., Champtiaux, N., Guillaume-Jugnot, P., et al. (2020). Severe axial and pelvifemoral muscle damage in immune-mediated necrotizing myopathy evaluated by whole-body MRI. *Semin Arthritis Rheum* 50, 1437–1440. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.02.009>.

Langen, R.C.J., Van Der Velden, J.L.J., Schols, A.M.W.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 18, 227–237. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0251com>.

Lee, J.H., and Jun, H.-S. (2019). Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front. Physiol.* 10, 42. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00042>.

Lee, S.-J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9306–9311. <https://doi.org/10.1073/pnas.151270098>.

Lemos, D.R., Paylor, B., Chang, C., Sampaio, A., Underhill, T.M., and Rossi, F.M.V. (2012). Functionally Convergent White Adipogenic Progenitors of Different Lineages Participate in a Diffused System Supporting Tissue Regeneration. *Stem Cells* 30, 1152–1162. <https://doi.org/10.1002/stem.1082>.

Lemos, D.R., Babaeijandaghi, F., Low, M., Chang, C.-K., Lee, S.T., Fiore, D., Zhang, R.-H., Natarajan, A., Nedospasov, S.A., and Rossi, F.M.V. (2015). Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 21, 786–794. <https://doi.org/10.1038/nm.3869>.

Li, Y.-P. (2003). TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C370-376. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00453.2002>.

Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., et al. (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150, 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.019>.

Li, Z.B., Kollias, H.D., and Wagner, K.R. (2008). Myostatin Directly Regulates Skeletal Muscle Fibrosis. *J Biol Chem* 283, 19371–19378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802585200>.

- Liu, F., Mih, J.D., Shea, B.S., Kho, A.T., Sharif, A.S., Tager, A.M., and Tschumperlin, D.J. (2010). Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *Journal of Cell Biology* 190, 693–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004082>.
- Liu, W., Wei-LaPierre, L., Klose, A., Dirksen, R.T., and Chakkalakal, J.V. (2015). Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.09221>.
- Lloyd, T.E., Mammen, A.L., Amato, A.A., Weiss, M.D., Needham, M., and Greenberg, S.A. (2014). Evaluation and construction of diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Neurology* 83, 426–433. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000642>.
- Lokireddy, S., Mouly, V., Butler-Browne, G., Gluckman, P.D., Sharma, M., Kambadur, R., and McFarlane, C. (2011). Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 301, C1316–C1324. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00114.2011>.
- Long, K., and Danoff, S.K. (2019). Interstitial Lung Disease in Polymyositis and Dermatomyositis. *Clin Chest Med* 40, 561–572. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.05.004>.
- Loumaye, A., de Barse, M., Nachit, M., Lause, P., Frateur, L., van Maanen, A., Trefois, P., Gruson, D., and Thissen, J.-P. (2015). Role of Activin A and myostatin in human cancer cachexia. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 2030–2038. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4318>.
- Love, L.A., Weinberg, C.R., McConaughy, D.R., Oddis, C.V., Medsger, T.A., Reveille, J.D., Arnett, F.C., Targoff, I.N., and Miller, F.W. (2009). Ultraviolet radiation intensity predicts the relative distribution of dermatomyositis and anti-Mi-2 autoantibodies in women. *Arthritis Rheum* 60, 2499–2504. <https://doi.org/10.1002/art.24702>.
- Lu, H., Huang, D., Saederup, N., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., and Zhou, L. (2011). Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J* 25, 358–369. <https://doi.org/10.1096/fj.10-171579>.
- Lubbers, R., van Essen, M.F., van Kooten, C., and Trouw, L.A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol* 188, 183–194. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>.
- Lundberg, I., Ulfgren, A.-K., Nyberg, P., Andersson, U., and Klareskog, L. (1997). Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis & Rheumatism* 40, 865–874. <https://doi.org/10.1002/art.1780400514>.
- Lundberg, I.E., Tjärnlund, A., Bottai, M., Werth, V.P., Pilkington, C., Visser, M. de, Alfredsson, L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Liang, M.H., et al. (2017). 2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1955–1964. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211468>.
- Lundberg, I.E., Fujimoto, M., Vencovsky, J., Aggarwal, R., Holmqvist, M., Christopher-Stine, L., Mammen, A.L., and Miller, F.W. (2021). Idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Dis Primers* 7, 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00321-x>.

- Ma, J.F., Sanchez, B.J., Hall, D.T., Tremblay, A.-M.K., Di Marco, S., and Gallouzi, I.-E. (2017). STAT3 promotes IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -induced muscle wasting in an NF- $\kappa$ B-dependent and IL-6-independent manner. *EMBO Mol Med* 9, 622–637. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607052>.
- Madaro, L., Passafaro, M., Sala, D., Etxaniz, U., Lugarini, F., Proietti, D., Alfonsi, M.V., Nicoletti, C., Gatto, S., De Bardi, M., et al. (2018). Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol* 20, 917–927. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0151-y>.
- Maffioletti, S.M., Sarcar, S., Henderson, A.B.H., Mannhardt, I., Pinton, L., Moyle, L.A., Steele-Stallard, H., Cappellari, O., Wells, K.E., Ferrari, G., et al. (2018). Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering. *Cell Rep* 23, 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.091>.
- Malecova, B., Gatto, S., Etxaniz, U., Passafaro, M., Cortez, A., Nicoletti, C., Giordani, L., Torcinaro, A., De Bardi, M., Biciato, S., et al. (2018). Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat Commun* 9, 3670. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06068-6>.
- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle* 1, 34. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-34>.
- Mammen, A.L., Chung, T., Christopher-Stine, L., Rosen, P., Rosen, A., Doering, K.R., and Casciola-Rosen, L.A. (2011). Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 63, 713–721. <https://doi.org/10.1002/art.30156>.
- Mammen, A.L., Allenbach, Y., Stenzel, W., Benveniste, O., and ENMC 239th Workshop Study Group (2020). 239th ENMC International Workshop: Classification of dermatomyositis, Amsterdam, the Netherlands, 14-16 December 2018. *Neuromuscul Disord* 30, 70–92. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.10.005>.
- Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 1, 21. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-21>.
- Mariampillai, K., Granger, B., Amelin, D., Guiguet, M., Hachulla, E., Maurier, F., Meyer, A., Tohmé, A., Charuel, J.-L., Musset, L., et al. (2018). Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol* 75, 1528–1537. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2598>.
- Mariot, V., Joubert, R., Hourdé, C., Féasson, L., Hanna, M., Muntoni, F., Maisonobe, T., Servais, L., Bogni, C., Le Panse, R., et al. (2017). Downregulation of myostatin pathway in neuromuscular diseases may explain challenges of anti-myostatin therapeutic approaches. *Nat Commun* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01486-4>.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- Martinez, C.O., McHale, M.J., Wells, J.T., Ochoa, O., Michalek, J.E., McManus, L.M., and Shireman, P.K. (2010). Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related

to macrophage recruitment. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299, R832–R842. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00797.2009>.

Mathur, T., Manadan, A.M., Thiagarajan, S., Hota, B., and Block, J.A. (2014). The utility of serum aldolase in normal creatine kinase dermatomyositis. *J Clin Rheumatol* 20, 47–48. <https://doi.org/10.1097/RHU.000000000000062>.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>.

McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162, 1135–1147. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207056>.

McCroskery, S., Thomas, M., Platt, L., Hennebry, A., Nishimura, T., McLeay, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2005). Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci* 118, 3531–3541. <https://doi.org/10.1242/jcs.02482>.

McNally, A.K., and Anderson, J.M. (2005). Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol* 79, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.06.008>.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>.

Meyer, A., Meyer, N., Schaeffer, M., Gottenberg, J.-E., Geny, B., and Sibia, J. (2015). Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 54, 50–63. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu289>.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.

Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., and Fujiwara, H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1529–1537. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1529>.

Mohsen Afshar Bakooshi, Lippmann, E.S., Mulcahy, B., Iyer, N., Nguyen, C.T., Tung, K., Stewart, B.A., van den Dorpel, H., Fuehrmann, T., Shoichet, M., et al. (2019). A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *ELife* 8, e44530. <https://doi.org/10.7554/eLife.44530>.

Molberg, Ø., and Dobloug, C. (2016). Epidemiology of sporadic inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 28, 657–660. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000327>.

Molina, T., Fabre, P., and Dumont, N.A. (2021). Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biology* 11, 210110. <https://doi.org/10.1098/rsob.210110>.

Moratal, C., Raffort, J., Arrighi, N., Rekima, S., Schaub, S., Dechesne, C.A., Chinetti, G., and Dani, C. (2018). IL-1 $\beta$ - and IL-4-polarized macrophages have opposite effects on adipogenesis of intramuscular fibro-adipogenic progenitors in humans. *Sci Rep* 8, 17005. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35429-w>.



- Moriwaki, K., Matsumoto, H., Tanishima, S., Tanimura, C., Osaki, M., Nagashima, H., and Hagino, H. (2019). Association of serum bone- and muscle-derived factors with age, sex, body composition, and physical function in community-dwelling middle-aged and elderly adults: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord* *20*, 276. <https://doi.org/10.1186/s12891-019-2650-9>.
- Morris, K.M., Aden, D.P., Knowles, B.B., and Colten, H.R. (1982). Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest* *70*, 906–913. .
- Morris, T.A., Naik, J., Fibben, K.S., Kong, X., Kiyono, T., Yokomori, K., and Grosberg, A. (2020a). Striated myocyte structural integrity: Automated analysis of sarcomeric z-discs. *PLoS Computational Biology* *16*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007676>.
- Morris, T.A., Naik, J., Fibben, K.S., Kong, X., Kiyono, T., Yokomori, K., and Grosberg, A. (2020b). Striated myocyte structural integrity: Automated analysis of sarcomeric z-discs. *PLOS Computational Biology* *16*, e1007676. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007676>.
- Mosher, D.S., Quignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., Mellersh, C.S., Parker, H.G., and Ostrander, E.A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* *3*, e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030079>.
- Mukund, K., and Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* *12*, e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.
- Mulder, K., Patel, A.A., Kong, W.T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S.E., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* *54*, 1883-1900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>.
- Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., and Friedl, A. (2002). Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Receptor Binding in Breast Carcinomas. *Am J Pathol* *160*, 185–194. .
- Muramatsu, T., Muramatsu, H., and Kojima, T. (2006). Identification of Proteoglycan-Binding Proteins. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 263–278.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* *41*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
- Nagaraju, K., Raben, N., Merritt, G., Loeffler, L., Kirk, K., and Plotz, P. (1998). A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin Exp Immunol* *113*, 407–414. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00664.x>.
- Naito, A.T., Sumida, T., Nomura, S., Liu, M.-L., Higo, T., Nakagawa, A., Okada, K., Sakai, T., Hashimoto, A., Hara, Y., et al. (2012). Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* *149*, 1298–1313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.047>.
- Nedachi, T., Hatakeyama, H., Kono, T., Sato, M., and Kanzaki, M. (2009). Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *297*, E866–E878. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00104.2009>.

- Nelke, C., Dziewas, R., Minnerup, J., Meuth, S.G., and Ruck, T. (2019). Skeletal muscle as potential central link between sarcopenia and immune senescence. *EBioMedicine* 49, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.034>.
- Nguyen, H.X., and Tidball, J.G. (2003). Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 547, 125–132. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.031450>.
- Nilwik, R., Snijders, T., Leenders, M., Groen, B.B.L., van Kranenburg, J., Verdijk, L.B., and van Loon, L.J.C. (2013). The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Experimental Gerontology* 48, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.012>.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34–47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>.
- Ochoa, O., Sun, D., Reyes-Reyna, S.M., Waite, L.L., Michalek, J.E., McManus, L.M., and Shireman, P.K. (2007). Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2<sup>-/-</sup> mice during impaired skeletal muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293, R651–R661. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00069.2007>.
- Oddis, C.V., Reed, A.M., Aggarwal, R., Rider, L.G., Ascherman, D.P., Levesque, M.C., Barohn, R.J., Feldman, B.M., Harris-Love, M.O., Koontz, D.C., et al. (2013). Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum* 65, 314–324. <https://doi.org/10.1002/art.37754>.
- O’Hanlon, T.P., Rider, L.G., Mamyrova, G., Targoff, I.N., Arnett, F.C., Reveille, J.D., Carrington, M., Gao, X., Oddis, C.V., Morel, P.A., et al. (2006). HLA polymorphisms in African Americans with idiopathic inflammatory myopathy: allelic profiles distinguish patients with different clinical phenotypes and myositis autoantibodies. *Arthritis Rheum* 54, 3670–3681. <https://doi.org/10.1002/art.22205>.
- Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., and Saito, T. (2000). Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 35751–35758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007476200>.
- Oprescu, S.N., Yue, F., Qiu, J., Brito, L.F., and Kuang, S. (2020). Temporal Dynamics and Heterogeneity of Cell Populations during Skeletal Muscle Regeneration. *IScience* 23, 100993. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100993>.
- Osaki, T., Sivathanu, V., and Kamm, R.D. (2018). Crosstalk between developing vasculature and optogenetically engineered skeletal muscle improves muscle contraction and angiogenesis. *Biomaterials* 156, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.041>.
- Osaki, T., Uzel, S.G.M., and Kamm, R.D. (2020). On-chip 3D neuromuscular model for drug screening and precision medicine in neuromuscular disease. *Nat Protoc* 15, 421–449. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0248-1>.
- Osaki, Y., Nakagawa, Y., Miyahara, S., Iwasaki, H., Ishii, A., Matsuzaka, T., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Yahagi, N., et al. (2015). Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 466, 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.065>.

- Ostrovidov, S., Salehi, S., Costantini, M., Suthiwanish, K., Ebrahimi, M., Sadeghian, R.B., Fujie, T., Shi, X., Cannata, S., Gargioli, C., et al. (2019). Three dimensional bioprinting in skeletal muscle tissue engineering. *Small* 15, e1805530. <https://doi.org/10.1002/sml.201805530>.
- Pawlikowski, B., Betta, N.D., Elston, T., O'Rourke, R., and Olwin, B.B. A cellular atlas of skeletal muscle regeneration and aging. 39. .
- Pedersen, B.K., and Febbraio, M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88, 1379–1406. <https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Febbraio, M., and Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 24, 113–119. <https://doi.org/10.1023/a:1026070911202>.
- Peng, L., Lee, W., Liu, L., Lin, M., and Chen, L. (2018). Healthy community-living older men differ from women in associations between myostatin levels and skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9, 635–642. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12302>.
- Pham, S., and Puckett, Y. (2022). Physiology, Skeletal Muscle Contraction. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Pichavant, C., and Pavlath, G.K. (2014). Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging. *Skelet Muscle* 4, 9. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-4-9>.
- Pinal-Fernandez, I., and Mammen, A.L. (2016). Spectrum of immune-mediated necrotizing myopathies and their treatments. *Current Opinion in Rheumatology* 28, 619–624. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000335>.
- Pinal-Fernandez, I., Parks, C., Werner, J.L., Albayda, J., Paik, J., Danoff, S.K., Casciola-Rosen, L., Christopher-Stine, L., and Mammen, A.L. (2017a). Longitudinal Course of Disease in a Large Cohort of Myositis Patients With Autoantibodies Recognizing the Signal Recognition Particle. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 69, 263–270. <https://doi.org/10.1002/acr.22920>.
- Pinal-Fernandez, I., Casal-Dominguez, M., Carrino, J.A., Lahouti, A.H., Basharat, P., Albayda, J., Paik, J.J., Ahlawat, S., Danoff, S.K., Lloyd, T.E., et al. (2017b). Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 681–687. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210198>.
- Pinal-Fernandez, I., Casal-Dominguez, M., Derfoul, A., Pak, K., Miller, F.W., Milisenda, J.C., Grau-Junyent, J.M., Selva-O'Callaghan, A., Carrion-Ribas, C., Paik, J.J., et al. (2020). Machine learning algorithms reveal unique gene expression profiles in muscle biopsies from patients with different types of myositis. *Ann Rheum Dis* 79, 1234–1242. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216599>.
- Pistilli, E.E., and Alway, S.E. (2008). Systemic elevation of interleukin-15 in vivo promotes apoptosis in skeletal muscles of young adult and aged rats. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.188>.
- Preuße, C., Paesler, B., Nelke, C., Cengiz, D., Müntefering, T., Roos, A., Amelin, D., Allenbach, Y., Uruha, A., Dittmayer, C., et al. (2022). Skeletal muscle provides the immunological micro-milieu for specific plasma cells in anti-synthetase syndrome-associated myositis. *Acta Neuropathol* 144, 353–372. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02438-z>.

- Price, F.D., von Maltzahn, J., Bentzinger, C.F., Dumont, N.A., Yin, H., Chang, N.C., Wilson, D.H., Frenette, J., and Rudnicki, M.A. (2014). Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nat Med* 20, 1174–1181. <https://doi.org/10.1038/nm.3655>.
- Purslow, P.P. (2008). The Extracellular Matrix of Skeletal and Cardiac Muscle. In *Collagen: Structure and Mechanics*, P. Fratzl, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 325–357.
- Purslow, P.P. (2020). The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function. *Front Physiol* 11, 495. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00495>.
- Quinn, L.S., Haugk, K.L., and Grabstein, K.H. (1995). Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 136, 3669–3672. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628408>.
- Quinn, L.S., Anderson, B.G., Drivdahl, R.H., Alvarez, B., and Argilés, J.M. (2002). Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res* 280, 55–63. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5624>.
- Rao, L., Qian, Y., Khodabukus, A., Ribar, T., and Bursac, N. (2018). Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat Commun* 9, 126. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02636-4>.
- Redpath, S., Michaelsen, T., Sandlie, I., and Clark, M.R. (1998). Activation of complement by human IgG1 and human IgG3 antibodies against the human leucocyte antigen CD52. *Immunology* 93, 595–600. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00472.x>.
- Reeves, W.H., Nigam, S.K., and Blobel, G. (1986). Human autoantibodies reactive with the signal-recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9507–9511. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9507>.
- Rider, L.G., and Miller, F.W. (2011). Deciphering the clinical presentations, pathogenesis, and treatment of the idiopathic inflammatory myopathies. *JAMA* 305, 183–190. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1977>.
- Rider, L.G., Werth, V.P., Huber, A.M., Alexanderson, H., Rao, A.P., Ruperto, N., Herbelin, L., Barohn, R., Isenberg, D., and Miller, F.W. (2011). Measures of adult and juvenile dermatomyositis, polymyositis, and inclusion body myositis: Physician and Patient/Parent Global Activity, Manual Muscle Testing (MMT), Health Assessment Questionnaire (HAQ)/Childhood Health Assessment Questionnaire (C-HAQ), Childhood Myositis Assessment Scale (CMAS), Myositis Disease Activity Assessment Tool (MDAAT), Disease Activity Score (DAS), Short Form 36 (SF-36), Child Health Questionnaire (CHQ), physician global damage, Myositis Damage Index (MDI), Quantitative Muscle Testing (QMT), Myositis Functional Index-2 (FI-2), Myositis Activities Profile (MAP), Inclusion Body Myositis Functional Rating Scale (IBMFRS), Cutaneous Dermatomyositis Disease Area and Severity Index (CDASI), Cutaneous Assessment Tool (CAT), Dermatomyositis Skin Severity Index (DSSI), Skindex, and Dermatology Life Quality Index (DLQI). *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63 Suppl 11, S118-157. <https://doi.org/10.1002/acr.20532>.
- Rojana-Udomsart, A., Bundell, C., James, I., Castley, A., Martinez, P., Christiansen, F., Hollingsworth, P., and Mastaglia, F. (2012). Frequency of autoantibodies and correlation with HLA-DRB1 genotype in sporadic inclusion body myositis (s-IBM): a population control study. *J Neuroimmunol* 249, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.04.007>.

- Römisch, K., Miller, F.W., Dobberstein, B., and High, S. (2006). Human autoantibodies against the 54 kDa protein of the signal recognition particle block function at multiple stages. *Arthritis Res Ther* 8, R39. <https://doi.org/10.1186/ar1895>.
- Rose, M.R., and ENMC IBM Working Group (2013). 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 23, 1044–1055. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.08.007>.
- Rothwell, S., Cooper, R.G., Lundberg, I.E., Miller, F.W., Gregersen, P.K., Bowes, J., Vencovsky, J., Danko, K., Limaye, V., Selva-O'Callaghan, A., et al. (2016). Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Ann Rheum Dis* 75, 1558–1566. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208119>.
- Rozo, M., Li, L., and Fan, C.-M. (2016). Targeting  $\beta$ 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat Med* 22, 889–896. <https://doi.org/10.1038/nm.4116>.
- Rubenstein, A.B., Smith, G.R., Raue, U., Begue, G., Minchev, K., Ruf-Zamojski, F., Nair, V.D., Wang, X., Zhou, L., Zaslavsky, E., et al. (2020). Single-cell transcriptional profiles in human skeletal muscle. *Sci Rep* 10, 229. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57110-6>.
- Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Mackey, A.L., Arnold, L., Ardjoune, H., Magnan, M., Sailhan, F., Chelly, J., Pavlath, G.K., Mounier, R., et al. (2013). Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 31, 384–396. <https://doi.org/10.1002/stem.1288>.
- Saito, Y., Chikenji, T.S., Matsumura, T., Nakano, M., and Fujimiya, M. (2020). Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. *Nat Commun* 11, 889. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14734-x>.
- Santulli, G., Lewis, D.R., and Marks, A.R. (2017). Physiology and pathophysiology of excitation-contraction coupling: the functional role of ryanodine receptor. *J Muscle Res Cell Motil* 38, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9470-z>.
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., and Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1248-1257. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2009>.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature00858>.
- Scheibner, K.A., Lutz, M.A., Boodoo, S., Fenton, M.J., Powell, J.D., and Horton, M.R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177, 1272–1281. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1272>.
- Schiaffino, S., and Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1, 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91, 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.

- Schiaffino, S., Rossi, A.C., Smerdu, V., Leinwand, L.A., and Reggiani, C. (2015). Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle* 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Schnoor, M., Cullen, P., Lorkowski, J., Stolle, K., Robenek, H., Troyer, D., Rauterberg, J., and Lorkowski, S. (2008). Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* 180, 5707–5719. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5707>.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., and Lee, S.-J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350, 2682–2688. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040933>.
- Schultz, E. (1976). Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am J Anat* 147, 49–70. <https://doi.org/10.1002/aja.1001470105>.
- Schultz, E., Jaryszak, D.L., and Valliere, C.R. (1985). Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle & Nerve* 8, 217–222. <https://doi.org/10.1002/mus.880080307>.
- Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ* 23, 927–937. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.171>.
- Scott, R.W., Arostegui, M., Schweitzer, R., Rossi, F.M.V., and Underhill, T.M. (2019). Hic1 Defines Quiescent Mesenchymal Progenitor Subpopulations with Distinct Functions and Fates in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell* 25, 797–813.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.004>.
- Scott, W., Stevens, J., and Binder–Macleod, S.A. (2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy* 81, 1810–1816. <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777–786. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00066-0).
- Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2010). Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 316, 3050–3058. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.035>.
- Serrano, A.L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2008). Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metabolism* 7, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.011>.
- Serrano, A.L., Mann, C.J., Vidal, B., Ardite, E., Perdiguero, E., and Muñoz-Cánoves, P. (2011). Chapter seven - Cellular and Molecular Mechanisms Regulating Fibrosis in Skeletal Muscle Repair and Disease. In *Current Topics in Developmental Biology*, G. k. Pavlath, ed. (Academic Press), pp. 167–201.
- Severinsen, M.C.K., and Pedersen, B.K. (2020). Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocrine Reviews* 41, 594–609. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa016>.
- Shappley, C., Paik, J.J., and Saketkoo, L.A. (2019). Myositis-Related Interstitial Lung Diseases: Diagnostic Features, Treatment, and Complications. *Curr Treatm Opt Rheumatol* 5, 56–83. <https://doi.org/10.1007/s40674-018-0110-6>.

- Simões, F.C., Cahill, T.J., Kenyon, A., Gavriouchkina, D., Vieira, J.M., Sun, X., Pezzolla, D., Ravaud, C., Masmanian, E., Weinberger, M., et al. (2020). Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair. *Nat Commun* 11, 600. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14263-2>.
- Singh, V.K., Mehrotra, S., Narayan, P., Pandey, C.M., and Agarwal, S.S. (2000). Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide. *Immunol Res* 22, 1–19. <https://doi.org/10.1385/IR:22:1:1>.
- Skladany, L., Koller, T., Molcan, P., Vnencakova, J., Zilincan, M., Jancekova, D., and Kukla, M. (2019). Prognostic usefulness of serum myostatin in advanced chronic liver disease: its relation to gender and correlation with inflammatory status. *J Physiol Pharmacol* 70. <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.3.03>.
- Smith, L.R., and Barton, E.R. (2018). Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol* 68–69, 602–615. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.014>.
- Song, Y., Yao, S., Liu, Y., Long, L., Yang, H., Li, Q., Liang, J., Li, X., Lu, Y., Zhu, H., et al. (2017). Expression levels of TGF- $\beta$ 1 and CTGF are associated with the severity of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Ther Med* 13, 1209–1214. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4105>.
- de Sordi, C.M., dos Reis-Neto, E.T., Keppeke, G.D., Shinjo, S.K., and Sato, E.I. (2022). Serum Myostatin and Follistatin Levels in Patients With Dermatomyositis and Polymyositis. *J Clin Rheumatol* 28, 33–37. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000001806>.
- Sousa-Victor, P., García-Prat, L., and Muñoz-Cánoves, P. (2022). Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23, 204–226. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00421-2>.
- Squire, J. (2019). Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *IJMS* 20, 5715. <https://doi.org/10.3390/ijms20225715>.
- Steel, J.C., Waldmann, T.A., and Morris, J.C. (2012). Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.09.004>.
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Møller, K., and Pedersen, B.K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 285, E433–E437. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176, 287–292. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287>.
- Stone, K.B., Oddis, C.V., Fertig, N., Katsumata, Y., Lucas, M., Vogt, M., Domsic, R., and Ascherman, D.P. (2007). Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 56, 3125–3131. <https://doi.org/10.1002/art.22865>.
- Suzuki, S., Nishikawa, A., Kuwana, M., Nishimura, H., Watanabe, Y., Nakahara, J., Hayashi, Y.K., Suzuki, N., and Nishino, I. (2015). Inflammatory myopathy with anti-signal recognition particle antibodies: case series of 100 patients. *Orphanet J Rare Dis* 10, 61. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0277-y>.
- Svensson, J., Arkema, E.V., Lundberg, I.E., and Holmqvist, M. (2017). Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in Sweden: a nationwide population-based study. *Rheumatology (Oxford)* 56, 802–810. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew503>.

- Szabó, K., Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Vincze, A., Zilahi, E., Szodoray, P., Dankó, K., and Griger, Z. (2018). Effect of Genetic and Laboratory Findings on Clinical Course of Antisynthetase Syndrome in a Hungarian Cohort. *Biomed Res Int* 2018, 6416378. <https://doi.org/10.1155/2018/6416378>.
- Targoff, I.N., Johnson, A.E., and Miller, F.W. (1990). Antibody to signal recognition particle in polymyositis. *Arthritis Rheum* 33, 1361–1370. <https://doi.org/10.1002/art.1780330908>.
- Theret, M., Rossi, F.M.V., and Contreras, O. (2021). Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. *Front Physiol* 12, 673404. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.673404>.
- Thompson, C., Pigué, V., and Choy, E. (2018). The pathogenesis of dermatomyositis. *Br J Dermatol* 179, 1256–1262. <https://doi.org/10.1111/bjd.15607>.
- Tidball, J.G., Flores, I., Welc, S.S., Wehling-Henricks, M., and Ochi, E. (2021). Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Experimental Gerontology* 145, 111200. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111200>.
- Tiniakou, E., and Mammen, A.L. (2017). Idiopathic Inflammatory Myopathies and Malignancy: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 52, 20–33. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8511-x>.
- Tiniakou, E., Pinal-Fernandez, I., Lloyd, T.E., Albayda, J., Paik, J., Werner, J.L., Parks, C.A., Casciola-Rosen, L., Christopher-Stine, L., and Mammen, A.L. (2017). More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Rheumatology (Oxford)* 56, 787–794. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew470>.
- Toquet, S., Granger, B., Uzunhan, Y., Mariampillai, K., Nunes, H., Benveniste, O., and Allenbach, Y. (2021). The seasonality of Dermatomyositis associated with anti-MDA5 antibody: An argument for a respiratory viral trigger. *Autoimmun Rev* 20, 102788. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102788>.
- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735–747. <https://doi.org/10.1038/nri911>.
- Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., and Glass, D.J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296, C1258–C1270. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00105.2009>.
- Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S., and Tsuchida, K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12, 143–152. <https://doi.org/10.1038/ncb2014>.
- Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M.M., Miyagoe-Suzuki, Y., et al. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 124, 3654–3664. <https://doi.org/10.1242/jcs.086629>.
- Valiyil, R., Casciola-Rosen, L., Hong, G., Mammen, A., and Christopher-Stine, L. (2010). Rituximab therapy for myopathy associated with anti-signal recognition particle antibodies: A case series. *Arthritis Care Res* 62, 1328–1334. <https://doi.org/10.1002/acr.20219>.



- Varga, T., Mounier, R., Horvath, A., Cuvellier, S., Dumont, F., Poliska, S., Ardjoune, H., Juban, G., Nagy, L., and Chazaud, B. (2016). Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *The Journal of Immunology* *196*, 4771–4782. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502490>.
- Vernerová, L., Horváthová, V., Kropáčková, T., Vokurková, M., Klein, M., Tomčík, M., Oreská, S., Špiritović, M., Štorkánová, H., Heřmánková, B., et al. (2020). Alterations in activin A–myostatin–follistatin system associate with disease activity in inflammatory myopathies. *Rheumatology* *59*, 2491–2501. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez651>.
- Verschuuren, J., Badrising, U., AR, W., Van Engelen, B., H, van, and JE, H. (1997). Inclusion body myositis. pp. 81–84.
- Volkman, A., and Gowans, J.L. (1965). THE ORIGIN OF MACROPHAGES FROM BONE MARROW IN THE RAT. *Br J Exp Pathol* *46*, 62–70. .
- Wallace, P.K., Howell, A.L., and Fanger, M.W. (1994). Role of Fcγ receptors in cancer and infectious disease. *Journal of Leukocyte Biology* *55*, 816–826. <https://doi.org/10.1002/jlb.55.6.816>.
- Wang, Y., and Pessin, J.E. (2013). Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *16*, 243–250. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328360272d>.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.-F., Wang, F.-S., and Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* *54*, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., and Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci* *108*, 563–569. <https://doi.org/10.1111/cas.13184>.
- Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A.V., and Budinger, G.R.S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest* *129*, 2619–2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>.
- Watanabe, Y., Uruha, A., Suzuki, S., Nakahara, J., Hamanaka, K., Takayama, K., Suzuki, N., and Nishino, I. (2016). Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *87*, 1038–1044. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-313166>.
- Weitkamp, B., Cullen, P., Plenz, G., Robenek, H., and Rauterberg, J. (1999). Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J* *13*, 1445–1457. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1445>.
- Westwood, F.R., Bigley, A., Randall, K., Marsden, A.M., and Scott, R.C. (2005). Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol* *33*, 246–257. <https://doi.org/10.1080/01926230590908213>.
- Wolf, K., and Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol* *21*, 736–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.006>.
- Wolfe, R.R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* *84*, 475–482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>.
- Wosczyzna, M.N., Konishi, C.T., Perez Carbajal, E.E., Wang, T.T., Walsh, R.A., Gan, Q., Wagner, M.W., and Rando, T.A. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic

Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Reports* 27, 2029-2035.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.074>.

Wu, W., Guo, L., Fu, Y., Wang, K., Zhang, D., Xu, W., Chen, Z., and Ye, S. (2021). Interstitial Lung Disease in Anti-MDA5 Positive Dermatomyositis. *Clin Rev Allergy Immunol* 60, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08822-5>.

Wynn, T.A. (2004). FIBROTIC DISEASE AND THE TH1/TH2 PARADIGM. *Nat Rev Immunol* 4, 583–594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>.

Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117, 524–529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>.

Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., et al. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>.

Yakar, S., Wu, Y., Setser, J., and Rosen, C.J. (2002). The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine* 19, 239–248. <https://doi.org/10.1385/ENDO:19:3:239>.

Yamada, S., Tsuruya, K., Yoshida, H., Tokumoto, M., Ueki, K., Ooboshi, H., and Kitazono, T. (2016). Factors Associated with the Serum Myostatin Level in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: Potential Effects of Skeletal Muscle Mass and Vitamin D Receptor Activator Use. *Calcif Tissue Int* 99, 13–22. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0118-6>.

Yang, F., Shang, L., Wang, S., Liu, Y., Ren, H., Zhu, W., and Shi, X. (2019). TNF $\alpha$ -Mediated Necroptosis Aggravates Ischemia-Reperfusion Injury in the Fatty Liver by Regulating the Inflammatory Response. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 2301903. <https://doi.org/10.1155/2019/2301903>.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiological Reviews* 93, 23. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>.

Yoshida, T., and Delafontaine, P. (2020). Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells* 9, 1970. <https://doi.org/10.3390/cells9091970>.

Zhang, C., Wang, C., Li, Y., Miwa, T., Liu, C., Cui, W., Song, W.-C., and Du, J. (2017). Complement C3a signaling facilitates skeletal muscle regeneration by regulating monocyte function and trafficking. *Nat Commun* 8, 2078. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01526-z>.

Zhang, J., Xiao, Z., Qu, C., Cui, W., Wang, X., and Du, J. (2014). CD8 T Cells Are Involved in Skeletal Muscle Regeneration through Facilitating MCP-1 Secretion and Gr1<sup>high</sup> Macrophage Infiltration. *The Journal of Immunology* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303486>.

Zhou, H.-F., Yan, H., Stover, C.M., Fernandez, T.M., Rodriguez de Cordoba, S., Song, W.-C., Wu, X., Thompson, R.W., Schwaeble, W.J., Atkinson, J.P., et al. (2012). Antibody directs properdin-dependent activation of the complement alternative pathway in a mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E415-422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119000109>.





## **Physiopathologie des myopathies inflammatoires idiopathiques: étude de la myostatine et spécificité des myopathies nécrosantes auto-immunes**

Les myopathies inflammatoires idiopathiques (MII) sont des maladies musculaires inflammatoires auto-immunes rares pouvant être séparées en 4 sous-groupes : le syndrome des anti-synthétases (SAS), les dermatomyosites (DM), les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) et les myosites à inclusions (IBM). Ces sous-groupes diffèrent en termes de physiopathologie, de phénotype clinique et de pronostic.

La caractéristique principale des MII est une faiblesse musculaire généralisée avec différents degrés de sévérité observés entre les sous-groupes. Les SAS et les DM ont des atteintes musculaires légères à modérées contrairement aux MNAI et IBM qui présentent une faiblesse musculaire plus intense. Les DM, MNAI et SAS ont une survenue rapidement progressive des symptômes, qui est plus lentement progressive pour les IBM.

L'activité des différentes MII est difficile à évaluer. Certains marqueurs existent mais ne sont pas applicables de la même manière à tous les sous-groupes. Dans ce travail de thèse, j'ai tout d'abord voulu voir si la myostatine, un régulateur de la masse musculaire pouvait être un marqueur d'activité dans les différents sous-groupes.

Pour cela, le taux de myostatine a été dosé au niveau protéique dans le sérum et au niveau transcriptomique dans le muscle chez les patients MII et comparé à des donneurs sains. Le taux de myostatine est diminué chez les patients dans le sang ainsi que dans le muscle. Le niveau de myostatine sérique diminué chez les patients SAS et DM ayant une maladie active remonte une fois la maladie contrôlée. Le taux de myostatine pourrait donc être utilisé comme un marqueur d'activité dans ces sous-groupes. Chez les MNAI cependant, il reste inchangé suggérant des mécanismes pathologiques sous-jacents différents pouvant expliquer la faible récupération de ces patients.

Je me suis ensuite intéressée à la physiopathologie des MNAI. Les patients présentent une atteinte musculaire proximale avec une infiltration fibro-adipeuse fréquente ainsi que la présence de fibres nécrotiques, des dépôts de protéines du complément, une infiltration macrophagique et la présence d'auto-anticorps.

J'ai dans un premier temps tenté de mettre au point des modèles cellulaires 2D et 3D *in vitro* de la maladie mais qui ne se sont pas révélés concluants. Je me suis alors tournée vers une analyse en transcriptomique spatiale des muscles de patients MNAI comparés aux sujets sains. Cette méthode permet d'avoir les transcrits de domaines tissulaires répartis sur l'ensemble de la coupe du tissu musculaire. Trois clusters majoritaires se détachent : 2 clusters immunitaires principalement macrophagiques accompagnés d'une signature interféron et de gènes de la voie du complément, l'un pro-inflammatoire et l'autre anti-inflammatoire et un cluster avec une signature de progéniteurs fibro-adipeux (FAP). Ces clusters expriment des gènes similaires à la signature transcriptomique des zones nécrotiques. Les FAPs sont plus nombreux chez les patients MNAI. Ils ont la capacité de se différencier en fibroblastes ou en adipocytes et pourraient alors être à l'origine de l'infiltrat fibro-adipeux des patients.

Mots-clés : myopathies inflammatoires idiopathiques, myopathies nécrosantes auto-immunes, biomarqueur, fibrose, inflammation