



HAL
open science

Etude préclinique évaluant l'utilisation de la fraction vasculaire stromale et les cellules souches dérivées de tissu adipeux dans le traitement des myosites.

Baptiste Pileyre

► To cite this version:

Baptiste Pileyre. Etude préclinique évaluant l'utilisation de la fraction vasculaire stromale et les cellules souches dérivées de tissu adipeux dans le traitement des myosites.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR054 . tel-04438428

HAL Id: tel-04438428

<https://theses.hal.science/tel-04438428v1>

Submitted on 5 Feb 2024

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.



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Etude préclinique évaluant l'utilisation de la fraction vasculaire stromale et les cellules souches dérivées de tissu adipeux dans le traitement des myosites.

Présentée et soutenue par

BAPTISTE PILEYRE

Thèse soutenue le 22/12/2023

devant le jury composé de :

M. JEREMY MAGALON	Maître de Conf Univ. - Prat Hospitalier - Aix-Marseille université	Rapporteur du jury
M. JEAN-THOMAS VILQUIN	Directeur de Recherche - SORBONNE UNIVERSITE	Rapporteur du jury
M. OLIVIER BENVENISTE	Professeur des Universités - SORBONNE UNIVERSITE	Membre du jury
M. JEREMIE MARTINET	Maître de Conf Univ - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Membre du jury Co-encadrant
MME MURIEL BARDOR	Professeur des Universités - Université de Rouen Normandie	Président du jury
MME ISABELLE DUBUS	Professeur des Universités - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **ISABELLE DUBUS** (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)

*Smile though your heart is aching
Smile even though it's breaking
When there are clouds in the sky, you'll get by
If you smile through your fear and sorrow
Smile and maybe tomorrow
You'll see the sun come shining through for you
Light up your face with gladness
Hide every trace of sadness
Although a tear may be ever so near
That's the time you must keep on trying
Smile, what's the use of crying?
You'll find that life is still worthwhile
If you just smile*

Nat King Cole – 1954 – Charlie Chaplin – 1936

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Muriel BARDOR, le Pr. Olivier BENVENISTE, le Dr. Jean-Thomas VILQUIN et le Dr. Jérémy MAGALON de prendre part à ce jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également le Pr. Olivier BOYER de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir eu l'idée de ce sujet de thèse.

Je remercie le Pr. Isabelle DUBUS et le Dr. Jérémie MARTINET d'avoir accepté d'encadrer ce travail.

Je remercie Chantal de m'avoir aidé de bien des manières sur le plan administratif de cette thèse et pour tout ce qu'elle fait pour les doctorants et étudiants du laboratoire.

Je remercie Sébastien, Sahil, Var, Aurélie, Marine, Marie-Laure, Manu et Maud pour toutes nos discussions et pour la passion qu'ils mettent dans leurs recherches.

Je remercie les équipes d'approvisionnement du CHU et spécialement Valérie pour sa motivation et l'envie qu'elle met dans son métier. Je remercie aussi l'équipes de la pharmacie du centre Henri Becquerel de m'avoir supporté cette dernière année de thèse.

Je remercie Catalina, Thara, Laetitia, Laurent, Christophe et Gaetan pour leur accueil dans l'équipe Muscle depuis le M2 et leur aide au quotidien, surtout depuis mon départ du laboratoire. Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans vous et ça a été un réel plaisir de travailler avec vous.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire pour leur bonne humeur et les moments passés ensemble : Léa, Laurine, Parvin, Henri, Allan, Mélanie, Sarah, Charlotte, Marion et les deux Marie. Un remerciement particulier à ma Poufsouffle, à Justine et au bureau des Toupoutous pour leur soutien lors des moments de craquages (un dernier Pineapple pour la route).

Je remercie enfin Julia, d'être là pour moi tous les jours et de m'avoir encouragé pour aller jusqu'au bout, malgré les difficultés que l'on rencontrait. Je ne peux pas rêver meilleure partenaire de vie. Je la remercie encore pour les deux bonheurs qu'elle m'a donnés, qui illuminent tous les jours ma vie.

Merci à vous tous.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
INTRODUCTION.....	11
I. Physiologie musculaire.....	12
1. Architecture tissulaire et moléculaire du muscle squelettique.....	12
2. Composition et différenciation cellulaire du muscle.....	15
3. Place de l'inflammation dans la régénération musculaire.....	18
i. Déclenchement de l'inflammation.....	18
ii. Rôle de l'immunité innée.....	20
iii. Rôle de l'immunité adaptative.....	23
II. Les myosites.....	26
1. Classifications et signes clinico-biologiques des myosites.....	26
2. Diagnostic et spécificités des sous-types de myosites.....	30
i. Dermatomyosites.....	30
ii. Polymyosites.....	32
iii. Myosites à inclusions.....	33
iv. Myosites nécrosantes auto-immunes.....	35
v. Myosites de chevauchement.....	37
3. Auto-anticorps dans les myosites.....	40
i. Classification des anticorps.....	40
ii. Détermination de la pathogénicité des anticorps.....	45
4. Modèles animaux.....	47
i. Modèles spontanés.....	47
ii. Modèle nutritionnel.....	48
iii. Les modèles infectieux.....	48
iv. Les modèles immunologiques.....	48
v. Les modèles transgéniques.....	50
vi. Souris NOD <i>IcosL</i> ^{-/-}	54
5. Mécanismes physiopathologiques.....	56
6. Prises en charge des myosites.....	62
III. Les thérapies cellulaires dérivées du tissu adipeux.....	66
1. Historique et développement des thérapies cellulaires dérivées du tissu adipeux.....	66
i. Tissu adipeux : physiologie et utilisations cliniques.....	66

ii.	Cellules souches adultes : de la moelle au tissu adipeux	69
iii.	Fraction vasculaire stromale : découverte et composition	72
2.	Mécanismes d'actions	75
i.	Effet immunomodulateur	76
ii.	Effet anti-fibrotique	78
iii.	Effet pro-angiogénique	79
iv.	Effet myorégénérateur	79
3.	Préparation, règlementation et applications cliniques	80
i.	Préparation de la FVS et des ADSC	80
ii.	Statut de médicament de thérapie innovante	84
iii.	Succès des thérapies cellulaires du tissu adipeux	87
iv.	Etudes cliniques des MSC dans le traitement des myosites	90
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	93
	ARTICLE 1.....	96
	<i>Icos</i> gene disruption in non-obese diabetic mice elicits myositis associated with anti-troponin T3 autoantibodies	
	ARTICLE 2.....	108
	Preclinical efficacy of adipose derived stem cell therapies in the treatment of myositis.	
	ARTICLE 3.....	125
	Correlation of <i>in vitro</i> potency assays to define predictive markers to Adipose-derived cell therapies efficacy.	
	DISCUSSION.....	141
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	149
	BIBLIOGRAPHIE.....	152
	ANNEXES	187
	Annexe 1 : revue de la littérature : Stromal vascular fraction in the treatment of myositis.....	188
	Annexe 2 : Liste des communications	199
	Annexe 3 : Liste des enseignements	199

ABREVIATIONS

A

aAc : auto-Anticorps

AD-MVF : *Adipose-derived microvascular fraction*

AMM : Autorisation de mise sur le marché

B

BAFF : *B cell Activating Factor* : facteur d'activation des lymphocytes B

BM : *Bone marrow* : Moelle osseuse

BPF : Bonnes pratique de fabrication

C

CAT : *Committee for advanced therapies* : comité des thérapies innovantes

C5b-9 : Complexe d'attaque membranaire

CD : *Cluster Differentiation*

CFU : *Colony Forming Unit* : test de formation de colonies

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CpG : Complexe IgG-Chromatine

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPK : Créatine Phosphokinase

D

DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern* : Séquence moléculaire associée aux dommages

DM : Dermatomyosite

E

EAM : *Experimental autoimmune myositis* : myosite expérimentale auto-immune

EMG : Electromyogramme

EPC : *Endothelial progenitor cell* : Cellule progénitrice endothéliale

F

FAP : *Fibro-Adipogenic Progenitor* : progéniteurs fibroadipogéniques

FGF : *Fibroblast Growth Factor* : facteur de croissance fibroblastique

FVS : Fraction vasculaire stromale

G

GVHD : *Graft Versus Host Disease* : maladie du greffon contre l'hôte

H

HLA : *Human leukocyte antigen*

HGF : *hepatocyte Growth Factor* : facteur de croissance des hépatocytes

HSC : *Hematopoietic stem cell* : Cellule souche hématopoïétique

I

IBM : *Inclusion Body Myositis* : Myosite à inclusions

ICOS/ICOSL : *Inducible Co-Stimulator / Ligand* : Co-stimulateur inducible et son ligand

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFATS : *international federation for adipose therapeutics and science*

IFN : Interféron

IGF : *Insulin-like Growth Factor* : facteur de croissance de l'insuline

IL : Interleukine

IM : Intra-Musculaire

IMNM : *Immune-Mediated Necrotizing Myositis* : Myosite nécrosante auto-immune

iNOS : *Inducible Nitric Oxyde Synthase* : Synthétase d'oxyde nitrique inducible

IRF : *Interferon regulatory factor*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISCT : *International society for cell and gene therapy*

IVIg : Immunoglobulines G Intraveineuses

L

LTB4 : leucotriène B4

M

MAA : *Myositis Associated Antibody* : Anticorps associé aux myosites

MEC : Matrice extracellulaire

MIF : *Migration Inhibitor Factor* : facteur d'inhibition de la migration des macrophages

MPO : myéloperoxydase

MSA : *Myositis-Specific Antibody* : Anticorps spécifique des myosites

MSC : *Mesenchymal stem cell* : Cellule souche mésenchymateuse

MTI : Médicament de thérapie innovante

MTI-PP : Médicament de thérapie innovante à préparation ponctuelle

Myf5 : facteur myogénique 5

MYH : *Myosin Heavy Chain* : chaîne lourde de myosine

MyoD : *myoblastic determination factor* : facteur de détermination myoblastique

MyoG : myogénine

N

NET : *Neutrophil Extracellular Trap* : piège extracellulaire des neutrophiles

NK : *Natural Killer*

NOD : *Non Obese Diabetes* : souris diabétique non obèse

O

OM : *Overlap Myositis* : Myosite de chevauchement

P

PAMP : *pathogen- Associated Molecular Pattern* : Séquence moléculaire associée aux pathogènes

Pax : *Paired Box*

PGE2 : Prostaglandine E2

PID : Pneumopathie Interstitielle Diffuse

PM : Polymyosite

PTC : Produit de thérapie cellulaire

R

ROS : *Reactive Oxygen Species* : radicaux libres de l'oxygène

S

SAS : Syndrome des Anti-Synthétase

SC : sous-cutanée

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TGF : *Transforming Growth Factor* : Facteur de croissance transformant

TLR : *Toll Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNN : troponine

Treg : Lymphocyte T régulateur

U

UC : *Umbilical cord* : cordon ombilical

V

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Architecture du muscle squelettique

Figure 2 : Formation du complexe Actine-Myosine

Figure 3 : La régénération musculaire

Figure 4 : Voies de signalisation des TLR

Figure 5 : cinétiques des médiateurs et cellules immunitaires lors d'une lésion musculaire

Figure 6 : Classification des myosites et association auto-anticorps/atteintes extramusculaires

Figure 7 : Signes histologiques des dermatomyosites

Figure 8 : Signes histologiques des polymyosites

Figure 9 : Signes histologiques des myosites à inclusions

Figure 10 : Signes histologiques des myosites nécrosantes auto-immunes

Figure 11 : Signes histologiques des myosites de chevauchements

Figure 12 : Frise chronologique de la découverte des principaux auto-anticorps des myosites

Figure 13 : Evaluation clinique de l'atteinte musculaire chez la souris NOD *Icos*^{-/-}

Figure 14 : Mécanismes pathologiques des myosites

Figure 15 : Composition d'un lobule de tissu adipeux

Figure 16 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

Figure 17 : Mécanismes d'action de la FVS et des ADSC

Figure 18 : Répartition des essais cliniques évaluant la FVS par indication

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : caractéristiques des différents types de fibres musculaires humaines

Tableau 2 : Caractéristiques des cellules de la lignée musculaire squelettique

Tableau 3 : Historique de la classification des myopathies inflammatoires idiopathiques

Tableau 4 : Anticorps de myosites

Tableau 5 : Modèles animaux de myopathies inflammatoires idiopathiques

Tableau 6 : Prise en charge des myosites

Tableau 7 : Proportion et marqueurs d'identification des principales populations cellulaires de la FVS

Tableau 8 : Liste des modifications non substantielles

Tableau 9 : Comparaison des produits thérapeutiques issus du tissu adipeux

Tableau 10 : Résumé des séries de cas de patients atteints de myosites traités par MSC

INTRODUCTION

I. Physiologie musculaire

Le système musculaire représente en moyenne 43% de la masse du corps humain. Il se divise en trois types de muscle :

- Le muscle cardiaque, ou myocarde, est un muscle dits « autonome » par la présence de cellules cardionectrices responsables de la contraction, autonome du système nerveux, des cardiomyocytes.
- Les muscles lisses sont des muscles dits « involontaires », se contractant de manière inconsciente, et sont présents dans la paroi des organes et des différentes structures de circulations (sanguines, respiratoires, digestives, urinaires).
- Les muscles squelettiques sont eux des muscles dits « volontaires » permettant, par leur attachement aux os par des tendons, les mouvements conscients de locomotion mais aussi de maintien de la posture.

1. Architecture tissulaire et moléculaire du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué de tissu musculaire mais aussi conjonctifs, vasculaire et nerveux. L'ensemble du muscle est entouré par un tissu conjonctif appelé Epimysium, qui est en continuité des tendons aux extrémités du muscle, permettant sont ancrages au niveau des os. Pénétrant le muscle à partir de cette gaine, un second niveau de tissu conjonctif, le Pérимysium, sépare le muscle en plusieurs Fascicules. Au sein de chaque fascicule, un troisième niveau de tissu conjonctif, l'endomysium, entoure les fibres musculaires, plus petite unité cellulaire du muscle (Figure 1).

Les fibres musculaires, de forme polygonale d'une longueur allant de 1 à 5 cm et d'un diamètre de 10 à 100 μm , peuvent contenir entre 40 et 500 noyaux se situant en périphérie de la fibre contre le sarcolemme, membrane cellulaire constituée d'une membrane plasmique et d'une lame basale. Le cytoplasme représente une proportion importante de la cellule, et près de 80% de son volume est constitué de myofibrilles, structures permettant la contraction des fibres musculaires.

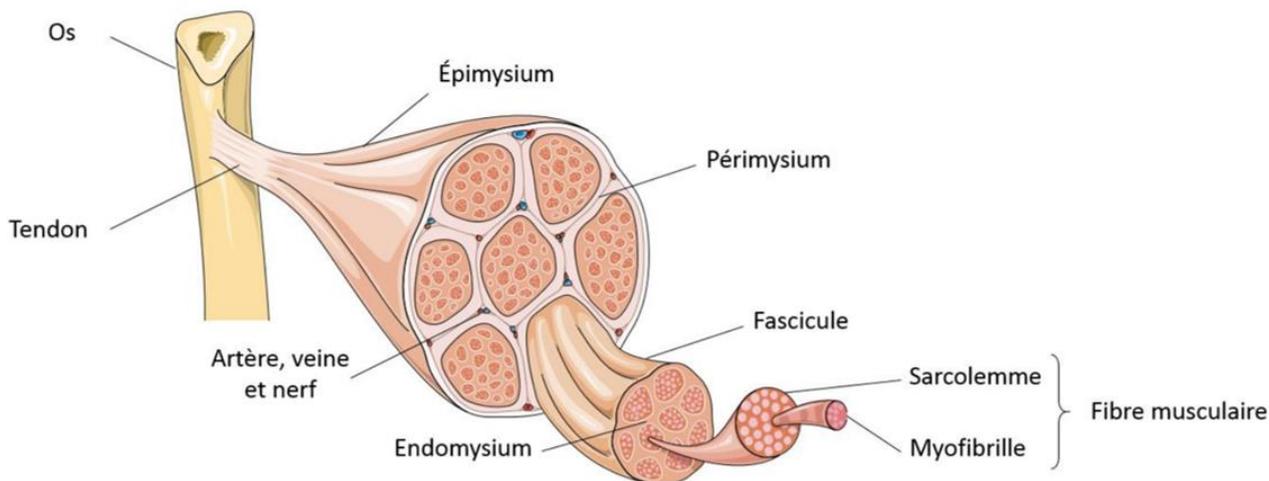


Figure 1 : Architecture du muscle squelettique : *La fibre musculaire, plus petite unité cellulaire du muscle, est entourée par l'endomysium, et forme en combinaison avec d'autres fibres un fascicule, lui-même entouré par le périmysium. L'ensemble des fascicules forme le muscle, lui-même entouré par l'Épimysium.*

Ces myofibrilles contiennent plusieurs sarcomères eux-mêmes composés de milliers de filaments fins, constitués principalement d'actine et de tropomyosine, et de filaments épais, constitués principalement de myosine. La contraction musculaire repose sur la formation de complexes actine-myosine, dépendant de l'inhibition de la tropomyosine par la troponine (TNN) lors d'un afflux de calcium et de l'activité ATPasique de la myosine. En effet, lors d'une contraction musculaire un influx nerveux va se propager dans le muscle à partir des plaques motrices. Cet influx va conduire à l'ouverture des canaux Calcium voltage-dépendant et à la libération du Calcium dans le cytosol. Ce dernier va se fixer sur la TNNC qui va bloquer l'action inhibitrice de la TNNI. Cette dernière, suite à la fixation de Calcium sur la TNNC, va changer de conformation, déplaçant la tropomyosine par l'intermédiaire de la TNNI et libérant le site de fixation de la myosine sur l'actine (Figure 2). Ce site va rester libre le temps de la contraction musculaire, soit plusieurs cycles de fixation-dissociation actine-myosine. Il se bloquera à nouveau après élimination du Calcium par des pompes Calcium-ATPase, permettant le retour du muscle à un état de repos.

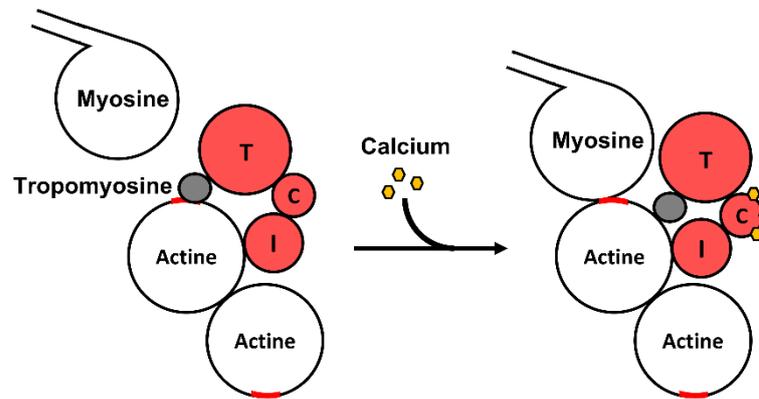


Figure 2 : Formation du complexe Actine-Myosine : *En absence de Calcium, le site de liaison de la myosine sur l'actine est masqué par la tropomyosine. L'afflux de Calcium modifie les interactions entre les sous-unités de la Troponine, déplaçant la Tropomyosine et permettant la formation du complexe et ainsi la contraction musculaire.*

La périphérie du cytoplasme, à proximité des noyaux, contient des vacuoles lipidiques, servant de réserves énergétiques à la cellule, et de la myoglobine, augmentant l'oxygénation cellulaire. Les cellules musculaires contiennent aussi de nombreuses mitochondries, élément indispensable à l'importante production d'énergie nécessaire à ces cellules. La densité de ces différents organites dans les cellules musculaires va déterminer leurs capacités oxydatives. Cela permet notamment de différencier les fibres de type I, dites « lentes » ou « rouges » (concentration élevée de myoglobine), ayant une forte capacité oxydative, et les fibres de type II, dites « rapides » ou « blanche » (concentration faible de myoglobine) ayant une faible capacité oxydative mais une importante capacité glycolytique. Le type de fibre est aussi défini par les isotypes de certaines protéines musculaires, tel que la myosine ou les troponines ^{1,2} (Tableau 1).

Les fibres de types 1 sont de petites tailles et très vascularisées. Elles présentent une forte capacité oxydative, avec une expression importante des protéines de la chaîne mitochondriale, leur permettant un effort continu et une résistance importante à la fatigue. Les myofibrilles expriment plus fortement les gènes de la myosine et des troponines dites lentes (*MYH (Myosin Heavy Chain) 7*, *TNNT1*, *TNNC1* et *TNNI1*), générant un mouvement lent et de maintien de la posture.

Les fibres de types II sont de plus grandes tailles et se divisent en type 2A, 2B (absentes chez l'Homme) et 2X, définies par l'expression respective des gènes *MYH2*, *MYH4* et *MYH1*. Les fibres 2A sont des fibres rapides mais résistantes à la fatigue, associant un métabolisme glycolytique et oxydatif. Les fibres 2B et 2X sont considérées comme ultra-

rapides et reposent principalement sur un métabolisme glycolytique. Les fibres 2A et 2X expriment de manière similaire les gènes des troponines dites rapides (*TNNT3*, *TNNC2* et *TNNI2*).

	Type 1	Type 2A	Type 2X
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Fatigabilité	Faible	Moyenne	Elevée
Métabolisme	Oxydatif	Oxydatif/ Glycolytique	Glycolytique
Myosine	MYH7	MYH2	MYH1
Troponines	TNNT1 TNNI1 TNNC1	TNNT3 TNNI2 TNNC2	TNNT3 TNNI2 TNNC2

Tableau 1 : caractéristiques des différents types de fibres musculaires humaines.

Enfin il existe des fibres intermédiaires, contenant plusieurs isoforme de MYH en même temps, tel que les fibres 1-2A (MYH7 + MYH2) ou les fibres 2A-2X (MYH2 + MYH1).

La proportion de ces différents types de fibres musculaires varie selon le muscle, mais aussi l'âge ou la physiologie du patient³. Si l'âge, entraînant une diminution de l'activité physique, conduit à une diminution des fibres de types 2 (A et X) contre un maintien des fibres de type 1, l'immobilisation prolongée conduit à une diminution plus importante des fibres de type 1, démontrant leur importance dans le maintien de la posture. L'obésité et le diabète de type 2, souvent associés à une diminution d'activité physique, induisent une diminution des fibres de type 1, par modification du métabolisme oxydatif au profit du métabolisme glycolytique.

2. Composition et différenciation cellulaire du muscle

Les fibres musculaires, unités fonctionnelles du muscle, dérivent toutes de cellules souches musculaires grâce au processus de myogénèse. Ce processus biologique correspond à un enchaînement de phase de prolifération et de différenciation pour aboutir, par fusion de plusieurs cellules, à la formation d'une fibre musculaire⁴. Il a lieu lors du développement

foetal ainsi qu'au cours de la croissance, mais aussi lors de lésion musculaire : on parle alors de régénération musculaire.

Ce processus débute par l'activation et la prolifération de cellules souches musculaires. Elles vont représenter près de 30% du muscle chez les sujets jeunes, avant de progressivement se réduire à 10% à l'âge adulte. Elles se répartissent le long des fibres musculaires en se logeant entre la lame basale et le sarcolemme, d'où leur nom de cellules satellites⁵. Cette position leur permet d'intervenir rapidement lors d'une lésion musculaire afin de renouveler les fibres musculaires.

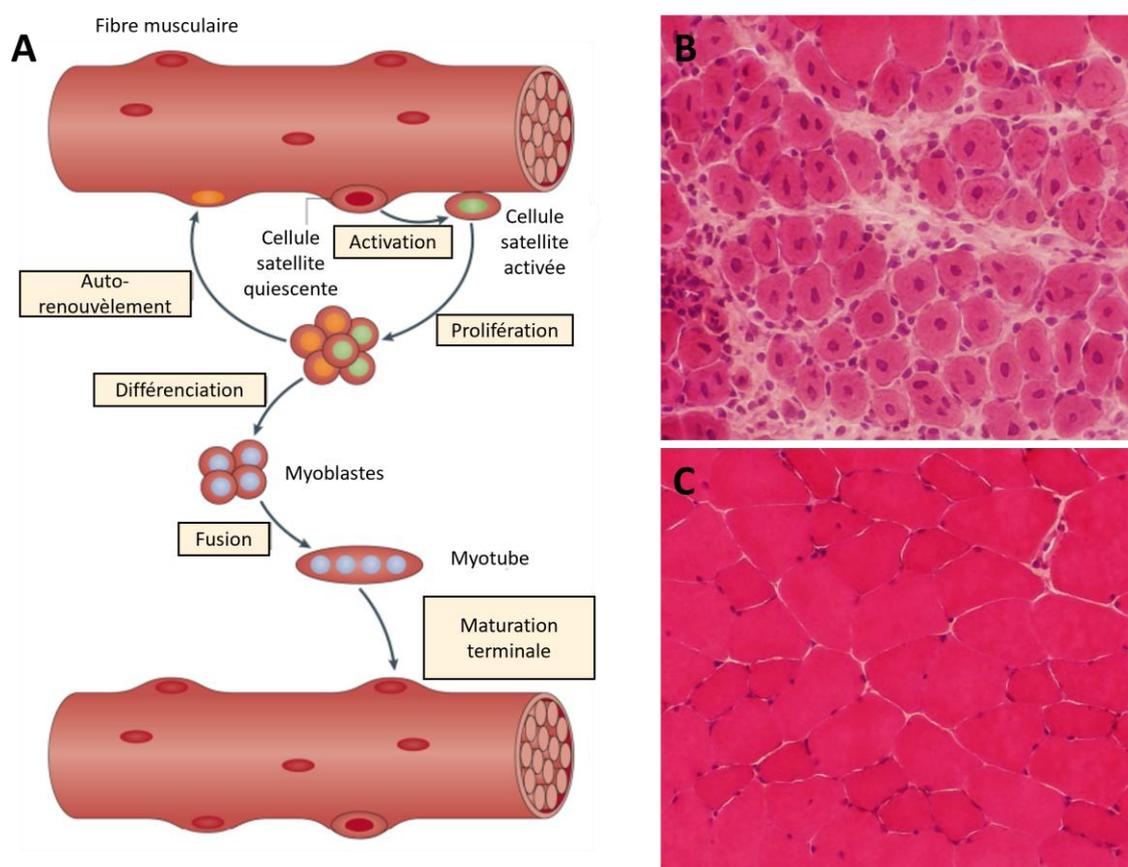


Figure 3 : La régénération musculaire : (A) les cellules satellites quiescentes en bordure des fibres musculaires vont s'activer et proliférer, avant de se différencier en myoblastes. Ces derniers vont poursuivre la prolifération et la différenciation en myocytes, qui vont fusionner sous la forme de myotubes. Ces derniers vont continuer leur maturation et s'organiser en fibre musculaire, unité fonctionnelle du muscle (adapté d'après Tidball et al 2017). Lors de la maturation terminale, (B) les noyaux centraux des myotubes vont se déplacer (C) en périphérie de la fibre musculaire et se loger contre la lame basale.

La régénération débute par l'activation des cellules satellites, jusqu'alors quiescente, qui vont commencer par proliférer. Une partie des cellules filles va revenir à un état quiescent permettant leur auto-renouvellement. L'autre partie va continuer à proliférer et progressivement se différencier en myoblastes puis en myocytes qui vont fusionner sous la forme de myotubes plurinucléés avant de s'organiser en myofibre mature⁶. Cette maturation coïncide avec le déplacement des noyaux du centre vers la périphérie de la fibre, signe de la régénération complète de celle-ci (Figure 3).

Ce processus peut être suivi au niveau moléculaire. Les cellules satellites quiescentes, exprimant *Pax7*, vont s'activer et commencer leur transformation en myoblastes par l'expression du facteur de détermination myoblastique (*MyoD*) et du facteur myogénique 5 (*Myf5*). Les myoblastes vont proliférer sous l'effet du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) qui va induire la prolifération de ces cellules, tout en inhibant leur différenciation. D'autres facteurs de croissance, tel que HGH (*Hepatocyte Growth Factor*) et l'IGF (*Insulin-like Growth Factor*) vont aussi participer à l'activation des cellules souches et à la prolifération des myoblastes. Sous l'influence de *MyoD*, les myoblastes vont progressivement se différencier en Myocytes, exprimant *MyoD*, la myogénine (*Myog*) et le facteur de régulation musculaire, qui vont fusionner en Myotubes à plusieurs noyaux.

Les myocytes vont fusionner en myotubes et murer jusqu'à devenir des fibres musculaires, se caractérisant par la perte d'expression de *MyoD* et la production de myosine, tout d'abord fœtale à partir du gène *MYH3*, puis périnatal à partir de *MYH8*. On observe toujours à l'âge adulte une expression transitoire de *MYH3* lors de synthèse de nouvelle fibre au cours de la régénération musculaire. *MYH7* va lui être exprimé par toutes les fibres dans un premier temps, puis être maintenu uniquement dans les fibres de type 1. Sa perte d'expression va coïncider avec l'apparition de transcrite de *MYH2* pour les fibres 2A et de *MYH1* pour les fibres 2X.

Ces facteurs, outre leur rôle essentiel dans le développement cellulaire et tissulaire, sont utilisés dans la caractérisation des cellules lors du développement mais aussi à l'âge adulte (Tableau 2).

Cellules	Cellules satellites	Myoblaste	Myocyte	Myotube ou fibre musculaire
Type	Multipotent	Multipotent	Différencié	Différencié
Facteur de Transcription	<i>Pax7</i>	<i>Pax7</i> <i>MyoD</i> <i>Myf5</i>	<i>MyoD</i> <i>MyoG</i> <i>Myf4</i>	<i>MYH3</i> <i>MYH8</i> <i>MYH7</i> <i>MYH1/2</i>
Facteur de croissance	FGF HGH IGF	FGF HGH IGF	FGF HGH IGF	FGF HGH IGF

Tableau 2 : Caractéristiques des cellules de la lignée musculaire squelettique : *FGF* : fibroblast Growth Factor ; *Pax* : paired box ; *HGF* : Hepatocyte Growth Factor ; *IGF* : Insulin-like Growth Factor ; *MyoD* : Myoblastic determination factor ; *Myf* : myogenic factor ; *MyoG* : myogenin, *MYH* : Myosin Heavy Chain.

3. Place de l'inflammation dans la régénération musculaire

i. Déclenchement de l'inflammation

La régénération musculaire après une lésion est un processus impliquant à la fois les cellules musculaires, comme vu précédemment, et les cellules immunitaires, dans le but de restaurer un muscle fonctionnel. Elle débute par une phase pro-inflammatoire avec une activation et une prolifération des cellules satellites, suivie par une diminution progressive de l'inflammation avec libération de cytokines anti-inflammatoire stimulant la différenciation des cellules musculaires et le remodelage tissulaire⁷. Les cellules satellites, exprimant *Pax7*, vont progressivement se différencier en myoblaste, myocytes puis myotubes, exprimant successivement les différents facteurs de transcription présentés dans le tableau 2. Mais contrairement à la myogenèse, cette différenciation ne va pas dépendre uniquement de la libération de facteur de croissance, mais aussi de celle de cytokines dans un ordre chronologique nécessaire à la régénération tissulaire complète.

La phase pro-inflammatoire débute par la libération, par les cellules musculaires endommagées, de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern*). Il s'agit de molécules exerçant différentes missions dans les cellules (protéines du choc thermique, des protéines associées à la chromatine (HMGB1), des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, acide hyaluronique, héparane sulfate),...) mais dont la libération dans le milieu extracellulaire va conduire à la stimulation des *Toll Like Receptor* (TLR)⁸. Les TLR font partis de la famille des récepteurs à reconnaissance de motif qui peuvent être stimulés par des motifs moléculaire associés aux pathogènes (PAMPs) ou par les DAMPs. 9 TLR différents ont été découverts chez l'Homme⁹. Les TLR1/2, 2/6, 4, 5 et 11 sont présents à la surface des cellules, tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 sont intracellulaires, dans des endosomes. Ces localisations vont conditionner le type de DAMPs les stimulants : les TLR2 et 4 vont être activés par des protéines et peptides (HMGB1, fibronectin, fibrinogène, HSP,...), par des lipoprotéines (Amyloïde A, acides gras saturés,...) ou encore des composants de la matrice ; les TLR3 par des ARN messagers ; les TLR7 et 8 par de petits ARN nucléaires et le TLR9 par des complexes IgG-chromatine (CpG)¹⁰.

La stimulation de la plupart des TLRs active la voie de signalisation canonique du NFκB, via l'activation de MyD88, conduisant à la libération de différentes cytokines proinflammatoires tel que le facteur de nécrose tumoral (TNF = *Tumor necrosis factor*) α et l'interleukine (IL) 1β, de chemokines et d'interféron (IFN) de type 2 (IFNγ) (Figure 4). Certains (TLR7, 8 et 9) vont en plus induire une réponse IFN de type I (IFNα/β), que l'on observe notamment dans la réponse antivirale, via la stimulation du facteur 7 de régulation de l'IFN (IRF7 = *Interferon regulatory factor 7*). Enfin, les TLR3 et 4 vont aussi induire une réponse IFN type I, via TIRF et IRF3, mais aussi activer une voie alterne du NFκB, indépendante de MyD88. Lors d'une lésion musculaire, le TLR4 va être stimulé par le complexe HMGB1-CXCL12, déclenchant la réponse inflammatoire avec le recrutement des cellules de l'immunité innée¹¹.

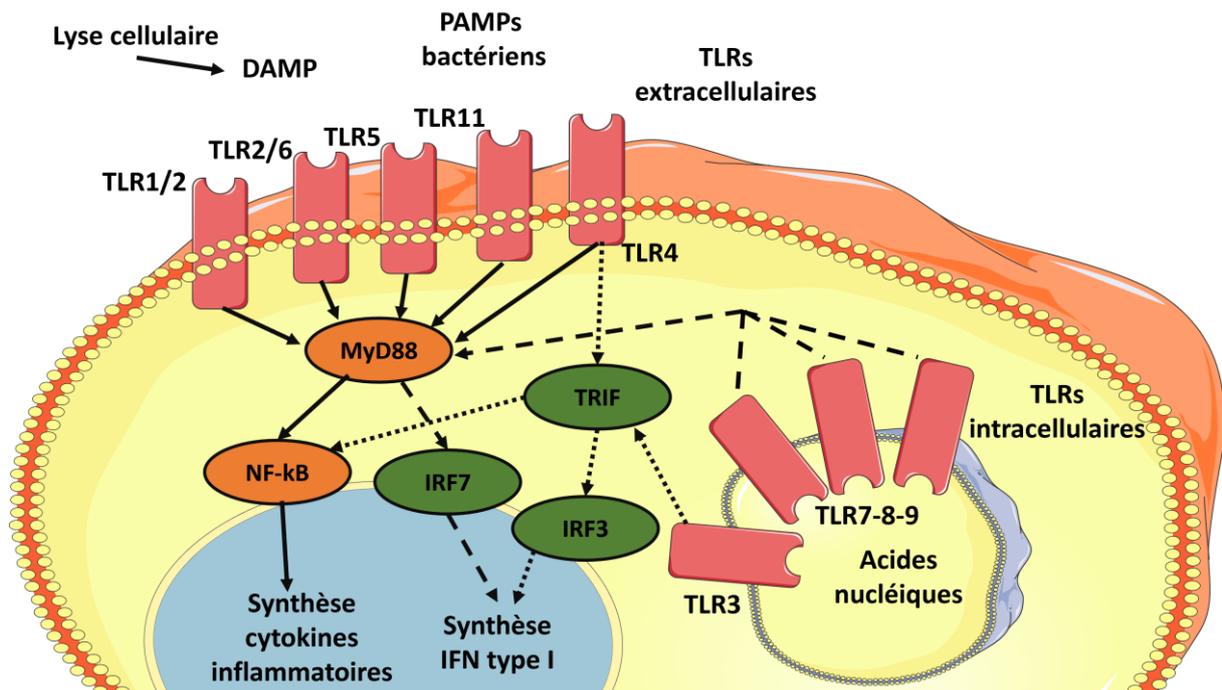


Figure 4 : Voies de signalisation des TLR : les DAMPs et les PAMPs activent, selon leur nature, différents TLR, conduisant à la synthèse de cytokines inflammatoires via la voie classique (MyD88) ou alterne (TRIF) du NFκB, et à une réponse IFN type I via IRF7 ou IRF3.

ii. Rôle de l'immunité innée

Le TNF α et l'IL-1 β sécrétés lors de la stimulation des TLR vont conduire au relargage par les cellules endothéliales des vaisseaux avoisinants d'IL-6 et d'IL-8, connues pour stimuler la synthèse et le recrutement des neutrophiles depuis la moelle osseuse¹². Ces dernières sont les premières cellules immunitaires recrutées au niveau de la lésion, visibles à partir de deux heures après la blessure¹³. Elles vont jouer un double rôle. Tout d'abord, elles vont débiter le « nettoyage » de la zone endommagée du muscle grâce à leurs capacités de phagocytose mais aussi par la production de myéloperoxydase (MPO) et de radicaux libres de l'oxygène (ROS = *Reactive Oxygen Species*). Ces molécules vont induire des dommages cellulaires longtemps considérés comme délétères pour les tissus lésés, mais dont l'importance dans la régénération musculaire a été démontrée dans de récentes études¹⁴. En effet, les neutrophiles semblent pouvoir stimuler la prolifération et la différenciation des cellules satellites, notamment par la libération de leucotriène B4 (LTB4)¹⁵, mais aussi influencer

sur l'action des macrophages de manière directe, via la libération de cytokines, ou indirecte, par exemple par l'oxydation des lipoprotéines de faible densité par la MPO¹⁶. Le deuxième rôle des neutrophiles est d'amplifier la réponse immunitaire, notamment le recrutement de macrophages, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α . Il semble alors y avoir une boucle d'amplification, les macrophages sécrétant un certain nombre de chimiokines participant au recrutement des neutrophiles depuis la moelle osseuse. Les neutrophiles vont aussi participer au recrutement d'éosinophiles, par la libération d'IL-5 et de LTB₄, ainsi qu'à leur propre recrutement, par celle d'IL-8^{17,18}. De manière surprenante, les neutrophiles, dans un second temps, vont également participer à la transition des macrophages pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire, en libérant lors de leur apoptose des cytokines anti-inflammatoires tel que le facteur de croissance transformant (TGF= *Transforming growth factor*) β et de l'IL-10¹⁴. Ce switch des macrophages est à l'origine de la diminution de la toxicité des neutrophiles lors de la phase anti-inflammatoire, par liaison entre le cluster de différenciation (CD) 206, l'un des principaux marqueurs des macrophages anti-inflammatoire, et la MPO, conduisant à son internalisation et ainsi à sa neutralisation¹⁹.

Les mastocytes sont détectables autour du site lésionnel huit heures après la blessure¹³. Ils vont aussi s'accumuler fortement aux alentours des vaisseaux sanguins proches de la lésion et vont être responsable du recrutement d'autres cellules immunitaires. Leur dégranulation va libérer de l'histamine, augmentant la perméabilité vasculaire, ainsi que des cytokines, notamment du TNF α ²⁰. Ensemble, ces molécules vont contribuer au recrutement rapide des cellules immunitaires, en augmentant la diapédèse. Ces cellules font parties intégrantes des mécanismes pathogéniques de certaines maladies inflammatoires chroniques, comme le démontre la diminution des infiltrats leucocytaires tissulaires ainsi que de l'incidence de ces maladies dans des modèles murins déficients en mastocytes²¹.

Au bout de 24 heures, la propagation du signal pro-inflammatoire dans le sang va permettre le recrutement de macrophages à partir des monocytes circulants. Comme les neutrophiles, ils vont grandement participer au nettoyage de la zone endommagées par la production de ROS, notamment avec l'expression augmentée de la synthèse d'oxyde nitrique inductible (iNOS : *Inducible Nitric Oxide Synthase*), mais aussi par l'élimination des débris et des cellules nécrotiques grâce à la phagocytose. La phagocytose va être réalisée à

la fois par des phagocytes dits « professionnels » (Macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques) et « non professionnels » (cellules épithéliales et endothéliales, fibroblastes, progéniteurs fibroadipogéniques (FAP = *Fibro-adipogenic progenitor*). Leur action va être dirigée, en plus des DAMPs libérés par les cellules nécrotiques et lésées, par deux types de signaux émis par les cellules apoptotiques : le signal « trouvez-moi », porté par différentes molécules solubles chémoattractantes, tel que l'ATP, la lysophosphatidylcholine ou CX3CL1, et par le signal « mangez-moi » présent à la surface des cellules apoptotiques, tel que la phosphatidylsérine²². Ce second signal va conduire à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires aboutissant au réarrangement du cytosquelette permettant l'endocytose de la cellule apoptotique. Le contact et l'endocytose de cellules apoptotiques par les macrophages va de manière paradoxale conduire à la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10 et le TGFβ²³. Cette sécrétion n'est pas observée lors de contact ou de l'endocytose de cellules nécrotiques et correspond donc à un mécanisme de régulation de l'inflammation, la limitant au site lésé. De récentes études ont par ailleurs montrées qu'en plus de la phagocytose, l'efferocytose de cellules musculaires apoptotiques pourrait être à l'origine du switch des macrophages pro-inflammatoires vers anti-inflammatoires²⁴. Ces études ont montré que différentes voies de signalisation seraient impliquées, aboutissant à l'activation de facteurs nucléaires et à la synthèse d'effecteurs anti-inflammatoires tel que le TGFβ et la prostaglandine E2 (PGE2). La voie de l'AMPK par exemple, activée par les Résolvines D1 et 2, l'Annexine A1 ou encore les glucocorticoïdes, serait l'une d'entre elles.

Neutrophiles et macrophages agissent donc de concert, à la fois à travers la libération de cytokines pro-inflammatoires, principalement TNFα, IL-6 et IL-1β, qui augmentent la production de substances cytotoxiques mais aussi le recrutement de cellules immunitaires innées et adaptatives, notamment les lymphocytes T, mais aussi de cytokines anti-inflammatoires, déclenchant la phase résolutive de la régénération. D'autres cellules de l'immunité innée, comme les éosinophiles, participent aussi à celle-ci. Comme les macrophages et les neutrophiles, les éosinophiles vont jouer un double rôle dans le temps. Ils vont être au départ pro-inflammatoire avec la libération de nombreux facteurs recruteurs et activateurs des leucocytes mais aussi de nombreux DAMPs notamment au travers d'une forme de dégranulation cytolytique proche de celle des neutrophiles appelé *EETosis*,

conduisant à la formation d'un réseau extracellulaire de ces messagers²⁵. Ils vont ensuite occuper une place centrale dans la régénération, par la libération d'IL-4, qui va aller stimuler les FAP, conduisant à leur prolifération et à leur transformation en fibroblaste. Ces cellules participant à la fois au nettoyage des débris par phagocytoses mais aussi à l'augmentation de la prolifération des progéniteurs musculaires et de leur différenciation et fusion en myotubes par la libération d'IL-6, d'IGF et de facteurs de la famille Wnt^{11,26}. La stimulation des FAP par l'IL-4 va aussi revenir leur différenciation en adipocytes et ainsi la dégénération adipocytaire du muscle que l'on observe dans certaines maladies chroniques du muscle.

Outre les FAP et les cellules satellites, d'autres cellules musculaires vont intervenir rapidement dans la régénération musculaire : les péricytes. Ces cellules vont participer à la prolifération et différenciation des myoblastes, mais aussi à la ré-innervation et à la revascularisation du tissu, par la libération d'un certain nombre de facteurs de croissance, notamment le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF = *Vascular endothelial growth factor*), le TGF β et le bFGF^{27,28}. Certaines études semblent aussi indiquer une transition de certains types de péricytes vers un type cellulaire proche des cellules satellites, avec expression de marqueurs spécifiques tel que la Nestine ou Pax7. Ce type de transition serait d'ailleurs être bidirectionnelle, permettant à certains myoblastes de se transformer en péricytes, et découlerait de l'existence d'un progéniteur commun aux deux populations²⁹.

iii. Rôle de l'immunité adaptative

Une fois l'inflammation déclenchée et les acteurs innés activés, le système immunitaire adaptatif va lui aussi entrer en action, par l'activation et le recrutement des lymphocytes T. Outre les lymphocytes T résidents, les lymphocytes circulants apparaissent environ trois jours après la lésion et sont généralement détectables jusqu'à dix jours lors d'une régénération normale³⁰. L'importance de ces cellules a été démontrée à travers de nombreuses expériences de déplétion puis de sauvetage par les cellules déplétées^{31,32}.

Les lymphocytes T CD8⁺ vont être les premiers lymphocytes à migrer après la lésion. Ces cellules, notamment celles résidentes du muscle, vont participer à l'initiation et à l'amplification du recrutement des monocytes circulants en stimulant la libération de CCL2

par les macrophages résidents du muscle^{6,31}. Ces monocytes vont ensuite se différencier en macrophages pro-inflammatoires et participer au nettoyage du site lésionnel.

Les lymphocytes T CD4⁺ vont eux arriver un peu plus tardivement que les CD8⁺. En combinaison avec ces derniers, ils vont participer à la régénération musculaire par la libération de plusieurs cytokines (IL1 α , TNF α , IFN γ , IL-13) qui vont promouvoir l'activation et la migration des cellules satellites, tout en conservant leur multipotence³³.

Etonnamment, la libération de CCL2 décrite plus haut va aussi conduire au recrutement et à l'activation des lymphocytes T régulateurs (Treg), qui expriment le CCR2, récepteur du CCL2, à leur surface. Cette expression semble être encore plus forte à la surface des lymphocytes Treg musculaires, cellules caractérisées notamment par la capacité de synthèse d'amphiréguline, que des Treg spléniques. L'amphiréguline est connue pour posséder des capacités myogéniques importantes, stimulant à la fois la prolifération des cellules satellites et la différenciation des myoblastes³³. Les Treg musculaires vont aussi s'accumuler dans le muscle lésé par la libération d'IL-33 par les FAP et les péricytes notamment. Contrairement au CCL2, cette cytokine ne semble pas agir sur le recrutement de ces cellules mais sur leur prolifération et leur maintien dans le muscle. L'accumulation de Treg dans le muscle coïncide avec celle de la transition vers un environnement anti-inflammatoire du muscle, qui est à son pic 4 jours après la lésion⁶. Ils vont être à l'origine d'une réaction en cascade, mettant en action leur pouvoir immunosuppresseur mais aussi la capacité à induire des propriétés immunosuppressives chez d'autres populations immunitaires, notamment de l'immunité innée. Les Treg vont ainsi déclencher la transition des macrophages et neutrophiles vers des phénotypes anti-inflammatoires et stimuler la sécrétion par ces cellules de cytokines tels que l'IL-10, responsable de la transition des macrophages, l'IL4 et le TGF β , stimulant la prolifération des FAP et leur différenciation en fibroblastes par échappement à l'apoptose induite par le TNF α , ou encore l'Indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) responsable de l'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T³⁴. Les Treg vont aussi participer à la transition des macrophages par le déclenchement de l'apoptose de certaines cellules immunitaires, tel que les lymphocytes T, via la libération de granzyme et perforine, ou les neutrophiles, par interaction CD11b-ICAM1^{35,36}. Or comme décrit plus haut, l'apoptose des cellules immunitaires conduit à la

libération de cytokines anti-inflammatoires mais aussi, par phagocytose de ces cellules, à la transition des macrophages.

La place de l'inflammation dans la régénération musculaire est de mieux en mieux définie, et les études démontrent la nécessité de tous les acteurs, à la fois cellulaire et moléculaire, pour que celle-ci soit complète. En effet, ces acteurs agissent dans un ordre spécifique, dont la moindre étape défectueuse peut-être à l'origine d'un blocage des étapes suivantes. Cette chronologie peut être schématisée en observant la cinétique d'apparition et de disparition de ces acteurs lors d'une lésion musculaire (Figure 5) : le TNF α est le premier libéré après une lésion et déclenche le recrutement des premières cellules immunitaires, les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires. Ces derniers sont à l'origine de l'augmentation de iNOS, puis sous l'influence des lymphocytes T CD8 $^+$ de celle du CCL2. Celui-ci va dans un premier temps amplifier la réponse pro-inflammatoire, avant d'accumuler un nombre suffisant de lymphocytes Treg pour induire la transition des macrophages pro- vers anti-inflammatoire. L'augmentation de l'IL-10 et de l'IGF1 sont le signe de cette transition vers un environnement anti-inflammatoire et pro-myogénique.

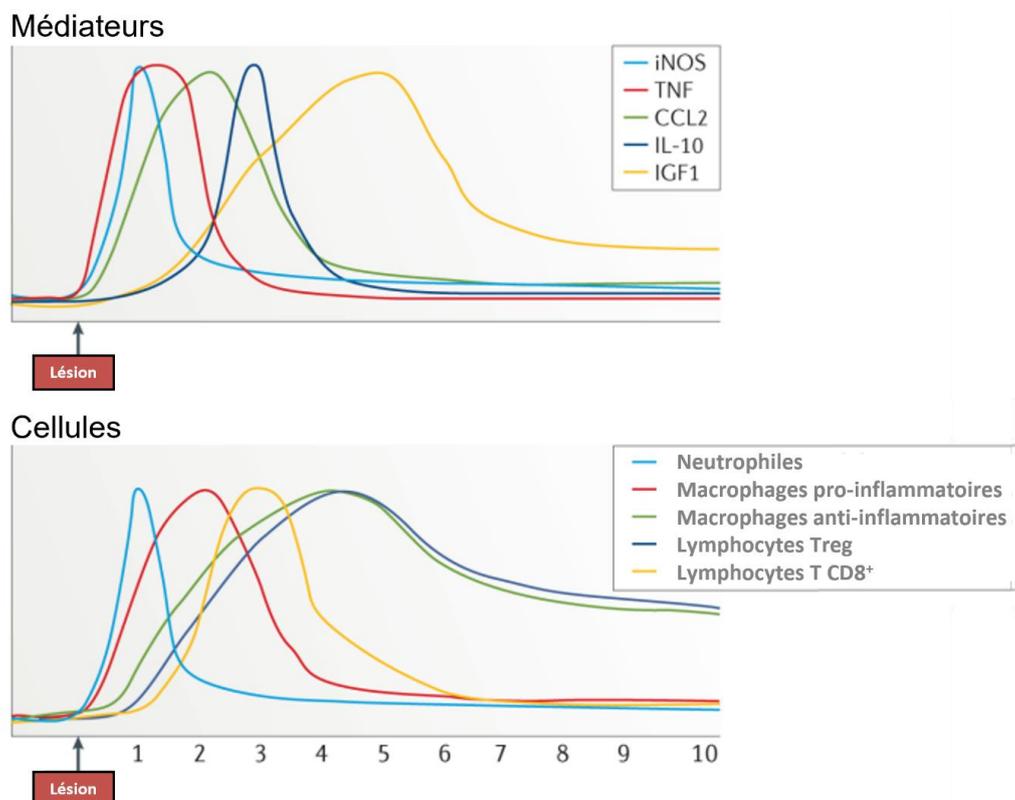


Figure 5 : cinétiques des médiateurs et cellules immunitaires lors d'une lésion musculaire (adapté de Tidball *et al* 2017)

II. Les myosites

1. Classifications et signes clinico-biologiques des myosites

Caractérisées pour la première fois par Bohan et Peter en 1975, elles se divisaient à l'époque en dermatomyosites (DM), avec présence d'atteintes cutanées typiques, et en polymyosites (PM)³⁷. Ce deuxième groupe s'est progressivement réduit avec la définition des myosites à inclusions (*IBM : Inclusion Body Myositis*) par Griggs en 1995, des myosites nécrosantes auto-immunes (*IMNM : Immune-Mediated Necrotizing Myopathy*) lors du 119^{ème} groupe de travail du centre européen des maladies neuromusculaire ou encore des myosites de chevauchements (*OM : Overlap Myositis*) par Troyanov en 2005³⁸⁻⁴⁰. Aujourd'hui encore, les PM restent un groupe hétérogène avec des critères peu ou mal définis (Tableau 3).

Les myosites, autrement appelées myopathies auto-immunes ou encore myopathies inflammatoires idiopathiques, regroupe un ensemble de maladies musculaires auto-immunes. On estime l'incidence entre 1 et 19 nouveaux cas par an pour 1 000 000 de personnes et la prévalence entre 2 et 33 personnes atteintes pour 100 000 personnes⁴¹. Bien qu'hétérogène, ces maladies se caractérisent cliniquement, dans le cas des DM, IMNM, OM et PM, par une atteinte musculaire généralement proximale et symétrique, conduisant à l'apparition aigüe ou subaigüe (de plusieurs semaines à plusieurs mois) d'une faiblesse musculaire⁴². Au contraire, dans le cas des IBM, l'atteinte est généralement distale, asymétrique et d'installation plus lente (plusieurs années)⁴³. Cette faiblesse s'observe au quotidien chez les patients, avec des difficultés à se lever, à monter des marches mais aussi à soulever des objets, mais aussi au travers de dysphagies dues à une atteinte des muscles nucaux et pharyngés. Outre l'atteinte musculaire, des manifestations extra-musculaires, autres que les rashes héliotropes et papilles de Gottron caractérisant les DM, peuvent être associées. Il s'agit notamment d'atteintes pulmonaires avec des pneumopathies interstitielle diffuse (PID), principale cause de mortalité (20%) chez ces patients, et des hypertensions artérielles pulmonaires⁴⁴, d'atteintes articulaires, allant de l'arthralgie à la polyarthrite rhumatoïde, ou encore de calcinose, consistant à des dépôts d'hydroxyapatite dans la peau, les tendons et les muscles des patients atteints de DM⁴⁵. Des troubles vasculaires tel que le syndrome de raynaud et l'apparition de cancer sont aussi fréquemment associés aux OM, dont le syndrome des anti-synthétases, et aux DM respectivement⁴¹. De manière

intéressante, la gravité des atteintes extra-musculaires semble inversement corrélée à celle de l'atteinte musculaire⁴⁵.

Des signes d'atteintes musculaires plus ou moins spécifiques comme l'augmentation du taux de créatine phosphokinase (CPK), du taux d'aldolase, de transaminases ou encore de lactate déshydrogénase peuvent être observés biologiquement⁴⁶. La CPK est le marqueur le plus sensible de la myolyse, et un taux élevé de cette enzyme aurait pour origine une myosite dans près de la moitié des cas⁴⁷. Ce taux reste cependant relativement bas dans le cas des IBM (10 fois la normale contre jusqu'à 50 fois dans d'autres myosites)⁴² et a tendance à diminuer avec la dégradation musculaire notamment liée à la fibrose et à la dégénérescence adipocytaire.

L'électromyogramme (EMG) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont deux techniques utilisées dans le diagnostic ou le suivi des myosites. En effet, l'EMG est généralement anormal avec un tracé dit « myogène » chez la plupart des patients atteints de myosites, peu importe le type de myosite. L'IRM lui permet de visualiser la présence d'œdème et d'infiltrats inflammatoires musculaires et de suivre leur évolution de manière non invasive⁴⁸. Elle permet aussi d'évaluer le remplacement graisseux, la fibrose ou encore l'atrophie musculaire⁴². Cette technique est aussi utile lors de biopsie, pour permettre de connaître la localisation des infiltrats et donc améliorer l'informativité du prélèvement⁴⁹.

Malgré les éléments décrits ci-dessus, la plupart de ces signes clinico-biologiques restent peu spécifique, et le diagnostic repose aujourd'hui encore principalement sur l'analyse histopathologique d'une biopsie musculaire. Cette technique permet d'observer la présence d'infiltrats de cellules mononucléées dans les muscles³⁹ et d'autres signes parfois spécifiques à certains type de myosite. Parmi ces signes spécifiques, on trouvera notamment⁵⁰ :

- Des infiltrats inflammatoires avec des cellules de l'immunité innée (Macrophage, Cellules dendritiques, Neutrophiles, Eosinophiles...) ou acquise (lymphocytes T ou B). En plus des infiltrats cellulaires, des signes d'immunité humorale peuvent être trouvés, comme la présence de dépôts de complexe d'attaque membranaire (C5b-9).
- Des anomalies des fibres musculaires, avec présence de fibres en nécroses, en régénération ou exprimant des marqueurs anormaux comme les complexes majeurs

d'histocompatibilité (CMH) I ou II, des vacuoles, inclusions, agrégats de protéines ou anomalies mitochondriales.

- La localisation tissulaire des lésions : endomysiale, périmysiale ou vasculaire.

La découverte d'auto-anticorps (aAc) chez des patients atteints de myosites a permis de faire évoluer cette classification avec l'ajout de sous-groupes homogènes. Ce type de classification a été pour la première fois proposé par Love *et al*, et se basait sur 4 aAc connu à l'époque⁵¹. Elle a grandi avec la découverte de nouveaux aAc et permet aujourd'hui d'améliorer le diagnostic, le pronostic et la prise en charge des patients⁴⁴. En effet, une association entre certains aAc et des manifestations extramusculaires a pu être mise en évidence (Figure 6). On sépare aujourd'hui les aAc spécifiques des myosites (*myositis specific auto-antibodies* = MSA), que l'on retrouve uniquement dans un sous-types de myosites, des aAc associés (*myositis associated auto-antibodies* = MAA) que l'on retrouve dans les OM ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes⁵². Cette classification reste cependant incomplète, avec des patients pour lesquels aucun aAc connu n'est détectable. Ce taux de patients séronégatifs varie selon les myosites entre 20 et 66%, confinant la détection d'aAc au second plan du diagnostic, derrière l'analyse histologique.

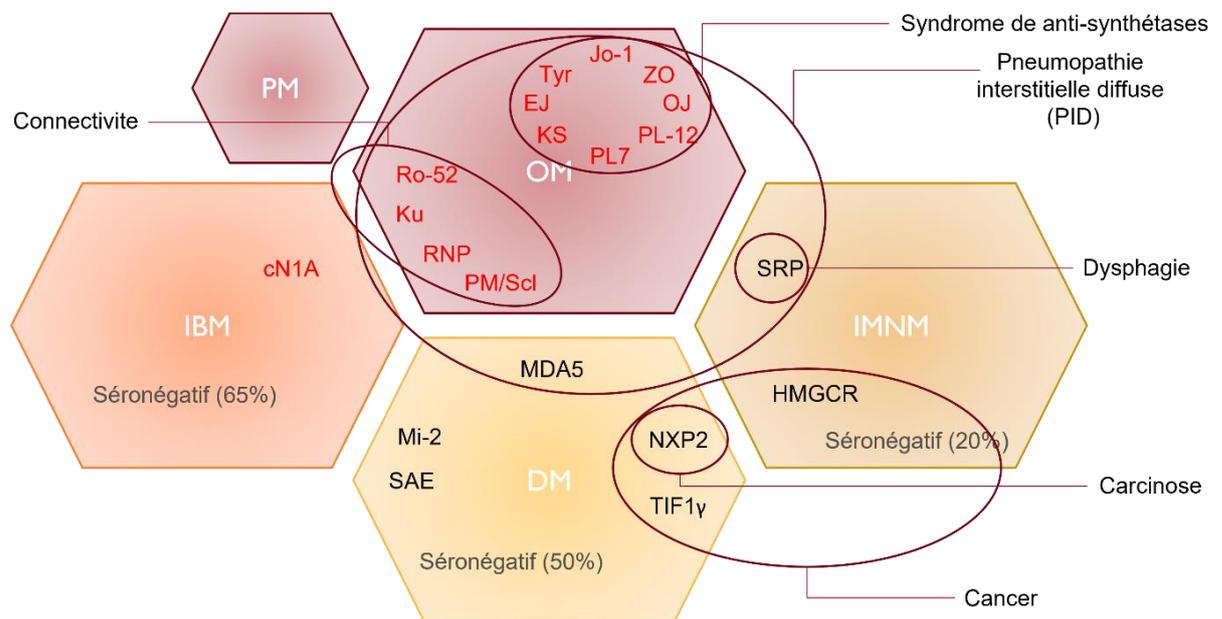


Figure 6 : Classification des myosites et association auto-anticorps/atteintes extramusculaires.

Tableau 3 : Historique de la classification des myopathies inflammatoires idiopathiques. Adapté de Allenbach et al, 2017

		Polymyosite (PM)	Dermatomyosite (DM)	Myosite à inclusion (IBM)	Myosite nécrosante auto-immune (IMNM)	Myosites non spécifiques		
Signes cliniques	Communs						Myosites rares et indéterminées	
	Particuliers						Myosites de chevauchement (OM)	
Histologie typique		Aucun, diagnostic d'exclusion	Atteinte cutanée typique	Faiblesse musculaire symétrique et distale, atrophie musculaire	Rhabdomyolyse	Signes cliniques d'une autre maladie associée		
		- Infiltrat endomysial (LyT CD8+) - Envahissement de fibres non nécrotiques - CMH1 diffus	- Atrophie périfasciculaire - Infiltrat périvasculaire, périmysial et périfasciculaire (Ly, mono, macro) - Dépôts de complément (capillaires ou sarcolemme) sauf anti-MDA5 et anti-SAE, nécrose - Myophagocytose - Marquage CMH-I périfasciculaire +/- CMH-II - Anti-Mi-2, Anti-TIF1y, Anti-MDA5, Anti-NXP2, Anti-SAE	- Vacuoles bordées - Dépôts B-amyloïde - Fibres Ragged-Red, fibres non nécrotiques envahies par LyT CD8+ - CMH-I diffus	- Fibres en nécroses - Dépôts de complément (fibres et capillaires) - Cellules infiltrantes (LyT) - CMH-I diffus avec accumulation autour des zones de myophagocytose	- Nécrose périfasciculaire - Dépôts de complément (fibres) - Infiltrat périmysial endomysial (Ly, macro) - CMH-I et CMH-II diffus (périfasciculaire) - Inclusion de filaments myonucléaires d'actine (70%)	Variable selon le type de myosite : - Fasciite éosinophile (syndrome de Shulman) - Sarcoidose musculaire - myosite focal - myosites associées aux maladies rhumatismales systémiques - myosites infectieuses - myosites paranéoplasiques	
Sérologie	MSA						Anti-SRP, anti-HMGCR	
	MAA (pathologie associée)	Anti-cN1A (syndrome de Gougerot-Sjögren et lupus érythémateux systémique)					Anti-tRNA synthétase (anti-Jo1, -PL-7, -PL-12, -OJ, -EJ, -KS, -ZO, -Tyr) (Syndrome des anti-synthétases) Anti-RNP (lupus érythémateux systémique) Anti-PM/Sic (sclérodermie) Anti-Ku, Anti-Ro52	
Complications		- Raynaud, sclérodermie, calcinose, atteinte cardiaque - Dysphagie (Anti-SAE) - Arthralgie, PID (anti-MDA5) - Cancer (Anti-NXP2, anti-TIF1y)					- Arthralgie, PID (Anti-Jo1, Anti-PM/Sic) - Raynaud, PID (Anti-PL7 et 12, Anti-PM/Sic) - Rash (Anti-EJ, PL7 et 12)	
		- Raynaud, dyspnée - dysphagie, PID, atteinte cardiaque (anti-SRP) - Cancer (anti-HMGCR < séronégatif)						

Légende : Bohan et Peter ——— Griggs Hoogendijk Troyanov Lundberg ——— Allenbach

2. Diagnostic et spécificités des sous-types de myosites

i. Dermatomyosites

La DM se caractérise par la présence de signes cutanés spécifiques, d'apparition plus précoce que les atteintes musculaires, voire parfois sans atteinte musculaire associée (amyopathique). Parmi ces signes, on trouvera les rashes héliotropes au niveau du visage, caractérisé par sa localisation péri-orbitaire, et les papules de Gottron que l'on observe au niveau des articulations métacarpo-phalangiennes et interphalangiennes. L'atteinte musculaire est, comme décrit plus tôt, symétrique, proximale, d'apparition subaigüe et de gravité variable, allant de l'amyopathie à la quadriparésie⁵³. D'autres atteintes cutanéovasculaires peuvent être présentes chez les patients atteints de DM, tel qu'un syndrome de Raynaud, une sclérodermie ou encore des calcinose sous-cutanées⁴⁴. Contrairement aux signes cutanés spécifiques que l'on retrouve dans la plupart des DM, l'incidence de ces derniers varie selon l'aAc présent. En effet, on retrouvera plus de syndrome de Raynaud, avec ulcères et nécrose digital, et de signes de sclérodermie chez les patients présentant des anti-MDA5, et plus de calcinose chez ceux présentant des anti-NXP-2. Les anti-Mi-2, anti-SAE et les anti-TIF-1 γ présenteront des signes plus classiques des DM, avec un phénotype plus sévère et diffus chez les anti-TIF-1 γ . Les anti-Mi-2 et anti-TIF-1 γ seront aussi fréquemment associés à l'apparition de cancer, tandis qu'on observera plus d'atteintes articulaires et pulmonaires, avec des cas graves de PID, chez les patients ayant des anti-MDA5. Enfin, les patients avec anti-SAE souffriront plus de dysphagies.

De manière générale, les analyses histologiques des biopsies de patients atteints de DM présentent des infiltrats leucocytaires périvasculaires et périmysiaux (Figure7C), avec une majorité de lymphocytes B (Figure7D) et T CD4+, mais aussi des cellules dendritiques, signe d'un processus humoral qui est confirmé par la présence d'un marquage C5b-9 positif⁵⁴. Ce marquage (Figure7A) est révélateur de la mise en place du complexe d'attaque membranaire et donc des mécanismes lytiques impliqués dans cette pathologie. Ces mécanismes humoraux sont à l'origine d'une atrophie périfasciculaire (Figure7B) associée à une perte de densité en capillaires. Ces derniers deviennent alors hypertrophiques par compensation avec des signes francs de vascularites et des dépôts de complexe immuns, causant une microangiopathie ischémique des muscles⁵⁵. Les fibres musculaires périfasciculaires des

patients atteints de DM présentent aussi une expression plus ou moins importante du CMH-I, normalement absent des muscles sains⁴⁴. Les biopsies musculaires de patients atteints de DM révèlent aussi une surexpression de l'IFN de type I, dont le rôle prépondérant dans les mécanismes pathologiques des DM a conduit à classer ces maladies dans le groupe des interféronopathies. En plus des muscles, les biopsies cutanées montrent aussi une cette signature IFN, dont les effets délétères sur les muscles et les capillaires sont aujourd'hui bien connu⁵⁶. Comme pour la clinique, ces signes histologiques sont variables en fonction des sous-groupes, avec peu de signe en présence d'anti-MDA5, présentant plutôt une maladie extra-musculaire, des signes modérés chez les patients avec anti-SAE et anti-NXP2, avec néanmoins présence modérée d'atrophie périfasciculaire, d'expression du CMH-I et de dépôt du complément, et des signes d'atteintes musculaires sévères chez les patients porteurs d'anti-Mi-2 et anti-TIF-1 γ , avec de nombreux infiltrats et fibres en nécroses.

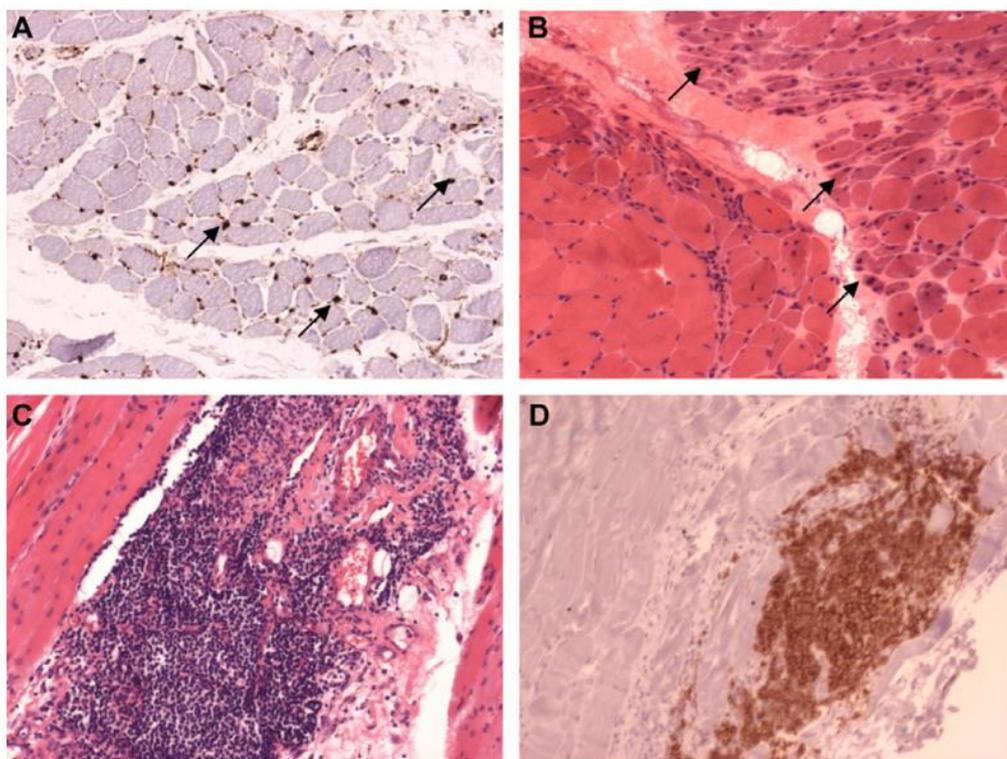


Figure 7 : Signes histologiques des dermatomyosites : (A) présence de dépôts périvasculaires de compléments (Ac antiC5b-9) et (B) d'atrophie périfasciculaire due à l'ischémie musculaire générée par la présence (C) d'infiltrats inflammatoires périvasculaires (D) riche en lymphocytes B (Ac anti-CD20). Benvéniste et al, 2007.

On considère en général que les anti-Mi-2 et anti-SAE seront de meilleurs pronostics, avec des atteintes musculaires modérées et peu de signes extra-musculaires graves, ainsi qu'une bonne réponse aux traitements. Les autres sous-groupes auront un moins bon pronostic, notamment les anti-MDA5 en raison du risque d'accru de PID ainsi que des atteintes cutané-vasculaires importantes.

ii. Polymyosites

Loin des critères de Bohan et Peter, le diagnostic des PM repose aujourd'hui principalement sur des critères d'exclusion des autres atteintes musculaires. Si les PM représentaient 45% des myosites à l'époque, ce chiffre a fortement diminué avec les nouveaux critères de classification. Dès 2005, Troyanov et coll l'estimaient à seulement 10%, considérant la plupart des cas comme des OM, mais ce chiffre repose sur une classification ne comprenant ni l'IBM, ni les IMNM⁴⁰. Aucun aAc n'a à ce jour pu être associé à ce sous-type de myosites.

D'un point de vue histologique, le diagnostic se fera la aussi par exclusion de certains signes, parmi lesquels l'atrophie périfasciculaire, l'atteinte des capillaires, des dépôts de C5b9 ou encore la présence de vacuoles bordées. De manière générale, les PM sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire endomysiale (Figure 8D) constitué principalement de lymphocytes T CD8+ (Figure 8C) et de macrophages envahissants plus ou moins des fibres musculaires non nécrotiques. Les lymphocytes T CD8+ sont parfois à l'origine d'un phénomène de tunnellation centromyocytaire (Figure 8C). Il s'agit donc d'un mécanisme cellulaire et non humorale comme décrit dans les DM, avec une cytotoxicité directe⁵⁵. L'expression du CMH-I est-elle diffuse et intense sur l'ensemble du muscle et non uniquement sur les zones lésées (Figure8 A-B).

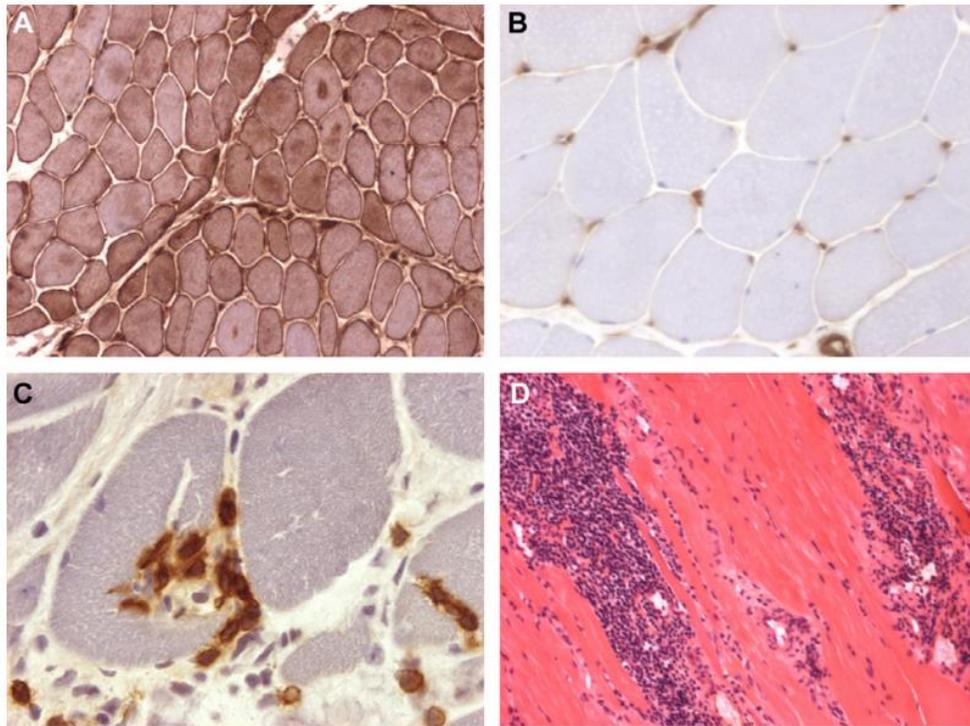


Figure 8 : Signes histologiques des polymyosites : (A) *expression intense et diffuse de CMH-I sur l'ensemble du muscle contrairement (B) au muscle d'un sujet sain (Ac anti-HLA-I), avec (C) présence de fibres partiellement envahie de lymphocytes T CD8+ (Ac anti-CD8) et (D) d'infiltrats inflammatoires endomysiaux. Benveniste et al 2007.*

iii. Myosites à inclusions

L'IBM se sépare en IBM sporadique, myosite la plus fréquente chez les patients de plus de 50 ans, et en IBM héréditaire, présentant des caractéristiques communes à l'exception du caractère inflammatoire de la maladie. Cette forme familiale, contrairement aux autres myosites, est considérée comme une myopathie génétique, dans laquelle des mutations du gène de l'UDP-N-acétylglucosamine-2-épimérase/N-acétylmannosamine kinase ont été identifiées⁵⁷. L'IBM sporadique, seule IBM dont on parlera dans ce travail, est une maladie d'apparition très progressive, généralement sur plusieurs années, caractérisée par une faiblesse musculaire asymétrique touchant à la fois les muscles proximaux et distaux des bras et des jambes mais également les muscles fléchisseurs des mains et extenseurs des pieds. Elle peut aussi atteindre les muscles de la face et est fréquemment associée à des dysphagies^{38,42}. Cette forme de myosite répond généralement mal aux traitements habituels, notamment aux corticoïdes^{42,58}. Un seul aAc a pour l'instant été mis en évidence (anti-cN1A) que l'on retrouve chez environ 30% des patients, mais aussi dans d'autres

maladies auto-immunes, telle que le syndrome de Gougerot-Sjögren ou le lupus érythémateux systémique⁴⁴.

Bien que, comme les DM, les infiltrats soient aussi caractérisés par la présence de lymphocytes T CD4+ dans les zones périvasculaires et périmisiales, les lymphocytes B y sont rares. On observe par ailleurs la présence en grand nombre de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ainsi que de macrophages dans les myofibrilles, dont l'action, comme lors des PM, conduit à une épargne relative des capillaires⁵⁴ (Figure 9C-D). La cytotoxicité directe de ces cellules est en partie liée à la présence du CMH-I à la surface des fibres nécrotiques, aboutissant là encore à l'expansion oligoclonale de lymphocytes T CD8+ parfois recirculants⁵⁹. L'analyse histologique de la biopsie révèle aussi la présence au sein du cytoplasme des fibres musculaires de vacuoles bordées de 3 à 30 µm contenant des granulations basophiles (Figure 9A-B)⁵⁵. Ces granulations ou inclusions, observables en microscopie électronique, correspondent à des structures tubulofilamenteuses constituées principalement de β-amyloïdes et permettent le diagnostic spécifique des IBM (Figure 9E-F). Des anomalies mitochondriales sont aussi visibles, sous la forme de fibres rouges déchiquetées (*ragged red fibres*, Figure 9A) ou encore l'absence d'activité enzymatique de la cytochrome oxydase. Ces différents éléments histologiques font douter sur l'origine de cette maladie, à savoir une maladie auto-immune entraînant des désordres métaboliques, ou au contraire une maladie métabolique dont l'accumulation de protéines malformées induit une réponse immunitaire secondaire⁶⁰

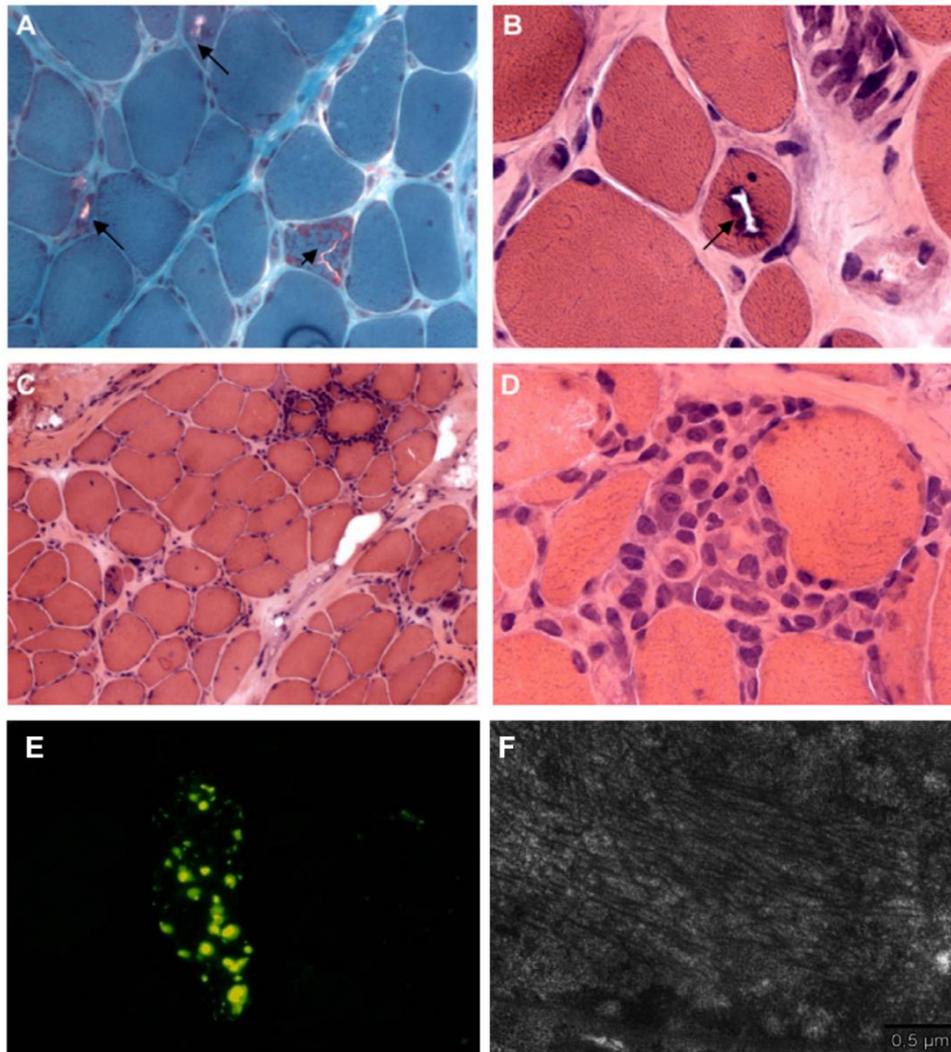


Figure 9 : Signes histologiques des myosites à inclusions : (A) présence de fibres rouges déchiquetée et (B) de vacuoles bordées typiques, ainsi que (C) d'infiltrats inflammatoires endomysiaux avec (D) envahissement des fibres musculaires. Les vacuôles contiennent (E) des inclusions de β -amyloïdes visible (F) sous forme tubulofilamenteuse en microscopie électronique. Benveniste et al 2007 et 2015.

iv. Myosites nécrosantes auto-immunes

Les IMNM, une des formes de myosites décrite le plus récemment, représentent près de 20% des cas de myosites⁶¹, touchant principalement les adultes. D'apparition subaigüe voir aigüe, elles peuvent parfois être secondaire à un traitement par statine, classe de médicaments hypocholestérolémiants, perdurant même après l'arrêt du traitement⁴². Deux MSA ont aujourd'hui été découverts dans les IMNM, les anti-SRP et les anti-HMGCR,

compilant à eux deux 80% des patients atteints de cette forme de myosite⁶². Les patients porteurs de ces aAc se distinguent cliniquement, avec une maladie musculaire plus sévère chez les patients ayant des anti-SRP, associée à des dysphagies, PID ou encore des atteintes cardiaques⁴².

Comme leur nom l'indique, les IMNM présentent de nombreuses fibres musculaires nécrotiques avec quelques infiltrats clairsemés voir absents⁶³ (Figure 10A-C) et des dépôts de complément à la surface de myofibres saines et rarement au niveau des capillaires (Figure 10B-D)³⁹. L'analyse des quelques infiltrats révèle la présence de lymphocytes T CD8+ et/ou CD4+, mais rarement de B, ainsi qu'une forte proportion de macrophages⁶⁴. Ces derniers sont associés à la présence d'une fibrose endomysial importante⁶⁵. Des cellules dendritiques plasmocytoïdes, productrices d'IFN-I, peuvent aussi être présentes. L'expression du CMH-I est plus faible que pour les autres myosites et peut-être diffus ou multi-focal (Figure 10F), se limitant parfois aux fibres nécrotiques ou en régénération (Figure 10E).

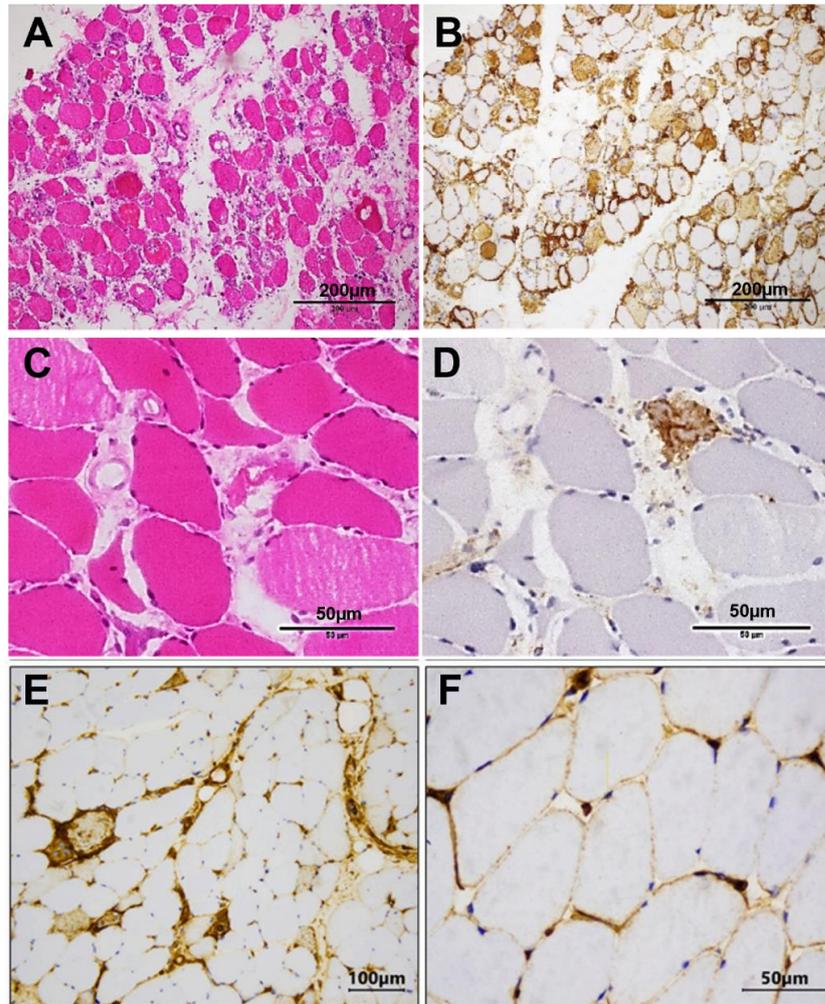


Figure 12 : Signes histologiques des myosites nécrosantes auto-immunes : (A) biopsie musculaire d'un patient présentant une nécrose intense et diffuse des fibres musculaires, associée à (B) un marquage intense sarcolemmique et sarcoplasmique du C5b-9 de fibres non-nécrotiques ou au contraire (C) biopsie présentant une nécrose moins sévère avec un (D) marquage anti-C5b-9 uniquement des fibres très nécrotiques. De même, le marquage du CMH-I peut être (E) intense mais limité aux cellules en nécrose ou (F) discret au niveau du sarcolemme mais touchant l'ensemble des cellules. D'après Merlonghi et al 2022, Day et al 2020.

v. Myosites de chevauchement

Les OM se définissent par la présence d'une myosite accompagnée par au moins un signe clinique d'une autre maladie systémique ou la présence d'un aAc chevauchant⁴⁰. Bien

qu'ils en existent différents, les principaux aAc chevauchants (anti-Jo-1, PL-7, PL-12, OJ, EJ, KS, ZO, Tyr) sont associés au syndrome des anti-synthétases (SAS) : il s'agit d'aAc anti-tRNA synthétases. D'autres aAc chevauchants (anti-RNP, PM/Scl, -Ku) ont été associés à d'autres maladies systémiques, et d'autres anticorps ont aussi été retrouvés chez des patients atteints de myosite, mais leur implication et leur fréquence reste mal connu à ce jour (tableau 4)⁶⁶.

Cliniquement, le SAS, OM voire myosite la plus fréquente, se présente avec une atteinte musculaire associée à des arthralgies, des atteintes cutanées, avec comme signe caractéristique les mains de mécanicien, des PID et un syndrome de Raynaud. La gravité de ces signes varie selon le type d'aAc présent, l'atteinte sera plutôt musculaire en présence d'anti-Jo-1, les anti-PL-7 et 12 présenteront plus fréquemment des syndromes de Raynaud et des PID plus sévères, et les signes cutanés semblent particulièrement associé aux anti-EJ, anti-PL-7 et 12^{44,52,62}. Au niveau histologique, le SAS est caractérisé par une atteinte pérимыsiale et périfasciculaire avec expression du CMH-I faisant penser à la DM. Contrairement à celle-ci, les atteintes périfasciculaires correspondent plus à des nécroses qu'à une atrophie (Figure 11A)⁶⁴, l'infiltrat inflammatoire est principalement constitué de macrophages (Figure 11B) et les dépôts de compléments sont plutôt à la surface des fibres non-nécrotiques périfasciculaires et non au niveau des capillaires (Figure 11E). De plus, l'expression du CMH-I est moins intense, contrairement à celle du CMH-II (Figure 11 C-D). Des inclusions de filaments myonucléaires d'actine ont aussi été décrites comme un critère morphologique spécifique du SAS (Figure 11F)^{67,68}.

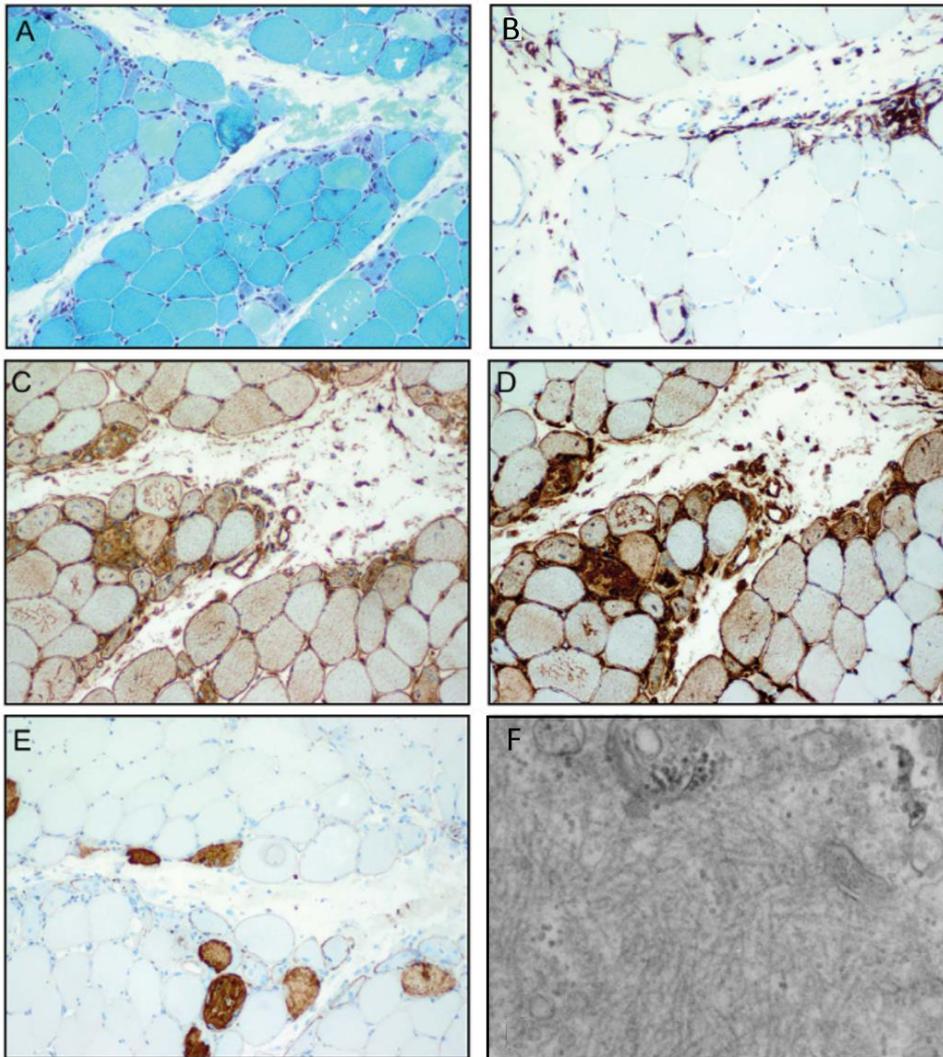


Figure 13 : Signes histologiques des myosites de chevauchements : (A) atteinte périfasciculaire avec présence de fibres nécrotiques et (B) d'infiltrat inflammatoire principalement constitué de macrophages. L'expression (C) du CMH-I et (D) du CMH-II, plus intense, se situe au niveau du sarcolemme avec une prédominance périfasciculaire. (E) Un dépôt de 5b-9 peut être détecté sur des fibres nécrotiques. Enfin (F) des agrégations myonucléaires de filaments d'actine sont observées et semblent spécifiques à ce syndrome. Stenzel et al 2015, Benveniste et al 2019.

3. Auto-anticorps dans les myosites

Si l'analyse histologique reste souvent l'outil diagnostique de référence, il est désormais systématiquement complété par la recherche d'auto-anticorps, examen moins invasif avec une meilleure valeur pronostic en permettant d'identifier les sous-groupes de myosites et d'adapter au mieux la prise en charge thérapeutique. Cette nouvelle classification en sous-groupe homogène a pu et continue à se développer au fil des ans grâce à la découverte de nouveaux aAc, et elle nécessite d'être complétée afin d'améliorer encore la prise en charge de ces patients⁶⁹. Cette recherche est cependant longue, comme le montre la chronologie de découverte des MSA et MAA (figure 12).

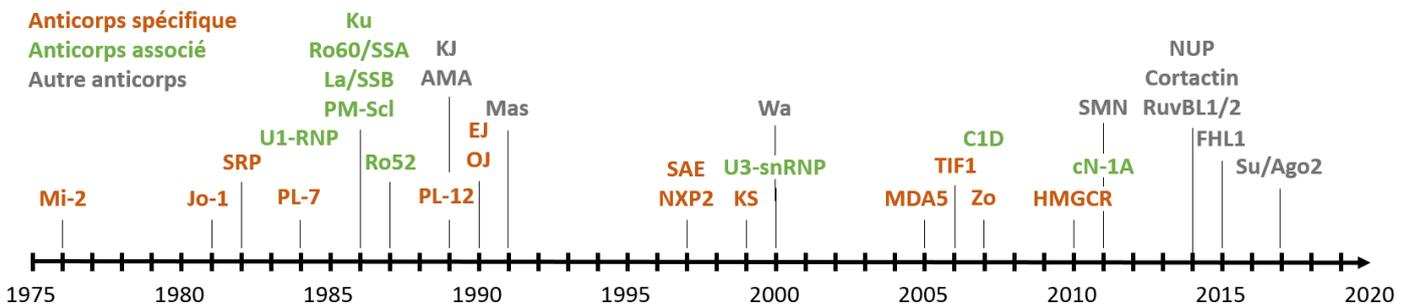


Figure 12 : Frise chronologique de la découverte des principaux auto-anticorps des myosites

i. Classification des anticorps

Les aAc des myosites sont généralement classés en MSA (16 identifiés à ce jour) et en MAA (9 reconnus à ce jour) (tableau 4). Ils se distinguent par le caractère spécifique, les MSA ne seront trouvés que lors d'une myosite, mais aussi exclusif, la présence de deux MSA étant particulièrement rare, contrairement à la présence de deux MAA ou d'un MSA et d'un MAA⁷⁰. Les MSA signent donc la présence d'une myosite et, de par leur association spécifique à certains symptômes et cette exclusivité, permettent de définir des sous-groupes homogènes de patients⁷¹. Certains aAc généralement découverts plus récemment n'ont pas encore été classés dans ces groupes, par manque de données pour confirmer leur rôle dans ces pathologies⁷².

Les cibles de ces aAc, qu'il s'agisse de MSA ou de MAA, sont très variables⁷³. On va ainsi distinguer :

- les aAc anti-nucléaires, visant des protéines impliquées soit dans la transcription de certains gènes ou dans la réparation de l'ADN. On trouvera ainsi des MSA ciblant Mi-2, constituant du complexe de remodelage du nucléosome impliqué dans la régulation de la transcription⁷⁴, NXP2 et SAE, protéines associées entre elles et jouant un rôle de répresseur de la transcription⁷⁵ ou encore TIF-1, une ligase d'ubiquitine régulant les voies TGF- β /Smad et Wnt/ β -Catenine et agissant ainsi sur la prolifération cellulaire⁷⁶. Des MAA anti-nucléaires ont aussi été décrits et ciblent Ro52 et Ro60, ribonucléases jouant un rôle dans la régulation de la réponse IFN type I^{77,78}, PM/Scl (100 et 75), protéines du complexe ribonucléase de l'ARN appelé exosome participant à la dégradation des ARNm, Ku, hétérodimère impliqué dans la réparation de l'ADN notamment lors de la recombinaison génique des immunoglobulines, U1 et U3-RNP, ribonucléoprotéines du spliceosome qui sont capables de stimuler les TLR et d'induire ainsi une réponse inflammatoire et IFN de type I⁷⁹, PMS (PMS1, PMS2 et MLH1), protéines se dimérisant pour former un complexe de réparation des mésappariements de l'ADN⁸⁰, RuvBL1 et 2, complexe nucléaire participant à la réparation de l'ADN et à la transcription, SMN, complexe multi-ribonucléoprotéique permettant l'assemblage des snRNP, et enfin les NUP, nucléoporines régulant le transport des protéines et ARN vers le noyau⁶⁶.
- Les aAc anti-cytoplasmiques ciblant des antigènes participant à la traduction, à la signalisation intra-cellulaire des protéines ou encore au métabolisme cellulaire. On a notamment identifié des MSA ciblant les ARNt-synthétases (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, JS, KS, ZO ou YRS), enzymes catalysant la formation d'aminoacyl-ARNt impliqués dans la synthèse protéique, la particule de signal de reconnaissance SRP, permettant la co-translation des protéines naissantes du ribosome vers le réticulum endoplasmique ou la membrane cellulaire⁸¹, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase, impliquée dans le métabolisme du cholestérol, ou encore MDA5, détecteur cytosolique d'ARN viral à l'origine d'une réponse IFN de type I⁶⁶. D'autres cibles non spécifique ou encore mal décrites existent, telles que cN-1A, protéine impliquée dans l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate et le contrôle du métabolisme cellulaire, Mas ou KJ, impliqués dans la translocation des protéines, la cortactine, qui aide au réarrangement et à la polymérisation du cytosquelette d'actine⁸², Su/Ago2, qui serait

associée au métabolisme des ARN et notamment à la maturation des micro-ARN, FHL1, agissant sur la croissance cellulaire et la maintenance structurale du sarcomère via différentes voies de signalisation dont Smad/TGF- β ⁸³, ou encore FER et WA, dont les fonctions restent mal connues.

- Les aAc anti-mitochondriaux, allant de M1 à M10, ont été retrouvés chez des patients présentant des myopathies inflammatoires fréquemment associées avec des cholangites ou cirrhoses biliaires primitives ainsi que des troubles cardiaques⁸⁴.

Parmi ces nombreux aAcs, qu'ils soient spécifiques ou non, il est intéressant d'observer qu'aucun ne cible précisément une protéine musculaire. Si l'on ne comprend toujours pas comment ces protéines intracellulaires deviennent des auto-antigènes, les mécanismes de destructions immunologiques, que l'on décrira plus tard, sont désormais mieux compris. Mais les raisons pour lesquelles certains tissus, notamment le muscle, la peau ou les poumons, sont touchés et pas d'autres restent mal comprises. Une hypothèse est la différence de niveau d'expression de ces auto-antigènes entre les tissus, voir la surexpression lors des phases de régénération musculaire⁸⁵. La compréhension de l'ensemble des mécanismes, immunologiques ou non, et du rôle des aAcs dans ces pathologies est une nécessité au développement de nouvelles thérapies.

Anticorps	Antigène	Myosite	Signes associés
Myositis-specific autoantibodies (MSAs)			
Anti-Jo-1	Histidyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétase classique avec signes musculaires fréquents
Anti-PL-7	Threonyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétases avec pneumopathie interstitielle
Anti-PL-12	Alanyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétases avec pneumopathie interstitielle
Anti-EJ	Glycyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-OJ	Isoleucyl-tRNA synthetase	OM	pneumopathie interstitielle seule ou associée à un syndrome des anti-synthétases
Anti-KS	Asparaginyl-tRNA synthetase	OM	pneumopathie interstitielle seule ou associée à un syndrome des anti-synthétases
Anti-Zo	Phenylalanyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-YRS/HA	Tyrosyl-tRNA synthetase	OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-Mi-2	Nucleosome Remodelling Deacetylase (NuRD) (Mi-2 α/β)	DM	Dermatomyosite classique
Anti-SAE	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme (SAE1/2)	DM	Dermatomyosite cutanée sévère avec symptômes systémiques et dysphagies sévères
Anti-MDA5 (anti-CADM140)	Melanoma Differentiation-Associated gene 5 (MDA5)	DM	Dermatomyosite sévère avec pneumopathie interstitielle et peu ou pas de signes musculaires
Anti-TIF1 γ/α (anti-p155/p140)	Transcription intermediary factor 1 (TIF1 γ/α)	DM	Dermatomyosite juvénile avec cancers associés et peu ou pas de signes musculaires
Anti-TIF1 β	Transcription intermediary factor 1 β	DM	Dermatomyosite classique
Anti-NXP2 (anti-MJ)	Nuclear matrix protein (NXP-2)	DM	Dermatomyosite juvénile avec cancers associés et calcinoses diffuses
Anti-SRP	Signal recognition particle	IMNM	Myosites nécrosantes auto-immunes avec dysphagie et possible pneumopathie interstitielle
Anti-HMGCR	HMG-CoA reductase	IMNM	Myosites nécrosantes auto-immunes primitive ou secondaire à une exposition aux statines

Tableau 4 : Anticorps de myosites (adapté de Palterer *et al* 2018)

Myositis-associated autoantibodies(MAAs)			
Anti-PM-Scl	Exosome protein complex (PM/Scl75/100)	OM	Sclérodémie systémique
Anti-C1D	Exosome associated protein	OM	Sclérodémie systémique
Anti-U1-RNP	U1 small nuclear RNP	OM	Maladies des tissus conjonctifs
Anti-fibrillarin (anti-U3-	Fibrillarin	OM	Sclérodémie systémique
Anti-Ku	DNA-PK regulatory subunit	OM	sclérodémie systémique avec pneumopathie interstitielle sévère
Anti-Ro52	Ro-52/TRIM21	OM	Pneumopathie interstitielle
Anti-Ro60/SSA	Ro-60/SS-A	OM	Syndrome de Steve et Johnson, Lempus érythémateux systémique
Anti-La/SSB	SS-B	OM	Syndrome de Steve et Johnson, Lempus érythémateux systémique
Anti-cN-1A (anti-Mup44)	Cytosolic 5' nucleotidase 1A	IBM	myosite à inclusions
Autres anticorps			
Anti-RuvBL1/2	RuvBL1/2 complex	PM	sclérodémie systémique, polymyosite
Anti-Su/Ago2	Argonaute 2	OM	PID
Anti-SMN	Survival of Motor Neuron	PM	sclérodémie systémique, cirrhose hépatique primitive
Anti-NUP	Nup358/RanBP2, gp210, Nup90, p200/p130, Nup62	PM	sclérodémie systémique, cirrhose hépatique primitive
Anti-mitochondrial (AMA-M2)	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex	PM	Trouble cardiaque et cirrhose hépatique primitive
Anti-KJ	Translocation factor	OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-Fer (anti-eEF1)	Eukaryotic elongation factor 1	OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-Wa		OM	Syndrome des anti-synthétases
Anti-Mas	selenocysteine seryl-tRNA-protein complex	OM	Rhabdomyolyse, hépatique auto-immune
Anti-PMS	DNA repair mismatch enzyme (PMS1, PMS2, MLH1)	OM	
Anti-cortactin	Cortactin	PM	Myasthénie
Anti-FHL1	Four-and-a-Half LIM domain 1	PM	Atteintes systémiques

Tableau 4 : Anticorps des myosites : suite

ii. Détermination de la pathogénicité des anticorps

Les myosites, encore souvent appelées myopathies inflammatoires idiopathiques, ont longtemps été considérées comme des maladies inflammatoires et non auto-immune. La définition d'une maladie auto-immune repose sur la démonstration de l'implication d'aAc ou de lymphocytes B ou T auto-réactifs. En effet, l'identification d'un aAc dans une maladie considérée comme auto-immune ne prédit en rien son implication dans la maladie : celui-ci peut être, selon sa spécificité, un marqueur diagnostic, pronostic ou de suivi, avec ou sans rôle pathogène, ou simplement être associé ou secondaire à la maladie. La démonstration de sa pathogénicité est importante pour mieux comprendre les mécanismes impliqués et proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques. Les critères pour cette démonstration ont été développés il y a plus de 30 ans mais restent valable aujourd'hui⁸⁶. *

Il a alors été proposé trois niveaux de preuves :

- **Preuves directes** : elles reposent principalement sur (i) le transfert passif d'aAc ou de cellules auto-réactives d'un patient vers un animal. De rares cas de transfert d'un patient vers un sujet sain ont pu être publiés, mais en dehors des (ii) transferts materno-fœtaux transplacentaux, il s'agit d'expériences dangereuses et non éthiques. Il existe deux cas décrivant la mort d'un fœtus/nouveau-né suite au développement d'une myosite à aAc anti-PL7 et à aAc anti-Jo1 pendant la grossesse^{87,88}. Outre ces deux cas, il existe très peu d'observations démontrant l'implication d'aAc. Les grossesses compliquées d'une myosite mènent dans 50% des cas à la mort du fœtus, principalement lorsque la myosite se déclare lors du premier trimestre. Si elle se déclare après, le nouveau-né n'est majoritairement pas atteint^{89,90}. Le transfert passif vers des animaux dans les myosites est lui aussi rare, car il nécessite une quantité importante d'aAc purifié ou de plasma présentant une forte concentration d'aAc, ainsi qu'une homologie importante de la cible de ces aAc entre les espèces. Ce type de démonstration a néanmoins pu être utilisé pour prouver la pathogénicité des anti-SRP et anti-HMGCR purifiés à partir de plasmaphèreses de patients⁹¹. La pathogénicité des aAc anti-SRP et anti-HMGCR a aussi été montré par une autre méthode directe : (iii) la destruction de cellules porteuses de l'antigène *in vitro*, après exposition à l'aAc⁹². En effet, suite à l'ajout des

aAc dans le milieu de culture, les aAc induisent une diminution de la fusion des myoblastes en myotubes ainsi qu'une atrophie des myotubes. On observe aussi une augmentation d'expression d'IL-6 et des espèces réactives de l'oxygène et une diminution d'IL-4 et d'IL13.

- **Preuves indirectes :** Les preuves indirectes sont plus faciles à obtenir mais ne reflètent souvent pas parfaitement la réalité. L'un des moyens les plus simples est (i) la reproduction de la maladie auto-immune par immunisation par l'antigène que l'on pense pathogène. Elle a notamment permis de démontrer la pathogénicité des anti-Jo-1, par induction d'une inflammation du muscle et du poumon semblable à ce qui peut être observé chez l'homme⁹³, de TIF-1γ, sans induction de signe clinique mais avec des signes histologiques de myosites⁹⁴, ou encore de FHL-1 dans un modèle exprimant de façon inductible le CMH-I et conduisant à une perte de force musculaire et à l'apparition de signe histologique⁸³. Si cette immunisation semble simple, elle requiert néanmoins parfois l'utilisation de différents adjuvants voir de différentes souches d'animaux aux seins d'une même espèce, celles-ci pouvant présenter des susceptibilités différentes à l'antigène. Une absence de réponse à un antigène n'exclut donc pas sa pathogénicité dans d'autres conditions. Cette méthode indirecte ne permet pas non plus de dire que l'aAc déterminé comme pathogène soit à l'origine de la maladie, ou simplement facteur aggravant secondaire à celle-ci. Une autre méthode indirecte est (ii) l'isolation d'aAc ou de cellules auto-réactives directement de l'organe cible de la maladie.
- **Preuves circonstancielle**s : les preuves circonstancielle

preuve circonstancielle. Elles ont été observées pour les anti-Jo1⁹⁵, anti-MDA5⁹⁶⁻¹⁰¹, anti-SRP^{102,103} et anti-HMGCR¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Cette corrélation concerne à la fois la clinique et la biologie, et peut être utilisée d'un point de vue pronostic ou comme marqueur de réponse au traitement^{103,107-111}.

4. Modèles animaux

Si la découverte de nouveaux aAc dans les myosites repose principalement sur l'analyse de prélèvement de patients, d'autres pathologies, dont le principal exemple est le diabète, ont pu en identifier à l'aide de modèles animaux. L'absence de modèle animal consensuel dans les myosites, notamment en raison de l'hétérogénéité de ces maladies, est une limitation au développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. En effet, malgré les avancées permises, aucun modèle existant à ce jour n'a pu répondre à l'ensemble des critères permettant une étude physiopathologique complète de ces maladies.

Dans le cadre de la présentation d'un nouveau modèle, Afzali et son équipe réalisèrent un bilan des différents modèles existants (Tableau 5), en reprenant leurs avantages et leurs inconvénients¹¹².

i. Modèles spontanés

Deux modèles spontanés canins existent, dont un présentant une forme locale au niveau des muscles masticateurs, avec des signes cliniques très proche de la DM humaine, et une forme généralisée proche de la PM humaine. De plus, l'étude des infiltrats montrait aussi des signes spécifiques à ces maladies, avec une présence plus importante des lymphocytes B et cellules dendritiques dans la forme locale, et des lymphocytes T dans la forme généralisée¹¹³. Si ces modèles permettent d'étudier la maladie dans un état naturel, sans induction induisant un biais mécanistique, ils demeurent en revanche peu répandus, de par la faible incidence de la maladie, le coût généré par ces études ainsi que l'absence de certains réactifs et anticorps spécifiques à cette espèce.

ii. Modèle nutritionnel

Ce modèle consiste à soumettre des lapins à un régime enrichi en cholestérol, entraînant l'apparition d'une myosite présentant des caractéristiques histologiques similaire à l'IBM, notamment un infiltrat riche en macrophages avec des dépôts dans des vacuoles intramyofibrillaires d'amyloïde- β , d'ubiquitine et de protéine tau hyperphosphorylée¹¹⁴. Néanmoins, son utilisation est limitée par des complications cardiovasculaires et neurodégénératives graves, pouvant biaiser l'évaluation de la myopathie, et une incidence relativement faible (1/3 seulement des lapins atteints).

iii. Les modèles infectieux

Ils sont basés sur l'observation de signes de myopathie chez l'Homme lors de certaines viroses (grippe, covid), ont conduit à l'observation des mécanismes de destruction aiguë du muscle et de transition vers la chronicité de la maladie. C'est notamment le cas lors d'infection de souris par le virus coxsackie B1, conduit à une myosite dose-dépendante accompagnée d'une nécrose et inflammation musculaire, avec persistance des signes cliniques après élimination du virus¹¹⁵. La forte mortalité et l'atteinte d'organes autres que les muscles ont conduit à l'utilisation d'autres virus, comme le virus de la rivière Ross ou le chikungunya, ou encore de parasites tels que *Trypanosoma cruzi* ou *Leishmania infantum*. Contrairement à l'infection par coxsackie B1 qui présente une importante réponse humorale avec des aAc anti-nucléaires ou anti-cytoplasmiques, ces deux autres virus entraînent une myosite indépendante du système adaptatif, alors que les modèles parasitaires présentent des infiltrats majoritairement composés de lymphocytes T CD8⁺¹¹².

iv. Les modèles immunologiques

Ces modèles sont induits par immunisation par un antigène, purifié ou dans un homogénat de cellulaire ou tissulaire, généralement à l'aide d'adjuvant afin de rendre l'injection suffisamment immunogène. Ces modèles ont commencé à se développer dans les années 50, avec le premier modèle de myosite expérimental auto-immune (*experimental autoimmune myositis* = EAM), généré par injection sous-cutanée (SC) d'homogénats de

muscle de rat mélangé avec du *Mycobacterium tuberculosis*, conduisant à l'apparition d'une inflammation des fibres musculaires non spécifique¹¹⁶. Ces modèles ont continué d'être développés en modifiant la souche ou l'espèce animal (rat, souris, cochon d'inde), la voie d'administration (Intra-musculaire (IM), SC dans le coussinet des pattes arrières), l'adjuvant (adjuvant complet ou incomplet de Freund, toxine pertussique,...) ou encore le mélange antigénique (syngénique ou non, partiellement (fraction MB = myosine-actine-tropomyosine) ou complètement purifié (myosine, protéine-C...))¹¹². D'un modèle aigu avec une récupération en un mois, ces travaux ont permis le développement d'un modèle plus stable dans le temps, dont la sévérité augmente avec le nombre d'injections réalisées (généralement 3 ou 4). Si l'aspect clinique reste souvent absent ou partiellement évaluable à travers la force musculaire, ces modèles présentent des signes histologiques intéressants, avec un infiltrat majoritairement constitué de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans les myofibres nécrotiques, ainsi que de macrophages. Ils ont permis de mieux comprendre certains mécanismes, notamment le rôle pathogène de l'IL-6¹¹⁷ ou celui protecteur des lymphocytes Treg¹¹⁸. Ils ont aussi été beaucoup utilisés comme modèles précliniques, permettant d'évaluer et de comprendre l'effet thérapeutique de médicaments utilisés depuis de nombreuses années (corticoïdes, immunoglobulines G intraveineuses (IVIg) ou immunosuppresseurs) ou en cours de développement (anticorps monoclonaux, cytokines...).

D'autres équipes ont développé des modèles d'immunisations par d'autres protéines musculaires, tel que la laminine, composant majeur de la membrane basale des fibres musculaires, ou encore l'histidyltransfer-RNA-synthetase, cible des anti-Jo1. Ce dernier modèle présente l'avantage de cibler un auto-antigène bien décrit dans les myosites, générant une pathologie proche du SAS¹¹⁹. L'immunogénicité intrinsèque de cet antigène est importante, permettant dans différentes souches de souris des immunisations sans adjuvant, bien que ceux-ci restent généralement requis et même complétés par des agonistes des TLR pour obtenir une maladie chronique disséminée à l'ensemble des muscles¹²⁰. L'étude de ce modèle a permis de mieux comprendre les mécanismes pathologiques, notamment de démontrer l'implication des lymphocytes T et B ainsi que du système immunitaire inné dans ce syndrome.

Un modèle d'immunisation passive, utilisant des cellules dendritiques sensibilisées par des peptides de la pyruvate kinase M1/M2, protéine ubiquitaire de la glycolyse, a aussi été

mis au point, et présentait, chez 40% des souris, un atteinte musculaire histologique avec signes de nécrose/régénération des fibres musculaires ainsi qu'un infiltrat majoritairement composé de lymphocytes T CD4+¹²¹.

Les modèles immunologiques ont l'avantage d'être souvent simple et rapide à utiliser, reproductibles et peu coûteux. Ils présentent un grand intérêt dans l'évaluation préclinique de nouvelles thérapies, bien qu'ils ne présentent pas l'ensemble des aspects des myosites. S'ils peuvent apporter certaines informations concernant les mécanismes pathologiques, celles-ci peuvent néanmoins être biaisées du fait de l'importante réaction inflammatoire engendrée par les adjuvants. Certains adjuvants posent d'ailleurs à ce titre des problèmes éthiques de respect du bien-être animal et leur usage tend à être réduit aux expériences sans autre alternative.

Un autre type de modèle immunologique a pu être développé au sein du laboratoire, ne présentant pas ces limitations : il s'agit d'un modèle de IMNM induit par injection d'aAc anti-SRP ou anti-HMGCR issus de patients obtenu par purification à partir de plasmaphérèse⁹¹. Ce modèle présente une myosite modérée associée à une perte de force musculaire et des signes histologiques d'IMNM. Il a permis de démontrer l'importance du complément dans la pathogénicité des IMNM, dont la déficience empêche l'apparition de la maladie, qui peut au contraire être aggravée par ajout de complément humain. Ce modèle a ainsi permis de définir une nouvelle cible thérapeutique dans cette forme de myosite¹²².

v. Les modèles transgéniques

Les modèles transgéniques reposent la surexpression ou au contraire la délétion d'un gène, conduisant à l'apparition spontanée de la maladie. Il existe ainsi des modèles présentant :

Une surexpression d'amyloïde- β intracellulaire est induite par fusion du gène du précurseur de la protéine amyloïde avec un promoteur musculaire, permettant d'étudier l'impact neuromusculaire de l'amyloïde β , en augmentant sa production dans les muscles. Ce modèle d'IBM fut progressivement amélioré pour ressembler à la pathologie humaine, tout d'abord en modifiant l'expression de la preseniline-1, composant d'un complexe enzymatique permettant une production prépondérante d'amyloïde- β 42, considéré comme

toxique chez l'Homme, par rapport à l'amyloïde- β 40, et par la fusion avec un promoteur spécifique des fibres de type II, celui de la chaîne légère de myosine. Cependant, bien que ces modèles présentent cliniquement une myopathie avec une perte de force musculaire, ils semblent manquer de caractéristiques immuno-histologiques similaires à la maladie humaine, notamment l'infiltrat de cellules mononuclées, remplacé par des polynucléaires neutrophiles¹¹². Un modèle semblable, avec expression spécifiquement dans le muscle d'amyloïde- β humain chez le nématode *C.Elegans*, a permis de montrer l'induction d'un stress oxydatif ainsi qu'une activation de la réponse au stress via l'augmentation d'expression des protéines chaperonnes. Cependant, ce modèle ne présentait pas une réponse inflammatoire.

Une augmentation de l'expression des lymphotoxines spécifiquement dans les muscles, suite à l'observation d'une augmentation chez les patients à conduit au développement d'un autre modèle d'IBM. Cette modification conduisit à l'apparition d'une myosite histologique avec présence d'infiltrats cellulaires mononucléés et de surexpression du CMH-I, ainsi que perte de force musculaire. De plus, des signes d'autophagies étaient présent, notamment des agrégats protéiques dans les myofibres. Mais la composition de ceux-ci n'a pas été décrite.

Une surexpression du CMH-I dans le muscle, comme observé lors des myosites humaine, a inspiré un modèle transgénique le surexprimant de manière inductible dans le muscle¹²³. Ce modèle présente une faiblesse musculaire accompagnée d'une élévation des enzymes musculaire et la présence d'infiltrats mononucléés. Cependant, ces derniers étaient constitués de cellules de l'immunité innée et se caractérisaient par l'absence de lymphocytes B et T. D'abord décrit comme un modèle de PM, son étude plus approfondie l'a rapproché de l'IBM, notamment en raison d'un stress cellulaire important. La part non immunologique de l'atteinte a d'ailleurs été démontré par la suite, par la fusion de ce modèle avec des souris *Rag2^{-/-}*, conduisant à une toxicité directe du CMH-I dans le muscle, avec apparition de signes histologiques et cliniques similaires¹²⁴.

Une déplétion en synaptotagmine VII chez la souris, dont les premières études rapportent l'apparition de symptômes cutanés, pourrait engendrer un modèle d'étude de la DM. La synaptotagmine VII est une protéine membranaire fixant le calcium et impliqué dans l'exocytose vésiculaire et lysosomale, dont l'absence entraîne des problèmes d'intégrité

membranaire avec un risque d'exposition d'antigènes intracellulaires à la surface des cellules. Ce modèle reste cependant insuffisamment décrit, et ne permet pas de savoir si la maladie observée est due à la présence de lymphocytes auto-réactif contre le muscle ou à l'induction d'un stress cellulaire¹¹².

Si la pathogénie des modèles immunologiques repose quasi-uniquement sur l'induction d'une réponse immune et présente peu d'autres mécanismes, les modèles transgéniques présentés ici reposent principalement sur des mécanismes non immunologiques mais plus métabolique. La plupart d'entre eux sont basés sur la surexpression d'un gène et présentent ainsi les mêmes biais qu'une induction par immunisation. Bien qu'aucun de ces modèles ne permette d'étudier l'ensemble des MII, ils ont fortement contribué à la compréhension de certains mécanismes physiopathologiques, prérequis essentiels à la recherche clinique. De nombreuses équipes continuent de travailler au développement de modèles plus proches de la pathologie humaine, sans les biais dus aux conditions expérimentales.

Type de modèle	animal	Méthode	Forme humaine	Caractéristiques
Naturel	Chien	Myosite des muscles masticateurs canin	DM	Infiltrats de LyB et CD4+, CMH-II surexprimé sur l'adventia et l'endothélium des capillaires
		Polymyosite canine	PM	Myosites chroniques symétriques avec infiltrats des fibres par LyT CD8+, altérations génétiques de l'immunité innée et adaptative
Nutritionnel	Lapin	Régime enrichi en cholestérol	IBM	Myosite chronique avec dépôts intracellulaires de protéines β amyloïde et Tau hyperphosphorylées
Infectieux	Souris BALB/c, Swiss C3H, COH	Coxsackievirus B1	PM	Myosite aiguë progressive, implication des LyT en phase chronique, taux élevé de décès
	Souris CD-1, C57BL/6	Ross River Virus Chikungunya	PM	Myosite aiguë modérée, non spécifique avec arthrites et tendosynovites médiées par le complément
	Souris CBA/J	Trypanosoma cruzi	PM	Myosite aiguë modérée et myocardite induite par LyT CD8+
	Hamster syrien	Leishmania infantum	PM	Myosite aiguë modérée avec LyT CD8+, fibres nécrotique et CMH-I
Immunologique	Cochon de guinée, rats Lewis, souris SJL/J	Fraction de myosine B	PM	Myosite histologique sans signe clinique, réaction immunitaire à prédominance macrophagique
	Rats Lewis, Souris SJL/J, Balb/c, C57BL/6	Myosine purifiée	PM	Myosite modérée avec réaction immunitaire lymphocytaire et cytokinique, uniquement chez les souris SJL/J
	Rats Lewis, souris C57BL/6	fragment de protéine C	PM	Myosite modérée avec réaction immunitaire lymphocytaire et cytokinique
	C57BL/6	Splénocyte de souris avec myosite induite par protéine C	PM	Myosite modérée similaire à une myosite induite par protéine C
	Rats Wistar	Laminine	PM	Myosite histologique sans signe clinique, avec infiltrats endomysial de macrophages et de Ly.
	Souris C57BL/6, B6,G7, Nod.idd3/5	portion N-ter de HRS	PM	Myosite focale modérée et chronique, avec infiltrat CD4+ et CD8+.
Transgénique	Souris C57BL/6 et SJL/J	MCK-APP/PS1	IBM	Myopathie clinique chronique, avec infiltrats de cellules mononucléées et de vacuoles de β -amyloïde et de Thioflavine S
	Souris C57BL/6 et SJL/J	MLC-APP	IBM	Myopathie clinique chronique, sans infiltrats mais dépôts de β -amyloïde et de Thioflavine S dans les fibres de type 2M.
	Souris	HSA-Ltab	IBM	Myopathie clinique chronique, infiltrats de cellules immunitaires, surexpression du CMH-I et agrégats intracellulaires.
	Nématode <i>C.elegans</i>	Surexpression de β -amyloïde humaine dans les muscles	IBM	Myopathie clinique chronique avec immunoréactivité contre la β -amyloïde et la thioflavine S
	souris C57BL/6 H+T+	CMH-I	PM / IBM	Myopathie chronique induite par des mécanismes de stress cellulaire, sans infiltrats de cellules T.
	Souris C57BL/6 SytVII ^{-/-}	Synaptotagmin VII	DM	Myosites chroniques avec infiltrat endomysial de CD3+, CD11b+ et Ly-6G+, ANA positive.

Tableau 5 : Modèles animaux de myopathies inflammatoires idiopathiques : MCK-APP : combinaison du gène du précurseur protéique de l'amyloïde (APP) avec le promoteur de la créatine kinase musculaire (MCK); PS1 : gène de la préséniline 1; MLC-APP : fusion du gène APP et d'une chaîne légère de myosine (MLC) spécifique des fibres de type II; HSA-LTab : fusion des gènes de lymphotoxine α et β (LTab) au gène de l'actine α -squelettique humaine (HSA); H+T+ : fusion du gène du CMH-I à une séquence TRE (tetracycline response element) et au promoteur MCK; SytVII^{-/-} : déficit en synaptotagmine VII.

vi. Souris NOD *IcosL*^{-/-}

La plupart des modèles, si ce n'est l'ensemble, ont été développés à la suite d'observations cliniques : myopathies post-infectieuses, présence de dépôts d'amyloïde- β , surexpression du CMH-I et d'antigènes intracellulaires à la surface des cellules musculaires. Ils ne représentent ainsi qu'un fragment de la pathologie. Néanmoins, un autre modèle transgénique a récemment été décrit. Il est le fruit de l'étude de l'implication des voies de co-stimulation lymphocytaire dans le diabète. En effet, la délétion de certaines de ces voies chez la souris NOD (*Non Obese Diabetes*), modèle très utilisé dans l'étude de cette maladie, permet d'aggraver ou de prévenir l'apparition du diabète^{125,126}. Néanmoins, ces délétions vont souvent réorienter la réaction immunitaire vers d'autres organes. C'est le cas de la délétion de la voie du co-stimulateur inductible des lymphocytes T et son ligand (ICOS/ICOSL), dont la perte permanente d'un des deux membres est à l'origine de l'apparition d'une myosite spontanée¹²⁷.

Dans ces modèles, les signes cliniques débutent aux alentours de 20 semaines de vie, avec une perte de force musculaire symétrique au niveau des pattes arrière et rapidement progressive aux autres muscles. L'atteinte débute généralement au niveau des muscles extenseurs des doigts, puis à ceux du reste de la patte, conduisant à des rétractations des membres le long du corps (Figure 13). La souris va progressivement perdre en autonomie, avec une paralysie atteignant les pattes arrière, rendant ses déplacements difficiles. Ceci va être à l'origine d'une perte de poids, associée à une fonte musculaire importante. La souris va aussi perdre en force musculaire¹²⁸. La prévalence, à 40 semaines de vie, est plus importante chez les femelles que chez les mâles, atteignant 100% et 76% pour les femelles NOD *Icos*^{-/-} et *IcosL*^{-/-} respectivement.

Au niveau histologique, la maladie a tout d'abord été décrite par la présence d'infiltrats inflammatoires dans les muscles, les nerfs périphériques et plus rarement dans le système nerveux central. Ces infiltrats sont composés de lymphocytes T, macrophages et de quelques granulocytes¹²⁷. Ils ont été plus précisément caractérisés dans le modèle NOD *IcosL*^{-/-}, avec une présence détectable entre 16 et 24 semaines de vie de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, de macrophages et d'autres cellules myéloïdes visible en immunohistochimie¹²⁸. L'analyse en cytométrie en flux de la composition de l'infiltrat révélait aussi la présence de

lymphocytes B ainsi que de lymphocytes Treg. Ces derniers sont d'ailleurs en nombre réduit dans la rate et les ganglions des souris NOD *IcosL*^{-/-} par rapport au souris NOD *IcosL*^{+/+}. En plus de ces infiltrats, des signes de nécrose et de régénération musculaire étaient aussi visibles.

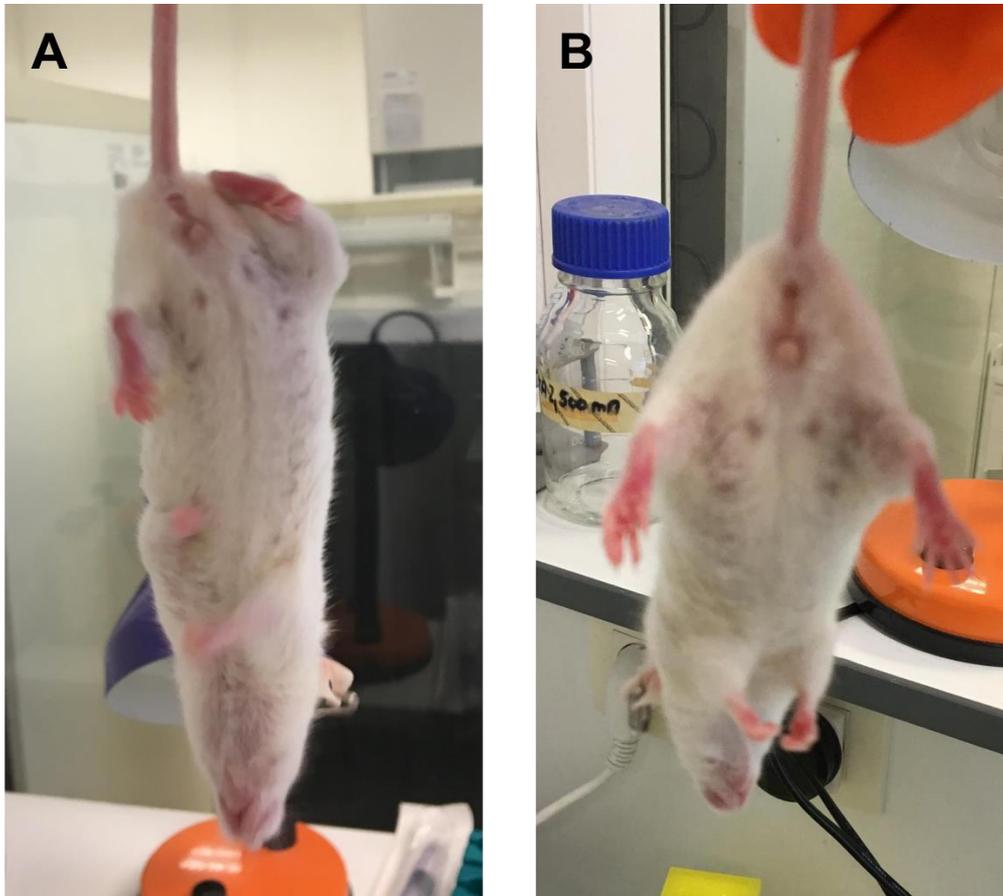


Figure 13 : Evaluation clinique de l'atteinte musculaire chez la souris NOD *IcosL*^{-/-} : la suspension de l'animal par la queue permet d'observer (A) une rétractation des pattes le long du corps contrairement à (B) une souris saine qui aura tendance à les écarter.

Afin de démontrer le caractère auto-immun de cette myopathie et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires, des expériences de transferts adoptifs de lymphocytes T CD4⁺ et/ou CD8⁺ de souris NOD *IcosL*^{-/-} vers des souris NOD.*scid* ne possédant pas de système immunitaire ont été effectuées. Ces expériences ont permis d'observer que les lymphocytes T CD4⁺ seul ou avec les CD8⁺ transféraient la maladie avec des signes cliniques et histologiques similaires à ceux observés chez les souris NOD *IcosL*^{-/-}, mais que les CD8⁺ seuls ne transféraient pas la maladie. De plus, des souris NOD *IcosL*^{-/-} dont le gène *C2ta*, codant pour le CMH-II, est délété ne développent pas la myopathie. Ce n'est pas le cas des

souris NOD *IcosL*^{-/-} dont le gène *β2-M*, codant pour la β2-microglobuline composant le CMH-I, est délété, sans que cela modifie l'incidence de la myosite. Ceci démontre le rôle essentiel des lymphocytes T CD4⁺ dans cette atteinte.

Ce modèle, bien qu'encore insuffisamment caractérisé, présente donc une myopathie auto-immune portée par les lymphocytes T CD4⁺. De par sa mise au point fortuite, il ne présente pas les biais immunologiques observés dans les autres modèles. Il pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des myosites, mais aussi la recherche de nouveaux auto-anticorps diagnostics ou pathogènes, à condition que ceux-ci soient transposables chez l'Homme.

5. Mécanismes physiopathologiques

Les mécanismes physiopathologiques des myosites restent aujourd'hui encore mal compris. Le diagnostic se faisant généralement lors de l'apparition d'une faiblesse musculaire chronique, le ou les éléments déclencheurs dans les myosites restent à identifier⁶⁰, notamment par l'utilisation de modèles animaux spontanées. Un certain nombre de mécanismes ont néanmoins pu être décrits (Figure 14).

Le processus de myorégénération présenté plus tôt repose sur la présence d'un côté de cellules satellites fonctionnelles dans le muscle et d'un autre sur les agents environnementaux qui contrôlent, lors des différentes phases, la prolifération, la différenciation et la fusion de ces cellules en myotubes. Parmi ces stimuli, la sécrétion par les cellules immunitaires de cytokines pro- puis anti-inflammatoires joue un rôle particulièrement important. Dans le cas des myosites, on observe une activation chronique des cellules immunitaires innées et adaptatives capables de reconnaître des auto-antigènes. Ces cellules, normalement transitoires, restent dans le muscle, et cette persistance peut être à l'origine de lésions musculaires. Cela a notamment été démontrée pour les neutrophiles, dont la participation à la destruction des fibres musculaires par la libération d'enzymes protéolytiques et la formation de pièges extracellulaires des neutrophiles (*Neutrophil Extracellular Trap* = NET) est désormais bien connue^{129,130}. Ce mécanisme, aussi appelé NETose, participe physiologiquement à retenir les agents infectieux ou molécules dangereuses au sein de la zone de contact, limitant la propagation au reste de l'organisme.

Elle va aussi avoir un rôle d'activateur du système immunitaire par stimulation des réponses IFN¹³¹. Une corrélation a pu être démontrée entre le taux de NET circulants et l'atteinte musculaire clinique et biologique, mais aussi avec certaines complications extramusculaires telles que les calcinoses et les PID. De plus, cette formation extracellulaire semble être induite par la présence de certains MSA, notamment les anti-MDA5.

La NETose est un phénomène déclenché en réponse à différents médiateurs de l'immunité innée, tel que les ROS, qui vont activer la MPO et différents enzymes conduisant à la décondensation de l'ADN. Elle participe ainsi à une boucle d'amplification inflammatoire avec d'autres cellules myéloïdes, dont les macrophages¹³¹. Reimann *et al* ont montré eux une augmentation de la densité des macrophages pro-inflammatoires dans le muscle, par l'intermédiaire de l'expression d'iNOS corrélée à une forte expression du facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF), une cytokine aux effets anti-apoptotiques, prolifératifs et chimiotactiques sécrétée par les macrophages, les lymphocytes T mais aussi les fibres musculaires¹³². Les patients atteints de myosite en général présentent une forte réponse Th1, avec une expression accrue de l'IFN γ , de l'IL-1 β et du TNF α , mais aussi de chimiokines telles que CXCL-9, CXCL-10 ou CCL-2^{133,134}. Cette réponse Th1 semble encore plus forte chez les patients atteints d'IMNM et serait à l'origine d'une recirculation de lymphocytes T mémoires, dont le taux est augmenté chez les patients atteints d'IBM. Elle entraîne l'induction et le maintien de macrophages pro-inflammatoires et amplifie ainsi la destruction musculaire. Longtemps considérée comme la seule réponse cytokinique impliquée dans les myosites, on sait aujourd'hui que la réponse Th17, via l'IL-17 et l'IL-22, ainsi que la réponse Th2, pourtant anti-inflammatoire, participent aussi au mécanisme pathogénique de ces maladies¹³⁵.

Outre l'IFN γ fortement exprimé lors de la réponse Th1, une signature IFN de type 1 a été observée dans le sang des patients atteints de DM ou de PM et corrélée à l'activité de la maladie¹³⁶. Une étude récente a montré que l'activation de la voie de l'IFN de type 1 dans les cellules musculaires *in vitro* induit l'atrophie des myotubes et altère l'angiogenèse des cellules endothéliales, des caractéristiques observées dans la DM¹³⁷. La destruction musculaire est également due à l'expression anormale du CMH-I à la surface des myocytes, induite par l'IFN γ et l'IL-1 β ^{133,135,138}. Cette expression est également induite par l'IL-17, produite par les lymphocytes Th17, qui potentialise les effets de l'IL-1 β . Certaines études ont

montré que la surexpression du CMH-I dans le muscle peut induire une myopathie par des mécanismes à la fois immunologiques, avec une cytotoxicité médiée par les CD8+, et non immunologiques^{124,139}. Ces mécanismes non immunologiques, démontrés par l'utilisation de souris *rag*^{-/-}, pourraient être à l'origine de certains signes pathologiques observés dans les IBM, notamment l'apparition de dépôts de protéines malformés dans des vacuoles intracellulaires, l'activation du système de réponse au stress du réticulum, notamment l'*Unfolded Protein Response*, ou encore des signes d'autophagie. Ils restent cependant secondaires aux mécanismes immunologiques, notamment à l'activation du système adaptatif. Ainsi, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ peuvent être activés par les cellules musculaires, qui agissent directement en tant que cellules présentatrices d'antigènes, mais aussi indirectement par l'intermédiaire des cellules dendritiques détectées dans l'infiltrat musculaire au cours de la myosite^{135,140}, ou encore par la stimulation des TLR par les DAMP⁸.

L'activation et la différenciation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène entraînent la formation d'un environnement permissif pour la maturation des cellules B, comme en témoigne la présence de cellules B CD19+ ou CD20+ et de plasmocytes CD138+, ainsi que l'expression du facteur d'activation des cellules B (BAFF)¹⁴¹. En plus de cet environnement permissif, une surexpression de CXCL13, un chemoattractant des lymphocytes B, a été détectée dans certaines myosites¹³³. Des MSA ont été identifiés chez plus de la moitié des patients¹⁴², et une étude récente a associé l'expression des cytokines Th1 et Th17 à l'agrégation et à la maturation des cellules B, par la formation de structures lymphoïdes ectopiques dans le muscle de la myosite¹⁴³. La pathogénicité des MSA n'a pas toujours été démontrée, mais ils sont souvent corrélés à la gravité de la myosite et aux maladies sous-jacentes, comme la PID, le syndrome de Raynaud ou le cancer¹⁴⁴. De plus, pour certains d'entre eux, le mécanisme d'action a été identifié, notamment dans l'IMNM, où les anti-HMGCR et les anti-SRP induisent l'atrophie des myofibres en augmentant la sécrétion d'IL-6, de TNF α et de ROS, et réduisent la formation de myotubes en diminuant celle d'IL-4 et d'IL-13¹⁴⁵. Cet effet pathogène semble également impliquer le système du complément⁹¹.

Des cellules anti-inflammatoires sont également présentes dans les muscles de patients atteints de myosites et certaines d'entre elles participent aux mécanismes pathologiques de ces maladies. L'IL-4, cytokine bien connue de la réponse Th2, est surexprimée dans les

myosites. Elle semble inversement corrélée à la sévérité de la destruction musculaire, comme en témoigne le taux d'enzymes musculaires dans le sérum¹⁴⁶. Cependant, d'autres cytokines anti-inflammatoires, dont le TGF β et l'IL-10, sont elles aussi plus fortement exprimées dans les myosites et semblent être impliquées dans la pathogenèse^{132,147}. L'exposition prolongée au TGF β et à l'IL-10 est corrélée à la durée de la myosite par le biais de leur association avec d'autres cytokines, en particulier chez les patients atteints d'IBM^{135,148}. L'exposition prolongée au TGF β 1, par exemple, est fortement impliquée dans la dérégulation de la régénération musculaire dans différentes myopathies, en inhibant l'activation et la différenciation des cellules satellites et la fusion des myocytes, mais aussi en augmentant la différenciation et l'accumulation des myofibroblastes et ainsi la fibrose¹⁴⁹⁻¹⁵¹. La fibrose musculaire est également générée par l'accumulation de FAP, qui échappent à l'apoptose induite par le TNF α et se différencient en cellules productrices de collagène de type 1 (fibroblastes) sous l'effet de la forte expression de TGF β 1 par les macrophages anti-inflammatoires^{152,153}. Cet échappement à l'apoptose pourrait également être dû à l'expression de facteurs de contrôle immunitaire (PD-L1, PD-L2 et CD47) par la FAP, comme l'a montré un modèle murin de myosite¹⁵⁴. La fibrose peut entraîner, comme dans l'IBM, une perturbation de l'architecture tissulaire et capillaire et une augmentation de la distance entre les fibres musculaires et les capillaires, responsable d'une hypoxie et d'un stress oxydatif¹⁵⁵.

Les fonctions des lymphocytes Treg sont également altérées dans la myosite, ce qui conduit à la dérégulation de la réponse immunitaire et à l'altération de la régénération musculaire. En effet, les dysfonctionnements des lymphocytes Treg ont été mis en évidence à la fois dans la DM et la PM et dans plusieurs modèles de myosite, qui présentent une maladie plus sévère lorsque les lymphocytes Treg sont épuisées. À l'inverse, l'injection de lymphocytes Treg fonctionnelles au moment de l'immunisation a bloqué la progression de la maladie¹⁵⁶. D'autre part, les lymphocytes Treg semblent être pleinement fonctionnelles au cours de l'IBM bien qu'une diminution de leur fréquence est observée dans la circulation et les muscles¹³⁴.

Si le point de départ des mécanismes pathogéniques dans les myosites n'a pas encore été identifié, en partie à cause du manque de modèles animaux spontanés, l'hypothèse d'une anomalie du système immunitaire qui serait seule responsable ou même à l'origine de

la maladie est controversée, surtout dans l'IBM^{60,157}. Les cellules musculaires participent à la pathogenèse et à l'aggravation de la maladie, par l'activation de plusieurs mécanismes délétères et non entièrement compris, impliquant des défauts du réticulum endoplasmique et/ou des mitochondries. Si l'expression du CMH-I à la surface des cellules musculaires est souvent liée à l'infiltration de leucocytes, il a été démontré qu'elle peut être induite par le stress du réticulum endoplasmique, que sa présence peut être détectée avant l'infiltration et qu'elle peut affecter la contractibilité des fibres musculaires¹⁵⁸. Au-delà de la destruction musculaire, qui reste chroniquement bloquée dans un état pro- et/ou anti-inflammatoire sans résolution, l'altération des capacités d'activation et de prolifération des cellules satellites est également impliquée dans la maladie. Les myoblastes de patients IBM présentent un taux de prolifération et une capacité de clonogénicité réduits *in vitro* par rapport aux myoblastes de donneurs sains, probablement en raison de l'épuisement réplicatif et de la sénescence ainsi que de l'exposition chronique aux cytokines pro et anti-inflammatoires¹⁵⁹. Cette observation a été confirmée *in vivo*, avec une plus faible expression de MyoD¹⁵⁵. De plus, la persistance de l'expression de la myogénine observée chez ces patients pourrait refléter un trouble de la différenciation des myoblastes et de la maturation des fibres musculaires.

Les myosites représentent un groupe hétérogène de maladies qui font intervenir des mécanismes immunitaires et non immunitaires. Dans ces maladies, le système immunitaire agit à la fois sur la dégénérescence et la régénération musculaire, avec une stimulation des cellules progénitrices musculaires par des cytokines. Si la suppression de la myosite peut apparaître comme une solution efficace pour stopper ou ralentir la maladie, elle peut s'avérer insuffisante, voire parfois aggravante, en raison des mécanismes non immunitaires ou du défaut de régénération des muscles. Dans ces cas, de nouveaux traitements, agissant aussi sur ces mécanismes, doivent être mis au point.

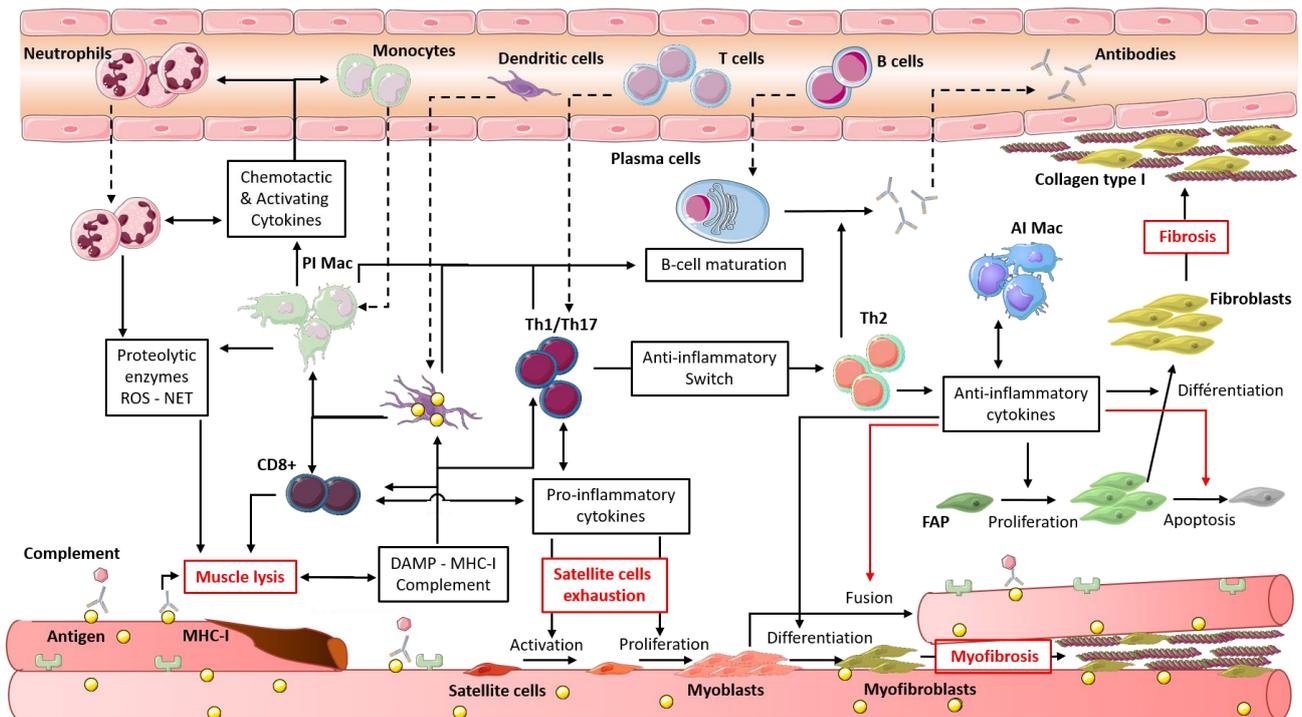


Figure 14 : Mécanismes pathologiques des myosites : selon la zone musculaire, les cellules immunitaires adaptatives maintiennent un environnement pro- ou anti-inflammatoire par la sécrétion de cytokines. L'environnement pro-inflammatoire conduit à une accumulation de cellules myéloïdes, principalement des neutrophiles, formant des réseaux par NETose, et des macrophages, qui sécrètent des enzymes protéolytiques et des ROS. Ces molécules dégradent les myotubes qui libèrent des signaux qui alimentent les cellules pro-inflammatoires (MIF, DAMP). De plus, les myofibres surexpriment des antigènes musculaires et le CMH-I, ce qui stimule encore plus de cellules adaptatives, directement ou via des anticorps spécifiques et/ou le système du complément. Les anticorps spécifiques sont générés par les plasmocytes, eux-mêmes activés par l'expression de BAFF par les ; macrophages, les DC et les lymphocytes Th1 et Th17. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent également la prolifération et l'activation des cellules satellites, jusqu'à épuisement. L'environnement anti-inflammatoire remplace les macrophages pro-inflammatoires (PI Mac) par des macrophages anti-inflammatoires (AI Mac), qui sécrètent de grandes quantités de TGF- β . Cette cytokine induit e la fibrose par la différenciation des myoblastes en myofibroblastes, en inhibant la fusion des myotubes, et par la différenciation des FAP en fibroblastes, en inhibant l'apoptose de ces cellules induite par le TNF- α . L'accumulation de fibrose entraîne des troubles musculaires et vasculaires, ainsi qu'une perte de force. Extrait de Gandolfi et al¹⁶⁰

6. Prises en charge des myosites

La plupart des traitements utilisés dans les myosites ciblent les acteurs de l'inflammation (Tableau 6). L'approche thérapeutique la plus courante reste les glucocorticoïdes, généralement prescrit seuls en première intention puis associés à d'autres molécules immunosuppressives dans les cas réfractaires¹⁶¹. Les glucocorticoïdes vont agir au niveau génomique, par la fixation sur les promoteurs de certains gènes grâce aux récepteurs cytoplasmiques aux glucocorticoïdes. Ils vont alors avoir un effet transrépresseur sur de nombreux gènes de l'inflammation, dont des cytokines (Interleukine, TNF α , IFN γ), chémokines (IL-8), enzymes (iNOS, cyclo-oxygénase-2, protéase, lysozyme, C3 convertase), molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, L-sélectine, LFA-1) et récepteurs (IL-2R). S'ils sont efficaces chez un grand nombre de patients, ils présentent certains effets secondaires, notamment au niveau musculaire, limitant dans certains cas leur usage.

Bien que les traitements immunosuppresseurs présentent aussi de nombreux effets indésirables, ils ont l'avantage de permettre une action synergique avec les glucocorticoïdes, réduisant la dose nécessaire de corticostéroïdes et entraînant moins d'effets secondaires. Ces associations sont ainsi plus efficaces pour améliorer la fonction musculaire, et agissent également sur les maladies associées à la myosite comme la PID. Les principaux immunosuppresseurs utilisés sont :

- l'hydroxychloroquine, inhibant l'activation des TLR ainsi que celle des lymphocytes T et altérant la présentation des auto-antigènes de manière sélective ;
- le méthotrexate, dont l'action sur différentes enzymes du cycles des folates va conduire à l'inhibition du recrutement leucocytaire et à l'induction de l'apoptose des lymphocytes activés, ainsi qu'à une libération d'adénosine avec un effet immunomodulateur ;
- l'azathioprine, analogue des bases puriques dont l'insertion dans l'ADN et l'ARN va conduire à l'inhibition de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose ;
- le mycophénolate mofétil, inhibiteur de la synthèse des bases puriques, conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire ;

- la ciclosporine-A et le tacrolimus sont des inhibiteurs de calcineurine, dont le blocage entraîne une inhibition de la déphosphorylation du facteur de transcription NF-AT et la synthèse de l'IL-2, principale cytokine impliqué dans l'activation lymphocytaire ;
- le cyclophosphamide, agent alkylant inhibant la transcription et la réplication de l'ADN avec un effet anti-prolifératif prédominant sur les lymphocytes B.

En plus de ces traitements, des agents biologiques ont également été testés dans les myosites¹⁶² :

- les IVIg, considérées comme présentant des propriétés immunomodulatrices, sont utilisées depuis plusieurs dizaines d'années dans différentes maladies auto-immunes. Elles présentent en effet des propriétés immunomodulatrices de mieux en mieux décrites, dont un potentiel de neutralisation des auto-anticorps, une augmentation de leur dégradation (par inhibition de leur recyclage par le récepteur du fragment commun FcRn), une diminution d'un grand nombre de médiateur de l'inflammation (complément, cytokines et chimiokines) et une de l'activité des macrophages¹⁶³. En plus de cet effet sur le versant immunitaire, certaines études ont démontré un effet promyogénique chez l'animal, que l'on retrouve cliniquement chez l'Homme¹⁶⁴.
- les anticorps monoclonaux sont aussi utilisés, tels que le Rituximab, anti-CD20, déplétant les lymphocytes B et ayant montré une efficacité importante dans d'autres maladies auto-immunes, le Tocilizumab, anti-IL-6, première cytokine de l'inflammation, l'Infliximab, anti-TNF α dont on a décrit plus tôt l'importance dans les mécanismes pathologiques, l'Alemtuzumab, anti-CD52 ayant un effet déplétif sur les lymphocytes B et T, le Belimumab, anti-BAFF bloquant la maturation des lymphocytes B, le Basiliximab, anti-IL-2R bloquant l'activation lymphocytaire, ou encore le Sifalimumab anti-IFN α présentant un effet intéressant dans les DM¹⁶⁵. Le bimagrumab, anti-récepteur à l'activine IIb bloquant l'action négative de la myostatine sur la croissance musculaire, le canakinumab, un anti-IL-1 β , cytokine co-localisée avec les précurseurs du β -amyloïde dans le muscle et induisant son expression ou encore l'Alemtuzumab ont été testés dans le traitement spécifique des IBM. Leur efficacité est toujours en cours d'évaluation pour un grand nombre d'entre eux, et si certains ont déjà montré un intérêt dans la prise en charge de ces patients (Rituximab, Eculizumab, Basiliximab ou encore Alemtuzumab), d'autres n'ont permis

aucune amélioration et leur développement a pour certains été abandonné (Sifalimumab, Infliximab, Bimagrumab, Canakinumab)

- D'autres biothérapies sont aussi utilisées de manière empirique, comme l'Anakinra, antagoniste des récepteurs IL-1R, les protéines de fusion tel que l'Abatacept, ciblant les CD80/CD86 impliqué dans l'activation leucocytaire, ou l'Etanercept, récepteur capturant le TNF α ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Plus récemment, les inhibiteurs de la Janus Kinase Tofacitinib et Ruxolitinib, agissant sur la voie de signalisation de l'IFN, ont été instaurer dans la prise en charge de certains patients. Afin d'entrer totalement dans les pratiques cliniques, ces traitements nécessite d'être mieux étudié notamment au travers d'essais cliniques¹⁶².

1^{ère} ligne	Corticothérapie +/- en association Methotrexate Azathioprine
2^{ème} ligne	Association Methotrexate/Azathioprine Mycophénolate mofétil (PID)
3^{ème} ligne	Ciclosporine (PID) Tacrolimus (PID) Cyclophosphamide (PID, connectivites) Rituximab (PID)
Adjuvant	Immunoglobulines intraveineuses Echanges plasmatiques
Essais cliniques	<ul style="list-style-type: none"> - mAb : Belimumab (anti-BAFF), Alemtuzumab (anti-CD52), Tocilizumab (anti-IL-6R), Sifalimumab (anti-IFNα), Basiliximab (anti-IL-2R), Bimagrumab (anti-RAIIb), Canakinumab (anti-IL-1β), Eculizumab (anti-C5) - Biothérapies : Abatacept (CTLA4-Fc), Anakinra (antagoniste IL-1R), Etanercept (TNFα-R), Tofacitinib et Ruxolitinib (inhibiteur JAK) - Autres : IFN-Kinoid (immunisation anti-IFNα), BAF321 (S1P récepteur modulateur), arimoclomol...

Tableau 6 : Prise en charge des myosites

Si ces traitements sont efficaces dans la plupart des cas de DM et de PM réfractaires à une première et une deuxième ligne, certains patients restent réfractaires ou rechutent. De plus, ces traitements semblent n'apporter que peu de bénéfices voire même exacerber la maladie chez les patients atteints d'IBM, qui restent dans une impasse thérapeutique⁵⁸. Dans ce sous-type de myosite, de nouvelles molécules sont en cours d'évaluation, comme l'Arimoclomol, un amplificateur de l'activation du Heat Shock Factor 1, qui augmente l'activité des protéines chaperonnes et donc la voie de réparation des protéines

malconformées, ou la follistatine, un antagoniste de la myostatine, dont le virus adéno-associé qui la code est injecté par voie IM¹⁶⁹.

Enfin, les thérapies cellulaires sont occasionnellement utilisées pour traiter les patients atteints de PM ou de DM réfractaires, mais très peu de cas ont été rapportés. L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, utilisée pour remplacer le système immunitaire autoréactif après son ablation par chimiothérapie, a montré des avantages, mais avec un risque élevé d'effets secondaires¹⁷⁰⁻¹⁷³. Plus récemment, la découverte des effets immunomodulateurs des cellules souches mésenchymateuses (MSC) provenant de la moelle osseuse (BM-MSC (*Bone Marrow*)) ou du sang du cordon ombilical (UC-MSC (*Umbilical Cord*)), en plus de leur effet régénérateur bien connu, a conduit à leur utilisation pour le traitement de patients atteints de maladies auto-immunes réfractaires, y compris la myosite¹⁷⁴. Si ces types de cellules souches semblent plus sûrs, le caractère invasif du prélèvement et le faible taux de cellules souches récupérées à partir de ces sources restent des limites importantes à leur utilisation. Cependant, une autre source de MSC peut être utilisée, permettant par un prélèvement moins invasif d'obtenir une grande quantité de ces cellules : le tissu adipeux.

III. Les thérapies cellulaires dérivées du tissu adipeux

1. Historique et développement des thérapies cellulaires dérivées du tissu adipeux

i. Tissu adipeux : physiologie et utilisations cliniques

Le tissu adipeux est un organe essentiel pour le fonctionnement de l'organisme. Outre ses différentes fonctions métaboliques et de thermorégulation, il joue aussi un rôle dans l'homéostasie hormonale et immunitaire. Il représente 15 à 25% du poids corporel chez l'Homme. Il existe deux grands types de tissu adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux marron, ce dernier étant principalement présent à la naissance mais se réduit progressivement chez l'Homme, contrairement aux rongeurs. Le WAT peut être viscéral, au contact des organes, ou bien sous-cutané. Sa fonction principale va être différentes selon son emplacement :

- Le tissu adipeux viscéral va jouer un rôle structurel, servant de support adaptatif et protecteur vis-à-vis de l'environnement. Il va ainsi protéger les organes face aux contraintes mécaniques et de pressions, mais aussi permettre l'absorption et la répartition de la masse corporelle au niveau des points d'appuis (palmes des mains et plantes des pieds) et autour des articulations. Ce tissu adipeux, par son caractère structurel, varie peu au cours de la vie.
- Le tissu adipeux sous-cutané, ainsi que celui au niveau de la cavité abdominale, vont occuper un rôle d'isolation thermique et de réserve d'énergie, sous forme lipidique dans les adipocytes. Contrairement au tissu adipeux viscéral, ils vont varier selon les conditions métaboliques, s'hypertrophiant ou se réduisant selon les apports alimentaires, mais aussi selon l'âge.

D'un point de vue structurel, le tissu adipeux est organisé en lobule d'adipocytes entouré par du tissu conjonctif soutenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs (Figure 15). Ce tissu de soutien entourant l'amas d'adipocytes est aussi appelé la fraction vasculaire stromale (FVS), et est constituée de précurseurs adipocytaires, de MSC, de progéniteurs endothéliaux (EPC), de péricytes, cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux sanguins, ainsi que de leucocytes.

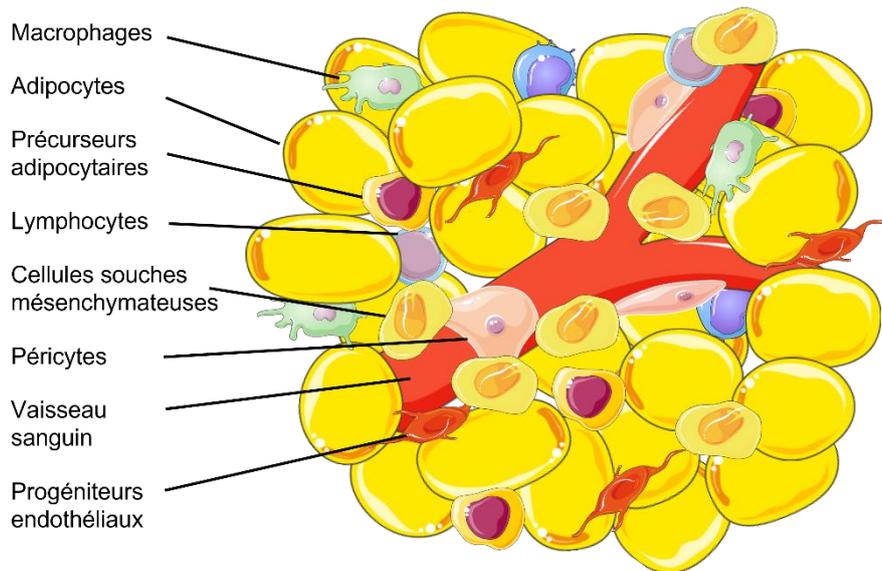


Figure 15 : Composition d'un lobule de tissu adipeux : le lobule est constitué d'adipocytes en amas entourés de fraction vasculaire stromale, tissu conjonctif de soutien contenant de nombreuses populations cellulaires.

En plus de ces fonctions de structure et de réserve énergétique, le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un organe endocrinien, notamment par la découverte de la sécrétion de différentes adipokines, cytokines dérivées du tissu adipeux et agissant sur l'homéostasie énergétique¹⁷⁵. On peut citer parmi elles la leptine, qui agit sur l'hypothalamus et est à l'origine de la sensation de satiété régulant la prise alimentaire et donc les apports énergétiques¹⁷⁶, et l'adiponectine, connue pour sensibiliser les tissus à l'insuline et possédant des propriétés anti-inflammatoires¹⁷⁷.

L'utilisation clinique du tissu adipeux débute dès la fin du XIX^{ème} siècle. Gustav Neuber et Victor Czerny l'utilisèrent, sous forme de bloc de tissu entier, pour combler des cicatrices secondaires à d'autres maladies¹⁷⁸. En 1992, Hollander combine du tissu adipeux humain à du tissu adipeux de béliers afin d'améliorer le traitement de ces cicatrices. Progressivement, le traitement se rapproche de l'utilisation actuelle du tissu adipeux, d'abord sous forme de petits morceaux, puis sous une forme plus dissociée dans des malformations congénitales ou traumatiques. Beaucoup utilisée durant le début du XX^{ème} siècle en raison des traumatismes de guerre, l'efficacité de cette technique est transitoire, la moitié des adipocytes disparaissant en moins de un an, laissant une formation fibrotique à la place¹⁷⁹. Dans les années 80, la technique est redécouverte grâce à l'invention de la

liposuction, permettant l'obtention d'un produit cellulaire plus fluide et une utilisation plus corrective que réparatrice : c'est l'avènement du lipofilling.

Cette technique sera par la suite améliorée pour réduire la résorption du tissu adipeux injecté. Tout d'abord par Chajchir en réduisant la rupture des adipocytes lors du prélèvement, en éliminant les cellules mortes et débris par lavage en solution saline puis en greffant les cellules sur lit vascularisé¹⁸⁰. Puis par Coleman dans les années 90 en améliorant les dispositifs de prélèvement et d'injection, et en ajoutant une étape de centrifugation permettant d'éliminer les liquides infiltrants le prélèvement (sang, eau, huile) et d'obtenir un produit de meilleure qualité avant implantation¹⁸¹. Des études ont montré par la suite que cette centrifugation apportait aussi une concentration plus importante de MSC et d'EPC dans une forme plus dense du lipoaspirat, permettant une meilleure prise et survie de la greffe¹⁸².

Les procédures de lipofilling ont continué d'évoluer, vers une fluidification de plus en plus importante du produit. Partant du « macrofat », autre nom du lipoaspirat classique, en passant par le « microfat », utilisant des canules plus fines pour le prélèvement et l'injection, pour aboutir au « nanofat », correspondant à du « microfat » filtré puis émulsifié par passages entre deux seringues et administré au travers d'une aiguille encore plus fine (27 gauges)¹⁸³. Cette étape d'émulsification entraîne la destruction de l'ensemble des adipocytes, tout en maintenant vivante les cellules stromales, permettant de conserver leurs capacités prolifératives. La procédure de production du nanofat a elle aussi été améliorée, par l'ajout de centrifugation et de filtration automatisée, conduisant à l'« *evo-modified-nanofat* » et au « supercharged-nanofat », forme proche de la FVS par l'élimination de 95% des adipocytes matures¹⁸⁴. Ces thérapies rejoignent progressivement le champ de la médecine régénérative, notamment dans le traitement des cicatrices post-chirurgicales grâce à leurs capacités régénératives et anti-fibrotiques, et quittent celui de la chirurgie esthétique par perte de l'effet volumateur du lipofilling classique¹⁸⁵.

ii. Cellules souches adultes : de la moelle au tissu adipeux

Le terme de cellule souche apparaît dès la fin du XIX^{ème} siècle pour décrire les cellules pouvant donner naissance à la lignée germinale. On les caractérise alors comme des cellules capables de se régénérer et de se différencier en d'autres cellules d'un point de vue fonctionnel¹⁸⁶. Les premières cellules souches non embryonnaires ou adultes découvertes ont été les cellules souches hématopoïétiques. Si l'hématopoïèse était alors déjà grandement connue, beaucoup pensaient qu'il existait plusieurs précurseurs cellulaires correspondant aux lignées lymphoïdes, siégeant dans la moelle, et myéloïdes, siégeant dans la rate. D'autres au contraire visualisaient une cellule commune unique, la cellule souche hématopoïétique (HSC)(Figure16)¹⁸⁷. Il faudra cependant attendre le milieu du XX^{ème} siècle pour que ce débat soit clos avec la démonstration de la présence d'une cellule commune unique transmettant certains marqueurs génétiques à l'ensemble des cellules de sa lignée¹⁸⁸. Le terme de cellule souche repose alors sur deux critères : l'auto-renouvellement et la capacité de différenciation en différents types cellulaires (pluri ou multipotence).

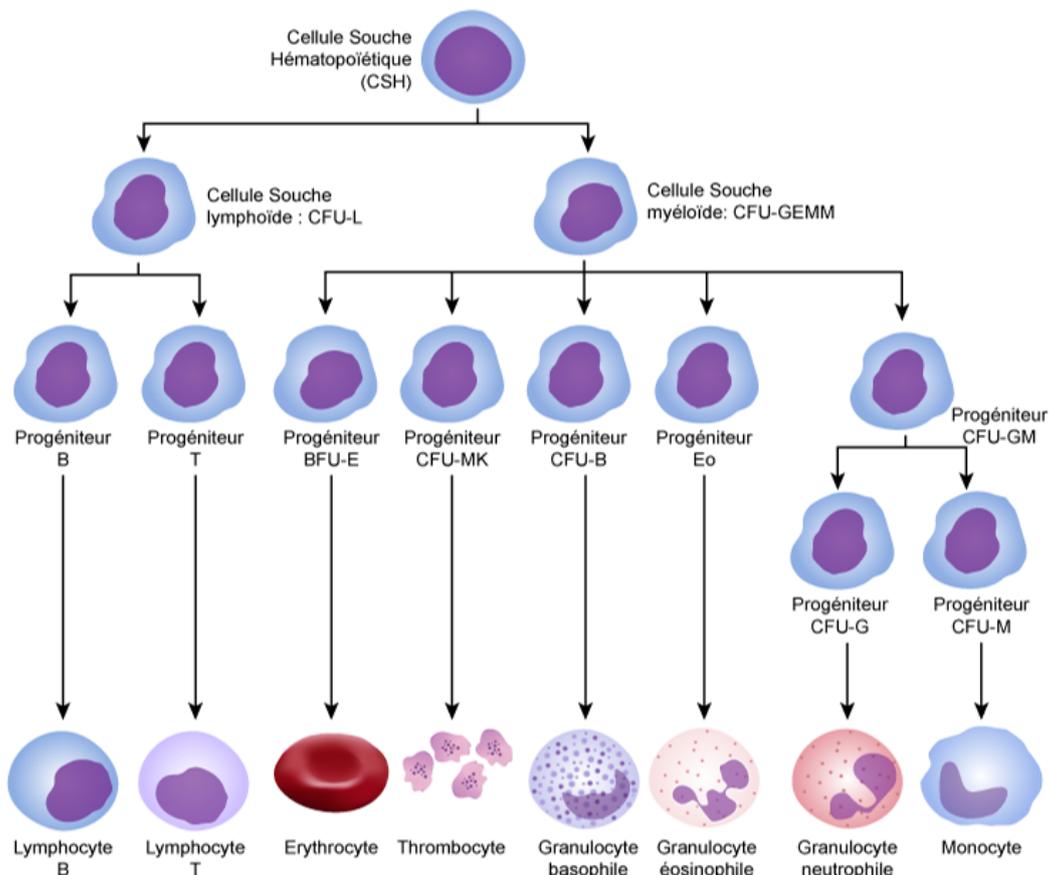


Figure 16 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

L'utilisation des HSC en thérapie n'a pas attendue cette confirmation. Les premières greffes de moelle osseuse ont eu lieu vers le milieu des années 50, chez des patients atteints de différentes formes de cancer hématologique (leucémie, myélome) ou solide (carcinome ovarien, cancer pulmonaire)¹⁸⁹. La source des HSC varie en fonction des cas rapportés, mais provenait généralement de cadavre d'adulte ou de fœtus, de côtes retirées lors d'interventions chirurgicales ou de biopsie iliaque. Le taux de survie était presque nul, dû aux nombreux effets indésirables de ces thérapies : rejet de greffe, maladie du greffon contre l'hôte (GVHD = *Graft Versus Host Disease*) ou encore infections opportunistes à la suite du conditionnement de greffe. La découverte du système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) en 1958 permit de comprendre en partie l'origine de ces échecs. Il faudra attendre 1968 pour qu'une greffe HLA identique entre membre d'une fratrie réussisse dans le traitement de déficit immunitaire¹⁹⁰. C'est seulement au cours des années 70 que cette technique s'élargira aux hémopathies malignes, puis dans les années 80 que l'on commencera à greffer des HSC de donneurs non apparentés, face au manque de greffons intrafamiliaux. Dans les années 90, deux autres sources d'HSC viennent s'ajouter : les cellules souches du sang périphérique qui représentent aujourd'hui la majorité des greffons, et les cellules souches du sang de cordon ombilical, mieux tolérées d'un point de vue immunologique. Bien qu'elles restent principalement utilisées en cancérologie, les transplantations d'HSC sont aujourd'hui aussi utilisées dans d'autres pathologies telles que des déficits immunitaires, maladies héréditaires hématologiques ou encore maladies auto-immunes. Ces utilisations restent cependant limitées par le fait que les HSC ne peuvent produire que des cellules de la lignée hématopoïétique.

L'étude des HSC a permis de mettre en évidence une autre population de cellules souches au sein de la moelle osseuse. En effet, dans les années 60, des cellules progénitrices, pouvant se différencier en fibroblaste ont été identifiées dans la moelle osseuse de souris¹⁹¹. L'étude de ces cellules, pouvant être isolées en culture grâce à leur capacité d'adhérence au plastique, a ensuite montré leur multipotence et leur origine mésodermique. En effet, elles présentent la capacité de se différencier notamment en ostéoblastes, en chondrocytes, en adipocytes ou en myoblastes. Le caractère d'auto-renouvellement clonal a lui aussi été démontré à cette époque, par l'utilisation d'un test de formation de colonies (CFU) consistant à mettre en culture un nombre restreint de cellules sur une surface importante, permettant la formation de colonie cellulaire dérivant d'une seule cellule¹⁹². L'incorporation

de thymidine tritiée lors de ce test permet de confirmation la filiation des cellules à une cellule unique.

Il faudra attendre 1992 pour que des MSC soient isolées à partir de la culture expansive de moelle osseuse et quelques années supplémentaires pour définir des critères spécifiques les caractérisant. Ces critères ont notamment été proposés par l'ISCT (*International Society for Cell and gene Therapy*) et l'IFATS (*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) et comptent 4 points¹⁹³ :

- L'adhérence au plastique, permettant l'isolation de ces cellules
- L'expression des marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105
- L'absence d'expression des marqueurs de surface CD45, CD19, CD14, CD11b, CD34, CD79 α et HLA-DR
- La capacité de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in vitro*

Le premier essai clinique impliquant des MSC a eu lieu en 1995¹⁹⁴. Il s'agissait alors d'un essai de phase I, vérifiant la faisabilité de l'obtention et de l'administration de BM-MSC chez des patients atteints d'hémopathies malignes en rémission. En 2000 fut publié les premiers résultats d'un essai à visée thérapeutique utilisant des BM-MSC¹⁹⁵. L'objectif était d'améliorer la rémission hématologique et d'améliorer la prise des HSC à la suite d'une greffe avec conditionnement par chimiothérapie chez des patientes atteintes de cancer du sein. Il permit à nouveau de démontrer l'innocuité de l'administration des BM-MSC. En 2001 débuta le premier essai clinique évaluant les BM-MSC dans une indication immunologique : la GVHD cortico-résistante après transplantation allogénique d'HSC¹⁹⁶. En plus de montrer l'efficacité du traitement dans cette indication, cet essai démontra aussi l'absence de différence d'effet et de tolérance lors de la transfusion de BM-MSC de donneurs apparentés, de donneurs haplo-identiques ou de donneurs HLA non-compatibles. Hélas, un essai de phase III évaluant le Prochymal[®], BM-MSC industrielles produites par OSIRIS Therapeutics, n'a pas confirmé les résultats obtenus lors de l'essai précédent, faisant se poser la question de l'équivalence entre les cellules préparées par l'industriel et celles préparées par des académiques¹⁹⁷. Cet essai fut reconduit quelques années plus tard dans une population pédiatrique et en utilisant des BM-MSC provenant de banques de cellule et non d'une forme commerciale, et elle confirma l'effet des BM-MSC dans cette indication, puis dans d'autres indications¹⁹⁸. Cet échec du Prochymal mis en avant le manque d'analyses fonctionnelles

avant administration ainsi que du manque d'homogénéité et de réglementation dans le choix des tests à appliquer¹⁹⁹. Cette question est d'autant plus vraie avec la découverte de nouvelles sources de MSC utilisable en clinique : le cordon ombilical, comme pour les HSC, mais aussi le tissu adipeux, la pulpe dentaire ou le placenta, ces deux dernières restant moins décrites. L'isolation des MSC de cordon ombilical (UC-MSC), plus précisément de la gelée de Wharton, date de 1991²⁰⁰ et celles du tissu adipeux (ADSC) de 2001²⁰¹. Malgré certaines études rapportant des différences fonctionnelles entre les BM-MSC, UC-MSC et ADSC²⁰², elles répondent toutes aux mêmes critères de caractérisation, définis par l'ISCT en 2013¹⁹³.

iii. Fraction vasculaire stromale : découverte et composition

La première extraction de FVS a eu lieu dans les années 60 et avait pour objectif non pas son utilisation mais l'étude des adipocytes²⁰³. Ces cellules ont pu être extraites du tissu adipeux par digestion enzymatique par une collagénase à 37°C pendant 45 minutes, puis centrifugation permettant de séparer une couche d'adipocytes, flottant au-dessus, une phase aqueuse contenant la collagénase, et enfin un culot cellulaire contenant la FVS. Il faudra attendre quelques années de plus pour découvrir les capacités prolifératives de la FVS, bien que la forme fibroblastique et la présence de vacuoles lipidiques leur fasse conclure qu'il s'agit de précurseurs adipocytaires²⁰⁴. Dans les années 80, la FVS est utilisée pour ces propriétés pro-angiogéniques et c'est seulement au milieu des années 90 que la composition de la FVS commence à être déterminée. Il faudra cependant attendre 2001 pour que les MSC présents dans la FVS puissent être isolés grâce à la culture expansive sur plastique²⁰¹.

Selon les recommandations de l'ISCT et de l'IFATS, la FVS est composée majoritairement de MSC (15-30%), de EPC (10-20%), de péricytes (3-5%), cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux sanguins, ainsi que de leucocytes (25-45%)¹⁹³(Tableau 7). Elles définissent aussi par identifications de différents marqueurs cellulaires positifs (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD34) et négatif (CD31, CD45) quantifiable par cytométrie flux, par l'utilisation du test de formation de colonies (CFU) afin d'évaluer les propriétés prolifératives de la FVS et des ADSC, ainsi que par des protocoles de différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes. De manière générale, la cytométrie en flux permet facilement de différencier uniquement 4 marqueurs de surface :

CD45 (leucocytes), CD34 (MSC), CD31 (EPC) et CD146 (péricytes lorsqu'il est regardé sur les cellules négatives pour les trois premiers marqueurs)²⁰⁵.

Cellules	Proportion	Marqueurs
Leucocytes	25-45%	CD45 ⁺
MSC	15-30%	CD45 ⁻ CD34 ⁺ CD31 ⁻
EPC	10-20%	CD45 ⁻ CD34 ^{dim} CD31 ⁺
Péricytes	3-5%	CD45 ⁻ CD34 ⁻ CD31 ⁻ CD146 ⁺

Tableau 7 : Proportion et marqueurs d'identification des principales populations cellulaires de la FVS

Parmi les leucocytes composant la FVS, on retrouvera principalement des monocytes/macrophages, des lymphocytes et des neutrophiles. Les macrophages résidants du tissu adipeux sont principalement anti-inflammatoires. Ils se situent dans l'espace interstitiel, entre les adipocytes, et participent à l'homéostasie du tissu. Une sous population de macrophages, exprimant le CD34, a aussi montrée des propriétés proches de MSC, notamment l'adhérence au plastique, les capacités de prolifération ainsi que de différenciation en cellules mésenchymateuses²⁰⁶. Les lymphocytes présents sont principalement des lymphocytes T ainsi que des cellules NKT (*Natural Killer T*), mais très peu de lymphocytes B ont été retrouvés. Parmi ces lymphocytes T, une proportion importante de Treg a été mise en évidence.

Les MSC, déjà décrites plus haut, sont des cellules multipotentes pouvant s'autorenouveler. Elles participent grandement aux différentes propriétés de la FVS que l'on décrira ensuite, à la fois par contact cellulaire et par communication paracrine par l'intermédiaire notamment de facteurs de croissance et de cytokines [74]. Le tissu adipeux est une source importante de MSC qui sont facilement accessibles et en grande quantité, contrairement à la moelle osseuse. De plus, elles présentent, comme les autres MSC, une faible immunogénicité de par l'absence d'expression du CMH-II et une faible expression du CMH-I²⁰⁷, les rendant particulièrement propices à la greffe.

Les EPC ont d'abord été isolés du sang périphérique, puis de la moelle osseuse et finalement du sang de cordon ombilical. Les EPC du tissu adipeux partagent de nombreux points communs avec les autres EPC, notamment l'expression du CD31 et du récepteur 2 au VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*), dont la fixation leur donne leur capacité de prolifération et de formation de réseaux ressemblant à des capillaires sanguins *in vitro*²⁰⁸.

Enfin les péricytes sont des cellules vasculaires murales, présentent dans la plupart des organes et homologues des cellules musculaires lisse des gros vaisseaux au niveau des microvaisseaux. Ils sont caractérisés par l'expression du CD146 et du récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFβR) et l'absence d'expression du CD45, CD34 et CD31. Ils jouent un rôle de régulateur de l'angiogénèse, en couvrant et inhibant les EPC présents dans les vaisseaux. Ce rôle a notamment été démontré lors de l'inflammation, la libération de PDGFβ par les macrophages pro-inflammatoires conduisant au décrochage des péricytes et l'activation de EPC²⁰⁹. Leur action inhibitrice ne s'arrête pas au PDGFβR, mais passe aussi par le récepteur au VEGF présent à leur surface qui va capturer et séquestrer ce facteur de croissance, empêchant son action sur les EPC et donc l'angiogénèse²¹⁰.

L'ensemble de ces cellules sont étroitement connectées entre elles : les EPC et les cellules endothéliales sont des formes plus matures dérivant de l'angioblaste, lui-même affilié à l'hémangioblaste qui donne aussi naissance aux HSC et à la lignée hématopoïétique²¹¹. Les HSC peuvent eux se différencier en monocyte CD14⁺, dont certains peuvent prendre un phénotype pro-angiogénique et pourrait par la suite se différencier en cellules endothéliales. D'un autre côté, des monocytes CD45⁺CD14⁺CD34⁺, précédemment cités, possède des capacités de prolifération et de différenciation mésenchymateuse proche des MSC²⁰⁶. Les péricytes et les MSC sont aussi étroitement liés, de par leur fonction commune (prolifération et différenciation) et les positions dans les vaisseaux sanguins²¹².

La proximité et les marqueurs communs des différentes populations cellulaires de la FVS rendent difficiles l'étude de la composition de cette thérapie, et donc des cellules impliquées dans son effet thérapeutique. Malgré les recommandations de l'ISCT, la terminologie et les critères d'identification des cellules manquent encore d'homogénéité, compliquant l'interprétation des résultats d'essais cliniques²¹³. De plus, il existe pour la FVS une forte hétérogénéité de composition en fonction de caractéristique physiologique des donneur (Sexe, Age, Corpulence, pathologies sous-jacente)²¹⁴⁻²¹⁹, du tissu adipeux prélevé (Sous-cutané contre viscéral et par zone anatomique (ventre, cuisse,...))²²⁰⁻²²², ou encore de la méthode de préparation (enzymatique ou mécanique, voir en III.3.i)^{223,224}, sans qu'une composition idéale n'est à ce jour été complètement établie. Il convient aujourd'hui de

mieux comprendre les mécanismes d'action des thérapies extraites du tissu adipeux afin de pouvoir établir cette composition idéale et déterminer des marqueurs prédictifs d'efficacité.

2. Mécanismes d'actions

Comme nous l'avons vu plus haut, l'injection intramusculaire de FVS ou d'ADSC est connue pour être sûre et a montré des effets cliniques prometteurs dans les maladies auto-immunes et musculaires. Son intérêt dans le traitement de la myosite repose sur quatre propriétés, dont les mécanismes d'action ne sont pas entièrement connus (Figure 17).

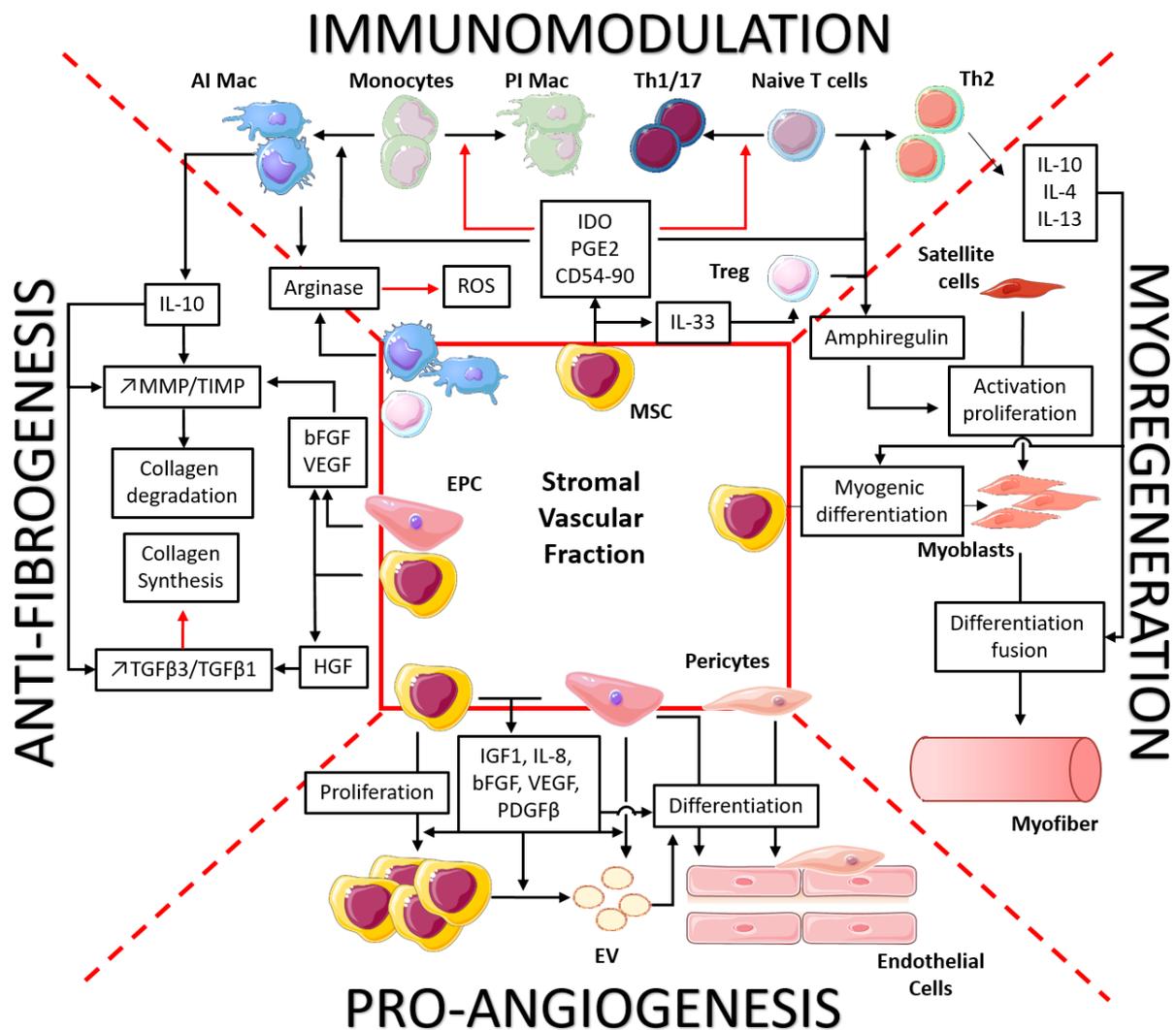


Figure 17 : Mécanismes d'action de la FVS et des ADSC : *La capacité immunomodulatrice est principalement médiée par les MSC/ADSC, par la réduction des cellules Th1/Th17, en inhibant leur différenciation à partir des cellules T naïves et en augmentant la différenciation vers les cellules Th2 via l'IDO, la PGE2, l'interaction CD58-CD2. Les MSC induisent également la différenciation des monocytes en macrophages anti-inflammatoires (AI Mac) en les piégeant dans un environnement anti-inflammatoire grâce à l'interaction CD90-CD11b. Les Treg et les Mac du tissu adipeux s'ajoutent aux cellules immunitaires présentes dans le muscle pour réduire l'inflammation. Ces cellules libèrent également de l'IL-10, qui modifie l'équilibre MMP/TIMP en faveur de la dégradation du collagène. Ce rapport est également modifié par le bFGF et le VEGF, libérés par les EPC et les MSC. Les MSC libèrent également du HGF qui modifie, comme l'IL-10, l'équilibre TGF β 3/1 pour réduire la synthèse du collagène. Avec les EPC, elles libèrent également de l'IGF1, du bFGF, du VEGF, du PDGF β et des vésicules extracellulaires (EV), qui agissent à différents niveaux pour différencier les EPC et les péricytes en cellules endothéliales et ainsi renforcer le réseau vasculaire. Enfin, les MSC pourraient se différencier en myoblastes et reconstituer le stock de cellules musculaires, épuisé par l'inflammation chronique. L'amphiréguline et les cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL-4 et IL-13 libérées par les cellules immunitaires participent à la prolifération, à la différenciation et à la fusion de ces cellules. Extrait de Gandolfi et al¹⁶⁰*

i. Effet immunomodulateur

Les capacités immunomodulatrices des ADSC sont similaires voir supérieures à celles des BM-MSc selon différentes études *in vitro*^{225–227}, se basant notamment sur des tests d'inhibition de la prolifération et de l'activation lymphocytaire. Même si les mécanismes impliqués ne sont pas entièrement compris pour ces cellules, plusieurs études confirment leurs effets sur l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et des macrophages de Th1 en Th2, par le biais :

- de facteurs solubles tels que la PGE2 et IDO^{228–230}. PGE2 est connue comme une molécule régulatrice de l'immunité, agissant notamment sur le recrutement et l'activation lymphocytaires, diminuant les fonctions des principales populations cellulaires impliquées dans la réponse Th1 pro-inflammatoire (macrophages, neutrophiles, cellules NK, lymphocytes)²³¹. A contrario, elle augmente les réponses Th2 et l'activation des lymphocytes T reg. IDO n'est pas un facteur soluble en soi, mais une enzyme exprimée par les MSC et dégradant le tryptophane en kynurénine. La kynurénine stimule l'activation des lymphocytes

T reg et diminue celle de lymphocytes T effecteurs, par induction de leur anergie voir de leur apoptose²³². L'expression de cette enzyme est induite par l'IFN γ , le TNF α et la PGE2, expliquant l'augmentation de l'effet anti-inflammatoire des MSC après exposition à un environnement pro-inflammatoire²³³. PGE2 et IDO participent aussi au switch des macrophages pro-inflammatoire vers anti-inflammatoire par l'induction de la libération d'IL-10 par les lymphocytes T^{234,235}. Une partie de l'IL-10 est aussi produit par les lymphocytes Treg, qui sont activés via la sécrétion de TGF β et d'IL-33 par les MSC^{236,237}. En plus de IDO, une autre enzyme présente à la surface des MSC participe à son effet immunomodulateur : le CD73²³⁸. Il s'agit d'une ectonucleotidase agissant sur la voie de l'adénosine. Cette voie passe par la dégradation de l'ATP, molécule pro-inflammatoire, en AMP par le CD39 présent à la surface de certains lymphocytes, puis par la dégradation de l'AMP en adénosine par le CD73. L'adénosine est fortement immunosuppresseur, bloquant la prolifération lymphocytaire et activant les lymphocytes Treg.

- D'interactions directes via CD58/CD2 et CD54/CD11a, qui augmentent elles aussi la production d'IL-10²³⁵ par les lymphocytes et les macrophages et le switch d'une réponse Th1 pro-inflammatoire vers une réponse Th2 anti-inflammatoire. Le signal passant par l'IL-10 est à la fois paracrine, mais aussi autocrine par fixation au CD210 présent à la surface des lymphocytes sécréteurs d'IL-10, conduisant à une boucle d'immunomodulation. L'expression du CD54 à la surface des MSC, comme celle d'IDO décrit précédemment, est induite par un milieu pro-inflammatoire, notamment la sécrétion d'IFN γ et de TNF α ^{239,240}. Une autre interaction observée est celle entre CD90 et CD11b, créant un lien qui a pour effet de piéger les monocytes et les macrophages dans une zone anti-inflammatoire²⁴¹.

En plus de l'effet des MSC seuls, la FVS contient également :

- Des macrophages qui présentent des activités anti-inflammatoires. Ces effets anti-inflammatoires sont notamment induits par la diminution d'expression d'iNOS et l'augmentation de celle de l'Arginase 1 par les macrophages. Comme ces deux enzymes consomment le même substrat, la L-arginine, elles rentrent en

compétition, conduisant à une diminution de l'activité d'iNOS et donc une diminution de la production des ROS. Cela abouti à une réduction du stress oxydatif et de la destruction des myofibres²⁴².

- Des lymphocytes T reg dont le taux augmente dans les tissus injectés conduisant à une diminution des lymphocytes pro-inflammatoires (Th1 et Th17), mais aussi anti-inflammatoire (Th2)^{236,243}. Il n'est cependant pas clair de savoir si il s'agit d'une prolifération des lymphocytes Treg de la FVS ou simplement de l'induction des lymphocytes Treg tissulaires.

ii. Effet anti-fibrotique

L'effet anti-fibrotique de la FVS et des ADSC va dépendre de plusieurs molécules. Tout d'abord, découlant de leur effet immunomodulateur, de l'augmentation d'expression de l'IL-10, qui va agir à différents niveaux. Tout d'abord au niveau cellulaire, par inhibition de l'activation des mastocytes²⁴⁴ et de l'invasion des neutrophiles et des macrophages producteurs de ROS²⁴⁵. Ensuite au niveau moléculaire, elle va conduire, de manière indirecte, à la diminution du taux de collagène type I et III, produits par les fibroblastes, et de l'actine alpha des muscles lisses (α SMA), produit par les myofibroblastes²⁴⁶. Cette diminution dépend d'un côté de la diminution de leur synthèse par une diminution de l'expression du TGF β 1 pro-fibrotique au profit du TGF β 3 anti-fibrotique, et d'un autre côté de l'augmentation de leur dégradation par l'augmentation d'expression des metalloproteinases (MMP1 et 8) responsable de la dégradation du collagène, et une diminution de l'expression de TIMP-2, régulateur de l'activité des MMP²⁴⁷.

En plus de l'IL-10, des études précliniques et cliniques suggèrent aussi que les effets anti-fibrotiques sont fortement liés à la sécrétion de HGF par les MSC pendant les réponses inflammatoires, comme le montrent les paramètres cliniques et histologiques^{248,249}. En effet, l'effet paracrine de ce facteur induit les mêmes mécanismes que ceux de l'IL-10 conduisant à un important effet anti-fibrotique^{250,251}. L'expression des MMP est également stimulée par des facteurs pro-angiogéniques, comme le bFGF ou le VEGF sécrétés par les EPC, dans l'objectif de dégrader la matrice extracellulaire et de préparer la néo-angiogenèse²⁵².

iii. Effet pro-angiogénique

La FVS est connue pour exprimer des niveaux élevés d'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor*), d'IL-8, de PDGF β , de bFGF et de VEGF, et pour avoir des activités angiogéniques et vasculogéniques robustes démontrées à la fois *in vitro* et *in vivo*^{253–255}. Ces facteurs de croissance contribuent à maintenir un micro-environnement de type vasculaire qui favorise la différenciation des MSC en cellules endothéliales et participe ainsi à l'angiogenèse et à la réparation vasculaire au cours de la régénération musculaire²⁵⁶. Traktuev *et al.* ont démontré que le VEGF favorise la migration des MSC et encourage la sécrétion de PDGF β par les EPC, ce qui permet aux MSC de proliférer^{254,257}. Le PDGF β est bien connu pour son action au cours du développement vasculaire²⁵⁸ mais joue également un rôle dans les propriétés pro-angiogéniques de la FVS, en induisant la sécrétion de vésicules extracellulaires pro-angiogéniques à la fois par les MSC et les EPC^{259,260}. Ces vésicules extracellulaires contiennent des molécules pro-angiogéniques qui participent au recrutement des EPC et à leur différenciation en cellules endothéliales²⁶¹. La sécrétion de PDGF β par les EPC induit également le recrutement de péricytes²⁶² qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'angiogenèse²⁶³.

iv. Effet myorégénérateur

Enfin, la FVS présente des propriétés myorégénératrices qui s'appuient à la fois sur les cellules immunitaires et musculaires. La FVS, par ses propriétés immunomodulatrices, agit à la fois sur l'inflammation chronique et sur la réparation musculaire via la libération de cytokines (IL-4 et IL-13). De plus, les effets régénérateurs des MSC, basés sur leur capacité à se différencier *in situ* en fonction de leur environnement cellulaire, pourraient renforcer et aider les cellules satellites à remplacer les cellules défectueuses. La conversion des ADSC ou de la FVS vers un phénotype myogénique a été obtenue *in vitro* par l'ajout d'un milieu inducteur, contenant du sérum de cheval et de l'hydrocortisone. Cela conduit à l'expression des facteurs de transcription myogéniques MyoD et MyoG, puis à la fusion et à la formation de cellules multinucléées exprimant la chaîne lourde de la myosine^{264–266}. D'après les preuves histologiques, les ADSC fusionnent pour former des myotubes multinucléés *in vitro*. Dans leur étude, Di Rocco *et al* ont montré que les ADSC et la FVS étaient capables de se différencier en cellules musculaires squelettiques lorsqu'elles étaient cultivées en présence de myoblastes primaires différenciés²⁶⁷. De plus, la conversion de la FVS vers un phénotype

myogénique est favorisée par un environnement myogénique même en l'absence de contacts cellule-cellule (culture *transwell*) et de cellules musculaires. Elle reste cependant moins fréquente. Cette conversion myogénique a également été démontrée *in vivo* par plusieurs études. Dans un modèle lagomorphe de lésion musculaire induite par la cardiotoxine, l'injection intramusculaire de cellules de FVS cultivées à court terme (3 jours) a induit une augmentation de la masse musculaire et des capacités fonctionnelles. La différenciation myogénique de la FVS et la fusion avec des cellules musculaires ont été démontrées en utilisant de la FVS génétiquement modifiées pour exprimer la β -galactosidase ou la GFP, démontrant la contribution des cellules de la FVS à la régénération musculaire *in vivo* avec 20 % de fibres GFP positives dans la surface totale de sections de membres postérieurs traités^{267,268}. Cette contribution pourrait être renforcée en prétraitant la FVS et les ADSC avec des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 ou le SDF1 avant de l'utiliser, afin d'augmenter la capacité myogénique des cellules²⁶⁹. Enfin, il a également été rapporté que l'injection d'ADSC humains dans des souris mdx, utilisées comme modèle de dystrophie de Duchène, entraînait une expression substantielle de dystrophine humaine à la fois dans le muscle injecté et dans le muscle adjacent, révélant ainsi la propagation des cellules à d'autres muscles²⁷⁰.

3. Préparation, réglementation et applications cliniques

i. Préparation de la FVS et des ADSC

Si elle a longtemps reposée principalement sur une méthode de séparation enzymatique à l'origine de sa découverte, plusieurs méthodes de séparation existent aujourd'hui pour obtenir de la FVS. Ces différentes méthodes présentent des avantages et des inconvénients qu'il convient de prendre en compte. Elles peuvent être divisées en deux types principaux^{223,224,271} :

- Les méthodes enzymatiques : ce sont les plus fréquemment utilisées dans les études cliniques. Elles consistent à utiliser une collagénase afin de dissocier les liens inter-cellulaires par dégradation de la matrice extracellulaire permettant le maintien du tissu adipeux. Les adipocytes et la FVS sont ensuite

séparés par centrifugation permettant d'éliminer les adipocytes et le liquide infiltrant (contenant l'huile et la collagénase) et d'obtenir un culot cellulaire. Après plusieurs lavages et/ou filtrations, on obtient à la fin une suspension cellulaire dissociée, parfois appelée c-FVS (FVS cellulaire). Dans cette méthode, le temps d'incubation à 37°C avec la collagénase varie selon les études. Proche des 45 minutes voir 1 heure dans la plupart des études, il est parfois raccourci jusqu'à 15 minutes, conduisant à une dissociation moins importante et à une FVS parfois désignée sous le terme de fragments microvasculaire dérivés du tissu adipeux (AD-MVF)^{272,273}. Cette dernière contient alors en partie la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que les facteurs de croissance qu'elle contient.

- Les méthodes mécaniques : moins coûteuses et plus rapides²⁷⁴, elles regroupent plusieurs techniques visant généralement à détruire les adipocytes (par centrifugation, vortex, broyage, émulsification entre seringue à l'aide d'un connecteur...) puis à centrifuger et/ou à laisser décanter la suspension pour séparer les cellules. Des étapes de lavages et/ou de filtration peuvent aussi avoir lieu. On parle alors de t-FVS (FVS tissulaire) car les liaisons inter-cellulaires ne sont pas complètement coupées et la MEC reste présente. Si la viabilité cellulaire a tendance à être la même avec les deux techniques, le rendement, notamment en termes de cellules progénitrices (MSC, EPC) est plus élevée avec la méthode enzymatique²⁷⁵.

Ces deux méthodes permettent d'obtenir une FVS répondant aux critères de l'ISCT, mais elles présentent tout de même des différences au niveau du produit final (notamment en termes de composant de la MEC et de facteur de croissance) qui ne sont pas pris en compte dans ces critères. Selon l'indication (régénératrice, immunomodulatrice, vasculaire...) et le site d'action (local ou systémique), l'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes pourrait probablement apporter une plus grande efficacité²²³. Cependant, le choix entre les deux repose actuellement plus sur des critères de pratique ou réglementaire.

A ces deux types de méthodes d'extraction s'ajoute d'autres critères pouvant influencer les rendements et la composition cellulaire de la FVS, ainsi que la sécurité du traitement²⁷⁶ :

- Automatisation de l'extraction : les préparations, qu'elles soient enzymatiques ou mécaniques, peuvent bénéficier de l'automatisation. De nombreux dispositifs existent, pouvant aboutir à un processus manuel, semi-automatisé (certaines étapes non automatisées) et complètement automatisé (Celuthion® par exemple)²⁷⁷. Ces méthodes permettent une plus grande reproductibilité du procédé, mais pas de la composition de la FVS qui reste variable entre les donneurs²⁷⁸. Elles vont généralement aboutir à un rendement plus faible que les méthodes manuelles et le coût de production sera plus élevé comparé au même type d'extraction manuelle.
 - Système-clos : afin de garantir la stérilité du produit, des systèmes clos ou partiellement clos permettent de limiter les expositions à l'air libre et donc aux contaminants infectieux. Ces systèmes ont l'avantage de permettre une production sûre sans avoir besoin d'une hotte à flux laminaire et d'une salle blanche. Ils sont souvent associés aux dispositifs de production automatisés, même peuvent aussi être utilisés lors de productions manuelles. Là encore, le rendement sera généralement plus faible qu'une méthode manuelle classique, et le coût plus élevé.

La préparation des ADSC, comme des autres MSC, repose sur les capacités d'adhérence au plastique, permettant un tri fiable des MSC de la FVS, et de prolifération, permettant par culture expansive d'obtenir un grand nombre de cellules en 3-4 semaines. Cette production requiert à la fois un grand nombre de cellules à amplifier, mais aussi des dispositifs et consommables pour la culture de ces cellules. Il existe de nombreux dispositifs de culture, qui vont différer entre une production académique et une production industrielle. En effet, la culture de ces cellules au niveau académique va généralement reposer sur des systèmes de culture en 2 dimensions, système statique utilisant des flasques simples ou à plusieurs étages, dont le rendement dépendra de la surface des flasques. La culture de ces cellules au niveau industriel se fera généralement à l'aide de systèmes de culture en 3 dimensions, consistant en des bioréacteurs dynamiques dans lesquelles les cellules sont constamment remises en suspension et se multiplient en s'aggrégeant à la surface de microbilles²⁷⁹. Afin de garantir la sécurité du traitement et de limiter les risques de contamination, il s'agit souvent de système clos permettant les manipulations sans

contact avec l'extérieur. L'un comme l'autre, ces systèmes de culture présentent des avantages et des inconvénients, et nécessitent un contrôle qualité important afin de respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

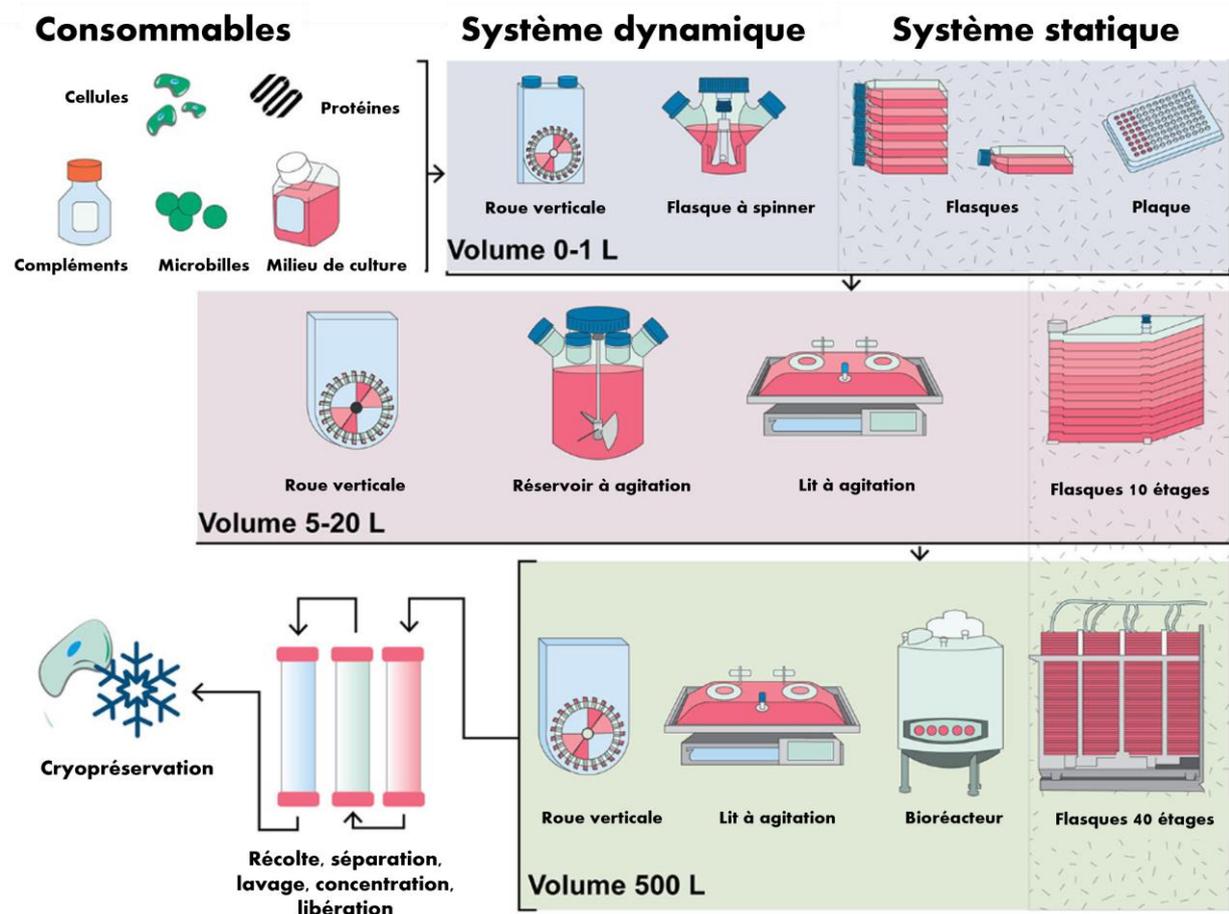


Figure X : comparaison des stratégies de culture d'amplification des MSC : utilisation de systèmes différents selon la quantité de cellules à amplifier. Adapté de Cherian *et al.*

Côté consommable, la principale limitation est l'utilisation de sérum (humain ou bovin), qui est un apport en nutriments et protéines indispensable pour la croissance cellulaire. Le plus fréquemment utilisé est le sérum de veau fœtal (SVF), qui, en dehors des problèmes de coût, de variabilité d'efficacité entre les lots et de disponibilité limitée, pose des problèmes à la fois sanitaire et d'éthique²⁸⁰. L'utilisation de sérum humain, issue de donneurs de groupe sanguin AB, a été évalué et semble répondre aux besoins de ces cellules²⁸¹. Si son usage permet de répondre aux problèmes éthiques du SVF, le problème sanitaire reste avec le risque de transmission de maladie aux cellules en culture et au patient recevant le traitement. De plus, le sérum humain dépendant des dons, et il est fréquemment

concerné par des ruptures de stocks. Différents milieux de culture synthétiques ont été développés pour répondre au besoin spécifique de certains types cellulaires. Ils présentent l'avantage d'être standardisés, limitant la variabilité inter-lot, et ne présentent pas les risques infectieux décrits plus tôt. Cependant, ces milieux ne sont pas encore produits à suffisamment grande échelle pour répondre aux besoins de telle culture, et leur prix est trop élevé en comparaison du SVF²⁷⁹. De plus, ces produits, facilement utilisables en recherche préclinique, ont besoin de répondre aux critères des BPF spécifiques aux Médicaments de Thérapies Innovantes (MTI) avant d'être utilisés dans les futures essais cliniques.

ii. Statut de médicament de thérapie innovante

Cette partie est extraite de mon mémoire de thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie²⁸². En Europe, le statut de MTI et ses définitions ont été instaurés par deux textes :

- La directive 2003/63/CE, modifiant la directive 2001/83/CE, relative aux médicaments à usage humain, en y ajoutant la notion de MTI. Elle les classa alors en (i) thérapies géniques, correspondant à tout produit obtenu par un ensemble de procédés de fabrication visant, par l'utilisation d'un vecteur viral ou non-viral, au transfert d'un gène (prophylactique, diagnostique ou thérapeutique), *in vivo* ou *ex vivo*, vers des cellules humaines ou animales, et à son expression consécutive *in vivo* ; et en (ii) thérapies cellulaires somatiques, correspondant à des cellules vivantes somatiques autologues, allogéniques ou xénogéniques dont les caractéristiques ont été sensiblement modifiées (expansion, sélection ou activation *ex vivo*, ou association à un dispositif médical) pour obtenir un effet thérapeutique, diagnostique ou préventif s'exerçant par des moyens métaboliques, pharmacologiques et immunologiques en vue de son utilisation chez l'Homme²⁸³.
- le règlement CE n°1394/2007, imposant légalement le statut de MTI et complétant les définitions par l'ajout (i) des produits issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, constitués de cellules ou tissus d'origine humaine et/ou animale, viable ou non viable, mais également de substances supplémentaires (produits cellulaires,

biomolécules, biomatériaux, substances chimiques, supports ou matrices), et présentés comme possédant des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain et (ii) des médicaments combinés de thérapie innovante, combinant une partie cellulaire ou tissulaire viable, ou non viable mais susceptible d'avoir une action considérée comme essentielle, et une partie intégrant un ou plusieurs dispositifs médicaux²⁸⁴.

Ces définitions excluent des MTI une partie des thérapies cellulaires, qui ne subissent que des modifications non substantielles (Tableau 8) et sont utilisées de manière homologue, c'est-à-dire pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et le donneur. En France, elles sont classées en tant que produit de thérapie cellulaire (PTC), avec un statut réglementaire différent des MTI.

Modifications non substantielles (Annexe 1 - CE 1394/2007)
Découpage
Broyage
Façonnage
Centrifugation
Trempages dans des solutions antimicrobiennes
Stérilisation
Irradiation
Séparation, concentration ou purification de cellules
Filtration
Lyophilisation
Congélation
Cryoconservation
Vitrification

Tableau 8 : Liste des modifications non substantielles

Les MTI étant des produits hautement complexes, autant dans leur fonctionnement que dans leur production, le règlement 1394/2007 instaura un comité des thérapies innovantes

(CAT), dont la principale mission est de répondre aux requêtes de classification de MTI soumises par les développeurs. Mis en place en 2009, ce comité a, à ce jour, répondu à plus de 600 demandes de classification. Le CAT joue aussi un rôle important dans la rédaction des BPF, des Bonnes Pratiques Clinique et de suivi et gestion des risques spécifiques des MTI.

Afin de permettre le développement académique de MTI et l'accès des patients à ces traitements dans des maladies rares, l'Europe instaura une exemption hospitalière, alternative à la procédure centralisée²⁸³. Cette notion permet aux états membres de produire et d'administrer, au sein d'un même état, des MTI préparés ponctuellement et en faible quantité, répondant aux critères de qualité et de sécurité requis mais dont le caractère ponctuel ou personnalisé au patient empêche le recueil de données suffisantes à une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Ces MTI sont prescrits et administrés sous la responsabilité d'un médecin et produits au sein d'un même centre hospitalier, et ne peuvent être exportés. La notion d'exemption hospitalière fut transposée en droit national sous le terme de MTI préparés ponctuellement (MTI-PP) en France par la loi n°2011-302 et la loi n°2016-41.

Les ADSC ont été directement classés comme MTI, plus précisément comme thérapies cellulaires, par le CAT, en raison des modifications substantielles subites (digestion enzymatique, amplification) et l'usage non homologue de cette thérapie (Tableau 9). Comme vu plus tôt, la préparation des ADSC peut être standardisée, et l'utilisation allogénique de ces cellules les rends propices à la commercialisation. Cependant, cela requiert un investissement conséquent en termes de matériel notamment, limitant la place des petites entreprises dans ce marché. La FVS, aussi utilisé de manière non homologue et généralement modifié substantiellement (méthode enzymatique), a aussi un classement en tant que thérapie cellulaire. Cependant, du fait de son usage autologue, de sa production rapide au plus près du patient et de sa grande hétérogénéité, cette thérapie s'oriente vers un statut de MTI-PP et une production principalement académique.

Dénomination	Coleman lipofilling	Microfat	Nanofat	t-FVS	AD-MVF	c-FVS	ADSC
Canule de prélèvement	Coleman (3 mm de diamètre)	2 mm de diamètre		Canules à large trous			
Procédé de préparation	Centrifugation		Emulsification ± filtration	Action mécanique + centrifugation ± filtration	Digestion enzymatique + centrifugation ± filtration		Digestion enzymatique + centrifugation + culture
Durée de préparation	< 30 min				2,5 heures	3 heures	3-4 semaines
Composition	Lobules	Micro-lobules	Suspension cellulaire hétérogène avec MEC			Suspension cellulaire hétérogène	Suspension cellulaire homogène
Utilisation	Autologue						Allogénique
Statut	PTC		PTC ou MTI selon l'indication		MTI		

Tableau 9 : Comparaison des produits thérapeutiques issus du tissu adipeux

iii. Succès des thérapies cellulaires du tissu adipeux

Le développement des thérapies dérivées du tissu adipeux a rapidement atteint un stade clinique en comparaison avec d'autres thérapies innovantes, sautant probablement certaines étapes précliniques qui aurait permis de mieux comprendre leurs mécanismes d'action respectifs. Les ADSC, dont le premier isolement a été publié en 2001, ont été administrés à une patiente dès 2003 dans le traitement de fistules anales dans la maladie de Crohn²⁸⁵, et un premier essai clinique de phase II dans cette indication a débuté en 2004. Bien qu'il s'agisse d'une nouvelle source de cellules souches, celles-ci ont été considérées comme équivalentes aux autres MSC, notamment du point de vue de leur tolérance et de leur sécurité. Même si cette idée perdure, on sait aujourd'hui qu'il existe un certain nombre de différences phénotypiques, transcriptomiques et fonctionnelles entre les ADSC, BM-MSC et UC-MSC²⁸⁶⁻²⁸⁸, et certaines d'entre elles orientent le choix d'une source ou d'une autre selon l'action recherchée²⁸⁹. Elles suggèrent ainsi que les BM-MSC auraient de meilleures capacités de différenciation ostéogénique et chondrogénique, mais que les ADSC auraient des propriétés immunomodulatrices plus importante, ainsi qu'un taux de sécrétion de bFGF et IGF plus important²⁸⁹.

Pour la FVS, le développement clinique est un peu plus paradoxal. Bien que la première méthode d'isolement ait été décrite dans les années 1960, il faudra attendre les années 1980 pour que la FVS soit étudiée et que ses propriétés prolifératives et pro-angiogéniques soient mises en avant. C'est finalement là encore l'isolement des ADSC en 2001 qui conduit à un engouement important pour l'étude de la FVS au niveau clinique. Le

premier essai clinique enregistré sur *ClinicalTrials* évaluant la FVS dans le traitement du diabète (type 1 et 2) débute en 2007. Le nombre d'essais augmente lentement au début, seulement 10 essais initiés avant 2011, puis plus rapidement, avec plus de 100 essais évaluant la FVS enregistrés avant 2017¹⁶⁰. Ce changement de vitesse semble faire suite aux premiers scandales sanitaires du « tourisme des cellules souches » (*Stem cell tourism*) et des « thérapies non éprouvées / non approuvées » (*Unproven / Unapproved therapies*) touchant fortement les Etats-Unis²⁹⁰. En plus du risque infectieux importants lors de l'administration, notamment dans des pays en voie de développement, et de l'absence d'efficacité par rapport au coût du traitement, ces thérapies peuvent être à l'origine d'effets secondaires graves^{291,292}. Bien que fortement critiquées, ces thérapies dangereuses n'en sont pas moins légales. Elles profitent en effets de vides juridiques ou de dérogations à la réglementation permettant de la contourner et de pouvoir produire et administrer ces thérapies en dehors du statut de MTI ou équivalent. L'un des vides juridiques aux Etats-Unis a longtemps concerné la définition des modifications substantielles lors de la préparation de la FVS, conduisant au développement de nombreux dispositifs permettant une séparation mécanique. Il existe ainsi aujourd'hui une grande diversité dans les méthodes de production de la FVS, conduisant à d'importantes différences dans la composition de celle-ci.

L'utilisation de la FVS a été rapportée dans de nombreuses indications et peut représenter une thérapie adjuvante prometteuse pour les patients atteints de maladies pour lesquelles les thérapies actuelles et conventionnelles sont inadéquates. La variété de ces indications a été récemment passée en revue par Andia *et al* qui ont analysé 71 études cliniques publiées évaluant la FVS²⁹³. Cependant, plus de 65 % d'entre eux étaient des séries de cas avec un faible niveau de preuve, et seulement 16 % d'entre eux étaient des essais cliniques randomisés. Pour confirmer cette analyse, nous avons recherché des essais cliniques dans la base de données *clinicaltrial.gov* en mai 2023 (stratégie de recherche avec les mots clés : Stromal vascular fraction OR FVS OR ADFVS OR ADRC OR ADSC), ce qui nous a permis d'identifier 177 essais cliniques évaluant l'injection de FVS (Figure 19A). Les indications les plus fréquentes, selon ces études, étaient les troubles orthopédiques (50,7 % et 29,9 % pour Andia *et al* et *Clinical trial*, respectivement), puis les plaies chroniques (14 % et 24,3 %) et les maladies cardiovasculaires et pulmonaires (12,6 % et 13 %) (Figure 19B). Les autres indications fréquentes étaient les maladies urogénitales (5,6 % et 9 %), neurologiques

(5,6 % et 5,1 %) et auto-immunes (5,6 % et 11 %), qui se chevauchent souvent avec le traitement des plaies chroniques. Parmi les maladies auto-immunes, on trouve en premier la sclérodémie, puis la maladie de Crohn, la sclérose en plaque, les myosites (plus précisément IBM) et la polyarthrite rhumatoïde. Ces données sont cohérentes avec celles d'autres études^{219,293} et démontrent l'intérêt croissant de la FVS pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immune, dégénératives ou non.

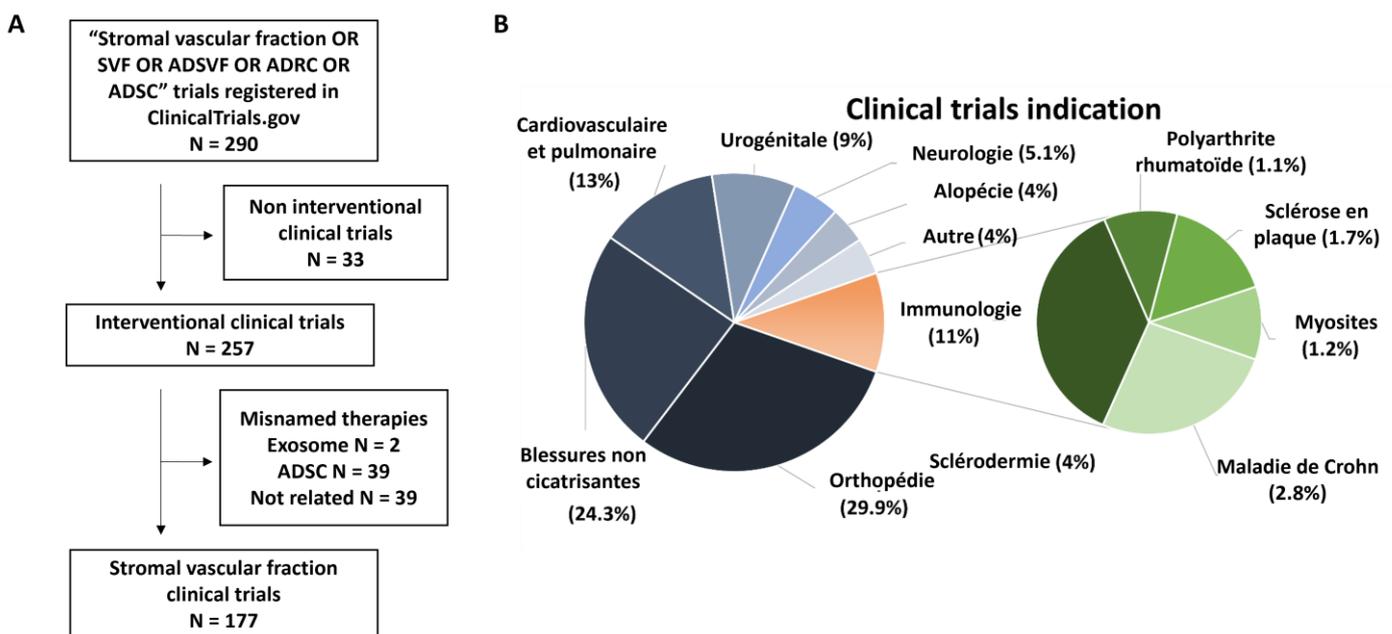


Figure 18 : Répartition des essais cliniques évaluant la FVS par indication : (A) diagramme de sélection des essais cliniques et (B) répartition des essais cliniques par indication.

Les sites d'injection locaux étaient plus fréquents que les sites intravasculaires, avec une prédominance des injections sous-cutanées, intra-articulaires, intra-fistuleuses et intramusculaires (IM). Néanmoins, la FVS reste une nouvelle thérapie en développement et les essais cliniques étaient principalement des études pilotes en phase I (73% contre 32,9% pour l'ensemble des essais cliniques), et les phases II et III ne sont apparues que récemment (23% contre 42,4% et 4% contre 24,7%, respectivement) (Fig.2E). En outre, plusieurs essais cliniques en FVS n'ont pas été achevés (39% contre 15%), ont été fermés prématurément ou ont été retirés (23,3% contre 4,3%) (Fig.2F). Aucune de ces fermetures n'était cependant due à un problème de sécurité.

Les injections intramusculaires de FVS ont été utilisées cliniquement comme voie locale pour le traitement des séquelles musculaires^{294,295}, permettant une amélioration de la force

musculaire, ou pour le traitement de l'ischémie des membres^{296,297}, soulignant ses effets proangiogéniques. Dans ces études, la sécurité de cette voie a été confirmée. De plus, l'injection IM a conduit à la libération d'effecteurs paracrines dans la circulation sanguine et pourrait être une alternative à d'autres sites d'injection (intrathécal, intra-articulaire).²⁹⁸. Un autre avantage de cette voie est l'augmentation du temps de séjour des cellules injectées, ce qui fait passer de quelques jours à plusieurs mois la persistance de ces cellules dans l'organisme²⁹⁹. Même s'ils restent dans le muscle, ils répondent à des signaux inflammatoires distants et agissent sur des sites distants³⁰⁰. L'injection IM de FVS pourrait conduire à une efficacité clinique prolongée par rapport à d'autres voies, à la fois dans les muscles injectés et non injectés.

Les ADSC sont eux aussi évalués dans de nombreuses indications, Malgré la facilité d'obtention des ADSC comparés aux autres sources de MSC, ils représentent encore une faible part des MSC évalués lors des essais cliniques, variant entre 5 et 20% selon les études et les indications³⁰¹⁻³⁰³. Une étude récente par Lee *et al* a comptabilisé les essais cliniques utilisant des ADSC sur *ClinicalTrial* et analysés les indications de ces essais³⁰⁴. Parmi celle-ci, on observe comme pour la FVS un intérêt particulier dans le traitement des maladies musculosquelettiques (26,9%), particulièrement articulaires, cardiovasculaire (16,6%) et les blessures non cicatrisantes (11,5%), mais aussi dans des indications gastro-intestinales (17,9%). Les indications immunologiques sont-elles très faibles, avec seulement 3,8%. Malgré cette faible proportion, le seul traitement commercialisé utilisant des ADSC (Alofisel®) est indiqué dans le traitement des fistules anales de la maladie de Crohn.

Si les ADSC sont encore peu utilisés, les MSC de manière générale ont été évalué au travers de plus de 500 essais cliniques, avec comme indications principales à nouveau les troubles musculosquelettiques, les maladie cardiovasculaires et pulmonaires, dont un essor très important dans le traitement des complications du COVID, et les maladies neurologiques³⁰⁵. Plusieurs études ont rapporté l'utilisation des MSC, toutes origines confondues, dans le traitement des myosites.

iv. Etudes cliniques des MSC dans le traitement des myosites

La première étude clinique utilisant les MSC a été publiée en 2011 par Wang *et al* et a rapporté le cas de 10 patients souffrant de PM ou de DM réfractaires³⁷. Après un traitement

par injection IV BM-MSc ou UC-MSc allogéniques, ils ont observé une amélioration de la force musculaire et du score clinique, ainsi qu'une réduction de l'inflammation et de la dégénérescence musculaire³⁰⁶. Les cellules transplantées ont également été efficaces sur les symptômes associés, notamment la PID et les ulcères cutanés dans la DM, et ont permis de réduire les traitements immunosuppresseurs de base pour tous les patients. Cependant, trois patients ont rechuté et deux patients sont décédés à la suite de l'aggravation d'une infection des voies respiratoires. Cette cohorte a été suivie et s'est agrandie au fil du temps pour atteindre trente patients et les données de sécurité ont été publiées en 2018. Elles ont montré une faible fréquence d'effets indésirables, mais ont fait état du décès de 11 patients en raison de maladies sous-jacentes à leur myosite, principalement la PID¹⁷⁴. Lai *et al* ont publié le seul essai clinique contrôlé, comparant la thérapie conventionnelle (6 mois de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs) avec (n = 37 patients) ou sans (n = 44 patients) injections allogéniques de UC-MSc chez des patients atteints de PM ou de DM³⁰⁷. Après un suivi de 6 à 12 mois, les auteurs ont démontré une meilleure efficacité du traitement conventionnel par infusion de MSc sur les caractéristiques cliniques et la force musculaire (score MMT), confirmée par une diminution du taux plasmatique de créatine kinase. Ils ont également montré un effet sur la PID associée, avec une réduction des lésions pulmonaires interstitielles au scanner haute résolution. Les contrôles cliniques et biologiques à 1, 3 et 6 mois après la transplantation n'ont révélé aucune complication.

Une seule étude a rapporté le cas d'un patient atteint d'une PM réfractaire et invalidante, traité par quatre perfusions d'ADSC, ce qui a entraîné une amélioration de la force musculaire (score MMT) et de la mobilité trois mois après le traitement, mais aucun changement significatif dans les valeurs de laboratoire sanguin³⁰⁸. A la suite du traitement, le patient a vu diminuer sa dose de corticostéroïdes, sans parvenir à les arrêter néanmoins.

Etude	Traitement	Suivi	Efficacité	Sécurité
Wang et al (2011) ⁸⁶	BM ou UC-MSC allogénique en IV (n=10) (non contrôlé)	A 1, 2, 3, 6, 12, 18 et 24 mois Clinique : Sévérité (VAS score), <i>manual muscle test</i> (MMT score) et effets indésirables Biologique : CK, CK-MB	Amélioration du score VAS et MMT Réduction de l'inflammation à l'IRM (n=2) Amélioration des symptômes associés (PID, ulcère cutané) Diminution significative des CK et CK-MB Réduction de dose du traitement initial Rechute (n=3) à 6 ou 8 mois	Effet indésirable (n=0) mort (n=2) par infection des voies respiratoires, une détérioration de la maladie et une insuffisance cardiaque ou une myocardite grave
Ra et al (2011) ⁸⁸	ADSC autologue IV (n=1) (non contrôlé)	A 3 mois Clinique : MMT, qualité de vie (SF-36) Biologique : non détaillé	Amélioration de la force musculaire et de la qualité de vie, permettant au patient de monter les escaliers, de marcher en tenant la rampe, de conduire seule Aucun changement biologique significatif traitement de base réduit	Non spécifié
Lai et al (2015) ⁸⁷	Traitement conventionnel (n=44) ou UC-MSC allogénique IV (n=37)	A 1, 3 et 6 mois Clinique : force musculaire, scanner thoracique Biologique : CK	Force musculaire augmenté dans les deux groupes, mais plus dans le groupe UC-MSC Imagerie pulmonaire améliorée CK diminués dans les deux groupes, mais plus dans le groupe UC-MSC	Non spécifié
Liang et al (2018) ¹¹	BM ou UC-MSC allogénique IV (n=30) (non contrôlé)	Entre 2007 et 2016 Suivi des effets indésirables	Non spécifié	Effets indésirables suraigus (n=6) : fièvre, maux de tête, palpitations, rougeur du visage, insomnie, malaise gastrique. Décès (n=11) : maladie sous-jacente (PID)

Tableau 10 : Résumé des séries de cas des patients atteints de myosites traités par MSC

CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Les myosites sont aujourd'hui principalement traitées par corticostéroïde ou par d'autres traitements immunosuppresseurs. Malgré leur efficacité, ils ne suffisent à traiter l'ensemble des patients, dont certains rechutent et restent réfractaire à ces thérapies. Parmi les nouveaux traitements en cours de développement, les thérapies cellulaires extraites du tissu adipeux représentent une piste intéressante, combinant à leur effet immunomodulateur des effets régénérateurs, pro-angiogénique et anti-fibrotique. En prémices des essais cliniques qui débutent, une étude préclinique de ces thérapies pourraient permettre de comprendre et de comparer les effets de deux de ces thérapies, la c-FVS et les ADSC. Une des limites de cette étude est aujourd'hui l'absence d'un modèle animal spontané bien établi, qui reprendrait les aspects immunologiques mais aussi dégénératifs et fibrotiques des myosites.

Dans ce contexte, les OBJECTIFS de ce travail de doctorat sont :

- 1) L'étude et la caractérisation du modèle NOD *Icos*^{-/-}, notamment de la cinétique de la maladie et des signes clinico-biologiques pouvant servir lors du suivi après traitement.
- 2) La mise au point de la préparation et de l'administration des deux thérapies étudiées dans ce modèle, afin de déterminer leur efficacité.
- 3) Le développement de test *in vitro* et la recherche de marqueurs prédictifs de l'efficacité de ces thérapies

RESULTATS

ARTICLE 1

***Icos* gene disruption in non-obese diabetic mice elicits myositis associated with anti-troponin T3 autoantibodies**

Contexte de l'étude : Les myosites sont un ensemble de maladies auto-immunes musculaires conduisant à la perte de force musculaire et à des handicaps moteurs. Bien que les critères clinico-biologiques servant à leur diagnostic et à leur classification soient aujourd'hui bien établis, les mécanismes déclencheurs et la physiopathologie de ces maladies restent insuffisamment décrits, faute de modèles animaux spontanés permettant leur étude. Le blocage de la voie ICOS/ICOSL par invalidation de l'un des deux gènes chez la souris NOD conduit à l'apparition spontanée d'une myopathie inflammatoire, qui reste à caractériser.

Méthode : La caractérisation clinique du modèle a été faite par suivi du diabète, de la myopathie ainsi que de la force musculaire sur plusieurs mois. Les fonctions motrices ont aussi été évaluées en utilisant le système d'analyse Catwalk. Une analyse histologique des muscles a été réalisée par coloration en hématoxyline et éosine ainsi qu'en rouge sirius, et les infiltrats leucocytaires ont été caractérisés par immunofluorescence et cytométrie en flux. L'identification d'auto-antigènes a été réalisée par spectrométrie de masse sur des extraits de protéines musculaires obtenus par électrophorèse 2 dimensions sur gel et recherche de réactivité avec le sérum de souris malades. Des souris NOD ont ensuite été immunisées par les antigènes identifiés.

Principaux résultats :

- Les souris NOD *Icos*^{-/-} développent une myosite spontanée progressive avec une perte de force musculaire et une altération des fonctions motrices. L'histologie révèle des signes de nécroses, de myophagocytose, de régénération et de fibrose, associés à la présence d'infiltrats cellulaires composés majoritairement de lymphocytes T et de macrophages.
- La spectrométrie de masse a mis en évidence la protéine TNNT3, contre laquelle des souris NOD *Icos*^{-/-} présentent des anticorps dont le taux est corrélé avec l'âge.

- L'immunisation de souris NOD par la protéine TNNT3 abouti à l'apparition d'une myosite, montrant son implication dans la physiopathologie du modèle NOD *Icos*^{-/-}.

Icos gene disruption in non-obese diabetic mice elicits myositis associated with anti-troponin T3 autoantibodies

Gwladys Bourdenet¹ | Baptiste Pileyre¹ | Laurent Drouot¹ | Jérémie Martinet^{1,2} | Chantal Bécourt³ | Marion Carrette² | Gaétan Riou¹ | Cécile Bergua¹ | Thara Jaworski¹ | Philippe Chan⁴ | Laetitia Jean¹ | Manuel Fréret^{1,5} | Pascal Cosette^{4,6} | Christian Boitard³ | Catalina Abad¹ | Olivier Boyer^{1,2} 

¹Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, FOCIS Center of Excellence PAnTHER, Rouen, France

²CHU de Rouen, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France

³Cochin Institute, INSERM U1016, Paris, France

⁴Univ Rouen Normandie, INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRaLeS-PISSARO, Rouen, France

⁵CHU de Rouen, Department of Rheumatology, Rouen, France

⁶Univ Rouen Normandie, PISSARO, CNRS UMR6270, Rouen, France

Correspondence

Catalina Abad, Faculty of Health, Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, 22 bd Gambetta, F-76000 Rouen, France.

Email: catalina.abad@inserm.fr

Funding information

Association Française contre les Myopathies, Grant/Award Number: 19458; Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: FDM201806006523; Rouen University, INSERM, Normandy Region; European Union; European Regional Development Fund (ERDF)

Abstract

Aims: Idiopathic inflammatory myopathies (IIM) are autoimmune inflammatory disorders leading to skeletal muscle weakness and disability. The pathophysiology of IIM is poorly understood due to the scarcity of animal disease models. Genetic deletion of *Icos* or *Icosl* (inducible T cell co-stimulator/ligand) in non-obese diabetic (NOD) mice leads to muscle disease. Our aim was to characterise *Icos*^{-/-} NOD myopathy and to search for novel autoantibodies (aAbs) in this model.

Methods: Diabetes, weight, myopathy incidence/clinical score and grip strength were assessed over time. Locomotor activity was analysed with the Catwalk XT gait analysis system. Muscle histology was evaluated in haematoxylin/eosin and Sirius red-stained sections, and immune infiltrates were characterised by immunofluorescence and flow cytometry. 2D gel electrophoresis of muscle protein extracts and mass spectrometry were used to identify novel aAbs. NOD mice were immunised with troponin T3 (TNNT3) in incomplete Freund's adjuvant (IFA) and R848. An addressable laser bead immunoassay (ALBIA) was developed to measure aAb IgG serum levels.

Results: *Icos*^{-/-} NOD mice did not exhibit diabetes but developed spontaneous progressive myositis with decreased muscle strength and altered locomotor activity. Muscle from these mice exhibited myofibre necrosis, myophagocytosis, central nuclei, fibrosis and perimysial and endomysial cell infiltrates with macrophages and T cells. We identified anti-TNNT3 aAbs in diseased mice. Immunisation of NOD mice with murine TNNT3 protein led to myositis development, supporting its pathophysiological role.

Conclusions: These data show that *Icos*^{-/-} NOD mice represent a spontaneous model of myositis and the discovery of anti-TNNT3 aAb suggests a new autoantigen in this model.

KEYWORDS

autoantibody, ICOS, idiopathic inflammatory myopathies (IIM), mouse, myositis, NOD, TNNT3

Gwladys Bourdenet and Baptiste Pileyre contributed equally to this work as first authors.

Catalina Abad and Olivier Boyer contributed equally to this work as last authors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Neuropathology and Applied Neurobiology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Neuropathological Society.

INTRODUCTION

Idiopathic inflammatory myopathies (IIM), also named myositis, are a group of heterogeneous rare diseases characterised by muscle weakness and muscle histopathological features that include the presence of inflammatory infiltrates and myofibre necrosis/regeneration [1]. The discovery of a variety of myositis-specific or myositis-associated antibodies has provided tools for a better diagnosis and evaluation of the prognosis of myositis [2]. Yet, despite recent advances, a substantial proportion of patients do not display any known myositis-associated antibodies [3]. Studies using animal disease models may lead to the identification of new autoantibodies. Existing experimental autoimmune myositis models are mainly based on viral infection or immunisation against muscle homogenates, purified myosin or protein C [4]. Although these models may be useful tools to study certain aspects of myositis pathogenesis and to evaluate new therapies, they exhibit some limitations in terms of reproducibility, incidence and clinical signs of muscle impairment. In addition, the fact that they are immunologically biased towards a known antigen makes them unsuitable for the discovery of novel autoantibodies. Spontaneous models of myositis would therefore help unravel the natural development of human pathology. A few genetic murine models have been developed based on certain molecular hallmarks of human myopathies. For example, myofibre expression of major histocompatibility complex (MHC) class I, even at a distance from immune cell infiltrates, is a common characteristic of IIM [5]. Based on this, a transgenic mouse line was developed to conditionally overexpress MHC class I in myofibres [6]. These mice exhibit myopathy with, nonetheless, a mild inflammatory response mostly characterised by macrophage but no lymphocyte muscle infiltration. Indeed, non-immunological mechanisms such as endoplasmic reticulum stress have been ascribed to myopathy in these mice [7]. Another molecular feature of human IIM is the pathological accumulation of the amyloid- β peptide that occurs in inclusion body myositis (IBM) patients. This has led to the development of transgenic mice that overproduce amyloid- β precursor protein fragments in muscle [8–10]. Other than the presence of amyloid- β deposits, central nuclei in clusters of myofibres and neutrophil (but no macrophage or T cell) infiltrates were found in the muscles of these mice [10]. These models reproduce some but not all the characteristics of human IIM.

We previously observed that non-obese diabetic (NOD) mice deficient in the inducible T cell co-stimulator (ICOS)/ICOS ligand (ICOSL) pathway were protected from diabetes, the main autoimmune manifestation occurring in NOD mice. Interestingly, these mice spontaneously displayed a muscle deficiency compatible with a myositis [11]. In the *Icosl*^{-/-} NOD model, further studies have shown that the muscle pathology is linked to muscle-infiltrating CD4⁺ T cells producing IFN γ [12]. Features of myositis have been found in *Icos*^{-/-} NOD mice, but the disease has not been characterised.

Key points

- Spontaneous progressive myositis develops in *Icos*^{-/-} NOD mice.
- Anti-TNNT3 autoantibodies are detected in *Icos*^{-/-} NOD mice with myositis.
- NOD mice immunisation with TNNT3 triggers myopathy.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Icos^{-/-}, *Icosl*^{-/-} and *Icos*^{+/+} (wild-type [WT]) NOD mice were bred and housed in our facilities under specific pathogen-free conditions. *Icos*^{-/-} and *Icosl*^{-/-} NOD mice were generated as previously described [11]. WT NOD mice were purchased from Charles River Laboratories. Animal experiments were approved by an institutional ethics committee (#2015-080516503136). Mice were assessed weekly for weight, diabetes and myopathy clinical score and monthly for muscle strength. Diabetes was monitored using a urine strip test (Siemens) and muscle strength was assessed on the front paws using the grip test (Bioseb). Locomotor activity was evaluated at 34 weeks of age using the Catwalk XT gait analysis system (Noldus). For the clinical score, spontaneous muscle disability was separately scored for the two front paws and for the two hind ones as described in [13]: 0, normal; 1, mild muscle weakness with a tendency for spontaneous flexion of paws but conserved walk on a grid; 2, moderately impaired walk on a grid; and 3, severe disability to walk on a grid (with intermediate 0.5 values when required). Then, a global score was computed by adding the latter two values to a global limb disability score during a brief tail suspension assay (from 0, normal to 3, hunched up with no spontaneous movement; interval 0.5), plus 1 supplemental point when breathing difficulties were apparent. Hence, the clinical score ranged from 0 to 10. For disease incidence, mice with a clinical score above 3 were considered ill.

Muscle histology

At the endpoint, *gastrocnemius* muscles were harvested and frozen into cooled isopentane. Seven micrometres thick muscle sections were then stained with haematoxylin/eosin (H&E) or Sirius red. Immunofluorescence was performed after blocking with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin and 10% neonatal goat serum. Sections were labelled with primary antibodies directed against C5b-9 (Abcam), MHC class I (Invitrogen) and laminin (Dako) combined with CD4 (BD Pharmingen), CD8a (BD Pharmingen),

B220 (Sony Biotechnologies), CD11b (BD Pharmingen) or CD11c (eBioscience) and then revealed with appropriate secondary antibodies (Invitrogen). Slides were mounted with DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech). Pictures were taken with a Thunder Imaging Tissue 3D wide-field microscope (Leica Microsystems), and immunoreactive areas of two sections per mouse were quantified using Fiji software (ImageJ, NIH).

Flow cytometry

The two *gastrocnemius* and the two quadriceps muscles from each mouse were dissected and pooled for mechanical and enzymatic digestion. Skeletal muscle tissue was dissociated using a skeletal muscle dissociation kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Lymphoid cells were enriched using a Percoll gradient and then labelled with antibodies for CD45, CD4, Foxp3, CD8, CD19, F4/80 and CD11b (Sony Biotechnologies). Cells were analysed with a BD Fortessa flow cytometer (BD Biosciences), and data were processed with FlowJo software.

2D electrophoresis and western blotting

Proteins were extracted from the muscles of 40-week-old NOD mice with a denaturing buffer and then loaded on isoelectric focusing strips (pH 3–10). After migration, a second-dimension separation was performed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to separate proteins by molecular weight. For each sample analysed, two identical gels were run in parallel: one for hybridisation with sera from *Icos*^{-/-}, *Icosl*^{-/-} or *Icos*^{+/+} (WT) NOD mice and a second one for Coomassie blue staining. Spots identified after hybridisation using *Icos*^{-/-}, *Icosl*^{-/-} and WT NOD sera were manually excised from Coomassie gels, and in-gel digestion of proteins was performed before protein identification by mass spectrometry analysis.

Mass spectrometry analysis

After gel fragment washing in 50-mM ammonium bicarbonate and 50% v/v methanol or 50% v/v acetonitrile solution, the spots were digested overnight in 30 µL of a digestion buffer containing 50-mM ammonium bicarbonate and 6 ng/µL sequencing grade modified porcine trypsin (Promega). Speed-vac dried peptide extracts were resuspended in 10 µL of 5% v/v CH₃CN/0.1% v/v formic acid and then analysed with a nano-LC1200 system coupled to a 6340 Ion Trap mass spectrometer (Agilent Technologies). A 9-min linear gradient (3%–80% acetonitrile in 0.1% formic acid) at a flow rate of 400 nL/min was used. For protein identification, MS/MS peak lists were extracted and compared with the UniProtKB/Swiss-Prot 55.6

(390,696 sequences; 140,503,634 residues) database by using the MASCOT Daemon Version 2.2.2 (Matrix Science) search engine. The searches were performed with the following specific parameters: enzyme specificity, trypsin; one missed cleavage permitted; no fixed modifications; variable modifications, methionine oxidation, cysteine carbamidomethylation; monoisotopic; peptide charge, 2⁺ and 3⁺; mass tolerance for precursor ions, 1.5 Da; mass tolerance for fragment ions, 0.6 Da; ESI-TRAP as instrument; and taxonomy, *Mus Musculus*. Protein hits were automatically validated if they satisfied the following criteria: identification of two top-ranking peptides (bold and red), each with a MASCOT score of >38 (*p* < 0.05). To evaluate false-positive rates, all the initial database searches were performed by using the 'decoy' option of MASCOT. Results were considered relevant if the false-positive rate never exceeded 1%.

Anti-troponin T3 addressable laser bead immunoassay

Troponin T3 (TNNT3) protein fused with MYC/DDK-tag was obtained from OriGene Technologies. Ten micrograms per millilitre of recombinant proteins was coupled to Bio-Plex Pro magnetic carboxylated beads using a Bio-Plex amine coupling kit (Bio-Rad). Validation of tests was performed using a commercial antibody targeting the TNNT3 protein with anti-DDK from OriGene Technologies.

Beads were incubated with diluted sera or control antibodies for 2 h at room temperature. After washing, a secondary biotinylated antibody (SouthernBiotech) was added for 1 h followed by incubation with 50 µL of streptavidin R phycoerythrin (Bio-Rad) for 15 min. The mean fluorescence intensity (MFI) of each sample was determined on a Bio-Plex apparatus (Bio-Rad).

Mouse immunisation

Total RNA was extracted from mouse muscle by using TRIzol reagent (Invitrogen) and cDNA obtained by transcription of oligo(dT) primer RNA with Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The specific *Tnnt3* DNA fragment was amplified with specific primers (TNNT3-NdeI-sense 5'-CATATGTCTGACGAG-GAAACTGAACAA-3' and TNNT3-BamHI-reverse 5'-GGATCCT-TACTTCCAGCGCCACCG-3') and cloned into pET-15b (Novagen). The resulting plasmid was transfected into *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysE (Novagen), and the recombinant TNNT3 protein was produced and purified as previously described [14]. Purity was controlled by SDS-PAGE analysis with a 10% polyacrylamide gel followed by western blotting with an anti-TNNT3 mAb (Abcam).

Eight-week-old mice received two intramuscular injections (50 µL in the right *gastrocnemius*) of TNNT3 or ovalbumin (OVA) with incomplete Freund's adjuvant (IFA) and R848 (Sigma) at 0 and 3 weeks. Mice were monitored weekly for myopathy clinical score and diabetes and monthly for muscle strength as presented above.

Statistical analyses

Appropriate statistical tests were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism 8 software. Levels of statistical significance are illustrated as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTS

Spontaneous myositis with prominent inflammatory infiltrates develops in *Icos*^{-/-} NOD mice

The incidence of diabetes, body weight, myopathy clinical score [13] and front paw strength (grip test) of *Icos*^{-/-} NOD mice were

determined over time. *Icos*^{-/-} NOD mice did not develop diabetes in contrast to *Icos*^{+/+} NOD mice (Figure 1A), but they showed signs of myopathy from 24 weeks of age, reaching a prevalence of 100% at 35 weeks, reflecting a slowly progressive disease (Figure 1B). The survival curve reflects disease kinetics, as mice died in both strains (from myositis or diabetes according to the strain) with mortality being reduced and delayed in *Icos*^{-/-} NOD mice (40% mortality and median age at death of 33 weeks) with respect to *Icos*^{+/+} NOD mice (80% mortality and 22 weeks) (Figure 1C). In parallel with the development of myopathy, *Icos*^{-/-} NOD mice exhibited a loss of weight starting at 24 weeks of age (Figure 1D). In *Icos*^{-/-} NOD mice, the myopathy clinical score increased (Figure 1E) and muscle grip strength decreased over time (Figure 1F), with a difference becoming statistically significant from 27 and 32 weeks, respectively, compared with *Icos*^{+/+} NOD mice. Locomotor activity, determined with the Catwalk XT

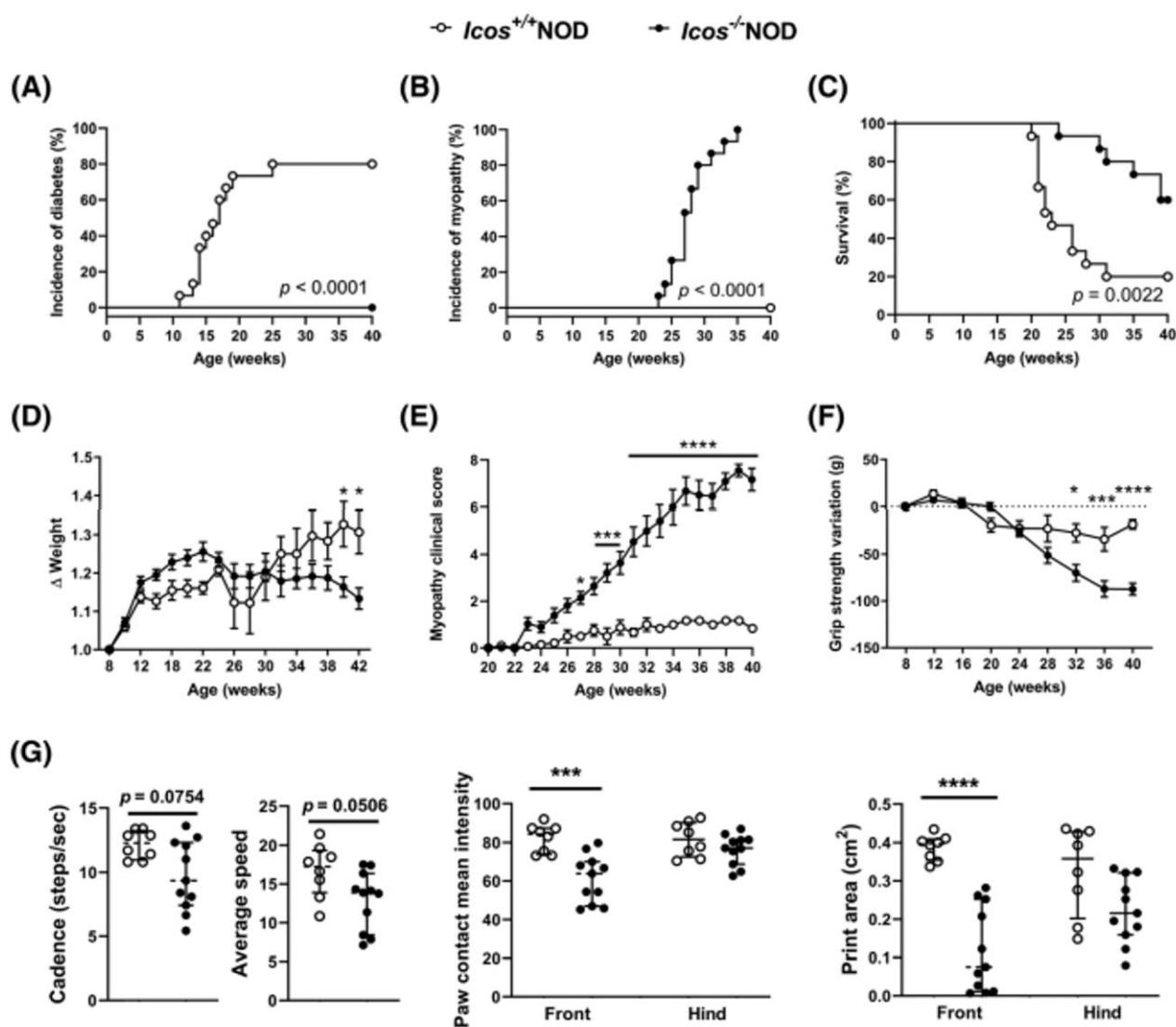


FIGURE 1 *Icos* gene disruption in non-obese diabetic (NOD) mice elicits myositis. (A) Incidence of diabetes and (B) myopathy, (C) survival curve, (D) body weight variation with respect to the original weight, (E) clinical score and (F) grip strength loss were monitored over time and (G) motricity was analysed by Catwalk at 34 weeks of age in *Icos*^{-/-} and *Icos*^{+/+} NOD mice ($n = 15$ mice per group). For (A)–(C), a log-rank test was performed. For (D)–(F), the mean and standard error of the mean are shown and analysis of variance with Šidák's multiple comparisons test was performed (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$). For (G), the median with interquartile range is shown and a Mann-Whitney test was performed (*** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

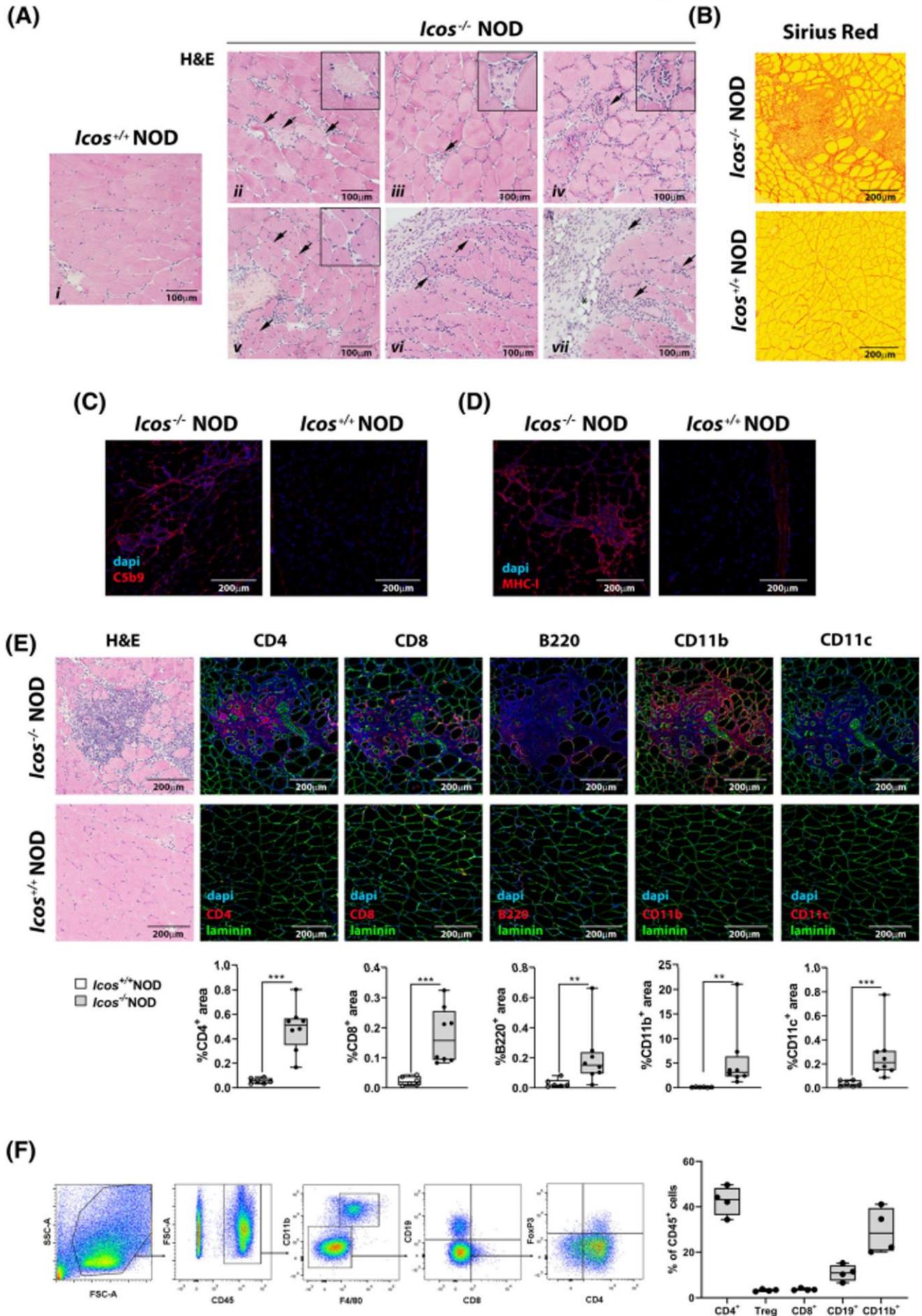


FIGURE 2 Legend on next page.

FIGURE 2 Histological analysis of *Icos*^{-/-} non-obese diabetic (NOD) and *Icos*^{+/+} NOD mouse muscle. (A) Haematoxylin/eosin (H&E) staining showing the presence of (ii) necrotic myofibres, (iii and iv) myophagocytosis, (v) central nuclei and (vi) atrophic/irregularly shaped myofibres in *Icos*^{-/-} NOD mice (black arrows pointing at abnormalities cited for each panel). Perimysial and endomysial infiltrates are present in (ii, iv, v, vi and vii) but highlighted with black arrows in (vi and vii). The presence of adipocytes is highlighted in (vii) with an asterisk. (B) Sirius red staining showing fibrosis. (C) C5b-9 and (D) MHC class I (MHC-I) staining showing immunoreactivity in muscles from *Icos*^{-/-} NOD mice. (E) Immunofluorescence staining of muscle infiltrate (H&E, left) with CD4, CD8a, B220, CD11b and CD11c antibodies. Representative images and quantification of the immunoreactive area are shown (below). (F) Frequency of immune cell subsets in the muscle infiltrates analysed by flow cytometry after enzymatic digestion. Representative flow cytometry panels showing the gating strategy (left). The CD45⁺ cell population was gated to determine the percentage of CD4⁺, regulatory T cells (Treg) (CD4⁺ Foxp3⁺), CD8⁺, CD19⁺ and F4/80⁺ CD11b⁺ cells. For (E) and (F), the median and min-to-max intervals are shown. For (E), a Mann-Whitney test was performed (***p* < 0.01 and ****p* < 0.001).

analysis system in mice with established disease, was also altered, with a trend to a decrease in step cadence and average speed of the mice and a significant reduction in the surface area and mean contact intensity of the front paws (Figure 1G).

In the muscles of *Icos*^{-/-} NOD mice with established disease (40 weeks of age), histological analysis with H&E staining (Figure 2A) revealed the presence of necrotic myofibres (ii), myophagocytosis (iii and iv), central nuclei (v) and atrophic/irregularly shaped myofibres (vi). Perimysial infiltrates (vi and vii), endomysial infiltrates (ii, iv, v, vi and vii) and adipocytes (vii) were also observed. Fibrosis was also found (Figure 2A, vi and vii) and confirmed by Sirius red staining (Figure 2B). These abnormalities were observed in all *Icos*^{-/-} NOD mice (*n* = 8) in our study, in the *gastrocnemius* (Figure 2) but also in the triceps and quadriceps (data not shown), and absent in *Icos*^{+/+} NOD mice. In addition, C5b-9 staining showed the presence of mild complement deposits in four out of five *Icos*^{-/-} NOD mice analysed (Figure 2C). Moreover, MHC class I immunoreactivity was observed in immune cell infiltrates and in myofibres in their proximity (Figure 2D), but not in myofibres located far from the infiltrate (data not shown) in five out of five *Icos*^{-/-} NOD mice analysed.

Immunofluorescence was performed with primary antibodies directed against CD4, CD8a, B220, CD11b or CD11c to characterise the immune infiltrate in these mice (Figure 2E). Immunofluorescence revealed the presence of a large proportion of CD11b⁺ macrophages (3.16% ± 6.54% immunoreactive area of total muscle section area) and CD4⁺ T cells (0.51% ± 0.19%). Foci of B220⁺ B cells were also observed (0.15% ± 0.2%) as well as a few scattered CD8a⁺ T cells (0.16% ± 0.09%) and CD11c⁺ dendritic cells (0.21% ± 0.22%). All these populations were significantly increased in *Icos*^{-/-} compared with *Icos*^{+/+} NOD mice. Immune cell infiltrates were further characterised by flow cytometry after muscle enzymatic digestion. Infiltrates were mainly composed of CD4⁺ T cells (43.17% ± 6.34% of CD45⁺ cells) including some regulatory T cells (Treg) (3.29% ± 0.46% of CD45⁺ cells), CD8⁺ T cells (3.49% ± 0.47% of CD45⁺ cells), B cells (10.96% ± 3.5% of CD45⁺ cells) and CD11b⁺ macrophages (28.4% ± 10.04% of CD45⁺ cells) (Figure 2F).

Identification of TNNT3 as a novel autoantibody target

In an attempt to identify new autoantibodies in the ICOS/ICOSL-deficient NOD model, we sought antigenic reactivities after

migration of muscle proteins on 2D gel and hybridisation with corresponding sera from *Icos*^{-/-} (*n* = 10), *Icosl*^{-/-} (*n* = 7) or *Icos*^{+/+} (*n* = 3) NOD mice (Figure 3A). After revelation, each spot found in sera from *Icos*^{-/-} or *Icosl*^{-/-} but not *Icos*^{+/+} NOD mice was characterised using mass spectrometry, leading us to identify TNNT3 as a candidate autoantigen. We then produced TNNT3, controlled its purity using Coomassie gel and western blot (Figure 3B) and developed a specific addressable laser bead immunoassay (ALBIA) (Figure 3C) to confirm the presence or absence of the autoantibody in sera from *Icos*^{-/-}, *Icosl*^{-/-} or *Icos*^{+/+} NOD mice at 8, 25 and 35 weeks of age (Figure 3D). Anti-TNNT3 antibody levels increased with age (and therefore with disease development) in *Icos*^{-/-} and *Icosl*^{-/-} NOD mice but remained absent in *Icos*^{+/+} NOD mice (Figure 3D).

We hypothesised that, if TNNT3 was relevant to the pathogenesis of myositis in this model, immunisation with recombinant TNNT3 would trigger myositis in the *Icos*^{+/+} NOD genetic background. To test this hypothesis, NOD mice were immunised with two intramuscular injections of TNNT3 or OVA combined with IFA and R848 as adjuvants at 0 and 3 weeks. Three weeks after the last injection, immunisation was confirmed by the presence of anti-TNNT3 IgG in sera (Figure 3E). All mice immunised with TNNT3, but not OVA, developed myositis (Figure 3F), with clinical signs appearing from 26 weeks after the first injection (Figure 3G). As with *Icos*^{-/-} NOD mice, the disease was slowly progressive, with a maximum clinical score at around 36 weeks. Muscle strength progressively decreased from 28 weeks and became significantly lower from 36 weeks (Figure 3H). Myositis was confirmed by histological analysis at the endpoint. Although the histological changes were milder than those in *Icos*^{-/-} mice (Figure 3I), we observed the presence of scattered necrotic fibres (ii), myophagocytosis (ii and iv), myofibres with central nuclei (iii) and endomysial infiltrates (v). Fibrosis was also observed by Sirius red staining (Figure 3J). MHC class I staining was restricted to the immune cell infiltrates (Figure 3K). The infiltrates were found to be composed of T cells (0.12% ± 0.04% and 0.11% ± 0.08% immunoreactive area of the total muscle section area for CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively) and macrophages (0.31% ± 0.22%) (Figure 3L). Altogether, these results demonstrate the induction of inflammatory myopathy in NOD mice by immunisation against TNNT3, and therefore, according to Witebsky's revised criteria for autoimmunity, the pathogenicity of the TNNT3-specific autoimmune response seems probable [15].

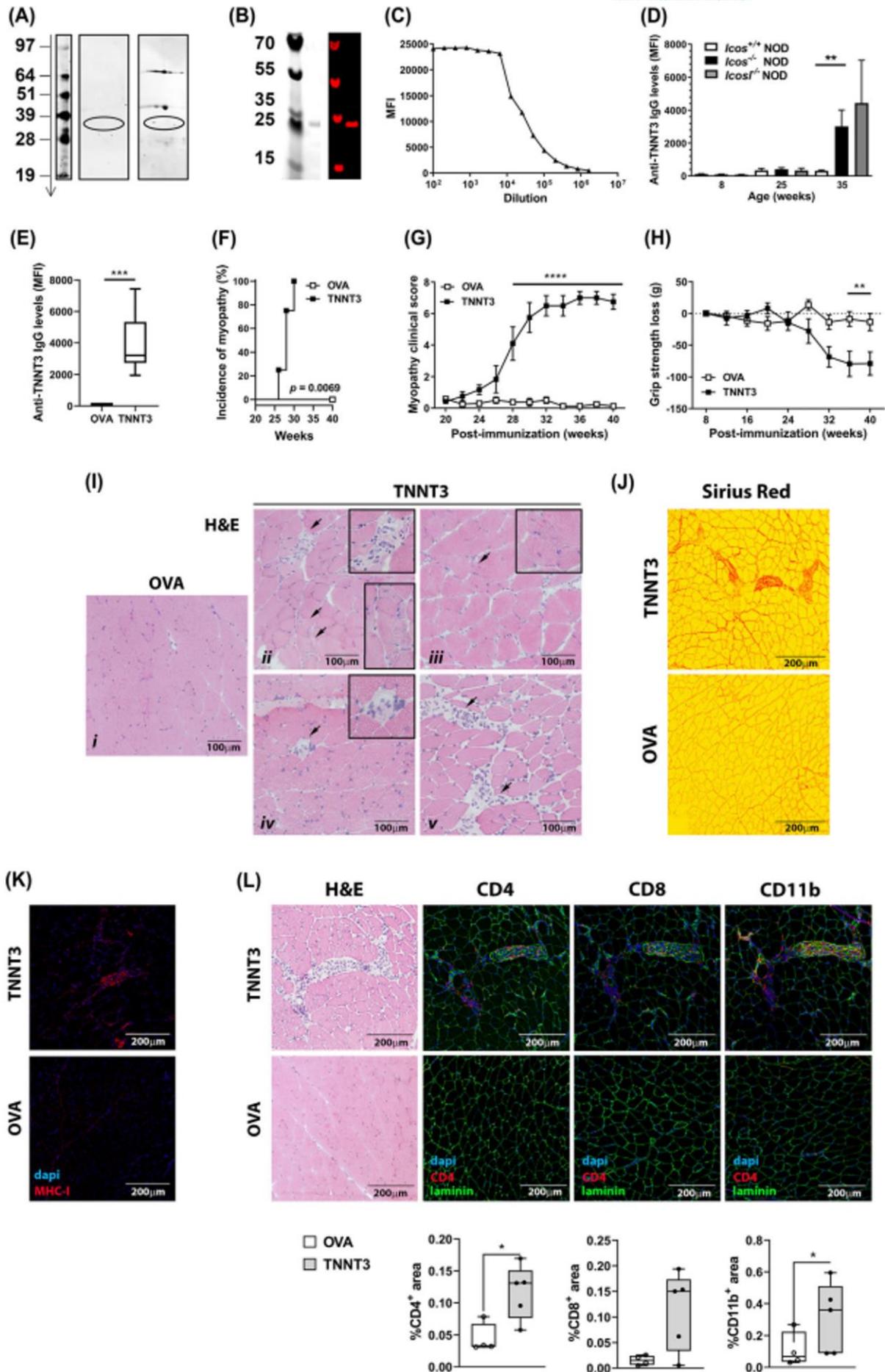


FIGURE 3 Legend on next page.

FIGURE 3 Anti-troponin T3 autoantibodies are involved in myositis pathogenesis. (A) Troponin T3 (TNNT3) was identified as a candidate autoantigen by 2D gel electrophoresis of non-obese diabetic (NOD) muscle proteins and hybridisation with sera from mice deficient (right) or not (left) in the inducible T cell co-stimulator pathway. The spot in the gel corresponding to TNNT3 (absent in wild-type mice) has been encircled. (B) Mouse TNNT3 protein was assessed by Coomassie blue and western blot. (C) Addressable laser bead immunoassay for the detection of anti-TNNT3 in mouse sera was validated by commercial antibody and (D) *Icos*^{-/-}, *Icosl*^{-/-} and *Icos*^{+/+} NOD sera from 8 ($n = 5$), 25 and 35 ($n = 15$ or 5 for *Icosl*^{-/-} NOD sera) week-old mice were assessed. (E) Anti-TNNT3 IgG antibody levels were measured in NOD mice 3 weeks after immunisation against ovalbumin (OVA) or TNNT3 by two intramuscular injections of protein and adjuvant (incomplete Freund's adjuvant + R848). (F) Incidence of myopathy, (G) clinical score and (H) grip strength were monitored over time. (I, J) Muscle histological analysis of TNNT3 and OVA-immunised NOD mice. (I) Haematoxylin/eosin (H&E) staining showing the presence of (ii) necrotic fibres, (ii and iv) myophagocytosis and (iii) myofibres with central nuclei (arrows pointing at abnormalities cited for each panel). (v) Endomysial infiltrates (black arrows) were also observed, and fibrosis was confirmed by (J) Sirius red staining. (K) MHC class I (MHC-I) staining showing expression in infiltrate. (L) H&E staining and immunofluorescence analysis showing an endomysial infiltrate of inflammatory cells characterised by the presence of CD4⁺, CD8a⁺ and CD11b⁺ cells. Representative images and quantification of immunoreactive areas are shown. For (D), the median with interquartile range is shown and a Mann-Whitney test was performed with $**p < 0.01$. For (E), the mean with min-to-max intervals is represented and a Mann-Whitney test was performed with $***p < 0.001$. For (F), a log-rank test was performed. For (G) and (H), the mean and standard error of the mean are shown and analysis of variance with Sidák's multiple comparisons test was performed. For (L), the median with min-to-max intervals and standard error of the mean are shown and a Mann-Whitney test was performed ($*p < 0.05$). MFI, mean fluorescence intensity.

DISCUSSION

Our results show that *Icos*^{-/-} NOD mice do not develop diabetes, but a spontaneous autoimmune myopathy. The fact that the genetic deletion of a T cell co-stimulatory molecule leads to autoimmunity rather than immunodeficiency may seem paradoxical but is not completely unexpected in accordance with other studies. For example, it has been shown that deleting CD28 in NOD mice does not prevent but conversely worsens diabetes [16]. This was ascribed to the fact that whereas Treg development and homeostasis are dependent on B7/CD28, pathogenic effector T cells use different co-stimulatory molecules for activation.

The reason underlying a switch in autoimmunity in NOD mice towards the muscle instead of pancreatic beta cells in the absence of the ICOS/ICOSL pathway is also intriguing but not unexpected based on the previous literature. Indeed, in addition to being prone to developing type 1 diabetes, NOD mice tend to naturally display mild immune responses against other tissues, including salivary, lacrimal, thyroid, parathyroid and adrenal glands, testis, large bowel and red blood cells. This supports a global susceptibility to autoimmunity in these mice, due to altered central and peripheral tolerance mechanisms [17]. It has been shown that genetic or therapeutic manipulation of NOD mice can promote the development of other autoimmune diseases with or without protection from diabetes [18]. Interestingly, NOD mice that are deficient in another co-stimulatory molecule, CD86, are protected from the development of diabetes but develop peripheral nerve autoimmunity instead [19]. The fact that *Icos*^{-/-} NOD mice are also protected from diabetes suggests that the ICOS/ICOSL pathway is critical for the function of diabetogenic T cells but dispensable for the development of T cell responses directed against skeletal muscle autoantigens.

Our results also highlight TNNT3 as a relevant autoantigen in this model of myositis. TNNT3 is one of the three isoforms of TNNT, which belongs to the troponin complex. This complex is involved in muscle contraction through calcium regulation of actin thin filament

function. Whereas TNNT1 is expressed in slow skeletal muscle and TNNT2 in cardiac muscle, TNNT3 is expressed in fast skeletal muscle [20]. Interestingly, in humans, more than 140 mutations in genes coding thin filament proteins, including TNNT3, have been found and have been associated with various congenital skeletal myopathies, supporting the important physiological role of these proteins [21]. Our study suggests that an immune response targeting TNNT3 leads to muscle inflammation and functional impairment. Interestingly, a decrease in TNNT3 protein levels in IIM has been reported [22]. A repetitive immune response against certain autoantigens might result in target destruction and ultimately in a reduction of its levels. As shown by *Icos*^{-/-} NOD mice histological analysis, muscle damage is conspicuous with the presence of numerous atrophic and necrotic fibres. Both humoral and cellular immune responses could be involved in TNNT3-induced myositis in NOD mice as evidenced by the presence of high levels of anti-TNNT3 antibodies in the sera of *Icos*^{-/-} and *Icosl*^{-/-} NOD mice together with lymphocyte and macrophage infiltrates in their muscles. Several studies have shown that autoantibodies may be pathogenic through a variety of mechanisms. Antibody-dependent or complement-mediated toxicity are well-known mechanisms for some myositis-specific autoantibodies [23, 24]. Some studies suggest that myositis-specific autoantibodies may directly impair the function of their target. For example, anti-MDA5 antibodies are suspected of deregulating the IFN-I pathway by inducing chronic activation in targeted tissues [24] and anti-SRP alter the translocation of proteins to the endoplasmic reticulum [25]. Yet, myositis-specific autoantibodies target predominantly ubiquitous proteins, which may explain the extra-muscular damage they trigger in different forms of myositis. The fact that TNNT3 has a muscle-specific expression suggests a direct pathogenicity that may warrant further mechanistic investigation.

Overall, we have described here the muscle disease of *Icos*^{-/-} NOD mice that confirms a spontaneous model of myositis with slowly progressive muscle weakness, myofibre necrosis, inflammatory infiltrates and anti-TNNT3 autoantibodies. These results support the use

of *Icos*^{-/-} NOD mice as a model for pathophysiological studies and preclinical evaluation of candidate therapies *in vivo*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GB, BP, CA and OB designed and/or performed experiments and were the manuscript's principal authors. LD, MC, GR, CBer, TZ, PC, MF and PC participated in experiments. JM participated in the experimental design. LJ was responsible for animal breeding and care. CBoit and CBec contributed to the mouse model and analysed data. All authors approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the 'Association Française contre les Myopathies' (grant #19458) and the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (grant #FDM201806006523). PISSARO Proteomics Platform was supported by the Rouen University, INSERM, Normandy Region, and the European Union. Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund (ERDF). The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

OB has received financial support for research from Argenx, Bristol Myers Squibb, UCB and CSL Behring. The other authors did not disclose any competitive interest relative to this work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available because of privacy or ethical restrictions.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Animal experiments were approved by a French institutional ethics committee (#2015-080516503136).

ORCID

Olivier Boyer  <https://orcid.org/0000-0002-7591-307X>

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/nan.12889>.

REFERENCES

- Simon JP, Marie I, Jouen F, Boyer O, Martinet J. Autoimmune myopathies: where do we stand? *Front Immunol*. 2016;7:234.
- Damoiseaux J, Mammen AL, Piette Y, Benveniste O, Allenbach Y, ENMC 256th Workshop Study Group. 256th ENMC international workshop: myositis specific and associated autoantibodies (MSA-ab): Amsterdam, the Netherlands, 8–10 October 2021. *Neuromuscul Disord NMD*. S0960-8966(22):00148-1.
- Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J Intern Med*. 2016;280(1):8-23. doi:10.1111/joim.12451
- Afzali AM, Ruck T, Wiendl H, Meuth SG. Animal models in idiopathic inflammatory myopathies: how to overcome a translational roadblock? *Autoimmun Rev*. 2017;16(5):478-494. doi:10.1016/j.autrev.2017.03.001
- Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol*. 1989;20(3):224-231. doi:10.1016/0046-8177(89)90128-7
- Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, et al. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9209-9214. doi:10.1073/pnas.97.16.9209
- Fréret M, Drouot L, Obry A, et al. Overexpression of MHC class I in muscle of lymphocyte-deficient mice causes a severe myopathy with induction of the unfolded protein response. *Am J Pathol*. 2013;183(3):893-904. doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.003
- Fukuchi K, Pham D, Hart M, Li L, Lindsey JR. Amyloid- β deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1687-1693. doi:10.1016/S0002-9440(10)65682-9
- Jin LW, Hearn MG, Ogburn CE, et al. Transgenic mice overexpressing the C-99 fragment of β PP with an α -secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1679-1686. doi:10.1016/S0002-9440(10)65681-7
- Sugarman MC, Yamasaki TR, Oddo S, et al. Inclusion body myositis-like phenotype induced by transgenic overexpression of β AAPP in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):6334-6339. doi:10.1073/pnas.082545599
- Prevot N, Briet C, Lassmann H, et al. Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2267-2276. doi:10.1002/eji.201040416
- Briet C, Bourdenet G, Rogner UC, et al. The spontaneous autoimmune neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD mice is CD4⁺ T-cell and interferon- γ dependent. *Front Immunol*. 2017;8:287. doi:10.3389/fimmu.2017.00287
- Bourdenet G, Dubourg B, Nicol L, et al. Value of magnetic resonance imaging for evaluating muscle inflammation: insights from a new mouse model of myositis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018;44(5):537-540. doi:10.1111/nan.12457
- Lartigue A, Drouot L, Jouen F, Charlionet R, Tron F, Gilbert D. Association between anti-nucleophosmin and anti-cardiolipin antibodies in (NZW \times BXSB)_{F1} mice and human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6):R1394-R1403. doi:10.1186/ar1838
- Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*. 1993;14(9):426-430. doi:10.1016/0167-5699(93)90244-F
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-440. doi:10.1016/S1074-7613(00)80195-8
- Alyanakian MA, You S, Damotte D, et al. Diversity of regulatory CD4⁺ T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15806-15811. doi:10.1073/pnas.2636971100
- Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2005;4(6):373-379. doi:10.1016/j.autrev.2005.02.002
- Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, et al. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*. 2001;194(5):677-684. doi:10.1084/jem.194.5.677
- Wei B, Jin JP. TNNT1, TNNT2, and TNNT3: isoform genes, regulation, and structure-function relationships. *Gene*. 2016;582(1):1-13. doi:10.1016/j.gene.2016.01.006

21. Ochala J. Thin filament proteins mutations associated with skeletal myopathies: defective regulation of muscle contraction. *J Mol Med Berl Ger*. 2008;86(11):1197-1204. doi:10.1007/s00109-008-0380-9
22. Parker KC, Walsh RJ, Salajegheh M, et al. Characterization of human skeletal muscle biopsy samples using shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2009;8(7):3265-3277. doi:10.1021/pr800873q
23. 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. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(1):131-139. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213518
24. Nombel A, Fabien N, Coutant F. Dermatomyositis with anti-MDA5 antibodies: bioclinical features, pathogenesis and emerging therapies. *Front Immunol*. 2021;12:773352. doi:10.3389/fimmu.2021.773352
25. Römisch K, Miller FW, Dobberstein B, High S. Human autoantibodies against the 54 kDa protein of the signal recognition particle block function at multiple stages. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(2):R39. doi:10.1186/ar1895

How to cite this article: Bourdenet G, Pileyre B, Drouot L, et al. *Icos* gene disruption in non-obese diabetic mice elicits myositis associated with anti-troponin T3 autoantibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2023;49(1):e12889. doi:10.1111/nan.12889

ARTICLE 2

Preclinical efficacy of adipose derived stem cell therapies in the treatment of myositis.

Contexte de l'étude : Le traitement des myosites repose principalement sur l'utilisation de corticoïdes et d'immunosuppresseurs. Malgré leur efficacité chez un grand nombre de patients, certains restent réfractaires, notamment ceux atteints de myosites à inclusion. Une nouvelle option de traitement pourrait être l'utilisation de thérapies cellulaires basées sur les cellules souches mésenchymateuses. Déjà testées dans d'autres pathologies auto-immunes tel que la maladie de Crohn, le diabète ou la polyarthrite, elles présentent des propriétés immunomodulatrices, régénératives, anti-fibrotiques et pro-angiogéniques d'intérêt dans le traitement des myosites. Ayant montré des résultats intéressants dans différents *Case report*, plusieurs essais cliniques sont sur le point de débiter [Gandolfi *et al*, 2023].

Méthode : Afin d'évaluer précliniquement l'efficacité de la fraction vasculaire stromale (FVS) et des cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC) dans un modèle de myosite *in vivo*, nous avons injecté en intra-musculaire ces thérapies à des souris NOD *Icos*^{-/-}, présentant une myosite spontanée d'apparition progressive. Nous avons suivi l'évolution clinique et celle de la force musculaire, et évalué les fonctions motrices par Catwalk® plusieurs semaines après traitement. En fin de protocole, nous avons prélevé les muscles gastrocnémiens et quadriceps ainsi que les ganglions pour réaliser des analyses histologiques et en cytométrie en flux.

Principaux résultats :

- Nous avons démontré, avec les deux thérapies, un effet préventif dose-dépendant significatif visible au niveau de la clinique, de la force musculaire ainsi que des fonctions motrices. Nous avons aussi montré une diminution de l'atrophie musculaire ainsi que de l'inflammation systémique par comparaison avec des souris non traitées.
- Les ADSC présentent une efficacité plus importante que la FVS, avec un délai de stabilisation de la maladie plus court (différence significative du score clinique en 7 semaines contre 15 semaines respectivement).
- La composition de la FVS varie entre les souris donneuses CD1 et les souris NOD *Icos*^{-/-} dès 8 semaines de vie, mais aussi entre des souris NOD *Icos*^{-/-} jeunes et âgées.

Original article

Preclinical efficacy of adipose derived stem cell therapies in the treatment of myositis.

, Pileyre B^{† 1,2}, Gandolfi S^{1,3}, Abad C¹, Jaworski T¹, Drouot L¹, Boyer O⁵, Dubus I¹, Martinet J⁵,

- 1) Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, F-76000 Rouen, France
- 2) Centre Henri Becquerel, Department of Pharmacy, F-76000 Rouen, France
- 3) Toulouse University Hospital, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, F-31000 Toulouse, France
- 4) Normandie Univ, UNIROUEN, U1234, CHU Rouen, Department of Plastic, Reconstructive and Hand Surgery, F-76000 Rouen, France
- 5) Normandie Univ, UNIROUEN, U1234, CHU Rouen, Department of Immunology and Biotherapy, F-76000 Rouen, France

[†] Corresponding author:

Dr Baptiste Pileyre
Department of Pharmacy
Centre Henri Becquerel
76038, Rouen, France
Baptiste.pileyre@gmail.com

Declaration of conflicting interests: The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Introduction

Myositis are characterized by autoimmune muscle damage leading to progressive loss of strength and disability. They include polymyositis, dermatomyositis, immune-mediated necrotizing myositis, inclusion myositis (IBM) and overlap myositis^{44,309}. Treatment of patients with myositis is still mainly based on the use of corticosteroids alone or combined with immunosuppressive agents³¹⁰. For patients refractory to these first lines of treatment, new therapies are being tested, including a number of immunosuppressive biotherapies aimed at reducing leukocyte infiltrates and humoral autoreactivity^{165,311,312}. Cell therapy, based on the use of hematopoietic or mesenchymal stem cells (MSC) and used in an increasing number of autoimmune diseases, has improved the management of these patients^{170,171,173}. This is particularly true for mesenchymal stem cells (MSC), which are difficult to extract from bone marrow or cord blood, but whose recent discovery in adipose tissue has brought them back into the light^{160,313}.

Two cell therapies can be extracted from adipose tissue: the stromal vascular fraction, a heterogeneous combination of different cell populations with a role in maintaining adipose tissue homeostasis, and adipose-derived stem cells, obtained by expansive culture of this combination³¹⁴. Criteria for identifying adipose tissue-derived cell therapies were quickly proposed to guarantee homogeneity of preparation and use^{193,315}, but the guidelines are still evolving with the advances in the field³¹⁶. Already used in numerous autoimmune diseases²⁹³, previous studies suggest immunomodulatory, regenerative, pro-angiogenic and anti-fibrotic properties, which may support their use in myositis treatment¹⁶⁰. To demonstrate this interest, preclinical studies and clinical trials are essential before these therapies can be made available to all patients.

Preclinical models have always been a limitation to the study of new therapeutics for the treatment of myositis. Most models are induced by immunization against an antigen, which can bias clinical efficacy when evaluating immunomodulatory molecules^{112,317}. The *Icos/IcosL*^{-/-} NOD models have the advantage of presenting a spontaneous disease with the main features of myositis: progressive loss of muscle strength, presence of cellular infiltrates and signs of muscle necrosis and regeneration^{127,128}. These models are still being studied to better understand the pathophysiological mechanisms of myositis and to evaluate anti-oxidative treatment^{49,318,319}. Here, we use *Icos*^{-/-} NOD mice to demonstrate the therapeutic efficacy of stromal vascular fraction and adipose tissue-derived stem cells in the treatment of myositis.

Material and method

Mice

CD1 mice were purchased from Charles River Laboratories. *Icos*^{-/-} NOD mice were bred and housed in our facilities under specific pathogen-free conditions. They were generated as previously described¹²⁷. Animal experiments were approved by an institutional ethics committee (#2019-083016072100). Clinical score of injected *Icos*^{-/-} NOD Mice was assessed on a weekly basis, by evaluating muscle disability as described previously⁴⁹. Briefly, this score is based on the number of legs showing impaired extension/flexion when suspended by the tail (from 0 to 4) combined with the number of legs showing a defect when walking on a grid (0 to 4). An extra point is added if a mouse has breathing difficulties. Muscle strength was assessed on front paws using the grip test (Bioseb). Locomotor activity was evaluated at 14 weeks after injection using the Catwalk XT gait analysis system (Noldus).

SVF extraction and injection

Inguinal and peri-anal white adipose tissue was collected after lymph node extraction from CD1 female mice between the ages of 8–12 weeks. CD1 mice were chosen because they share the same genetic background as NOD mice, and therefore as *Icos*^{-/-} NOD mice. Adipose was washed 3–4 times with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco) and finely minced. Adipose was then placed in an incubator shaker set to 100 rpm at 37°C for 10 minutes before addition of volume to volume of a digestion solution containing 0.25U/mL of collagenase NB5 type I and II (Nordmark) in PBS. Incubation and shaker were pursued for 1 hour. Digestion reaction was neutralized with PBS containing 10% fetal bovine serum (Gibco). Digested tissue was centrifuged and the supernatant containing adipocytes was removed. Solution was filtered on a 100 µm strainer and centrifuged to obtain the pellet of SVF cells. After counting, the cellular solution was diluted to different concentrations for injection of 10⁶ or 5x10⁵ cells distributed between the two lobes of the right gastrocnemius muscle of 20 weeks old anesthetised mice.

ADSC isolation and injection

For the isolation of ADSC, SVF was placed in a 75 cm² flask containing complete culture medium (CCM) consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium combined with the nutrient mixture F12 (DMEM-F12, Lonza), which was incubated at 37°C with 5% humidified CO₂. After 24 hours, Flasks were washed of non-adherent cells with PBS, and fresh CCM was added to each plate. Half the flask culture medium was replaced every 2-3 days with fresh CCM. When 70% confluence was achieved,

cells were passaged by trypsinization with 0.25% trypsin/1 mM EDTA (Gibco), neutralized with CCM, centrifuged, and re-seeded onto culture flask at a density of 100–200 cells per square centimeter. This process was repeated for subsequent passages then cells were injected. After counting, the cellular solution was diluted to different concentrations for injection of 2×10^5 or 10^5 cells distributed between the two lobes of the right gastrocnemius of 20 weeks old anesthetised mice.

Muscle histology

At the end point, gastrocnemius and quadriceps muscles were harvested, weighed and frozen into cooled isopentane. Immunofluorescence was performed on seven μm muscle sections after blocking with phosphate buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin and 10% neonatal goat serum. Sections were labelled with primary antibodies directed against CD45 (Sony) and laminin (Dako) and then revealed with appropriate secondary antibodies (Invitrogen). Slides were mounted with DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech). Pictures were taken with a Thunder Imaging Tissue 3D wide field microscope (Leica Microsystems) and immunoreactive area of two sections per mouse was quantified using Fiji software (ImageJ, NIH).

Flow cytometry

Cells are first washed and resuspended in FACS buffer consisting of 1X PBS with 0.5% of BSA (Sigma-Aldrich) and 5mM EDTA. They are then incubated for 15 minutes with a rat anti-mouse Fc block (BD Bioscience), followed by 30 minutes with the antibody mix according to the panel (table 1), combined with a viability marker (Fixable blue, Thermo). After incubation, cells are fixed using Fix/lyse solution (BD). All analyses were performed on the BD Fortessa™ cytometer (Becton Dickinson) and post-analyses on flowJo software (TreeStar Inc).

Statistical analysis

Appropriate statistical tests were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism 8 software. Levels of statistical significance are illustrated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Results

Stromal vascular fraction phenotype from different mouse strain

After extraction from inguinal and peri-anal fat pads of 8 weeks old mice, SVF cell populations were classified using the gating strategy shown in figure 1A. Comparison of compositions between CD1 mice and *Icos*^{-/-} NOD mice (Fig 1B) shows a lower proportion of leukocytes ($21.3 \pm$

2.85% VS $40.14 \pm 9.25\%$, $p = 0,0091$) mainly affecting HSCs ($20.42 \pm 0.83\%$ VS $30.93 \pm 5.09\%$, $p = 0.0091$) in CD1 mice. Among stromal cell populations, CD1 mice show a significantly higher proportion of MSCs ($53.78 \pm 5.49\%$ VS $26.26 \pm 6.03\%$, $p = 0,0091$) and of EPCs ($9.09 \pm 0.95\%$ VS $4.59 \pm 2.35\%$, $p = 0,0182$), but not for pericytes.

Some age-related differences can also be observed in *Icos*^{-/-} NOD mice. Indeed, 22-week-old mice have a significantly lower HSC ($19.3 \pm 3.08\%$ VS $30.93 \pm 5.09\%$, $p = 0.0020$) despite the absence of a significant difference in leukocyte rate (Fig 1B). The other populations showed no significant variation. When compared with other mouse strains of the same age, SVF from 22-week-old *Icos*^{-/-} NOD mice contains significantly fewer leukocytes ($32,98 \pm 6,65\%$ VS $44 \pm 3,10\%$, $p = 0,0159$, and $43,1 \pm 5,82\%$, $p = 0,0635$, compared to C57Bl6 and NOD mice respectively), HSCs ($19,3 \pm 3,08\%$ VS $33,31 \pm 2,68\%$, $p = 0,0159$, and $40,24 \pm 5,12\%$, $p = 0,0159$) and MSCs ($30,2 \pm 5,68\%$ VS $48,35 \pm 2,59\%$, $p = 0,0159$, and $44,04 \pm 7,33\%$, $p = 0,0317$) (Fig sup 1). EPCs and pericytes were not significantly different.

SVF from 20 CD1 mice were pooled and diluted for intramuscular injections, and a portion of the pooled SVF was cultured as described above. After 6 weeks of culture, ADSC obtained showed a very low signal for negative marker (CD45, CD34 and CD31), and a high signal for positive marker (CD73, CD90 and CD105) characteristic of ADSC phenotype (Fig Sup 2).

Adipose-derived cell therapies injections stabilize myositis progression in *Icos*^{-/-} NOD mice

SVF and ADSC, injected into *Icos*^{-/-} NOD mice in a preventive setting, controlled the progression of myositis over time, both in terms of clinical score and muscle strength. Indeed, we observed a significant difference in clinical score from 15 weeks after injection of a high dose of SVF (10^6 cells) compared with untreated mice ($p = 0,0094$, $0,0217$ and $0,0030$ at weeks 15, 16 and 17 respectively) (Fig 2A). Mice treated with ADSC showed a dose-dependent effect as early as 7 weeks post-injection for both doses compared to untreated mice ($p < 0.0345$ and 0.0137 for low and high dose respectively) (Fig 2B). However, this effect seems to diminish with time for the low dose, with a loss of significance from the 14th week. This stabilization of the disease was also evidenced by muscle strength measurements, with a significant difference at 17 and 6 weeks after injection for mice receiving the highest dose of SVF and ADSC respectively ($p < 0.0425$ and 0.0399 respectively)(Fig 2C-D).

At 14 weeks after SVF or ADSC injection, catwalk analysis showed an improvement in locomotor skills with a significantly shorter run duration compared to untreated mice after SVF injection (4.35 ± 1.8 s, 7.88 ± 2.33 s and 9.12 ± 1.33 s for High and Low dose and Control group respectively, $p = 0.0079$ for high dose group) and after ADSC injection (4.42 ± 2.45 s, 4.46 ± 1.34 s and 8.69 ± 2.05 s for High and Low dose and Control group respectively, $p = 0.0424$ and 0.0317 for High

and Low dose group respectively) (Fig 3A-C) . Average speed of treated mice was significantly increased with both treatments (12.59 ± 6.2 cm/s, 6.38 ± 3.61 cm/s and 5.79 ± 1.17 cm/s for High and Low dose and Control group respectively in SVF treated mice, with $p = 0.0317$ for High dose group, and 15.1 ± 8.44 cm/s, 11.95 ± 3.78 cm/s and 4.58 ± 2.55 cm/s for High and Low dose and Control group respectively in ADSC treated mice, with $p = 0.0424$ and 0.0317 for High and Low dose group respectively) (Fig 3B-D). Differences in step sequence pattern were also observed, with a greater proportion of alternating and cruciate sequences than rotate sequences in mice treated with High and Low dose of each therapy, and an increase in rotate sequences in untreated mice (Fig 3E-G). The regularity index of these step sequences is also significantly higher in mice treated with the highest dose of ADSC ($90 \pm 11\%$ VS $45 \pm 12\%$ of regularity for High dose and Control group respectively, $p = 0.0095$), but not with SVF (Fig 3F-H). Finally, the paw print areas seem to indicate greater support on the front paws and less on the hind paws in treated mice compared to untreated mice, with a difference significative for ADSC treated mice hind paws (0.28 ± 0.17 mm² and 0.18 ± 0.08 mm² VS 0.61 ± 0.19 mm², $p = 0.0333$ and $p = 0.0357$, for the right hind paw of High and Low dose treated mice respectively compared to Control, and 0.27 ± 0.15 mm² VS 0.64 ± 0.03 mm², $p = 0.0167$ for the left hind paw of High dose treated mice compared to Control) (Fig 3I-J).

Adipose-derived cell therapies injections limit muscular atrophy

Loss of muscle strength in *Icos^{-/-}* NOD mice correlated with the extent of muscle atrophy. In both protocols, gastrocnemius and quadriceps weights at the end of the protocol were significantly or almost significantly higher in mice treated with the highest dose than in untreated mice (133.4 ± 37.2 mg VS 85.2 ± 9.8 mg, $p = 0.048$ for right gastrocnemius of SVF injected mice or untreated respectively, 104.8 ± 27.5 mg VS 79 ± 19.8 mg, $p = 0.0328$ for the left, 117.4 ± 30.1 mg VS 62 ± 27.5 mg; $p = 0.0317$ for right gastrocnemius of ADSC injected mice or untreated respectively, and 109 ± 30 mg VS 73.8 ± 10.6 mg, $p = 0.0476$ for the left and 103.8 ± 31.5 mg VS 65.4 ± 27.1 mg, $p = 0.0556$ for right quadriceps)(Fig 4A-B). In SVF-treated mice, the weight of the right gastrocnemius (injected) was also significantly higher than the weight of the left gastrocnemius (133.4 ± 37.2 mg VS 104.8 ± 27.5 mg, $p = 0,0156$) but not in ADSC-treated mice. To confirm this result, we compared the average surface area of several sections of each muscle between treated (Fig 4C) and untreated mice (Fig 4D). We observed a decrease in muscle atrophy, with a significantly greater average surface area in the right gastrocnemius of treated mice (15.2 ± 2.9 mm² VS 6.8 ± 1.5 mm², $p = 0.0357$ for the right gastrocnemius of SVF injected mice or untreated respectively, 12.7 ± 0.7 mm² VS 7.3 ± 2.9 mm², $p = 0.0571$ for the left, and 10.4 ± 2.8 mm² VS 5.26 ± 1.65 mm², $p = 0.0238$ for right gastrocnemius of ADSC injected mice or untreated respectively, and 11.9 ± 3.8 mm² VS 6.6 ± 2.2 mm², $p = 0.0635$ for the left) (Fig 4E-F). Next, we evaluated the surface of leukocyte infiltrates in muscles to observe the

immunomodulatory effect of these therapies. Contrary to our expectations, the surface area of leukocyte infiltrates relative to total muscle area tended to be more important in the muscles of treated mice than in untreated mice, without significant differences (Fig 4G-H)

Adipose-derived cell therapies reduce systemic inflammation.

Next, we tried to evaluate the effect of cell therapies on systemic inflammation. Phenotype of the main leukocyte populations revealed significant differences between treated and untreated mice (Fig 5A). We observed a significant decrease in CD11b⁺ monocytes, in mice treated with both therapies ($0.45 \pm 0.22\%$, $p = 0.0381$, and $0.32 \pm 0.05\%$, $p = 0.0159$, VS $0.83 \pm 0.42\%$ for High and Low dose and Control group in SVF treatment protocol and $0.57 \pm 0.13\%$, $p = 0.0159$, $0.56 \pm 0.19\%$, $p = 0.0317$, VS $0.88 \pm 0.43\%$ for High and Low dose and Control group in ADSC treatment protocol) (Fig 5B-C). In contrast, CD4⁺ and CD8⁺ T cells proportions were increased in these mice ($43.7 \pm 3.2\%$, $p = 0.0333$, $43.4 \pm 1.76\%$, $p = 0.0159$, VS $37.7 \pm 1.83\%$ for CD4⁺ and $36.25 \pm 4.81\%$, $p = 0.0159$, $30.83 \pm 4.38\%$ and $27.66 \pm 2\%$ for CD8⁺ for High and Low dose and Control group in SVF treatment protocol, and $41 \pm 13.1\%$, $p = 0.0159$, $41 \pm 5.72\%$, $p = 0.0317$, VS $25.5 \pm 7.27\%$ for CD4⁺ and $38 \pm 5.76\%$, $p = 0.0357$, $36 \pm 1.48\%$, $p = 0.0571$, VS $25.5 \pm 1.62\%$ for CD8⁺ for High and Low dose and Control group in ADSC treatment protocol). In addition, we observed a decrease in the level of pro-inflammatory macrophages and/or effector T cells. Indeed, Ly6C^{Hi} monocytes are significantly reduced ($18.5 \pm 6.88\%$, $p = 0.0095$, $20.93 \pm 4.14\%$, $p = 0.0635$, VS $26.88 \pm 2.12\%$ for High and Low dose and Control group in SVF treatment protocol and $15.4 \pm 5.3\%$, $p = 0.0159$, $14.5 \pm 3.92\%$, $p = 0.0159$, VS $24.87 \pm 5.6\%$ for High and Low dose and Control group in ADSC treatment protocol). The distribution of naive T cells ($T_n = CD62L^{hi} CD44^{Lo}$), central memory T cells ($T_{cm} = CD62L^{Hi} CD44^{Hi}$) and memory effector T cells ($T_{em} = CD62L^{Lo} CD44^{Hi}$) is altered in favour of a reduction in T_{em} in treated mice ($13.69 \pm 3.2\%$, $p = 0.0159$, $20.43 \pm 1.73\%$, $p = 0.0159$, VS $24.7 \pm 1.45\%$ for CD4⁺ and $4.9 \pm 4.6\%$, $p = 0.0159$, $9.6 \pm 1.75\%$, $p = 0.0159$, VS $14.25 \pm 1.75\%$ for CD8⁺ for High and Low dose and Control group in SVF treatment protocol, and $22.2 \pm 5.1\%$, $p = 0.0159$, $19.65 \pm 5.7\%$, $p = 0.0159$, VS $30.3 \pm 4.1\%$ for CD4⁺ and $20.6 \pm 6.82\%$, $p = 0.0079$, $18.4 \pm 8.98\%$, $p = 0.0317$, VS $31.2 \pm 2.22\%$ for CD8⁺ for High and Low dose and Control group in ADSC treatment protocol).

Discussion

As explained above, the preclinical study of treatment in myositis is often biased by the design of the model, based on immunization against a muscle protein¹¹². Sometimes, immunization is carried out against an antigen specific to or associated with myositis in humans, enabling a humanized model to be obtained, but even these models do not enable all the clinico-biological signs

of myositis to be observed^{91,120,320}. In this study, we used the *Icos*^{-/-} NOD mice model, which shows inflammatory muscle damage beginning around 20 to 25 weeks of age, with progressive but irreversible loss of muscle strength¹²⁸. We chose to treat the mice at 20 weeks of age, before the onset of the first clinical signs, but not too early to guarantee the presence of the injected cells at the time of their appearance. Despite a longer or shorter delay in onset depending on the therapy used, we observed a stabilization of the disease with a dose-dependent effect. This effect was demonstrated by the clinical score, muscle strength and Catwalk analysis in *Icos*^{-/-} NOD, as described before³¹⁸. While the grip test is an easy way of measuring a mouse's muscular strength, it is limited to studying the front legs, and can be biased by a loss of strength in the fingers alone. Catwalk analysis confirms the loss of strength affecting all muscles, through a global assessment of motor functions. Initially used in behavioral study³²¹, this device is now used to study various neurological or musculoskeletal disorders³²², including myositis³¹⁹. Of the latter, it provides evidence of a change in gait over time in *Icos*^{-/-} NOD mice, with weight distribution on the hind legs due to a loss of strength affecting the front legs to a greater extent. In our study, these changes were reversed by the administration of adipose tissue-derived cell therapies.

Unlike immunization-induced models, *Icos*^{-/-} NOD mice do not display a specific biological marker. In this study, we demonstrated biologically the efficacy of cell-based therapies at both muscular and systemic levels. First, locally, by the reduction in muscle atrophy observed histologically is consistent with the reduced loss of muscle strength and improved motor function, as well as with the injection site having a strong local effect. Atrophy is also one of the gold standards for characterizing myositis, associated with leukocytic infiltrates³²³. Contrary to what was expected in this model, we observed more leukocyte infiltrate in treated than in untreated mice. We hypothesized that the muscles of untreated mice, as they degenerated with fibrosis and fatty infiltration, had lost the antigens/fibers targeted by the immune system³²⁴. This hypothesis remains to be explored in our model, but if proven, could demonstrate the important anti-fibrotic effect of adipose tissue-derived cell therapies. Secondly, we found differences in cell populations at lymph node level, suggesting a systemic anti-inflammatory effect of cell therapy. On the one hand, we observed a sharp decrease in monocytes, and mainly pro-inflammatory Ly6C⁺ monocytes in treated mice^{325,326}. These cells have already been linked to the acute phase of inflammation in an infectious model of myositis, and their decrease here could be indicative of reduced inflammation³²⁷. On the other hand, T lymphocytes increased, with a reduction in the number of memory effector T cells (T_{EM}) and an increase in the number of central memory T cells (T_{CM}). In contrast to acute infections, during which effector and T_{EM} cells rapidly diminish to make way for T_{CM}, the persistence of antigen in chronic infections and autoimmune diseases results in the maintenance of these T cell populations

over time, to the detriment of T_{CM} ³²⁸. This reversal in the levels of these populations has also been observed in systemic lupus erythematosus³²⁹.

In this study, we attempted to compare the effect of SVF with that of ADSCs. We chose to use cells from the same pool of donor mice, resulting in a time lag between the two protocols of around 6 weeks, the time required for ADSC production. This time lag necessitated the evaluation of two control groups, demonstrating the heterogeneity of the *Icos*^{-/-} NOD mice model. Nevertheless, both therapies demonstrated significant therapeutic efficacy, with a clear superiority of ADSCs. These latter showed a stronger effect at a lower dose (1/5). SVF and ADSC are rarely compared in either preclinical or clinical studies, especially in autoimmune diseases. Depending on the disease treated, one or the other shows superior efficacy to the other^{250,330-332}. When they are equivalent, SVF is generally described as a better treatment option, due to its ease of use. Indeed, this therapy is quick to prepare, ranging from a few minutes when using a mechanical separation method, to 3 -4 hours when using an enzymatic method. Used autologously, it is of great interest to academics and clinics alike, thanks to its low production costs. However, several health scandals have marred the intraoperative use of SVF by this type of clinic, leading to stricter legislation, notably in the United States^{333,334}. Another limitation to the current development of SVF at the clinical level is the great variability of SVF depending on the extraction method used^{223,224}, and also between donors according to their age, sex, lifestyle or underlying pathology²¹⁴⁻²¹⁹. This last point is particularly important in the difference in effect between preclinical studies in animals (using often syngeneic therapy from a healthy donor) and in humans (using autologous therapy from a sick patient). This inter-donor variability is also present for ADSCs, although it is phenotypically less visible. Unlike SVF, which is generally used freshly isolated, ADSCs, especially commercial ones, are a mixture of different donors (from a dozen or so for small manufacturing units to thousands for large-scale production), leading to very different results in the same disease^{197,198}. In order to improve the reproducibility and homogeneity of clinical trial results, minimum qualification criteria have been published^{193,315}, and a call for more mechanistic and preclinical studies has been made^{199,335}.

Here, we attempt to answer this call. We have been able to demonstrate the efficacy of the two therapies used here, both clinically and biologically. Intramuscular injection of these therapies showed no adverse effects, and several clinical studies have already demonstrated the safety of this route^{299,300}. While ADSCs appear to be more effective, SVF may be a more certain approach to treatment for patients with myositis refractory to other therapies. Firstly, because of the ease of production and regulation of this medicinal product compared with ADSCs. Secondly, and this is linked to the first point, due to the small number of patients who will benefit from this treatment. Myositis is a rare disease, and only a small proportion of patients would resort to these therapies,

which could block the involvement of industrials necessary to produce large quantities of ADSC. Additionally, very few commercial forms of ADSC exist today, and production is limited. An increase in the indications for these therapies could lead to greater demand than supply, potentially leading to a race for treatment as is beginning to emerge for other cellular therapies³³⁶. For all these reasons, patients could benefit more from SVF treatment. It now remains to demonstrate the effectiveness of this therapy in humans, and this point could be quickly answered thanks to the clinical trials already underway in IBM (NCT05032131, NCT04975841).

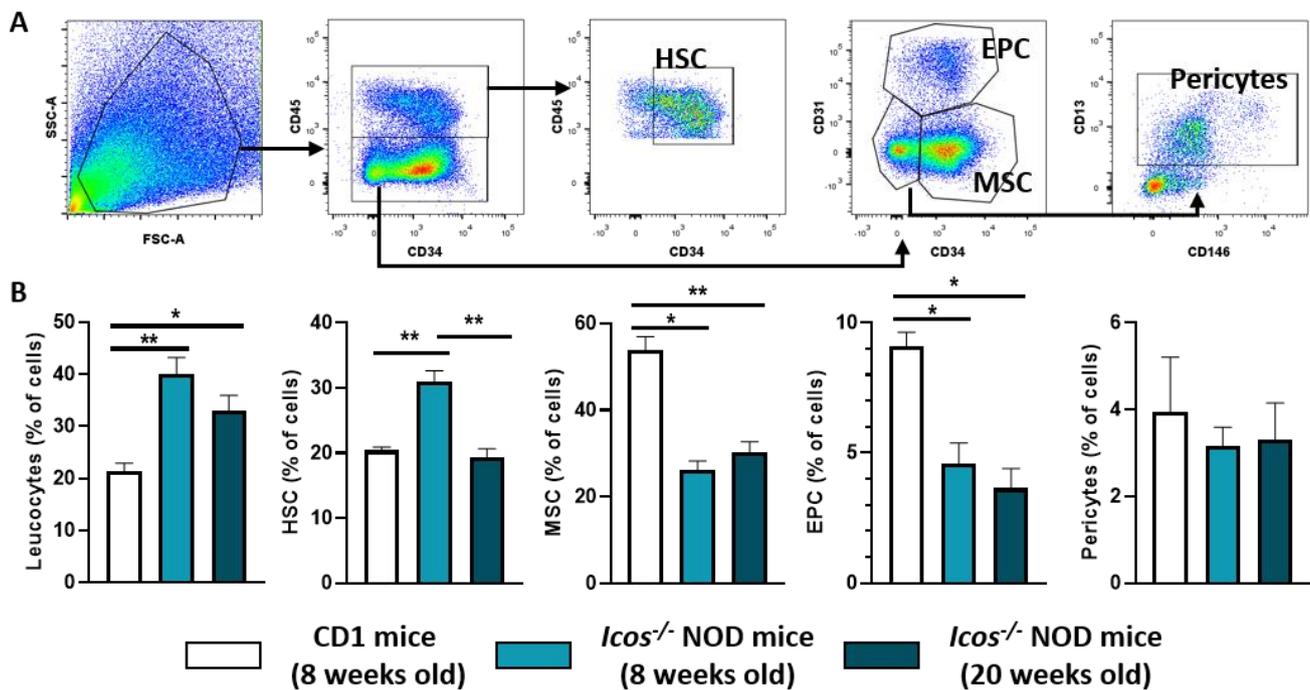
Conclusion

The adipose tissue-derived cell therapies evaluated in this study show efficacy in the treatment of a preclinical model of myositis. They reduced the severity of the disease and maintained muscle strength, notably by limiting atrophy. These two therapies have the potential to become a new treatment for myositis and must now be evaluated in humans, although further in vivo and in vitro studies will also be needed to better understand the mechanisms of action involved and identify factors predictive of their efficacy.

Table

Panel	Antibody	Laboratory	References	Clone
SVF / ADSC	CD45 BV510	SONY	1115685	30-F11
	CD34 APC	SONY	1243060	HM34
	CD31 PE	SONY	1112040	390
	CD146 A488	SONY	1273540	ME-9F1
	CD13 BV421	BD	564354	R3-242
	CD73 BV605	SONY	1236075	TY/11.8
	CD90.1 BV711	SONY	1612695	OX-7
	CD105 PERCPC5.5	SONY	1202080	MJ7/18
	CD140A PC7	SONY	1279560	APA5
Leukocytes	CD45 BV650	SONY	1115755	30-F11
	CD4 APC EFLUOR 780	EBIOSCIENCE	47-0042-82	RM4-5
	CD8 PRC5.5	SONY	1103670	53-6.7
	CD19 BV605	SONY	1177700	6D5
	CD62L FITC	SONY	1122030	MEL-14
	CD44 PC7	SONY	1115150	IM7
	CD11B A700	SONY	1106110	M1/70
	CD11C APC	SONY	1186550	N418
LY6C BV421	SONY	1240160	HK1.4	

Table 1 : Flow cytometry antibodies panel



Figures

Figure 1: Stromal vascular fraction phenotype and comparison between strains: (A) Gating strategy and (B) graphical representations of comparison of main cell population proportion for stromal vascular fraction harvested and extracted from CD1 (8 weeks old) or *Icos*^{-/-} NOD mice (8 or 22 weeks old) and analyzed by flow cytometry. (Mann-Whitney test, *, $p < 0,05$; ** $p < 0.01$). (EPC : Endothelial Progenitor Cell; MSC : Mesenchymal Stem Cell)

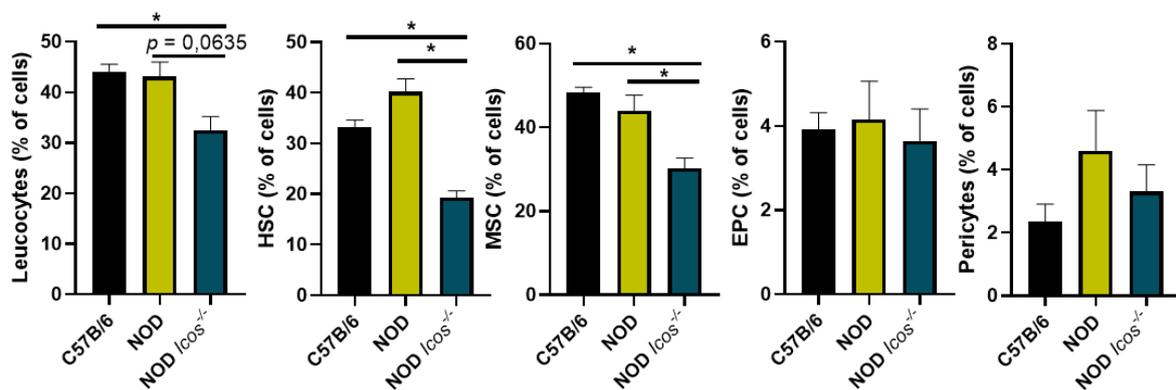


Figure Supplemental 1: Stromal vascular fraction extraction and comparison between strains: Graphical representation of comparison of main cell population proportion between 22 weeks old C57Bl/6 ($n = 4$), NOD ($n = 4$) and *Icos*^{-/-} NOD mice ($n = 5$) (*, $p < 0,05$; ** $p < 0.01$).

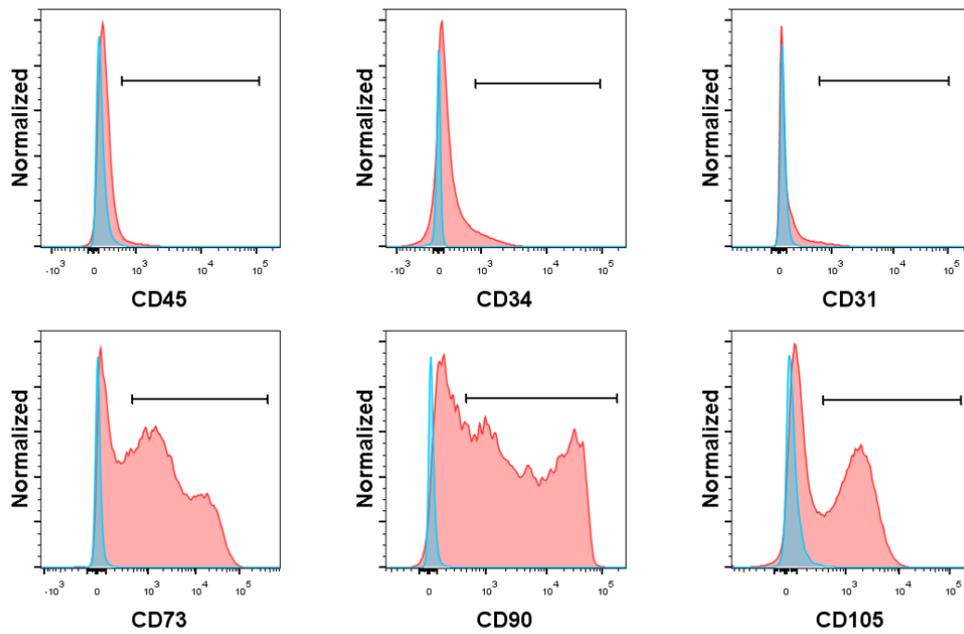


Figure Supplemental 2: Adipose derived stem cell phenotyping: Absence of expression of negative markers (CD45, CD34 and CD31) and expression of positive markers (CD73, CD90 and CD105) characteristic of ADSCs.

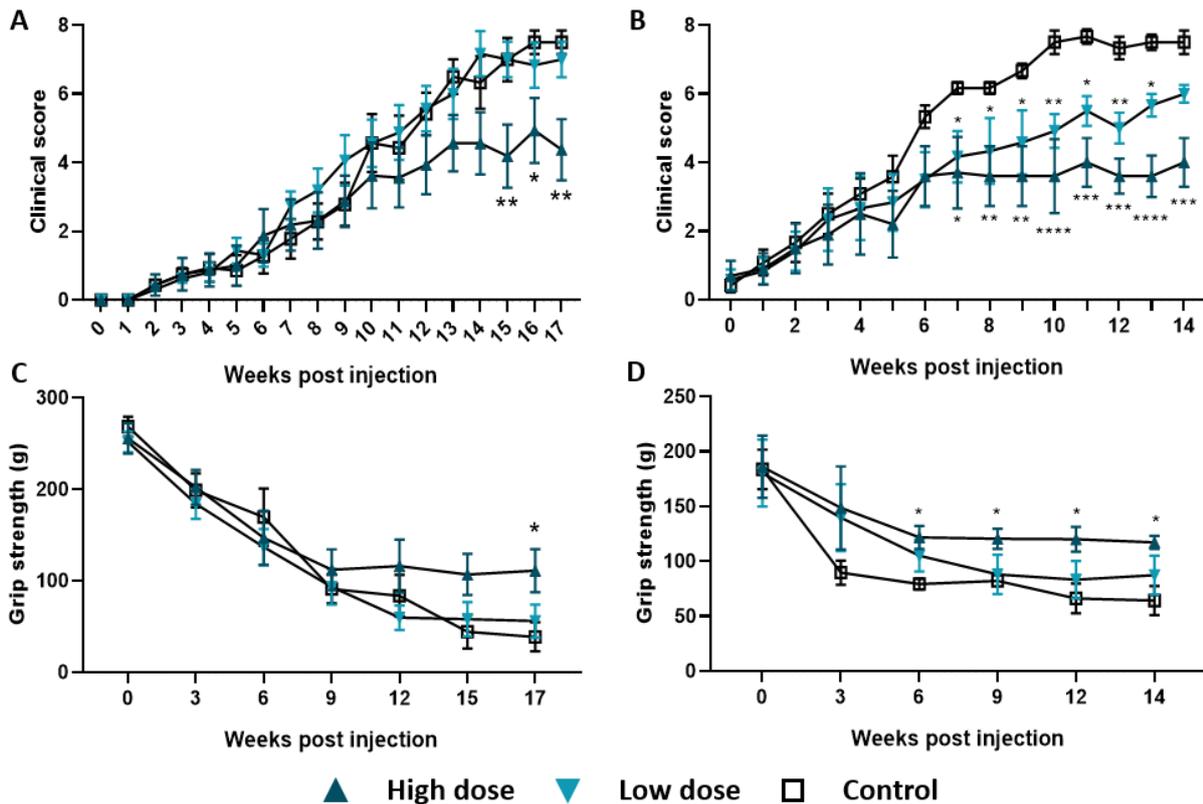


Figure 2: Clinical follow-up of *Icos*^{-/-} NOD mice after treatment with adipose derived cell therapies: Graphical representation of (A, B) clinical score, followed weekly, (C, D) grip strength, followed at three weeks intervals, for mice treated with stromal vascular fraction (N = 7 in each group) or adipose-derived stem cells (N = 5 in each group) respectively (Holm-Sidak's multiple comparisons test, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$).

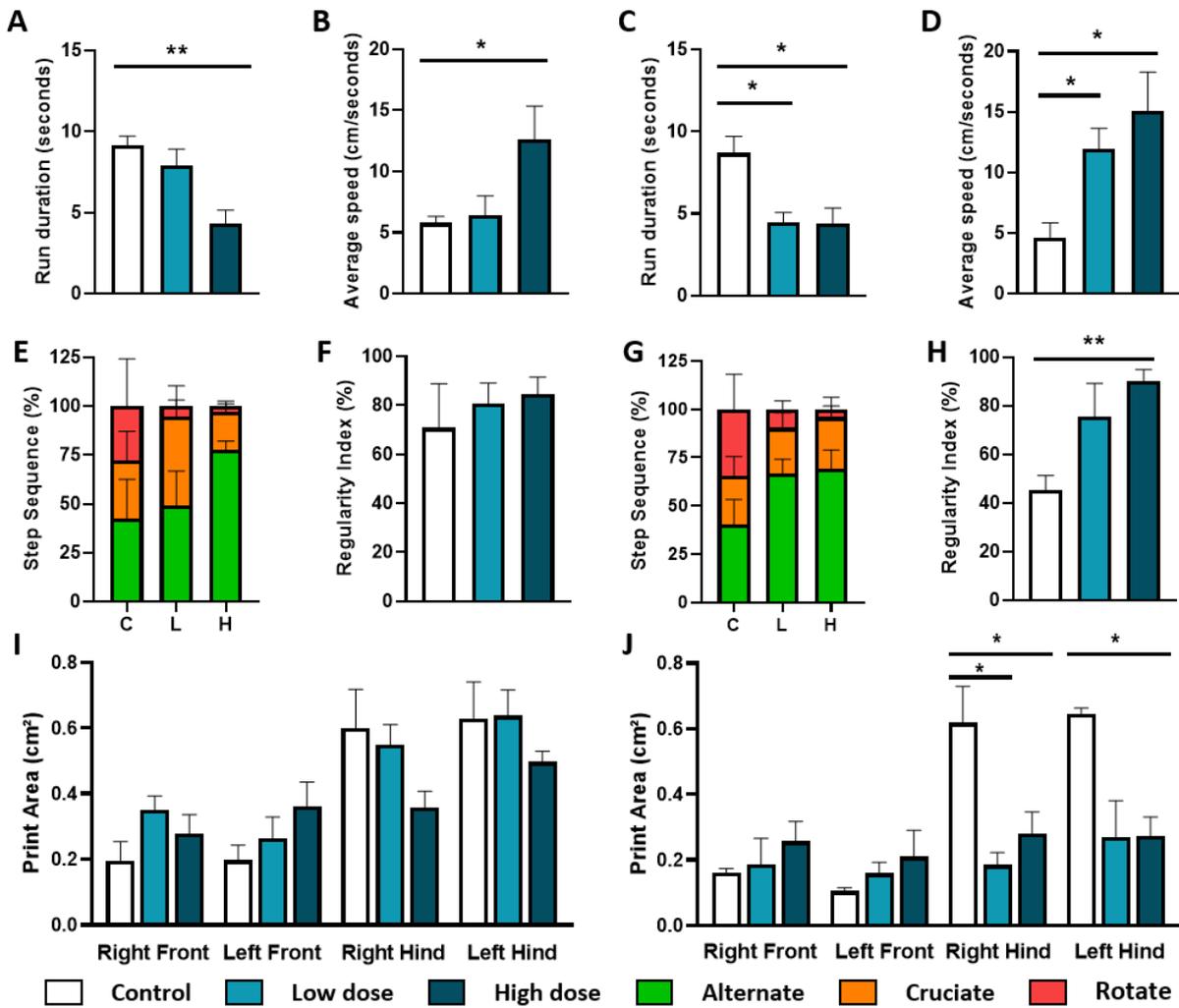


Figure 3 : Catwalk analysis of motor function of *Icos*^{-/-} NOD mice after treatment with adipose derived cell therapies: Graphical representation of (A, C) run duration, (B, D) average speed, (E, G) repartition of step sequence, (F, H) step sequence regularity index and (I, J) paw print area evaluated for 34 weeks old mice treated with stromal vascular fraction (N = 7 in each group) or adipose-derived stem cells (N = 5 in each group) respectively (Mann-Whitney tests, *, p < 0,05; **p<0.01).

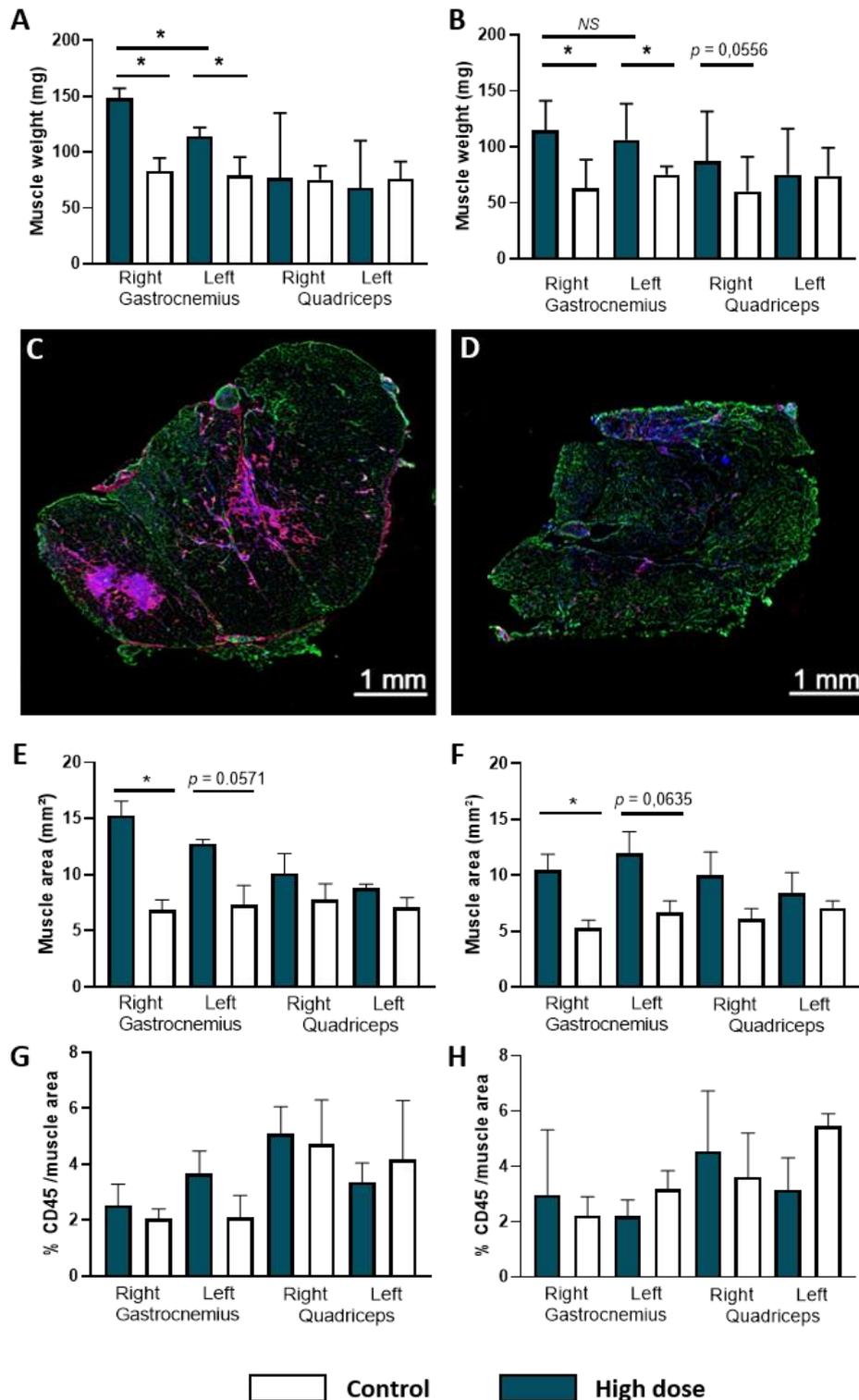


Figure 4 : Histological evaluation of adipose derived cell therapies treated muscles : (A, B) Graphical representation of muscle weight measured after their extraction from mice treated by stromal vascular fraction or adipose-derived stem cells respectively compared to control . Immunofluorescence staining illustrating muscle atrophy by laminin staining (green) and leucocytes infiltration by CD45/DAPI staining (red/blue) of (C) a treated or (D) untreated mouse. Graphical representation of (E,F) muscle area, (G,H) CD45⁺ cells area reported to muscle area mice treated by stromal vascular fraction or adipose-derived stem cells respectively compared to control (Mann-Whitney tests and Wilcoxon tests*, $p < 0,05$).

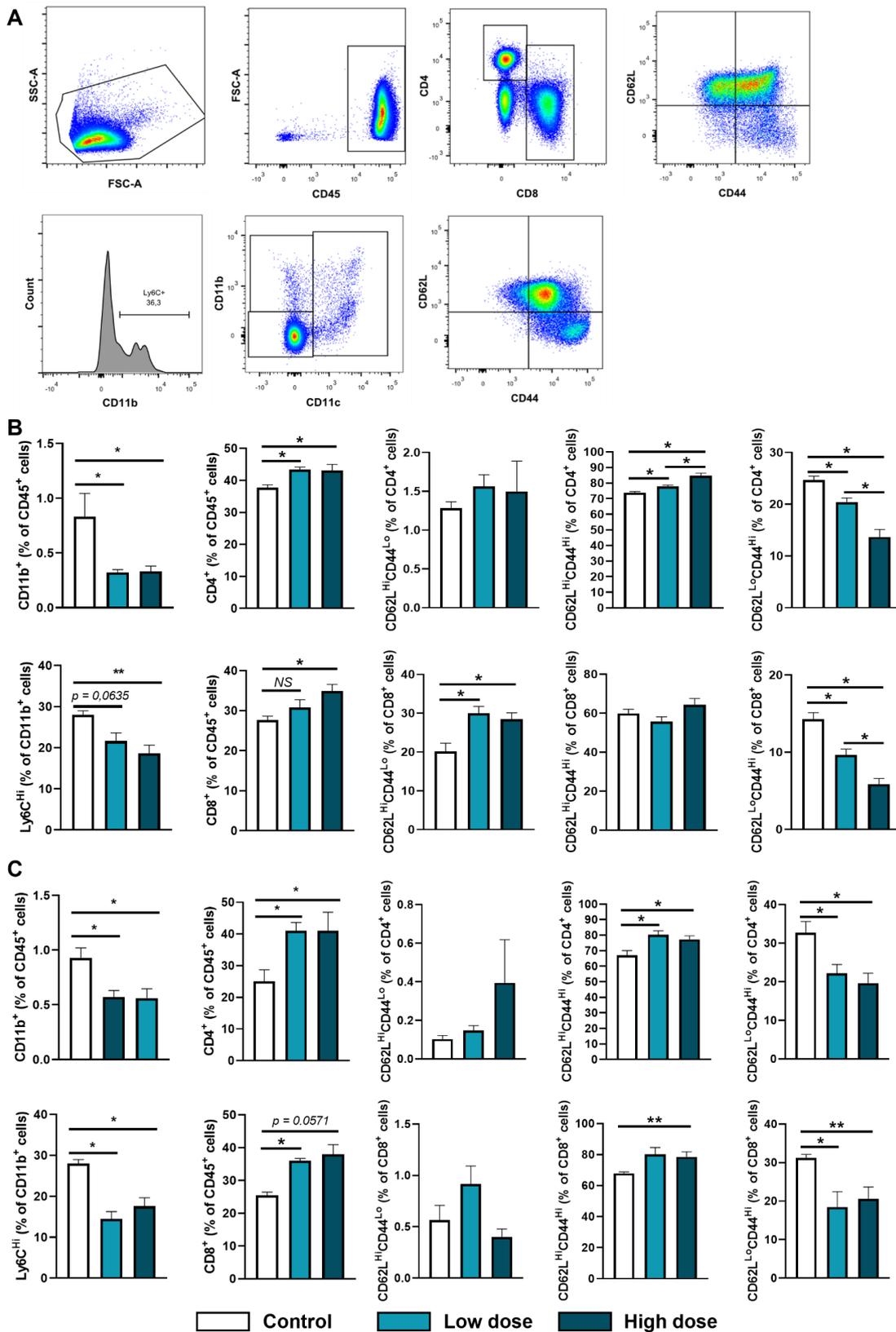


Figure 5: Analysis of the effect of adipose derived cell therapies on the immune population *in vivo*: (A) Gating strategy and (B,C) graphical representation of immunologic effects of cell therapies on leucocytes harvested from lymph node extracted from mice treated by stromal vascular fraction or adipose-derived stem cells respectively compared to control (Mann-Whitney tests*, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

ARTICLE 3

Correlation of *in vitro* potency assays to define predictive markers to Adipose-derived cell therapies efficacy.

Contexte de l'étude : La FVS et les ADSC ont été évaluées dans le traitement de nombreuses pathologies au travers de plus de 500 essais cliniques. La variabilité observée lors de l'analyse du phénotype des cellules utilisées pour ces thérapies selon l'âge, le sexe ou encore la méthode de préparation complique la comparaison des résultats de ces essais cliniques. Afin de pouvoir comparer ces résultats et garantir l'efficacité et la sécurité des traitements avant leur administration, les autorités réglementaires ainsi que différentes sociétés savantes appellent à l'utilisation de panel de tests de potentiel homogène entre les centres utilisateurs. Peu applicable à la FVS dans les pratiques cliniques, notamment en raison du délai court d'administration, leur utilisation en préclinique ou en parallèle d'essais cliniques pourrait permettre d'identifier d'éventuels marqueurs prédictifs de leur efficacité.

Méthodes : Après extraction de la FVS de lipoaspirat humain et culture d'ADSC, nous avons réalisé des tests d'inhibition de la prolifération et de l'activation lymphocytaire par coculture avec des PBMC pré-marqués au CFSE. Nous avons ensuite corrélé les résultats de ces tests et ceux des tests de CFU aux résultats des analyses phénotypiques de nos thérapies.

Principaux résultats :

- Nous avons démontré que la FVS et les ADSC présentaient un effet dose dépendant sur l'inhibition de la prolifération et de l'activation lymphocytaire, nous permettant de calculer l'efficacité max et le ratio inhibiteur 50%.
- Nous avons observé la supériorité des ADSC par rapport à la FVS, en termes de potentiel inhibiteur et de prolifération *in vitro*.
- Nous avons mis en évidence la corrélation des capacités prolifératives, mesurées par le test de CFU, avec le niveau d'expression du CD90 et du CD105 pour les ADSC, et avec la proportion de progéniteurs hématopoïétiques et de leucocytes dans nos différentes préparations de FVS.
- Nous avons aussi pu corréler les propriétés immunomodulatrices à l'expression du CD73 pour les ADSC, et de la proportion de macrophages dans nos différentes préparations de FVS.

Brief report

Correlation of *in vitro* potency assays to define predictive markers to Adipose-derived cell therapies efficacy.

Pileyre B^{† 1,2}, Dehayes J³, Bisson A³, Rioux G¹, Boyer O³, Dubus I¹, Martinet J³

- 1) Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, F-76000 Rouen, France*
- 2) Centre Henri Becquerel, Department of Pharmacy, F-76000 Rouen, France*
- 3) Normandie Univ, UNIROUEN, U1234, CHU Rouen, Department of Immunology and Biotherapy, F-76000 Rouen, France*

[†] Corresponding author:

Dr Baptiste Pileyre

Department of Pharmacy

Centre Henri Becquerel

76038, Rouen, France

Baptiste.pileyre@gmail.com

Declaration of conflicting interests: The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Introduction

Since their discovery at the beginning of the 21st century³³⁷, mesenchymal stem cells (MSC) derived from adipose tissue have attracted the interest of many academics and industrials for the treatment of previously incurable diseases²¹⁹. Their multipotency and capacity for self-renewal have led to their widespread use in regenerative medicine, which remains the main clinical application for these therapies³³⁸. MSCs also have immunomodulatory, pro-angiogenic and anti-fibrotic properties, justifying their use in the treatment of the degenerative complications of autoimmune diseases^{160,313}.

Because of their status as advanced therapy medicinal product (ATMP), therapies extracted from adipose tissue must meet certain criteria (phenotyping, colony-forming unit (CFU) assay and differentiation test)¹⁹³. These criteria primarily served to establish their identity and reflect their regenerative properties but are not predictive of their efficacy in other indications, such as autoimmune diseases³³⁹. To improve knowledge but also to assess the quality of MSC before use, as required by good manufacturing practice, various functional tests have been developed. However, they still lack standardization, making the results of clinical trials difficult to compare³³⁵. One of them aim to evaluate the inhibition of lymphocyte activation and proliferation during co-culture between pre-labelled peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and MSCs²⁸⁸. Initially used as a test to assess the impact of inter-donor variability and storage, this assay has been progressively optimized to better meet the requirements of GMPs³⁴⁰.

However, results of this assay have never been linked to MSC phenotype or proliferative capacity (CFU). Moreover, it has never been applied to stromal vascular fraction (SVF), the other cell therapy extracted from adipose tissue. In this paper, we evaluated the immunomodulatory effect of SVF as well as adipose derived stem cells extracted from it. We then studied the relationship between CFU, phenotype and an immunomodulatory score that we have established.

Material and method

SVF Cell isolation and ADSC culture

The lipoaspirates were recovered during plastic surgery from informed consenting healthy donors, in accordance with the Declaration of Helsinki. The collected adipose tissue was washed two or three times with lactated Ringer to remove infiltrating blood. It was then digested with a mixture of collagenase I and II (NB5, Nordmark) for 45 minutes at 37°C under constant agitation. The reaction was stopped by adding a 1% albumin solution (Vialebex, LFB) in NaCl 0.9% (B.Braun). After centrifugation, the lipophilic part was removed, and the cell pellet resuspended in the same solution. After filtration at 100µm, the SVF was washed several times with ringer lactate and then resuspended in a freezing solution composed of Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) 20%, fetal calf serum (Eurobio)50% and DMEM F12 (Lonza) and placed at -80°C.

After thawing, some of the cells are used for SVF testing, while the rest are cultured at a density of 30,000 cells/cm² in DMEM F12 (Lonza) with 20% FBS and 1% Pen Strep (Gibco). After 48h, the medium is changed entirely, then half changed every 72h. Cells are subcultured at 90% confluence, then reseeded at a density of 5,000 cells/cm². Cells were then harvested in the third passage using 0.25% trypsin-EDTA (Gibco).

Isolation and CFSE-labelling of PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats obtained via the French blood bank using Ficoll–Paque density gradient centrifugation (GE Healthcare). Briefly, buffy coats from 5 donors were mixed and diluted one-third with RPMI-1640 (Gibco) before being deposited on Ficoll. After centrifugation, PBMC were recovered and washed with RPMI-1640 before being resuspended in lymphocyte culture medium composed of RPMI-1640 with 10% FBS, 1% L-Glutamine (Gibco) and 1% Pen Strep. After incubation for 10 minutes with 1µL of CellTrace CFSE (molecular probes) per 10⁷ cells, the reaction was stopped by dilution in the medium and cooling at 4°C for 10 minutes. Cells were then washed, resuspended in a freezing medium consisting of FBS with 10% DMSO, and aliquoted before freezing.

Immunomodulatory assay

After thawing, PBMCs and SVF were cocultured at different ratios (40/1, 20/1, 10/1, 5/1, 1/1, 1/5, 1/10 and 1/15 SVF cells/PBMC) in the lymphocyte culture medium described above. In parallel, the remaining SVF is cultured to obtain ADSCs. After the 3rd passage, ADSCs are cocultured with PBMCs at different ratios (2/1, 1/1, 1/2, 1/4, 1/10 and 1/20 ADSC/PBMC). The assay begins with the

addition of 5 μ l/mL Phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich). Cells are recovered after 4 days in culture using trypsin-EDTA and marked for flow cytometry.

Flow cytometry

Cells are first washed and resuspended in FACS buffer consisting of 1X PBS with 0.5% of BSA (Sigma-Aldrich) and 5mM EDTA. They are then incubated for 15 minutes with a human Fc block (Invitrogen), followed by 30 minutes with the antibody mix according to the panel (table 1), combined with a viability marker (Fixable blue, Thermo). After incubation, cells are fixed using Fix/lyse solution (BD). All analyses were performed on the BD Fortessa™ cytometer (Becton Dickinson) and post-analyses on flowJo software (TreeStar Inc).

CFU

ADSC or SVF cells were seeded at 500 cells per well on a 6-well plate in DMEM F12 with 20% FBS and 1% Pen Strep. The medium was renewed every 3 days for 15 days. Cells were then fixed with ethanol for 10 min, and giemsa was added after drying the wells. After 15 minutes, the giemsa was removed and the wells rinsed twice with distilled water. Colonies of more than 50 cells were counted using a light microscope.

Statistical analysis

Appropriate statistical tests were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism 8 software. Levels of statistical significance are illustrated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Résultats

ADSCs have a stronger immunomodulatory effect than SVF

The immunomodulation assay shows decreased proliferation and activation, with CFSE and CD71 expression levels maintained respectively (Supp Fig 1). This capacity is dose dependent when ADSC or SVF are added, with a stronger effect of ADSC. In fact, a significant difference in effect is apparent from the 2/8 ratio (cells/PBMC) and even from the 1/9 ratio for inhibition of CD4+ T cell activation ($p = 0.0035$) (Fig 1 A-C-E-G). This superiority concerns both maximum efficacy (E_{max}), with a significant increase when using ADSC ($41.6 \pm 13\%$ VS $92.2 \pm 7.5\%$, $p = 0.001$, and $43.15 \pm 16.13\%$ VS $64.7 \pm 12.8\%$, $p = 0.0049$, of inhibition of proliferation for CD4+ and CD8+ T cells respectively, and $43.49 \pm 15.99\%$ VS $88.1 \pm 7.3\%$, $p = 0.001$, and $45.05 \pm 11.3\%$ VS $74.2 \pm 17.7\%$, $p = 0.002$, of inhibition of activation for CD4+ and CD8+ T cells respectively), and of the ratio to obtain 50% inhibition (IR50), with a significant decrease when using ADSC (4.7 ± 6.1 VS 0.31 ± 0.14 cells/PBMC, $p = 0.001$, and 2.95 ± 1.6 VS 0.38 ± 0.13 cells/PBMC, $p = 0.001$, for proliferation of CD4+ and CD8+ T cells respectively, and 5.4 ± 5.5 VS 0.22 ± 0.11 cells/PBMC, $p = 0.001$, and 5.8 ± 6.7 VS 0.22 ± 0.13 cells/PBMC, $p = 0.002$, for activation of CD4+ and CD8+ T cells respectively) (Fig 1 B-D-F-H).

In order to compare the immunomodulatory properties of both therapies, we have established an ImmunoScore, corresponding to the mean E_{max} divided by the mean IR50. Unlike the percentage inhibition alone as used in Ketterl *et al* study, this score better reflects the differences in effect between SVF and ADSC, with a significantly higher score for ADSCs than for SVF (344.2 ± 181.5 VS 14.7 ± 9.4 , $p = 0.001$) (Fig 1 I). We also assessed proliferative capacity using CFU assay and observed a slightly significant increase with ADSC (7.36 ± 6.74 colonies VS 16.12 ± 9.61 colonies, $p = 0.042$) (Fig 1 J). We then looked to see if there was a correlation between the immunoScore and CFUs of ADSCs (Fig 1 K) and SVF (Fig 1 L) and observed no significant correlation.

ADSC properties are linked to the presence of different surface markers.

ADSC phenotyping is based primarily on the absence of expression of markers CD31, CD34 and CD45, and expression of markers CD73, CD90 and CD105 (Supp 2). A heatmap correlating CFU results with the percentages of expression of these positive markers shows a link between the highest CFUs and the expression of CD90 and CD105 (Fig 2 A). This observation is confirmed by spearman correlation, showing a significant correlation of CFU with CD90 ($r = 0.7153$, $p = 0.0163$) (Fig 2B) and with CD105 ($r = 0.6150$, $p = 0.0483$) (Fig 2C), but not with CD73 (Fig 2D). Although CFU and immunoScore are not correlated, opposite correlations are observable in a heatmap between immunoScore and positive marker expression, (Fig 2E), with a significant correlation between this

score and CD73 expression ($r = 0.697$, $p = 0.0205$) (Fig 2F) but not with CD90 and CD105 (Fig 2G and H, respectively).

The SVF properties are linked to the presence of hematopoietic lineage cells and not to stromal cells.

SVF phenotyping involves the identification of several cell populations, mainly MSCs, endothelial progenitors (EPCs), pericytes and leukocytes, including numerous stem cells (HSCs) as well as macrophages and dendritic cells (Supp 3). While the expression of CD73, CD90 and CD105 markers is lower than in ADSCs, it remains high. Heatmap between the CFU and the main populations of the SVF shows a positive link with the populations of the hematopoietic lineage and negative with the stromal populations (Fig 3A). Spearman's correlation confirms a significant positive correlation of CFU with leukocyte rate ($r = 0.7654$, $p = 0.0081$), with HSC rate ($r = 0.7153$, $p = 0.0165$) and almost significant with macrophage rate ($r = 0.574$, $p = 0.0686$), and a significant negative correlation with EPC rate ($r = -0.7062$, $p = 0.0185$) (Fig 3 B, C, D and G respectively). We also observed a significant positive correlation of CFU with CD90 expression ($r = 0.6606$, $p = 0.0311$), but not with MSC levels (Fig 3E and F respectively). Heatmap between the immunoScore and these populations (Fig 3H) shows a link between this score and the rate of macrophages, confirmed by Spearman correlation ($r = 0.6273$, $p = 0.044$) (fig 3I), but not significant with leukocytes. We also observe a significant negative correlation with the expression of CD73 ($r = -0.6727$, $p = 0.0277$) and almost significant with that of CD90 ($r = -0.5545$, $p = 0.0818$) (Fig 3 K and J, respectively).

Discussion

As explained by the International Society for Cellular Therapy (ISCT), the key to unlocking the potential of cellular therapies extracted from adipose tissue is the widespread use of homogeneous matrix of tests to predict the efficacy of these therapies¹⁹⁹. However, they point out that these tests are generally expensive, making them inapplicable to small-scale or autologous productions such as SVF. These tests aim to limit the uncontrolled use of these therapies and guarantee patient safety³³³, but they also risk to slow down their academic development. Another way of improving the efficacy of these treatments would be to define predictive markers of effect or risk using these tests. These markers could be rapidly detectable, by flow cytometry or molecular biology, and would make it possible to avoid delaying treatment administration, particularly for SVF.

Some markers have already been described. CD90 appears to contribute to ADSC cell proliferation, via AKT activation and cell cycle induction³⁴¹. Our results point in the same direction, showing a correlation between CD90 and CFU outcome. Our results also show a correlation between CD73 expression and the immunomodulatory effect of ADSCs. The role of CD73 when MSC are used in autoimmune or inflammatory pathologies treatment has also been demonstrated *in vivo*, in various mouse models^{342,343}. Less described, CD105 is generally considered to be a marker of angiogenesis, but other studies have also found a correlation between its expression and the proliferative capacities of ADSC³⁴⁴.

The importance of HSC levels in the proliferative capacity of SVF, as observed in this study, has been little described. A retrospective study of SVF injections in various inflammatory and degenerative pathologies shows that an MSC/HSC ratio of around 2 provides the best clinical outcomes³⁴⁵. Our study shows that low levels of MSC and high levels of HSC increase stem cell proliferation. Given that MSCs proliferate in CFU assays and expansive culture, as demonstrated by their multilineage differentiation, we can assume that HSCs play probably a role in stimulating this proliferation. MSCs are known to aid and stimulate the development of HSCs by forming niches around them in bone marrow³⁴⁶, but it is possible that this crosstalk is reversed in adipose tissue.

As with the CFU results, the immunomodulatory properties of SVF do not appear to be related to stromal cell count or CD73 expression, as with ADSC, but are correlated with macrophages count. *In vivo* studies have shown that alternative macrophages, with their anti-inflammatory profile, play an important role in the regulation of autoimmunity³⁴⁷. However, these studies did not show the origin of these macrophages. Here, we demonstrate the importance of macrophages present in SVF in the immunomodulatory effect, probably serving as a starting pool for the recruitment of alternative macrophages.

Expression of CD73, CD90 or CD105, as well as HSC levels and macrophages, are predictive markers for the efficacy of adipose tissue-derived therapies. Unlike functional tests (CFU, immunotest....), these markers can be rapidly detected and used as validation criteria for therapy. Nevertheless, these markers still need to be validated in ancillary studies to clinical trials, and in parallel with functional testing, in order to establish a quality standard for manufacture.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant # FDM201806006523). The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

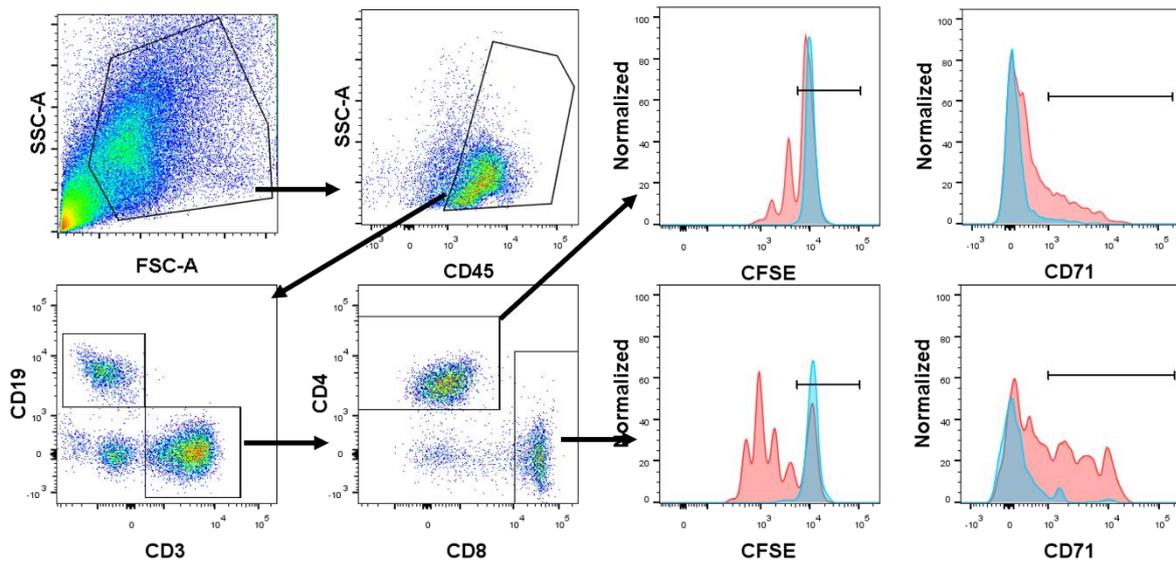
AUTHOR CONTRIBUTIONS

BP, ID and JM designed and/or performed experiments and were the manuscript's principal authors. JD, AB and GR participated in experiments. OB participated in the experimental design. All authors approved the final manuscript.

Figures

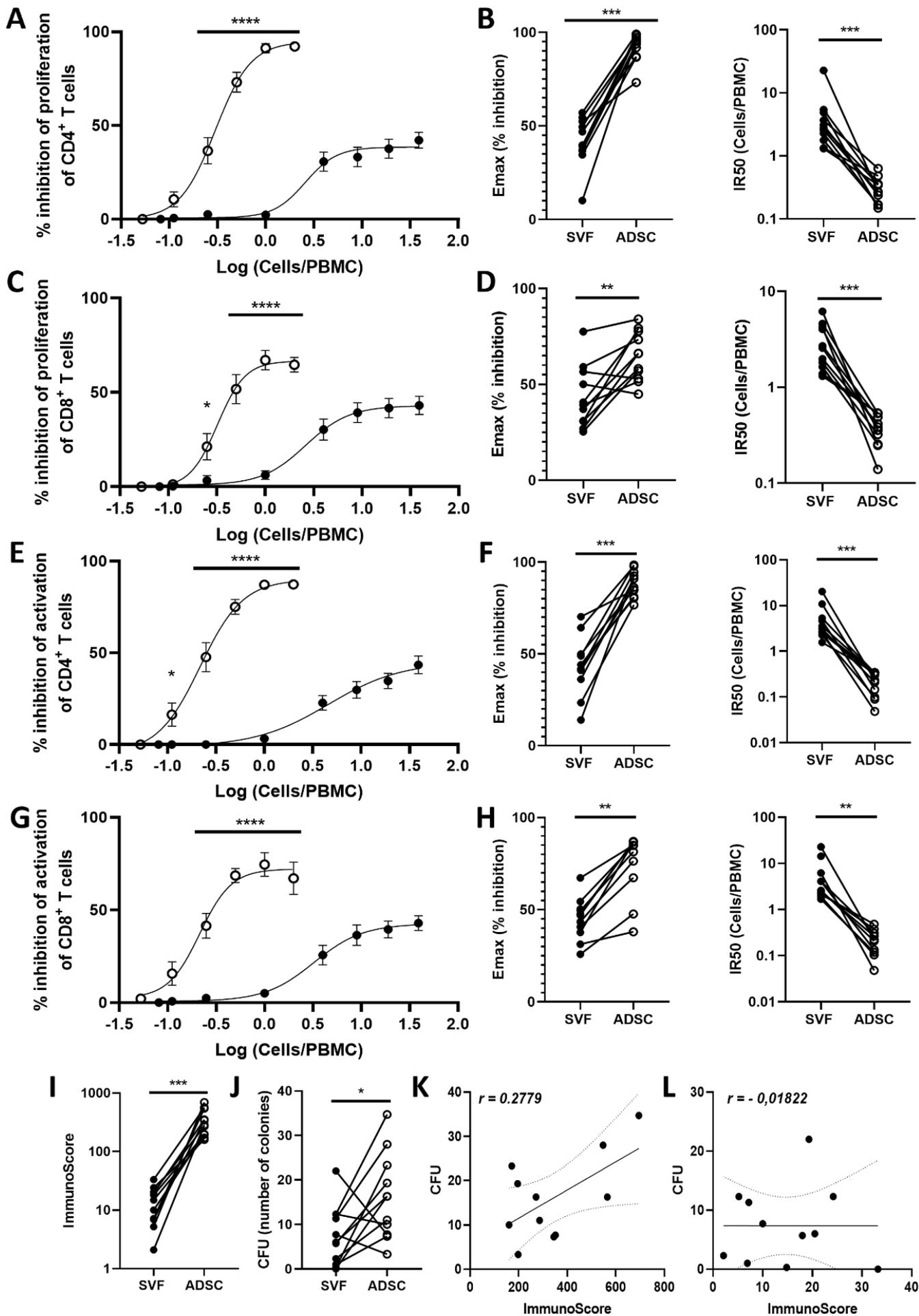
Panel	Antibody	Laboratory	References
Immunomodulatory assay	CD45 KrO	Beckman	B36294
	CD3 PC7	Beckman	737657
	CD4 AA700	Beckman	B10824
	CD8 PC5.5	Beckman	A99019
	CD19 AA750	Beckman	A94681
	CD69 APC	Beckman	A80711
	CD71 PE	Beckman	IM2001U
SVF / ADSC	CD45 KrO	Beckman	B36294
	CD34 ECD	Beckman	B49202
	CD31 Pacific Blue	Beckman	B13035
	CD73 PE	Beckman	B68176
	CD90 FITC	Beckman	IM1839U
	CD105 PC7	Beckman	B43293
	CD146 PC5	Beckman	A22364
Leukocytes	CD45 KrO	Beckman	B36294
	CD3 Pacific Blue	Beckman	A93687
	CD14 AA700	BD	557923
	CD16 PE	Beckman	A07766
	CD11C PC7	Beckman	B96763
	CD123 APC	Beckman	B06376
	CD56 PC5	Beckman	A07789
	HLA-DR FITC	Beckman	IM0463U

Table 1: Flow cytometry antibodies list



Supplemental 1: Immunomodulation test gating strategy: $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes are separated from other $CD45^+$ leukocyte cell populations by selection of $CD3^+$ lymphocytes and exclusion of $CD19^+$ B lymphocytes. After separation, CFSE and CD71 expression levels were quantified in $CD4^+$ (top) and $CD8^+$ T cells respectively (bottom) and compared between culture with (blue) or without (red) adipose-derived cells.

Figure 1: Stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells possess immunomodulatory properties, blocking lymphocyte activation and proliferation: Comparison of the inhibitory effect of SVF or ADSC on the proliferation (A, C) and activation (E, G) of $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes respectively (Holm-Sidak multiple T tests). Graphical representation of paired comparison of maximum efficacy (E_{max}) and ratio to obtain 50% of inhibitory effect (IR50) between SVF and ADSCs on proliferation (B, D) and activation (F, H) of $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes respectively (Wilcoxon test). Graphical representation of paired comparison of ImmunoScore (I) and CFU (J) between SVF and ADSCs (Wilcoxon test). Absence of correlation between immunoScore and CFU for ADSCs (K) and SVF (L) (Spearman correlation test).



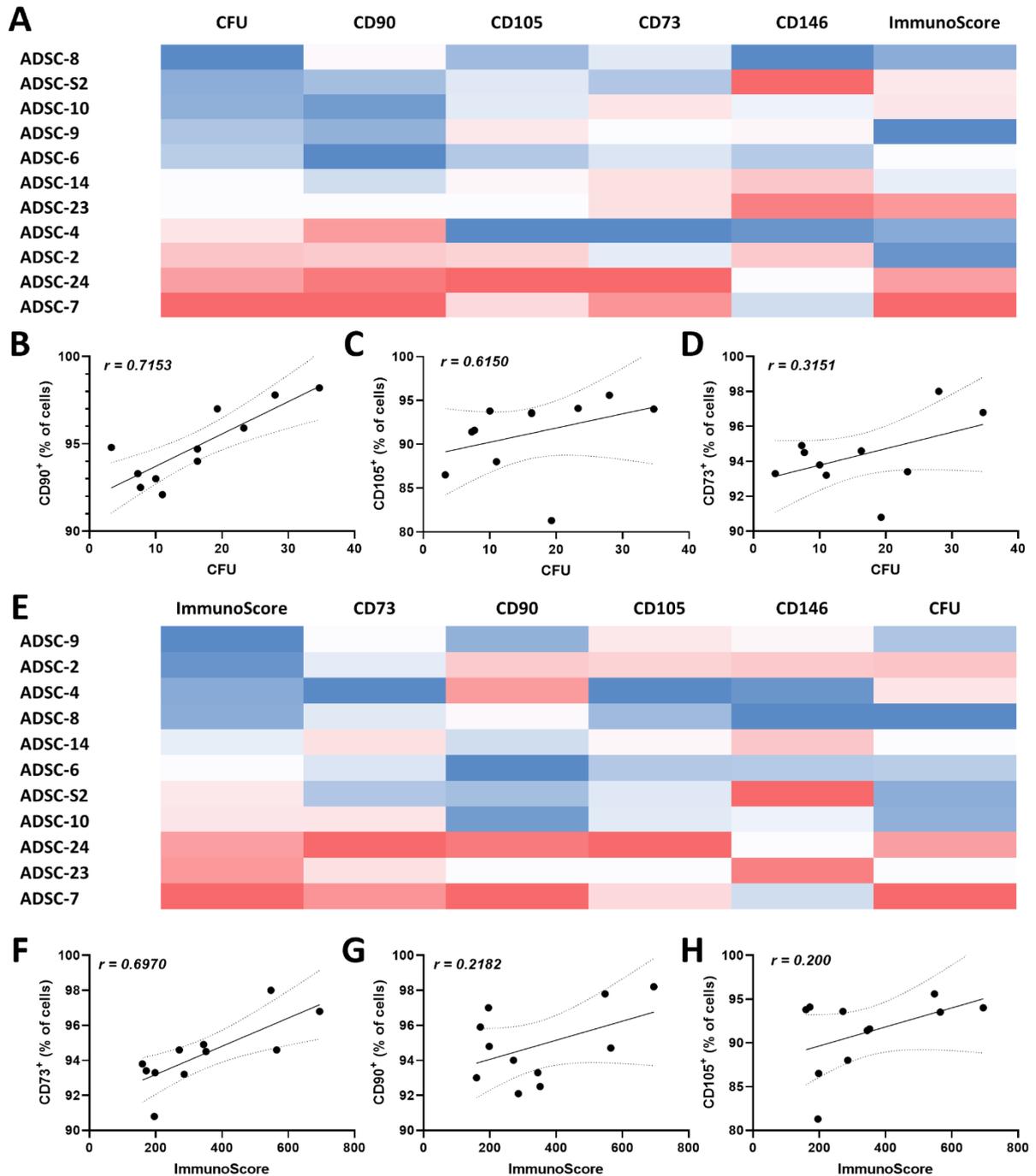
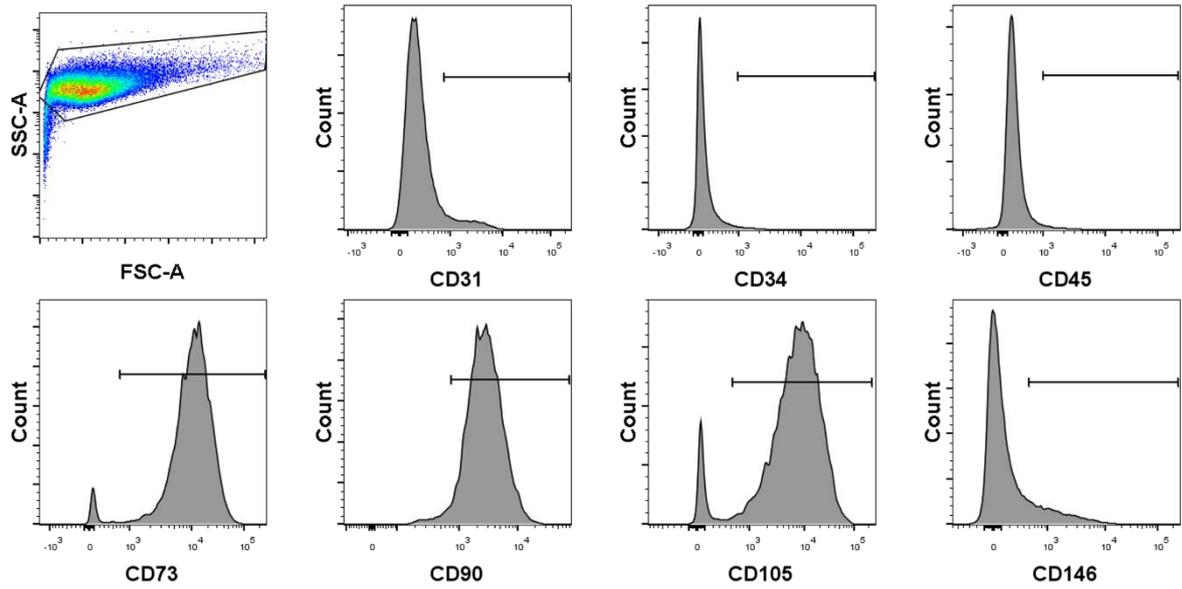
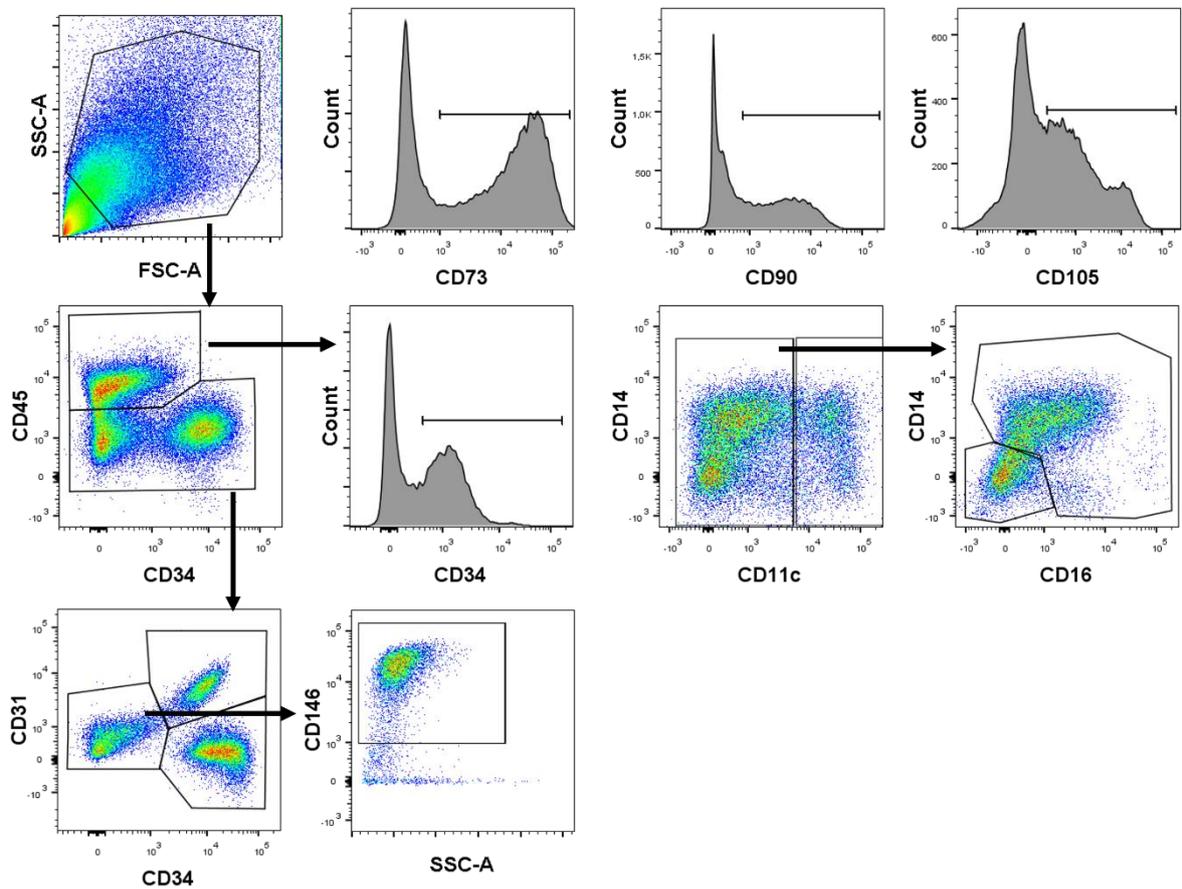


Figure 2: Analysis of the correlation between ADSC surface markers, CFU and immunoscore: Heatmap comparing surface marker expression at CFU and immunoscore between different ADSCs sorted according to CFU (A) or Immunoscore (E). Correlation between CFU and the level of cells expressing CD90, CD105 and CD73 (B, C or D respectively). Correlation between Immunoscore and the level of cells expressing CD73, CD90 and CD105 (F, G or H respectively).



Supplemental 2: Phenotyping of ADSCs: Analysis of expression levels of markers CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 and CD146.



Supplemental 3: SVF phenotyping: *the gating strategy begins with the separation of CD45⁺ leukocytic cells from CD45⁻ stromal cells. CD45⁺ CD34⁺ hematopoietic stem cells can be separated from CD45⁺ CD11c⁻ CD14/CD16⁺ macrophages within leukocyte cells. CD45⁻ CD34⁺ CD31⁻ mesenchymal stem cells are separated from CD45⁻ CD34^{dim} CD31⁺ endothelial progenitors. Finally, pericytes are identified as CD45⁻CD34⁻CD31⁻CD146⁺. Expression levels on all SVF cells of CD73, CD90 and CD105 were also analyzed.*

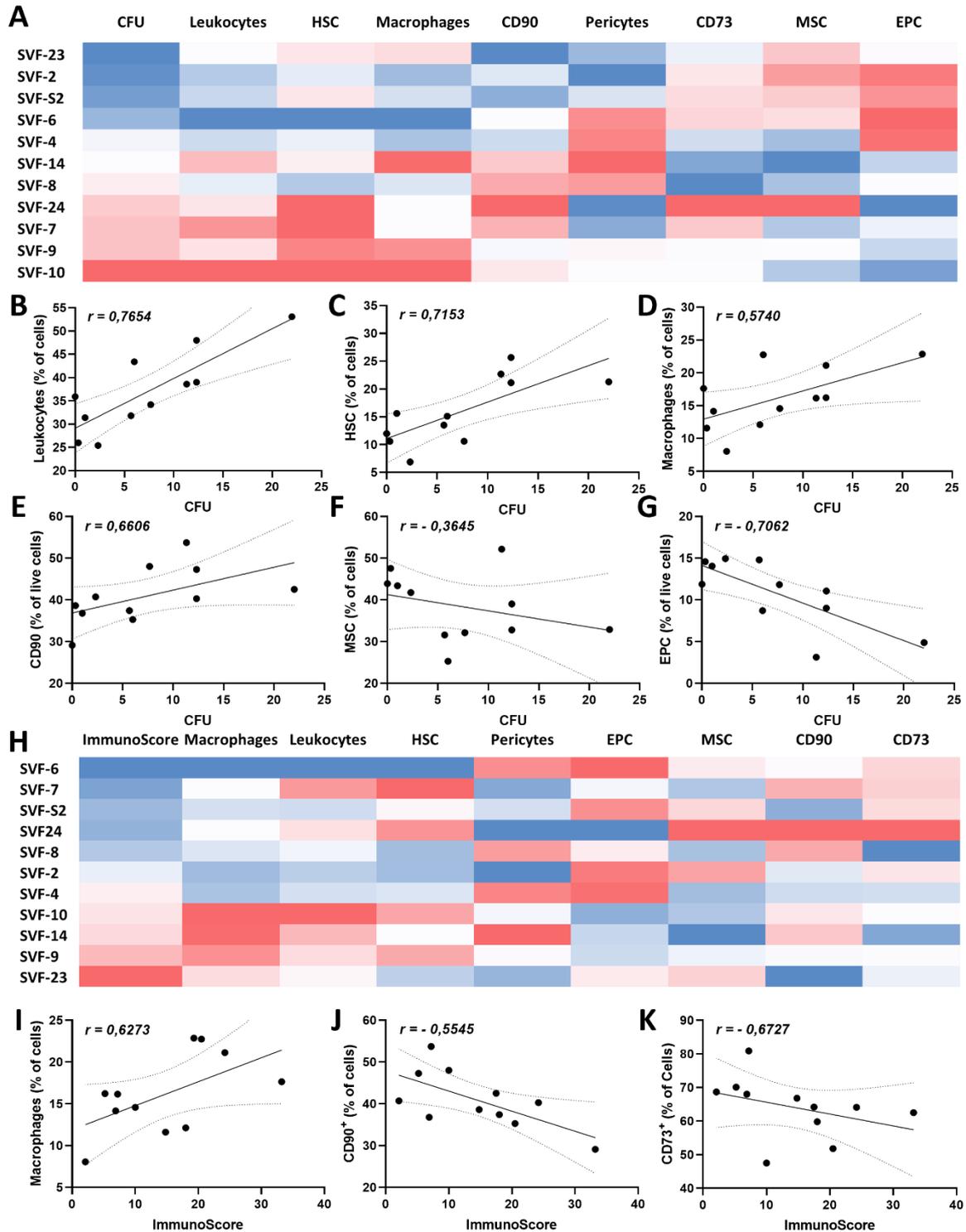


Figure 3: Analysis of the correlation between SVF phenotype, CFU and immunoscore: Heatmap comparing CFU and immunoscore at SVF phenotype sorted according to CFU (A) or Immunoscore (H). Correlation between CFU and the proportion of Leukocytes, HSC, Macrophages, MSC or EPC (B, C, D, F or G respectively) or the level of expression of CD90 (E). Correlation between ImmunoScore and the proportion of macrophages or the level of cells expressing CD90 or CD73 (I, J or K respectively).

DISCUSSION

Le sujet de ce travail de thèse trouve son origine dans un contexte bien particulier :

- D'une part, le développement d'un nouveau modèle murin de myosite, découvert lors de l'étude du diabète chez la souris NOD par inactivation de la voie ICOS/ICOSL¹²⁷. Si le modèle NOD *IcosL*^{-/-} avait déjà été en grande partie caractérisée en partenariat avec notre laboratoire, le modèle NOD *Icos*^{-/-}, autre versant de la voie ICOS/ICOSL, restait peu étudié. Une autre thèse était alors en cours pour caractériser ce modèle, déterminer les mécanismes physiopathologiques, notamment l'implication des lymphocytes T reg, et rechercher des marqueurs prédictifs et/ou diagnostics de la maladie³⁴⁸. Ce nouveau modèle était alors bien en place au sein du laboratoire, ainsi que plusieurs dispositifs permettant son suivi (score clinique, grip test, Catwalk, ...).
- D'autre part, l'implication du laboratoire d'immunologie et de biothérapie du CHU de Rouen dans un futur essai clinique visant à évaluer la FVS dans le traitement des IBM (NCT05032131) porté par l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris. Dans le cadre de cet essai et d'essais antérieurs, un partenariat entre le laboratoire et le service de chirurgie plastique et de la main du CHU existait aussi depuis plusieurs années, permettant d'obtenir des prélèvements de tissu adipeux en vue de la production de la FVS.
- Enfin, le contexte réglementaire des MSC de manière générale et plus spécifiquement de la FVS était en pleine ébullition, avec notamment les premiers procès aux Etats-Unis suite à l'utilisation de FVS dans des indications sans évaluation clinique préalable par des cliniques privées³⁴⁹. De nombreux scientifiques et différentes sociétés savantes appelaient alors à plus d'évaluation préclinique et à la mise en place de tests *in vitro* permettant de prédire le potentiel des MSC leur administration¹⁹⁹.

L'ambition de ce travail était alors de prédire l'efficacité de la FVS dans le traitement des myosites et de mettre en place des tests *in vitro* afin d'identifier des mécanismes d'actions et des marqueurs prédictifs de l'efficacité de cette thérapie. Ces tests visaient à étudier deux capacités de la FVS : l'immunomodulation et la myorégénération. La pandémie de COVID-19 a cependant fortement impacté le projet : le confinement a conduit à la fermeture du laboratoire, avec un raccourcissement de certains protocoles et l'impossibilité

de réaliser certaines expériences, ainsi qu'à la déprogrammation des opérations chirurgicales non urgentes, entraînant une rupture de l'approvisionnement en tissu adipeux et donc d'échantillons disponibles pour la réalisation des tests *in vitro*.

Le COVID-19 nous a aussi contraint à abandonner la partie myorégénération *in vitro*. Cet effet a déjà été démontré *in vivo*²⁶⁸ et *in vitro*²⁶⁵, à la fois par stimulation de la prolifération des myoblastes et leur différenciation en myocytes, mais aussi par la différenciation de cellules de la FVS et d'ADSC en myocytes. Nous avons alors envisagé de mettre au point un test de performance évaluant l'effet de la FVS sur la prolifération et la différenciation de myoblastes en myotubes, en utilisant à nouveau différentes concentrations de cellules. Avant le début de l'épidémie, nous étions en contact avec des chirurgiens orthopédistes du CHU de Rouen pour obtenir des prélèvements musculaires correspondant à des déchets opératoires de certaines de leur intervention. Cette collaboration n'a hélas pas pu se faire, et les confinements nous ont obligé à mettre de côté cette partie.

Si nous n'avons pas pu développer, faute de temps, les tests de myorégénération, nous avons pu évaluer plusieurs FVS et ADSC au travers de tests d'immunomodulation et de prolifération (CFU), dont les résultats sont présentés dans l'article 3. A notre connaissance, cette étude est la première évaluant *in vitro* les capacités d'immunomodulation de la FVS, par inhibition de la prolifération et de l'activation lymphocytaire. S'inspirant du travail de Ketterl *et al*, certaines modifications ont été apportées à notre test ; notamment l'analyse de l'activation lymphocytaire en plus de la prolifération, séparément pour les CD4⁺ et CD8⁺, et l'utilisation de différentes concentrations de FVS et d'ADSC, permettant d'observer une courbe effet-dose²⁸⁸. Ces modifications nous ont permis une observation de manière plus fine les effets de ces thérapies, ainsi que de pouvoir déterminer et comparer des données pharmacologiques telles que la concentration inhibitrice 50% et l'efficacité maximale. L'utilisation de telles données, plutôt que de l'effet à une dose fixe, fusionné dans un immunoscore est un meilleur reflet des capacités immunomodulatrices de ces thérapies, notamment pour évaluer la différence d'efficacité entre la FVS et les ADSC. La mise au point de ce test a cependant été complexe. En effet, la FVS présente un effet immunomodulateur plus faible que les ADSC, nécessitant des quantités plus importantes de cellules impliquant des conditions de culture à forte densité cellulaire pour observer son efficacité maximale. Du

fait de résultats négatifs lors des premiers tests en présence de FVS, l'amplification et l'évaluation des ADSC ont été ajoutés au projet. L'originalité de cette étude a été de pouvoir comparer chaque FVS avec les ADSC préparés à partir de celle-ci, démontrant qu'une FVS présentant peu d'effet immunomodulateur acquiert cette capacité lors de l'amplification en ADSC. Elle montre ainsi la supériorité des préparations d'ADSC en termes d'effet immunomodulateur.

Notre étude nous a aussi permis, par corrélation des résultats des tests d'immunomodulation et de prolifération avec ceux de l'analyse phénotypiques de nos thérapies par cytométrie en flux, de déterminer les populations cellulaires les plus impliquées dans ces effets. Si les marqueurs identifiés pour les ADSC sont cohérents avec les mécanismes d'actions prédits pour ces cellules, notamment le taux d'expression du CD90 et du CD105 reliés aux capacités de prolifération^{341,350} et celui du CD73 pour l'immunomodulation³⁴², les corrélations observées pour la FVS sont plus surprenantes. En effet, un rôle plus important des cellules stromales, notamment des MSC, était attendu, que ce soit dans la prolifération ou d'immunomodulation. Étonnamment, la présence de leucocytes, et notamment de cellules progénitrices exprimant le CD34 et de macrophages exprimant le CD14, semble avoir un impact bien plus important sur l'efficacité de ces thérapeutiques. Ce résultat avait été en partie observé en pratique clinique, avec une corrélation inverse entre le ratio MSC/HSC et l'efficacité de la thérapie dans des pathologies dégénératives³⁴⁵. La corrélation inverse de la proportion de cellules exprimant le CD73 et de l'ImmunoScore avec la FVS est elle aussi surprenante, car contraire au résultat observé avec les ADSC.

Ces résultats doivent cependant être confirmés, tout d'abord avec une échantillothèque plus importante de FVS et d'ADSC pour augmenter la puissance statistique des tests. L'utilisation d'un plus grand nombre de marqueurs phénotypiques pourrait aussi permettre d'identifier des biomarqueurs prédictifs. Il faudrait aussi ajouter des tests permettant d'évaluer d'autres propriétés de la FVS et des ADSC, notamment les propriétés anti-fibrosantes et pro-angiogéniques, ainsi qu'une analyse du sécrétome de ces cellules, afin de pouvoir potentiellement prévoir les effets à distance du site d'injection. L'utilisation de ce panel de tests, comme recommandé par l'ISCT¹⁹⁹, permettrait en effet de mieux comprendre et anticiper ces effets. La corrélation des effets *in vitro* avec l'efficacité clinique,

spécialement lors d'essais cliniques, pourrait aussi permettre par la suite de mieux choisir le type de thérapie cellulaire (FVS, ADSC, BM-MSC...) en fonction de la pathologie ciblée et de ses mécanismes physiopathologiques.

Dans certaines pathologies rares, comme les myosites, de telles études comparatives des différentes thérapies cellulaires sont limitées par le nombre de patients pouvant être inclus. C'est d'autant plus vrai pour ces thérapies cellulaires, dont la population cible, réfractaire aux autres traitements, est d'autant plus réduite. Bien qu'ils ne soient pas un reflet exact à la fois de la pathologie et de la réponse aux traitements, les modèles animaux permettent cependant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques ou thérapeutiques et de pouvoir évaluer plus largement différentes thérapies et doses. Dans les myosites, différents modèles ont été développés, présentant certains aspects de la maladie au prix de manipulations importantes induisant des biais dans leur étude¹¹². Si ces biais peuvent être ignorés lors de l'étude de la physiopathologie de la maladie, ils peuvent présenter des limites lors de l'étude de nouveaux traitements. Par exemple, les modèles immunologiques, induit par immunisation, répondront favorablement aux traitements immunosuppresseurs, contrairement aux modèles nutritionnels ou transgénique de l'IBM. Le développement d'un modèle plus physiologique, ne nécessitant pas d'induction ou la délétion d'un gène connu pour être fortement impliqué dans la physiopathologie, permettrait une meilleure transposition des résultats à l'Homme. Les modèles NOD *IcosL*^{-/-} et NOD *Icos*^{-/-} pourraient répondre à ce besoin. Ils sont la conséquence de l'accumulation de plusieurs modifications génétiques successives dont l'accumulation a engendré l'apparition d'une myosite spontanée. Sans cette accumulation, ni les souris NOD ni les souris *Icos/IcosL*^{-/-} d'autres souches que NOD ne présentent de myosite³⁵¹.

La caractérisation du versant ICOS de ce modèle montre peu de différence par rapport au modèle NOD *IcosL*^{-/-}. L'incidence reste la même avec une maladie progressive dont les premiers signes apparaissent entre 20 et 25 semaines de vie, une perte de force musculaire similaire débutant sur la même période, la présence de fibres nécrotiques, de myophagocytose, d'atrophie mais aussi de régénération, ainsi que d'un infiltrat leucocytaires importants, avec un taux élevé de lymphocytes T CD4⁺ et de macrophage CD11b⁺, et enfin une altération des capacités motrices visible au catwalk^{128,318}. Cette nouvelle étude montre, ce qui n'avait pas été étudié chez le modèle NOD *IcosL*^{-/-}, la présence d'une fibrose

musculaire avec augmentation des espaces endomysiaux, la présence de dépôts de C5b9 montrant l'implication du complément dans la physiopathologie de ce modèle et l'expression du CMH-I à la surface des fibres attaquées. Ce modèle ne semble pas correspondre à un sous-type spécifique de myosite, mais présente des critères communs à l'ensemble d'entre eux. La cinétique d'apparition plus lente que les autres modèles existants se rapproche aussi des myosites humaines et permet un suivi au long court des effets des thérapies évaluées.

Comme le modèle NOD *Icos^{+/+}*, ce modèle spontané peut être utilisé pour la recherche de potentiels auto-anticorps. Cette recherche est indispensable pour améliorer le diagnostic mais aussi la prise en charge des patients, celle-ci pouvant varier selon les sous-types de myosites. Dans l'article 1, nous avons décrit une méthode d'identification de potentiel auto-antigène par spectrométrie de masse. Cette méthode nous a permis d'identifier plusieurs antigènes à l'origine d'une auto-réactivité, parmi lesquels TNNT3 dont on a pu observer une augmentation du taux d'anticorps anti-TNNT3 circulants avec l'âge et l'évolution de la maladie. De plus, l'immunisation de souris NOD, par cet antigène a conduit à l'apparition d'une myopathie inflammatoire que l'on n'a pas observée lors des mêmes immunisations de souris Balb/c. Ces éléments constituent des preuves indirectes et circonstancielles de la pathogénicité de cet antigène, selon les critères de Rose et Bona⁸⁶. La présence de ces auto-anticorps chez l'Homme reste cependant à démontrer.

Dans l'article 2, nous avons utilisé le modèle NOD *Icos^{-/-}* afin d'évaluer l'efficacité des cellules dérivées du tissu adipeux. Nous avons pour cela mis au point l'extraction de la FVS à partir du tissu adipeux inguinal et péri-anal de souris CD1, ainsi que la culture d'ADSC. Cette souche de souris a été sélectionnée car elle est à l'origine des souris NOD, avec lesquelles elles partagent un fond génétique commun. Cela nous a permis de réaliser des transplantations syngéniques de nos cellules, plus proches de l'utilisation clinique de la FVS. L'analyse phénotypique de la FVS des souris CD1 et NOD *Icos^{-/-}* nous a cependant permis d'identifier un certain nombre de différences entre ces souches, de même qu'entre les souris NOD *Icos^{-/-}* de 8 et de 22 semaines. Cette différence en fonction de l'âge avait déjà été décrite chez des souris C57Bl6³⁵². Elle est suspectée d'être à l'origine des différences d'effets thérapeutiques entre les études précliniques et cliniques de ces thérapies, dans lesquelles la greffe autologue était souvent réalisée à partir d'un sujet âgé et/ou malade³⁰³.

Nous avons aussi pu réaliser des comparaisons entre souris âgées de 20 à 22 semaines d'autres souches (C57Bl6 et NOD), montrant peu de différence entre ces deux souches, mais d'importantes différences avec les souris NOD *Icos*^{-/-} notamment sur la proportion de leucocytes, d'HSC et de MSC. Ces différences montrent aussi une forte augmentation de la proportion de cellules non identifiées dans la FVS, augmentant chez les NOD *Icos*^{-/-} avec l'âge. On peut suspecter une différenciation des cellules mésenchymateuses en fibroblastes ou myofibroblastes due à l'état inflammatoire chronique de ces souris³⁵³. Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'utilisation de marqueurs spécifiques de ces cellules, tel que l' α SMA ou le collagène de type I³⁵⁴.

L'étude préclinique présentée dans l'article 2 nous a permis d'observer, comme lors des analyses *in vitro* de l'article 3, un effet dose-dépendant, que ce soit avec la FVS ou les ADSC. Contrairement à d'autres études testant lors d'un même protocole des ADSC décongelées et de la FVS fraîche²⁴³, nous avons fait le choix de comparer la FVS et les ADSC issues du même pool de cellules extraits des souris CD1. En raison de difficultés à produire un nombre suffisant d'ADSC dans le délai imposé entre les deux protocoles par l'âge des souris NOD *Icos*^{-/-}, nous avons choisi de réduire la quantité d'ADSC injecté dans ce protocole. Malgré un rapport de dose 5 fois supérieur pour la FVS, nous avons pu observer un effet thérapeutique plus important avec les ADSC à la fois cliniquement, musculairement et histologiquement. L'utilisation du Catwalk a aussi permis une exploration plus poussée des conséquences de la perte de force musculaire en termes de capacités motrices. Les souris malades semblent compenser cette perte en modifiant leur démarche (*Step sequence patterns*) et leurs appuis, en plaçant plus de poids sur les pattes arrières. Dans une autre étude de notre laboratoire en cours de soumission, l'analyse longitudinale de la démarche de ce modèle, allant de 14 semaines à 34 semaines de vie, montre jusqu'à 26 semaines une démarche alternée à plus de 90%, puis une augmentation des démarches croisées et rotatoires représentant près de 40% à 34 semaines³¹⁹. L'administration de la FVS et des ADSC a permis de réduire ce changement, maintenant en même temps la vitesse de déplacement des souris.

L'effet clinique est aussi visible histologiquement, avec une réduction importante de l'atrophie chez les souris traitées, plus marquée dans le muscle ayant reçu les injections de cellules. Contrairement à nos attentes, les infiltrats leucocytaires semblaient plus importants

chez les souris traitées que dans le groupe contrôle, même en normalisation les surfaces d'infiltrats par rapport à la surface des muscles correspondants. Ceci peut être dû à la diminution d'expression des antigènes musculaires suite de l'atrophie et de la fibrose de celui-ci, diminuant ainsi la stimulation et le recrutement leucocytaire. En effet, des études ont montrés que l'expression d'antigène à la surface des cellules musculaires est corrélée avec la régénération musculaire³⁵⁵. L'effet immunomodulateur de ces thérapies semble néanmoins s'appliquer au niveau systémique. Au niveau ganglionnaire, on observe en effet une diminution des macrophages, notamment pro-inflammatoires, et des lymphocytes T_{EM} recirculants au profit des lymphocytes T_{CM} restant dans les ganglions³⁵⁶. Plusieurs études ont par ailleurs montré l'importance des T_{EM} dans les mécanismes physiopathologiques de différentes maladies auto-immunes³⁵⁷. Leur diminution dans notre étude serait alors un signe d'effet immunomodulateur systémique.

L'ensemble des effets observés lors de l'administration de cellules dérivées du tissu adipeux chez le modèle NOD *Icos*^{-/-}, ainsi que ceux observés *in vitro*, nous permettent de conclure que ces thérapies pourraient améliorer la prise en charge des patients atteints de myosites. Depuis une vingtaine d'années, les thérapies cellulaires dérivées du tissu adipeux prennent doucement mais sûrement une place dans l'arsenal thérapeutique de nombreuses maladies dégénératives et auto-immunes. Bien qu'issues de la même source et possédant des propriétés similaires, la FVS et les ADSC présentent bien des différences. Les ADSC, de par la possibilité de leur utilisation allogénique, leur risque sanitaire et leur production à grande échelle, répondent parfaitement la définition du Médicament de thérapie innovante. Au contraire, la FVS, dont la composition et l'utilisation sont spécifiques à chaque patient, se rapproche plus d'un Produit de Thérapie Cellulaire, surtout en cas d'utilisation de méthodes de séparation mécanique. Son développement aurait pu bénéficier des facilités de ce statut, mais un certain nombre d'évènements graves dans les pays ayant fait ce choix nous ont montré l'importance d'une réglementation plus encadrante. Le statut de MTI-PP et les exemptions mise en place dans de nombreux pays doivent permettre de trouver un juste milieu, à condition cependant que les bonnes pratiques de fabrication et cliniques s'adaptent aux particularité de ces thérapies et aux capacités des centres de productions académiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le développement de nouveaux traitements pour les patients atteints de myosites réfractaires aux thérapeutiques actuelles est rendu complexe par le peu d'intérêt de la recherche privée pour cette maladie musculaire rare, mais incapacitante voire mortelle. L'hétérogénéité de cette maladie, comprenant plusieurs types et sous-types de myosites présentant des mécanismes physiopathologiques et des réponses aux traitements très différentes, est aussi un frein. Comme dans d'autres maladies de ce type, un moyen pour permettre l'évaluation de ces nouveaux traitements est la mise au point et l'utilisation de modèles animaux. Dans le cas des myosites, peu de modèles permettent cette évaluation. Il s'agit généralement de modèles immunologiquement induits, présentant des biais associés à cette physiopathologie qui en fait une maladie plus biologique que clinique. La caractérisation et l'utilisation dans cette étude d'un nouveau modèle plus proche biologiquement et cliniquement de la situation chez l'Homme est ainsi un pas important dans l'étude et le développement de nouvelles thérapies.

Les différentes études réalisées dans cette thèse nous ont permis de démontrer le potentiel de ces thérapies dans le traitement des myosites, mais aussi la supériorité clinique des ADSC sur la FVS. Cette thérapie présente, outre une efficacité plus importante, une moindre variabilité d'effet inter-donneur, permettant de garantir plus facilement son effet thérapeutique, notamment par la mise en place de test in vitro avant son utilisation. La FVS, au contraire, présente une grande variabilité d'effet, et sa faible stabilité dans le temps ne permet pas de mettre en place des tests souvent longs afin de démontrer son potentiel avant traitement. Le développement de tels tests pour la FVS est néanmoins indispensable : si ceux-ci ne pourront pas être utilisés en pratique clinique, ils pourraient permettre, en parallèle d'essais cliniques notamment, de déterminer les cellules et mécanismes impliqués spécifiquement dans le traitement d'une maladie, et ainsi d'identifier des marqueurs prédictifs de l'efficacité. Notre étude nous a à ce titre permis de montrer l'importance des populations leucocytaires de la FVS, à la fois dans l'immunomodulation et dans la prolifération des MSC.

L'évaluation de ces thérapies dans le traitement des myosites, au travers d'essais cliniques, est la prochaine étape pour leur utilisation dans cette indication. Si deux essais sont en cours évaluant l'efficacité de la FVS dans les IBM, l'utilisation des ADSC dans ces maladies nécessitera probablement l'implication des industriels. En plus des nombreux

articles mettant en avant l'importance des tests de performance, nous espérons que ce travail appuiera la mise en place d'études ancillaires à ces essais, couplant des tests fonctionnels à des analyses phénotypiques et transcriptomiques. Ces panels de tests, dont l'homogénéité nécessitera probablement l'implication des autorités réglementaires, permettront la comparaison des différentes thérapies. Elles permettront aussi une meilleure compréhension des mécanismes d'action et populations cellulaires impliqués dans les différentes thérapies, et pourrait conduire à les combiner afin d'en améliorer l'efficacité et la sécurité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **91**, 1447–1531 (2011).
2. Murgia, M. *et al.* Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study. *Skelet. Muscle* **11**, 24 (2021).
3. Talbot, J. & Maves, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **5**, 518–534 (2016).
4. Chal, J. & Pourquié, O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Dev. Camb. Engl.* **144**, 2104–2122 (2017).
5. Chal, J. *et al.* Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **33**, 962–969 (2015).
6. Tidball, J. G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 165–178 (2017).
7. Howard, E. E., Pasiakos, S. M., Blesso, C. N., Fussell, M. A. & Rodriguez, N. R. Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. *Front. Physiol.* **11**, 87 (2020).
8. Bianchi, M. E. & Manfredi, A. A. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **220**, 35–46 (2007).
9. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
10. Piccinini, A. M. & Midwood, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**, 672395 (2010).
11. Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A. A. & Rovere-Querini, P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* **23**, 927–937 (2016).
12. Ziemkiewicz, N., Hilliard, G., Pullen, N. A. & Garg, K. The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in Skeletal Muscle Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3265 (2021).

13. Gorospe, J. R., Nishikawa, B. K. & Hoffman, E. P. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J. Neurol. Sci.* **135**, 10–17 (1996).
14. Wang, J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* **371**, 531–539 (2018).
15. Sun, R., Ba, X., Cui, L., Xue, Y. & Zeng, X. Leukotriene B4 regulates proliferation and differentiation of cultured rat myoblasts via the BLT1 pathway. *Mol. Cells* **27**, 403–408 (2009).
16. You, Z. *et al.* Molecular feature of neutrophils in immune microenvironment of muscle atrophy. *J. Cell. Mol. Med.* **26**, 4658–4665 (2022).
17. Luna-Gomes, T., Bozza, P. T. & Bandeira-Melo, C. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. *Front. Pharmacol.* **4**, 27 (2013).
18. Zentay, Z., Sharaf, M., Qadir, M., Drafta, D. & Davidson, D. Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide in vitro: role of neutrophil interleukin-8 release. *Pediatr. Res.* **46**, 406–410 (1999).
19. Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1173–1187 (2010).
20. Madaro, L. & Bouché, M. From innate to adaptive immune response in muscular dystrophies and skeletal muscle regeneration: the role of lymphocytes. *BioMed Res. Int.* **2014**, 438675 (2014).
21. Yokota, M. *et al.* Roles of mast cells in the pathogenesis of inflammatory myopathy. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R72 (2014).
22. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059–1070 (2010).
23. Chung, E. Y. *et al.* Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* **27**, 952–964 (2007).
24. Juban, G. & Chazaud, B. Efferocytosis during Skeletal Muscle Regeneration. *Cells* **10**, 3267 (2021).

25. Aoki, A., Hirahara, K., Kiuchi, M. & Nakayama, T. Eosinophils: Cells known for over 140 years with broad and new functions. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* **70**, 3–8 (2021).
26. Heredia, J. E. *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* **153**, 376–388 (2013).
27. Shimizu, F. *et al.* Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J. Cell. Physiol.* **226**, 255–266 (2011).
28. Birbrair, A. *et al.* Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 245 (2014).
29. Cappellari, O. & Cossu, G. Pericytes in development and pathology of skeletal muscle. *Circ. Res.* **113**, 341–347 (2013).
30. Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G. & Koh, T. J. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C1183–1191 (2008).
31. Zhang, J. *et al.* CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1(high) macrophage infiltration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**, 5149–5160 (2014).
32. Fu, X. *et al.* Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res.* **25**, 655–673 (2015).
33. Deyhle, M. R. & Hyldahl, R. D. The Role of T Lymphocytes in Skeletal Muscle Repair From Traumatic and Contraction-Induced Injury. *Front. Physiol.* **9**, 768 (2018).
34. Lewkowicz, N., Klink, M., Mycko, M. P. & Lewkowicz, P. Neutrophil--CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology* **218**, 455–464 (2013).
35. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 1783–1786 (2005).

36. Lewkowicz, N. *et al.* Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol.* **9**, 364–378 (2016).
37. Bohan, A. & Peter, J. B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **292**, 403–407 (1975).
38. Griggs, R. C. *et al.* Inclusion body myositis and myopathies. *Ann. Neurol.* **38**, 705–713 (1995).
39. Hoogendijk, J. E. *et al.* 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord. NMD* **14**, 337–345 (2004).
40. Troyanov, Y. *et al.* Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* **84**, 231–249 (2005).
41. Opinc, A. H. & Makowska, J. S. Update on Malignancy in Myositis-Well-Established Association with Unmet Needs. *Biomolecules* **12**, 111 (2022).
42. Dalakas, M. C. Inflammatory muscle diseases. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1734–1747 (2015).
43. Hilton-Jones, D. & Brady, S. Diagnostic criteria for inclusion body myositis. *J. Intern. Med.* **280**, 52–62 (2016).
44. Allenbach, Y., Benveniste, O., Goebel, H.-H. & Stenzel, W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **43**, 62–81 (2017).
45. Meyer, A. *et al.* Inflammatory myopathies: A new landscape. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* (2017) doi:10.1016/j.jbspin.2017.03.005.
46. Iaccarino, L. *et al.* Assessment of patients with idiopathic inflammatory myopathies and isolated creatin-kinase elevation. *Auto-Immun. Highlights* **5**, 87–94 (2014).
47. Leverenz, D., Zaha, O., Crofford, L. J. & Chung, C. P. Causes of creatine kinase levels greater than 1000 IU/L in patients referred to rheumatology. *Clin. Rheumatol.* **35**, 1541–1547 (2016).

48. Day, J., Patel, S. & Limaye, V. The role of magnetic resonance imaging techniques in evaluation and management of the idiopathic inflammatory myopathies. *Semin. Arthritis Rheum.* **46**, 642–649 (2017).
49. Bourdenet, G. *et al.* Value of magnetic resonance imaging for evaluating muscle inflammation: insights from a new mouse model of myositis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **44**, 537–540 (2018).
50. Pestronk, A. Acquired immune and inflammatory myopathies: pathologic classification. *Curr. Opin. Rheumatol.* **23**, 595–604 (2011).
51. Love, L. A. *et al.* A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* **70**, 360–374 (1991).
52. Betteridge, Z. & McHugh, N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J. Intern. Med.* **280**, 8–23 (2016).
53. Dalakas, M. C. & Hohlfeld, R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 971–982 (2003).
54. Thompson, C., Piguert, V. & Choy, E. The pathogenesis of dermatomyositis. *Br. J. Dermatol.* **179**, 1256–1262 (2018).
55. Benveniste, O., Dubourg, O. & Herson, S. [New classifications and pathophysiology of the inflammatory myopathies]. *Rev. Med. Interne* **28**, 603–612 (2007).
56. Huard, C. *et al.* Correlation of cutaneous disease activity with type 1 interferon gene signature and interferon β in dermatomyositis. *Br. J. Dermatol.* **176**, 1224–1230 (2017).
57. Eisenberg, I. *et al.* The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat. Genet.* **29**, 83–87 (2001).
58. Benveniste, O. *et al.* Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. *Brain J. Neurol.* **134**, 3176–3184 (2011).

59. Dimitri, D. *et al.* Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain J. Neurol.* **129**, 986–995 (2006).
60. Benveniste, O. *et al.* Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **129**, 611–624 (2015).
61. Simon, J.-P., Marie, I., Jouen, F., Boyer, O. & Martinet, J. Autoimmune Myopathies: Where Do We Stand? *Front. Immunol.* **7**, 234 (2016).
62. Benveniste, O., Stenzel, W. & Allenbach, Y. Advances in serological diagnostics of inflammatory myopathies. *Curr. Opin. Neurol.* **29**, 662–673 (2016).
63. Day, J., Otto, S., Cash, K. & Limaye, V. Clinical and histological features of immune-mediated necrotising myopathy: A multi-centre South Australian cohort study. *Neuromuscul. Disord. NMD* **30**, 186–199 (2020).
64. Merlonghi, G., Antonini, G. & Garibaldi, M. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM): A myopathological challenge. *Autoimmun. Rev.* **21**, 102993 (2022).
65. Allenbach, Y., Mammen, A. L., Benveniste, O., Stenzel, W., & Immune-Mediated Necrotizing Myopathies Working Group. 224th ENMC International Workshop:: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. *Neuromuscul. Disord. NMD* **28**, 87–99 (2018).
66. Palterer, B. *et al.* Bench to bedside review of myositis autoantibodies. *Clin. Mol. Allergy CMA* **16**, 5 (2018).
67. Stenzel, W. *et al.* Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology* **84**, 1346–1354 (2015).
68. Benveniste, O., Goebel, H.-H. & Stenzel, W. Biomarkers in Inflammatory Myopathies-An Expanded Definition. *Front. Neurol.* **10**, 554 (2019).

69. Bonroy, C., Piette, Y., Allenbach, Y., Bossuyt, X. & Damoiseaux, J. Positioning of myositis-specific and associated autoantibody (MSA/MAA) testing in disease criteria and routine diagnostic work-up. *J. Transl. Autoimmun.* **5**, 100148 (2022).
70. Betteridge, Z. *et al.* Frequency, mutual exclusivity and clinical associations of myositis autoantibodies in a combined European cohort of idiopathic inflammatory myopathy patients. *J. Autoimmun.* **101**, 48–55 (2019).
71. Mariampillai, K. *et al.* Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA Neurol.* **75**, 1528–1537 (2018).
72. Allenbach, Y., Mariampillai, K. & Benveniste, O. Autoantibodies at the Center of (sub)Classification-Issues of Detection-Reply. *JAMA Neurol.* **76**, 868–869 (2019).
73. Sibilia, J. *et al.* [How can we diagnose and better understand inflammatory myopathies? The usefulness of auto-antibodies]. *Presse Medicale Paris Fr.* **1983** **39**, 1010–1025 (2010).
74. Ghirardello, A. *et al.* Anti-Mi-2 antibodies. *Autoimmunity* **38**, 79–83 (2005).
75. Rosendorff, A. *et al.* NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5308–5313 (2006).
76. Yu, C., Ding, Z., Liang, H., Zhang, B. & Chen, X. The Roles of TIF1 γ in Cancer. *Front. Oncol.* **9**, 979 (2019).
77. Oke, V. & Wahren-Herlenius, M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J. Autoimmun.* **39**, 77–82 (2012).
78. Reed, J. H. & Gordon, T. P. Autoimmunity: Ro60-associated RNA takes its toll on disease pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 136–138 (2016).
79. Paradowska-Gorycka, A. U1-RNP and TLR receptors in the pathogenesis of mixed connective tissue diseasePart I. The U1-RNP complex and its biological significance in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Reumatologia* **53**, 94–100 (2015).

80. Reitsam, N. G. *et al.* Concurrent loss of MLH1, PMS2 and MSH6 immunoexpression in digestive system cancers indicating a widespread dysregulation in DNA repair processes. *Front. Oncol.* **12**, 1019798 (2022).
81. Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. & Shan, S. Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 693–721 (2013).
82. Nazari, H. *et al.* Cortactin, an actin binding protein, regulates GLUT4 translocation via actin filament remodeling. *Biochem. Biokhimiia* **76**, 1262–1269 (2011).
83. Albrecht, I. *et al.* Development of autoantibodies against muscle-specific FHL1 in severe inflammatory myopathies. *J. Clin. Invest.* **125**, 4612–4624 (2015).
84. Maeda, M. H., Tsuji, S. & Shimizu, J. Inflammatory myopathies associated with anti-mitochondrial antibodies. *Brain J. Neurol.* **135**, 1767–1777 (2012).
85. Galindo-Feria, A. S., Wang, G. & Lundberg, I. E. Autoantibodies: Pathogenic or epiphenomenon. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **36**, 101767 (2022).
86. Rose, N. R. & Bona, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* **14**, 426–430 (1993).
87. Satoh, M. *et al.* Onset of polymyositis with autoantibodies to threonyl-tRNA synthetase during pregnancy. *J. Rheumatol.* **21**, 1564–1566 (1994).
88. Hung, N. A., Jackson, C., Nicholson, M. & Highton, J. Pregnancy-related polymyositis and massive perivillous fibrin deposition in the placenta: are they pathogenetically related? *Arthritis Rheum.* **55**, 154–156 (2006).
89. Kanoh, H. *et al.* A case of dermatomyositis that developed after delivery: the involvement of pregnancy in the induction of dermatomyositis. *Br. J. Dermatol.* **141**, 897–900 (1999).
90. Gutiérrez, G., Dagnino, R. & Mintz, G. Polymyositis/dermatomyositis and pregnancy. *Arthritis Rheum.* **27**, 291–294 (1984).

91. Bergua, C. *et al.* In vivo pathogenicity of IgG from patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies in immune-mediated necrotising myopathy. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 131–139 (2019).
92. Arouche-Delaperche, L. *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: Anti-SRP and Anti-HMGCR. *Ann. Neurol.* **81**, 538–548 (2017).
93. Katsumata, Y. *et al.* Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are associated with muscle and lung inflammation. *J. Autoimmun.* **29**, 174–186 (2007).
94. Okiyama, N. *et al.* Immune response to dermatomyositis-specific autoantigen, transcriptional intermediary factor 1 γ can result in experimental myositis. *Ann. Rheum. Dis.* **80**, 1201–1208 (2021).
95. Stone, K. B. *et al.* Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum.* **56**, 3125–3131 (2007).
96. Takada, T. *et al.* Serum cytokine profiles of patients with interstitial lung disease associated with anti-CADM-140/MDA5 antibody positive amyopathic dermatomyositis. *Respir. Med.* **109**, 1174–1180 (2015).
97. Sato, S., Kuwana, M., Fujita, T. & Suzuki, Y. Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer correlates with disease activity and predicts disease outcome in patients with dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* **23**, 496–502 (2013).
98. Gono, T. *et al.* Anti-MDA5 antibody, ferritin and IL-18 are useful for the evaluation of response to treatment in interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **51**, 1563–1570 (2012).

99. Kobayashi, I. *et al.* Anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody is a diagnostic and predictive marker for interstitial lung diseases associated with juvenile dermatomyositis. *J. Pediatr.* **158**, 675–677 (2011).
100. Sato, S., Kuwana, M., Fujita, T. & Suzuki, Y. Amyopathic dermatomyositis developing rapidly progressive interstitial lung disease with elevation of anti-CADM-140/MDA5 autoantibodies. *Mod. Rheumatol.* **22**, 625–629 (2012).
101. Muro, Y., Sugiura, K., Hoshino, K. & Akiyama, M. Disappearance of anti-MDA-5 autoantibodies in clinically amyopathic DM/interstitial lung disease during disease remission. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **51**, 800–804 (2012).
102. Aggarwal, R. *et al.* Anti-signal recognition particle autoantibody ELISA validation and clinical associations. *Rheumatology* **54**, 1194–1199 (2015).
103. Benveniste, O. *et al.* Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* **63**, 1961–1971 (2011).
104. Allenbach, Y. *et al.* Anti-HMGCR autoantibodies in European patients with autoimmune necrotizing myopathies: inconstant exposure to statin. *Medicine (Baltimore)* **93**, 150–157 (2014).
105. Alshehri, A., Choksi, R., Bucelli, R. & Pestronk, A. Myopathy with anti-HMGCR antibodies: Perimysium and myofiber pathology. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2**, e124 (2015).
106. Ge, Y., Lu, X., Peng, Q., Shu, X. & Wang, G. Clinical Characteristics of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Antibodies in Chinese Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies. *PLOS ONE* **10**, e0141616 (2015).
107. Kassardjian, C. D., Lennon, V. A., Alfugham, N. B., Mahler, M. & Milone, M. Clinical Features and Treatment Outcomes of Necrotizing Autoimmune Myopathy. *JAMA Neurol.* (2015)
doi:10.1001/jamaneurol.2015.1207.

108. Ramanathan, S. *et al.* Clinical course and treatment of anti-HMGCR antibody-associated necrotizing autoimmune myopathy. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2**, e96 (2015).
109. Suzuki, S. *et al.* Myopathy Associated With Antibodies to Signal Recognition Particle: Disease Progression and Neurological Outcome. *Arch. Neurol.* **69**, (2012).
110. Valiyil, R., Casciola-Rosen, L., Hong, G., Mammen, A. & Christopher-Stine, L. Rituximab therapy for myopathy associated with anti-signal recognition particle antibodies: a case series. *Arthritis Care Res.* **62**, 1328–1334 (2010).
111. Watanabe, Y. *et al.* Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **87**, 1038–1044 (2016).
112. Afzali, A. M., Ruck, T., Wiendl, H. & Meuth, S. G. Animal models in idiopathic inflammatory myopathies: How to overcome a translational roadblock? *Autoimmun. Rev.* **16**, 478–494 (2017).
113. Pumarola, M., Moore, P. F. & Shelton, G. D. Canine inflammatory myopathy: analysis of cellular infiltrates. *Muscle Nerve* **29**, 782–789 (2004).
114. Chen, X., Ghribi, O. & Geiger, J. D. Rabbits fed cholesterol-enriched diets exhibit pathological features of inclusion body myositis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R829-835 (2008).
115. Strongwater, S. L., Dorovini-Zis, K., Ball, R. D. & Schnitzer, T. J. A murine model of polymyositis induced by coxsackievirus B1 (Tucson strain). *Arthritis Rheum.* **27**, 433–442 (1984).
116. Pearson, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **91**, 95–101 (1956).
117. Scuderi, F., Mannella, F., Marino, M., Provenzano, C. & Bartoccioni, E. IL-6-deficient mice show impaired inflammatory response in a model of myosin-induced experimental myositis. *J. Neuroimmunol.* **176**, 9–15 (2006).
118. Allenbach, Y. *et al.* Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis. *Am. J. Pathol.* **174**, 989–998 (2009).

119. Soejima, M. *et al.* Role of Innate Immunity in a Model of Histidyl-tRNA Synthetase (Jo-1)-mediated Myositis. *Arthritis Rheum.* **63**, 479–487 (2011).
120. Sciorati, C. *et al.* Exacerbation of Murine Experimental Autoimmune Myositis by Toll-Like Receptor 7/8. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **70**, 1276–1287 (2018).
121. Kawachi, I., Tanaka, K., Tanaka, M. & Tsuji, S. Dendritic cells presenting pyruvate kinase M1/M2 isozyme peptide can induce experimental allergic myositis in BALB/c mice. *J. Neuroimmunol.* **117**, 108–115 (2001).
122. Julien, S. *et al.* Prevention of Anti-HMGCR Immune-Mediated Necrotising Myopathy by C5 Complement Inhibition in a Humanised Mouse Model. *Biomedicines* **10**, 2036 (2022).
123. Nagaraju, K. *et al.* Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9209–9214 (2000).
124. Fréret, M. *et al.* Overexpression of MHC class I in muscle of lymphocyte-deficient mice causes a severe myopathy with induction of the unfolded protein response. *Am. J. Pathol.* **183**, 893–904 (2013).
125. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
126. Salomon, B. *et al.* Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* **194**, 677–684 (2001).
127. Prevot, N. *et al.* Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2267–2276 (2010).
128. Briet, C. *et al.* The Spontaneous Autoimmune Neuromyopathy in ICOSL^{-/-} NOD Mice Is CD4+ T-Cell and Interferon- γ Dependent. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
129. Seto, N. *et al.* Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. *JCI Insight* **5**, (2020).

130. Gao, S. *et al.* The roles of neutrophil serine proteinases in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 134 (2018).
131. Villanueva, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 538–552 (2011).
132. Reimann, J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in normal human skeletal muscle and inflammatory myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 654–662 (2010).
133. Preuße, C. *et al.* Immune-mediated necrotizing myopathy is characterized by a specific Th1-M1 polarized immune profile. *Am. J. Pathol.* **181**, 2161–2171 (2012).
134. Allenbach, Y. *et al.* Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis. *PLoS One* **9**, e88788 (2014).
135. Moran, E. M. & Mastaglia, F. L. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications. *Clin. Exp. Immunol.* **178**, 405–415 (2014).
136. Greenberg, S. A. *et al.* Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun.* **13**, 207–213 (2012).
137. Ladislau, L. *et al.* JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain J. Neurol.* **141**, 1609–1621 (2018).
138. Chevrel, G. *et al.* Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J. Neuroimmunol.* **137**, 125–133 (2003).
139. Nagaraju, K. *et al.* Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum.* **52**, 1824–1835 (2005).

140. Page, G., Chevrel, G. & Miossec, P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum.* **50**, 199–208 (2004).
141. Salajegheh, M. *et al.* Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve* **42**, 576–583 (2010).
142. Allenbach, Y. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **43**, 62–81 (2017).
143. Radke, J. *et al.* Architectural B-cell organization in skeletal muscle identifies subtypes of dermatomyositis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **5**, e451 (2018).
144. Stuhlmüller, B., Schneider, U., González-González, J.-B. & Feist, E. Disease Specific Autoantibodies in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Front. Neurol.* **10**, 438 (2019).
145. Arouche-Delaperche, L. *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.* **81**, 538–548 (2017).
146. Fujiyama, T. *et al.* Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 110–120 (2014).
147. Rostasy, K. M. *et al.* Distinct inflammatory properties of late-activated macrophages in inflammatory myopathies. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* **27**, 49–53 (2008).
148. Noda, S. *et al.* Transforming growth factor- β signaling is upregulated in sporadic inclusion body myositis. *Muscle Nerve* **55**, 741–747 (2017).
149. Burks, T. N. & Cohn, R. D. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet. Muscle* **1**, 19 (2011).

150. Confalonieri, P., Bernasconi, P., Cornelio, F. & Mantegazza, R. Transforming growth factor-beta 1 in polymyositis and dermatomyositis correlates with fibrosis but not with mononuclear cell infiltrate. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 479–484 (1997).
151. Girardi, F. *et al.* TGF β signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. *Nat. Commun.* **12**, 750 (2021).
152. Uezumi, A. *et al.* Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **124**, 3654–3664 (2011).
153. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
154. Saito, Y., Chikenji, T. S., Matsumura, T., Nakano, M. & Fujimiya, M. Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
155. Wanschitz, J. V. *et al.* Expression of myogenic regulatory factors and myo-endothelial remodeling in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul. Disord. NMD* **23**, 75–83 (2013).
156. Schiaffino, S., Pereira, M. G., Ciciliot, S. & Rovere-Querini, P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* **284**, 517–524 (2017).
157. Henriques-Pons, A. & Nagaraju, K. Nonimmune mechanisms of muscle damage in myositis: role of the endoplasmic reticulum stress response and autophagy in the disease pathogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **21**, 581–587 (2009).
158. Loell, I. & Lundberg, I. E. Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies? *J. Intern. Med.* **269**, 243–257 (2011).
159. Morosetti, R. *et al.* Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol. Aging* **31**, 1205–1214 (2010).
160. Gandolfi, S. *et al.* Stromal vascular fraction in the treatment of myositis. *Cell Death Discov.* **9**, 346 (2023).

161. Barsotti, S. & Lundberg, I. E. Current Treatment for Myositis. *Curr. Treat. Options Rheumatol.* **4**, 299–315 (2018).
162. Moghadam-Kia, S. & Oddis, C. V. Current and new targets for treating myositis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **65**, 102257 (2022).
163. Dalakas, M. C. Update on Intravenous Immunoglobulin in Neurology: Modulating Neuro-autoimmunity, Evolving Factors on Efficacy and Dosing and Challenges on Stopping Chronic IVIg Therapy. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **18**, 2397–2418 (2021).
164. Goswami, R. P. *et al.* Efficacy and safety of intravenous and subcutaneous immunoglobulin therapy in idiopathic inflammatory myopathy: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* **21**, 102997 (2022).
165. Zeng, R., Glaubitz, S. & Schmidt, J. Antibody Therapies in Autoimmune Inflammatory Myopathies: Promising Treatment Options. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **19**, 911–921 (2022).
166. Oddis, C. V. & Aggarwal, R. Treatment in myositis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 279–289 (2018).
167. Khoo, T. & Limaye, V. Biologic therapy in the idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatol. Int.* **40**, 191–205 (2020).
168. Paik, J. J. *et al.* Study of Tofacitinib In Refractory Dermatomyositis (STIR): An open label pilot study of 10 patients. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* (2020) doi:10.1002/art.41602.
169. Schmidt, K. & Schmidt, J. Inclusion body myositis: advancements in diagnosis, pathomechanisms, and treatment. *Curr. Opin. Rheumatol.* **29**, 632–638 (2017).
170. Henes, J. C. *et al.* Antisignal recognition particle-positive polymyositis successfully treated with myeloablative autologous stem cell transplantation. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 447–448 (2009).
171. Salvador, F. B. & Isenberg, D. A. Use of autologous stem cell transplantation in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: a case-report and review of the literature. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, 979 (2012).

172. Baron, F. *et al.* Effective treatment of Jo-1-associated polymyositis with T-cell-depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **110**, 339–342 (2000).
173. Zhu, J. *et al.* Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for refractory juvenile dermatomyositis: a case-series study. *Pediatr. Rheumatol.* **16**, 72 (2018).
174. Liang, J. *et al.* Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 312 (2018).
175. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol.* **7**, 30 (2016).
176. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
177. Fang, H. & Judd, R. L. Adiponectin Regulation and Function. *Compr. Physiol.* **8**, 1031–1063 (2018).
178. Mazzola, R. F. & Mazzola, I. C. The fascinating history of fat grafting. *J. Craniofac. Surg.* **24**, 1069–1071 (2013).
179. Herndon, C. H. Transplantation of Tissues. Vol. 1. Lyndon A. Peer, M.D. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., 1955. \$13.50. *JBJS* **38**, 473 (1956).
180. Chajchir, A. & Benzaquen, I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast. Reconstr. Surg.* **84**, 921–934; discussion 935 (1989).
181. Coleman, S. R. Facial recontouring with liposstructure. *Clin. Plast. Surg.* **24**, 347–367 (1997).
182. Condé-Green, A. *et al.* Effects of centrifugation on cell composition and viability of aspirated adipose tissue processed for transplantation. *Aesthet. Surg. J.* **30**, 249–255 (2010).
183. Tonnard, P. *et al.* Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast. Reconstr. Surg.* **132**, 1017–1026 (2013).
184. Jeyaraman, M. *et al.* Nanofat: A therapeutic paradigm in regenerative medicine. *World J. Stem Cells* **13**, 1733–1746 (2021).

185. Gentile, P., Scioli, M. G., Bielli, A., Orlandi, A. & Cervelli, V. Comparing different nanofat procedures on scars: role of the stromal vascular fraction and its clinical implications. *Regen. Med.* **12**, 939–952 (2017).
186. Charitos, I. A. *et al.* Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues. *Stem Cells Int.* **2021**, 9978837 (2021).
187. Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H. On the origin of the term ‘stem cell’. *Cell Stem Cell* **1**, 35–38 (2007).
188. Becker, A. J., McCULLOCH, E. A. & Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452–454 (1963).
189. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
190. Juric, M. K. *et al.* Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front. Immunol.* **7**, 470 (2016).
191. Gomez-Salazar, M. *et al.* Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant? *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 148 (2020).
192. Bianco, P., Robey, P. G. & Simmons, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* **2**, 313–319 (2008).
193. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
194. Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S. & Caplan, A. I. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* **16**, 557–564 (1995).

195. Koç, O. N. *et al.* Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **18**, 307–316 (2000).
196. Le Blanc, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 1579–1586 (2008).
197. Galipeau, J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* **15**, 2–8 (2013).
198. Galipeau, J. & Sensébé, L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* **22**, 824–833 (2018).
199. Galipeau, J. *et al.* International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy* **18**, 151–159 (2016).
200. McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T. & McLean, W. H. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 29S (1991).
201. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228 (2001).
202. Wright, A., Arthaud-Day, M. L. & Weiss, M. L. Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 632717 (2021).
203. Rodbell, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**, 375–380 (1964).
204. Ramakrishnan, V. M. & Boyd, N. L. The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **24**, 289–299 (2018).

205. Saito, N. *et al.* Purification and characterization of human adipose-resident microvascular endothelial progenitor cells. *Sci. Rep.* **12**, 1775 (2022).
206. Eto, H. *et al.* Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency. *Stem Cells Dev.* **22**, 985–997 (2013).
207. Wang, Y. *et al.* The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. *iScience* **15**, 66–78 (2019).
208. Van Pham, P., Vu, N. B., Nguyen, H. T. & Phan, N. K. Isolation of endothelial progenitor cells from human adipose tissue. *Biomed. Res. Ther.* **3**, 19 (2016).
209. Onogi, Y. *et al.* Pro-inflammatory macrophages coupled with glycolysis remodel adipose vasculature by producing platelet-derived growth factor-B in obesity. *Sci. Rep.* **10**, 670 (2020).
210. Eilken, H. M. *et al.* Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1. *Nat. Commun.* **8**, 1574 (2017).
211. Marçola, M. & Rodrigues, C. E. Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int.* **2015**, 832649 (2015).
212. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).
213. Magalon, J. *et al.* Autologous Adipose Tissue-Derived Cells: Are We Talking About Adipose Derived Stem Cells, Stromal Vascular Fraction, or Coleman Fat Grafting? *Cell Transplant.* **24**, 2667–2668 (2015).
214. Marędzia, M., Marycz, K., Tomaszewski, K. A., Kornicka, K. & Henry, B. M. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, 2152435 (2016).
215. Dos-Anjos Vilaboa, S., Navarro-Palou, M. & Llull, R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy* **16**, 1092–1097 (2014).

216. Andjelkov, K., Conde-Green, A. & Mosahebi, A. Smoking and Physical Activity Significantly Influence Stromal Vascular Fraction Cell Yield and Viability. *Aesthetic Plast. Surg.* **45**, 315–321 (2021).
217. Abbo, O. *et al.* Comparison between pediatric and adult adipose mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **19**, 395–407 (2017).
218. Parsons, A. M., Ciombor, D. M., Liu, P. Y. & Darling, E. M. Regenerative Potential and Inflammation-Induced Secretion Profile of Human Adipose-Derived Stromal Vascular Cells Are Influenced by Donor Variability and Prior Breast Cancer Diagnosis. *Stem Cell Rev. Rep.* **14**, 546–557 (2018).
219. Bora, P. & Majumdar, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 145 (2017).
220. Li, K. *et al.* Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthetic Plast. Surg.* **37**, 153–158 (2013).
221. Faustini, M. *et al.* Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng. Part C Methods* **16**, 1515–1521 (2010).
222. Jurgens, W. J. F. M. *et al.* Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* **332**, 415–426 (2008).
223. van Dongen, J. A. *et al.* Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes: a systematic review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e261–e274 (2018).
224. Domenis, R. *et al.* Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 2 (2015).
225. Puissant, B. *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* **129**, 118–129 (2005).

226. Najar, M. *et al.* Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. *Int. Immunopharmacol.* **15**, 693–702 (2013).
227. Ketterl, N. *et al.* A robust potency assay highlights significant donor variation of human mesenchymal stem/progenitor cell immune modulatory capacity and extended radio-resistance. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 236 (2015).
228. Cui, L. *et al.* Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng.* **13**, 1185–1195 (2007).
229. DelaRosa, O. *et al.* Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2795–2806 (2009).
230. Menta, R. *et al.* Tryptophan concentration is the main mediator of the capacity of adipose mesenchymal stromal cells to inhibit T-lymphocyte proliferation in vitro. *Cytotherapy* **16**, 1679–1691 (2014).
231. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 21–28 (2012).
232. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* **34**, 137–143 (2013).
233. Polchert, D. *et al.* IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1745–1755 (2008).
234. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42–49 (2009).
235. Najar, M. *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Induce Proliferative, Cytokinic and Molecular Changes During the T Cell Response: The Importance of the IL-10/CD210 Axis. *Stem Cell Rev. Rep.* **11**, 442–452 (2015).

236. Cho, K.-S. *et al.* Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. *Mediators Inflamm.* **2014**, 436476 (2014).
237. Zeng, Q. *et al.* A Unique Population: Adipose-Resident Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
238. Kerkelä, E. *et al.* Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 781–790 (2016).
239. Ménard, C. *et al.* Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **38**, 146–159 (2020).
240. Espagnol, N., Balguerie, A., Arnaud, E., Sensebé, L. & Varin, A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep.* **8**, 961–976 (2017).
241. Shi, J. *et al.* CD90 highly expressed population harbors a stemness signature and creates an immunosuppressive niche in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **453**, 158–169 (2019).
242. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
243. Bowles, A. C. *et al.* Adipose Stromal Vascular Fraction-Mediated Improvements at Late-Stage Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 532–544 (2017).
244. Short, W. D. *et al.* Endogenous Interleukin-10 Contributes to Wound Healing and Regulates Tissue Repair. *J. Surg. Res.* **285**, 26–34 (2023).
245. Sato, Y., Ohshima, T. & Kondo, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 194–199 (1999).
246. Shi, J.-H. *et al.* Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch. Dermatol. Res.* **305**, 341–352 (2013).

247. Shi, J. *et al.* Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PLoS One* **9**, e98228 (2014).
248. Serratrice, N. *et al.* New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 138 (2014).
249. Mattei, A. *et al.* Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 202 (2018).
250. Domergue, S. *et al.* Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars. *PLoS One* **11**, e0156161 (2016).
251. Usunier, B., Benderitter, M., Tamarat, R. & Chapel, A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int.* **2014**, 340257 (2014).
252. Burbridge, M. F. *et al.* The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis* **5**, 215–226 (2002).
253. Jin, E., Chae, D.-S., Son, M. & Kim, S.-W. Angiogenic characteristics of human stromal vascular fraction in ischemic hindlimb. *Int. J. Cardiol.* **234**, 38–47 (2017).
254. Traktuev, D. O. *et al.* Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ. Res.* **104**, 1410–1420 (2009).
255. Koh, Y. J. *et al.* Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1141–1150 (2011).
256. Planat-Benard, V. *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656–663 (2004).
257. Traktuev, D. O. *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* **102**, 77–85 (2008).

258. Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 3047–3055 (1999).
259. Lopatina, T. *et al.* Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 26 (2014).
260. Zhou, L. *et al.* In vitro evaluation of endothelial progenitor cells from adipose tissue as potential angiogenic cell sources for bladder angiogenesis. *PLoS One* **10**, e0117644 (2015).
261. Matsui, J., Wakabayashi, T., Asada, M., Yoshimatsu, K. & Okada, M. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 18600–18607 (2004).
262. Stapor, P. C., Sweat, R. S., Dashti, D. C., Betancourt, A. M. & Murfee, W. L. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J. Vasc. Res.* **51**, 163–174 (2014).
263. Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242–245 (1997).
264. Lee, J.-H. & Kemp, D. M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 882–888 (2006).
265. Mizuno, H. *et al.* Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **109**, 199–209; discussion 210–211 (2002).
266. Goudenege, S. *et al.* Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **17**, 1064–1072 (2009).
267. Di Rocco, G. *et al.* Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J. Cell Sci.* **119**, 2945–2952 (2006).

268. Bacou, F. *et al.* Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Increases Mass and Functional Capacity of Damaged Skeletal Muscle. *Cell Transplant.* **13**, 103–111 (2004).
269. Zimowska, M. *et al.* IL-4 and SDF-1 Increase Adipose Tissue-Derived Stromal Cell Ability to Improve Rat Skeletal Muscle Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
270. Rodriguez, A.-M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* **201**, 1397–1405 (2005).
271. Gentile, P. *et al.* Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Human Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells (AD-SVFs) and Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSCs): Enzymatic Digestion Versus Mechanical Centrifugation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5471 (2019).
272. Später, T., Frueh, F. S., Nickels, R. M., Menger, M. D. & Laschke, M. W. Prevascularization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds: stromal vascular fraction versus adipose tissue-derived microvascular fragments. *J. Biol. Eng.* **12**, 24 (2018).
273. Laschke, M. W. & Menger, M. D. Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol.* **33**, 442–448 (2015).
274. Chaput, B. *et al.* Mechanically Isolated Stromal Vascular Fraction Provides a Valid and Useful Collagenase-Free Alternative Technique: A Comparative Study. *Plast. Reconstr. Surg.* **138**, 807–819 (2016).
275. Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A. & Hakakian, C. S. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus* **4**, 713 (2015).
276. Oberbauer, E. *et al.* Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen. Lond. Engl.* **4**, 7 (2015).
277. Fraser, J. K. *et al.* The Celution® System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System. *Adv. Wound Care* **3**, 38–45 (2014).

278. Doi, K. *et al.* Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **7**, 864–870 (2013).
279. Cherian, D. S., Bhuvan, T., Meagher, L. & Heng, T. S. P. Biological Considerations in Scaling Up Therapeutic Cell Manufacturing. *Front. Pharmacol.* **11**, 654 (2020).
280. Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R. & Baumans, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim. ATLA* **30**, 219–227 (2002).
281. Thaweesapthithak, S. *et al.* Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 79 (2019).
282. Pileyre, B. Étude comparative de la réglementation des médicaments de thérapie innovante entre différents pays et de son impact dans leur développement clinique et leur commercialisation. 125 (2018).
283. *Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE).* (2003).
284. *Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004 (Text with EEA relevance).* OJ L vol. 324 (2007).
285. García-Olmo, D. *et al.* Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int. J. Colorectal Dis.* **18**, 451–454 (2003).
286. Noël, D. *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp. Cell Res.* **314**, 1575–1584 (2008).
287. Wagner, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* **33**, 1402–1416 (2005).

288. Ketterl, N. *et al.* A robust potency assay highlights significant donor variation of human mesenchymal stem/progenitor cell immune modulatory capacity and extended radio-resistance. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 236 (2015).
289. Li, C. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 55 (2015).
290. Lyons, S., Salgaonkar, S. & Flaherty, G. T. International stem cell tourism: a critical literature review and evidence-based recommendations. *Int. Health* **14**, 132–141 (2022).
291. McMahon, D. S. The global industry for unproven stem cell interventions and stem cell tourism. *Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 1–9 (2014).
292. Bauer, G., Elsallab, M. & Abou-El-Enain, M. Concise Review: A Comprehensive Analysis of Reported Adverse Events in Patients Receiving Unproven Stem Cell-Based Interventions. *Stem Cells Transl. Med.* **7**, 676–685 (2018).
293. Andia, I., Maffulli, N. & Burgos-Alonso, N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **19**, 1289–1305 (2019).
294. Monreal, J. Functional and Aesthetic Recovery of Congenital Muscular Torticollis with Intramuscular Stromal Vascular Fraction Enriched Fat Grafting. *Cureus* **9**, e975 (2017).
295. Lee, H.-B. *et al.* Intramuscular Injection of Adipose Tissue Derived Stromal Vascular Fraction in Subjects with Poliomyelitis: Case Reports. *Int. J. Stem Cell Res. Ther.* **1**, (2019).
296. Bura, A. *et al.* Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* **16**, 245–257 (2014).
297. Lee, H. C. *et al.* Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **76**, 1750–1760 (2012).
298. Hamidian Jahromi, S. & Davies, J. E. Concise Review: Skeletal Muscle as a Delivery Route for Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **8**, 456–465 (2019).

299. Braid, L. R., Wood, C. A., Wiese, D. M. & Ford, B. N. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy* **20**, 232–244 (2018).
300. Hamidian Jahromi, S., Estrada, C., Li, Y., Cheng, E. & Davies, J. E. Human Umbilical Cord Perivascular Cells and Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Transplanted Intramuscularly Respond to a Distant Source of Inflammation. *Stem Cells Dev.* **27**, 415–429 (2018).
301. Yang, X. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: full of chances and challenges. *Cell Biosci.* **10**, 123 (2020).
302. Rifai, L. & Saleh, F. A. Conventional and Alternative Mesenchymal Stem Cell Therapies for the Treatment of Diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1312**, 97–106 (2021).
303. Zhou, T. *et al.* Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 24 (2021).
304. Lee, S. *et al.* ADSC-Based Cell Therapies for Musculoskeletal Disorders: A Review of Recent Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10586 (2021).
305. Galderisi, U., Peluso, G. & Di Bernardo, G. Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years? *Stem Cell Rev. Rep.* **18**, 23–36 (2022).
306. Wang, D. *et al.* Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in patients with drug-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1285–1288 (2011).
307. Lai, Q. *et al.* Umbilical cord blood mesenchymal stem cells transplantation for polymyositis/dermatomyositis: variation of Th cytokines. *Chin. J. Tissue Eng. Res.* 2186–2191 (2015).
308. Ra, J. C. *et al.* Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* **9**, 181 (2011).

309. Meyer, A. *et al.* Inflammatory myopathies: A new landscape. *Joint Bone Spine* **85**, 23–33 (2018).
310. Oddis, C. V. & Aggarwal, R. Treatment in myositis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 279–289 (2018).
311. Chiapparoli, I., Galluzzo, C., Salvarani, C. & Pipitone, N. A glance into the future of myositis therapy. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **14**, 1759720X221100299 (2022).
312. Glaubitz, S., Zeng, R. & Schmidt, J. New insights into the treatment of myositis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **12**, 1759720X19886494 (2020).
313. Jasim, S. A. *et al.* Shining the light on clinical application of mesenchymal stem cell therapy in autoimmune diseases. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 101 (2022).
314. Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **100**, 1249–1260 (2007).
315. Viswanathan, S. *et al.* Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **21**, 1019–1024 (2019).
316. Mazini, L., Ezzoubi, M. & Malka, G. Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Res. Ther.* **12**, 1 (2021).
317. Konishi, R., Ichimura, Y. & Okiyama, N. Murine models of idiopathic inflammatory myopathy. *Immunol. Med.* **46**, 9–14 (2023).
318. Bourdenet, G. *et al.* Icos gene disruption in non-obese diabetic mice elicits myositis associated with anti-troponin T3 autoantibodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **49**, e12889 (2023).
319. Abad, C. & Pinal-Fernandez. A pathogenic role for mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myositis. *Nature Communications*.
320. Drouot, L. *et al.* Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R39 (2014).

321. Garrick, J. M., Costa, L. G., Cole, T. B. & Marsillach, J. Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk. *Curr. Protoc.* **1**, e220 (2021).
322. Ritter, J. *et al.* Translational evaluation of gait behavior in rodent models of arthritic disorders with the CatWalk device – a narrative review. *Front. Med.* **10**, (2023).
323. Vattemi, G. *et al.* Muscle biopsy features of idiopathic inflammatory myopathies and differential diagnosis. *Auto-Immun. Highlights* **5**, 77–85 (2014).
324. Mann, C. J. *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **1**, 21 (2011).
325. Egawa, M. *et al.* Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* **38**, 570–580 (2013).
326. Yang, Q. *et al.* Bone marrow-derived Ly6C⁺ macrophages promote ischemia-induced chronic kidney disease. *Cell Death Dis.* **10**, 291 (2019).
327. Zaid, A. *et al.* Modulation of Monocyte-Driven Myositis in Alphavirus Infection Reveals a Role for CX3CR1⁺ Macrophages in Tissue Repair. *mBio* **11**, e03353-19 (2020).
328. Devarajan, P. & Chen, Z. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good. *Immunol. Res.* **57**, 12–22 (2013).
329. Fritsch, R. D. *et al.* Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **54**, 2184–2197 (2006).
330. Nyberg, E., Farris, A., O’Sullivan, A., Rodriguez, R. & Grayson, W. Comparison of Stromal Vascular Fraction and Passaged Adipose-Derived Stromal/Stem Cells as Point-of-Care Agents for Bone Regeneration. *Tissue Eng. Part A* **25**, 1459–1469 (2019).
331. Zhou, L. *et al.* Comparison of human adipose stromal vascular fraction and adipose-derived mesenchymal stem cells for the attenuation of acute renal ischemia/reperfusion injury. *Sci. Rep.* **7**, 44058 (2017).

332. Rasmussen, B. S. *et al.* Cell-Enriched Fat Grafting Improves Graft Retention in a Porcine Model: A Dose-Response Study of Adipose-Derived Stem Cells versus Stromal Vascular Fraction. *Plast. Reconstr. Surg.* **144**, 397e–408e (2019).
333. Rodriguez, R. L. *et al.* Arguments for a Different Regulatory Categorization and Framework for Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Dev.* (2020) doi:10.1089/scd.2019.0096.
334. Commissioner, O. of the. Innovative Regenerative Medicine Therapies – Patient Safety Comes First. *FDA* (2021).
335. De Wolf, C., van de Bovenkamp, M. & Hoefnagel, M. Regulatory perspective on in vitro potency assays for human mesenchymal stromal cells used in immunotherapy. *Cytotherapy* **19**, 784–797 (2017).
336. Kuipers, M. T. & Kersten, M. J. CAR Traffic jam: who can use the fast lane? *Blood* **142**, 1257–1258 (2023).
337. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
338. Margiana, R. *et al.* Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 366 (2022).
339. Robb, K. P., Fitzgerald, J. C., Barry, F. & Viswanathan, S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy* **21**, 289–306 (2019).
340. Hansen, S. B. *et al.* Optimizing an immunomodulatory potency assay for Mesenchymal Stromal Cell. *Front. Immunol.* **13**, 1085312 (2022).
341. Pan, Z. *et al.* CD90 serves as differential modulator of subcutaneous and visceral adipose-derived stem cells by regulating AKT activation that influences adipose tissue and metabolic homeostasis. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 355 (2019).
342. Chen, X. *et al.* CD73 Pathway Contributes to the Immunosuppressive Ability of Mesenchymal Stem Cells in Intraocular Autoimmune Responses. *Stem Cells Dev.* **25**, 337–346 (2016).

343. Suto, E. G. *et al.* Advantage of fat-derived CD73 positive cells from multiple human tissues, prospective isolated mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* **10**, 15073 (2020).
344. Lv, X.-J. *et al.* In vitro proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells isolated using anti-CD105 magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 826–834 (2012).
345. Kilinc, M. O. *et al.* The ratio of ADSCs to HSC-progenitors in adipose tissue derived SVF may provide the key to predict the outcome of stem-cell therapy. *Clin. Transl. Med.* **7**, 5 (2018).
346. Zhang, J., Liu, Y., Yin, W. & Hu, X. Adipose-derived stromal cells in regulation of hematopoiesis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **25**, 16 (2020).
347. Bowles, A. C. *et al.* Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 2198–2207 (2017).
348. Bourdenet, G. Étude physiopathologique de la myopathie auto-immune des souris NOD invalidées pour la voie de costimulation ICOS/ICOSL. (Normandie Université, 2017).
349. Sipp, D., Robey, P. G. & Turner, L. Clear up this stem-cell mess. *Nature* **561**, 455–457 (2018).
350. Kays, S.-K. *et al.* CD105 is a surface marker for receptor-targeted gene transfer into human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 714–723 (2015).
351. Dong, C. & Nurieva, R. I. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J. Autoimmun.* **21**, 255–260 (2003).
352. Frazier, T. *et al.* Gender and age-related cell compositional differences in C57BL/6 murine adipose tissue stromal vascular fraction. *Adipocyte* 1–7 (2018)
doi:10.1080/21623945.2018.1460009.
353. Datta, R., Podolsky, M. J. & Atabai, K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight* **3**, e122289.
354. Rajangam, T., Park, M. H. & Kim, S.-H. 3D Human Adipose-Derived Stem Cell Clusters as a Model for In Vitro Fibrosis. *Tissue Eng. Part C Methods* **22**, 679–690 (2016).
355. Pinal-Fernandez, I. *et al.* Myositis Autoantigen Expression Correlates With Muscle Regeneration but Not Autoantibody Specificity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **71**, 1371–1376 (2019).

356. Xu, H., Manivannan, A., Crane, I., Dawson, R. & Liversidge, J. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. *Blood* **112**, 1166–1174 (2008).
357. Raphael, I., Joern, R. R. & Forsthuber, T. G. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells* **9**, 531 (2020).

ANNEXES

REVIEW ARTICLE OPEN



Stromal vascular fraction in the treatment of myositis

S. Gandolfi^{1,2,6}, B. Pileyre^{1,3,6}, L. Drouot¹, I. Dubus¹, I. Auquit-Auckbur⁴ and J. Martinet⁵

© The Author(s) 2023

Muscle regeneration is a physiological process that converts satellite cells into mature myotubes under the influence of an inflammatory environment progressively replaced by an anti-inflammatory environment, with precise crosstalk between immune and muscular cells. If the succession of these phases is disturbed, the immune system can sometimes become auto-reactive, leading to chronic muscular inflammatory diseases, such as myositis. The triggers of these autoimmune myopathies remain mostly unknown, but the main mechanisms of pathogenesis are partially understood. They involve chronic inflammation, which could be associated with an auto-reactive immune response, and gradually with a decrease in the regenerative capacities of the muscle, leading to its degeneration, fibrosis and vascular architecture deterioration. Immunosuppressive treatments can block the first part of the process, but sometimes muscle remains weakened, or even still deteriorates, due to the exhaustion of its capacities. For patients refractory to immunosuppressive therapies, mesenchymal stem cells have shown interesting effects but their use is limited by their availability. Stromal vascular fraction, which can easily be extracted from adipose tissue, has shown good tolerance and possible therapeutic benefits in several degenerative and autoimmune diseases. However, despite the increasing use of stromal vascular fraction, the therapeutically active components within this heterogeneous cellular product are ill-defined and the mechanisms by which this therapy might be active remain insufficiently understood. We review herein the current knowledge on the mechanisms of action of stromal vascular fraction and hypothesise on how it could potentially respond to some of the unmet treatment needs of refractory myositis.

Cell Death Discovery (2023)9:346; <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01605-9>

FACTS

- Muscle regeneration involves a sequence of tissue repair mechanisms regulated by both pro- and anti-inflammatory immune cells.
- Myositis pathomechanisms are not fully understood but may result from chronic exposure to immune cells and cytokines, leading to destruction and mis-repair of muscle, with fibrosis and vascular architecture disturbance.
- Therapeutic options for inflammatory myopathies are predominantly based on immunosuppressive treatments, which are sometimes insufficient to regulate the different features of these complex pathologies.
- Adipose tissue-derived stem cells and stromal vascular fraction have immunomodulatory, anti-fibrotic, proangiogenic and regenerative properties that could be exploited for the treatment of refractory or relapsed myositis.
- However, the mechanisms behind these effects are still insufficiently understood and more preclinical studies are required before their clinical use.

OPEN QUESTIONS

- Does repeated acute muscular destruction trigger chronic autoimmune inflammation, or is auto-immunity responsible for muscle destruction in myositis?

- In myositis, how does chronic inflammation affect adipose-derived cells capacities?
- Will adipose stem cells replace muscle stem cells and directly participate in tissue regeneration, or rather have a supporting role for immune and local stem cells?

INTRODUCTION

The mechanisms of muscle regeneration following injury are now well-known and involve both muscle and immune cells, through a regulated process [1]. A disruption of this process may be the cause of chronic inflammation and a failure of muscle regeneration, which can lead to autoimmune diseases such as myositis. Myositis, also called idiopathic inflammatory myopathies, represents a group of immune-mediated diseases, including Polymyositis (PM), Dermatomyositis (DM), Immune-Mediated Necrotising Myositis (IMNM), Inclusion Body Myositis (IBM) and overlap myositis [2]. They are clinically characterised by muscle weakness, and histologically by the presence of varying levels of myofibre necrosis and leucocyte infiltrates in muscles [3]. Predominantly muscular, some forms of myositis can also be associated with other manifestations, such as Interstitial Lung Disease (ILD), skin ulcers or Raynaud's phenomenon. Corticosteroids and immunosuppressive drugs are commonly used but may be ineffective in

¹Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, FOCIS Center of Excellence PAN'THER, F-76000 Rouen, France. ²Toulouse University Hospital, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, F-31000 Toulouse, France. ³Centre Henri Becquerel, Department of Pharmacy, F-76000 Rouen, France. ⁴Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, FOCIS Center of Excellence PAN'THER, CHU Rouen, Department of Plastic, Reconstructive and Hand Surgery, F-76000 Rouen, France. ⁵Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, FOCIS Center of Excellence PAN'THER, CHU Rouen, Department of Immunology and Biotherapy, F-76000 Rouen, France. ⁶These authors contributed equally: S. Gandolfi, B. Pileyre. ✉email: Baptiste.pileyre@gmail.com

Received: 13 March 2023 Revised: 1 August 2023 Accepted: 14 August 2023

Published online: 19 September 2023

some patients or even aggravating due to their possible side effects [4–6].

For these patients, cell therapies have sometimes shown long-term beneficial effects. Autologous hematopoietic stem cell transplants, which have been used to replace auto-reactive immune systems, have improved patients' conditions, and even allowed some of them to enter into remission. These therapies generally seem to be safe, but can be complicated by severe or even life-threatening iatrogenic infections due to myeloablative conditioning regimens [7–10]. More recently, the discovery of the immunomodulatory effects of Mesenchymal Stem Cells (MSC) from Bone Marrow (BM-MSC) or Umbilical Cord Blood (UC-MSC), in addition to their well-known regenerative effect, has led to their use for the treatment of patients with refractory autoimmune diseases, including myositis [11]. If these types of stem cells seem safer, the invasiveness of the harvesting and the low rate of stem cells recovered from these sources remain important limitations to their use.

Adipose tissue is another source of MSC. They can be extracted safely and in large quantities from a lipoaspirate by enzymatic digestion or mechanical isolation for Stromal Vascular Fraction (SVF), followed by replicative cultures of adherent cells for Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) [12]. If ADSC are known to possess immunomodulatory, proangiogenic, anti-fibrotic and regenerative capacities like MSC from other tissues [13], SVF share similar properties and is easier to prepare [14]. However, the therapeutically active components within this heterogeneous cellular product are not well defined, and the mechanisms responsible for its activity remain insufficiently understood.

In order to evaluate the potential of SVF as a treatment for refractory myositis, we first summarise here the physiological mechanisms of muscle regeneration and the pathological mechanisms involved in myositis. Next, we address the main features of these diseases through the known mechanisms of action of this cell therapy. Last, we discuss its clinical relevance by analysing results from various clinical trials.

Physiological muscle regeneration

Muscle regeneration after trauma is a process that involves both immune and muscular cells in order to restore normal muscle function. At first, satellite cell activation and proliferation accompanied by inflammation, followed by a progressive decrease of inflammation under the influence of anti-inflammatory cells, which stimulate muscle progenitor cell differentiation and tissue remodelling [15].

At the earliest stage of regeneration after injury, muscle damaged cells release Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP) [16], which lead through Toll Like Receptor (TLR) to the activation and infiltration of immune cells, mostly mast cells [17] and neutrophils [18]. These cells start to clear the damaged myofibres and secrete pro-inflammatory cytokines (mostly IL-1, IL-6, IL-8 and TNF α). The pro-inflammatory signal spreads and after 24 h, macrophages can be observed at the lesion site [19]. They are mostly involved in the elimination of damaged muscular cells by the production of Reactive Oxygen Species (ROS), through the increased expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), and phagocytosis. Like neutrophils, they secrete a large amount of cytokines (mostly TNF α , IL-6, and IL-1 β) which triggers a positive feedback loop between neutrophil and macrophage recruitment and production of cytotoxic substances, but also T-cell recruitment [20].

Around three days after injury, both CD8⁺ and CD4⁺ T cells appear at the lesion site and can be detected for up to ten days [21]. CD8⁺ T cells pursue the task of macrophages and neutrophils, by releasing many cytokines which amplify the recruitment of leucocytes and by acting on extracellular matrix remodelling to speed up cellular debris elimination [22]. CD4⁺ T cells seem to be recruited a little later than CD8⁺ T cells [23]. They differentiate preferentially into Th1 cells, which maintain

macrophage recruitment and pro-inflammatory polarisation through the production of cytokines (IL-1 β , TNF α and IFN γ).

The large amount of secreted cytokines modulates the environment of the injured site and triggers muscular regeneration [1]. Fu et al. demonstrated that the cytokines secreted by T cells promote satellite cell proliferation in vitro and in vivo [24]. Indeed, TNF α is known to attract satellite cells to the damaged site and to enhance their proliferation through the activation of NF- κ B signalling and the p38 pathway [25, 26]. The importance of TNF α secretion in response to muscular damage has been demonstrated in vivo in TNF α or TNF-receptor knockout mice, which show severe muscular regeneration defects [27, 28]. TNF α is associated with other cytokines, such as IL-6, secreted by both immune and muscle cells, and IL-1 β , which maintains the proliferation but also stimulates the differentiation of satellite cells into myoblasts [29, 30]. The importance of IL-1 β has also been demonstrated in IL-1 β knockout mice, which present a slowdown of satellite cell differentiation, shown by a reduced expression of myoblast markers MyoD and Myogenin.

When the clearing of damaged cells ends, the naive T cells recruited polarise into Th2 cells, which release anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-13) [31]. These cytokines stimulate myoblast fusion and Fibro-Adipogenic Progenitor (FAP) proliferation [32]. After activation and differentiation, FAP are another source of myogenic factor like Wnt family members, IL-6 and Insulin-like Growth-Factor 1 (IGF1), which enhance satellite cell proliferation and myoblast differentiation and fusion [33–35]. They also release IL-33, which participates in the activation of muscle Treg cells and the recruitment of circulatory Treg cells, which are genetically and functionally distinct [36]. Indeed, in addition to regulating and reducing the inflammatory environment, muscle Treg cells play an important role in regeneration through amphiregulin secretion [37, 38]. The change of inflammatory environment is mainly based on the change of macrophage populations from pro-inflammatory to anti-inflammatory, under the influence of Th2 and Treg cell cytokines [39]. These macrophages produce anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13), which reduce the local inflammation induced by the lesion and stimulate the differentiation and fusion of myoblasts into myotubes, promoting the late stage of myogenesis [35, 40]. They also release TGF β , which regulates myotube fusion and prevents the TNF α -induced apoptosis of FAP, inducing their differentiation into matrix-producing cells [41]. These cells also produce growth factors such as IGF1, Hepatocyte Growth Factor (HGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), which stimulate endothelial cells and contribute to bringing together endothelial and satellite cells [42]. The proximity and crosstalk between muscular, mesenchymal and endothelial cells are essential for both myoangiogenesis and total muscle recovery [43].

Defective muscle regeneration during myositis

The myoregeneration process relies on the presence of functional satellite cells in the muscle and the environmental agents that control at different phases the proliferation, differentiation and fusion of these cells into myotubes [44]. Among these stimuli, secretion by immune cells of pro- then anti-inflammatory cytokines plays an important role. In the case of myositis, a chronic activation of innate and adaptive immune cells which can recognise auto-antigens is observed and these cells, normally transient, remain in the muscle (Fig. 1). Neutrophil persistence in muscle infiltrates has been demonstrated in myositis muscle, as well as neutrophil participation in the destruction of muscle fibres through the release of proteolytic enzymes and the formation of neutrophil extracellular traps [45, 46]. Further, this extracellular formation seems to be induced by the presence of myositis-associated antibodies. Reimann et al. showed an increase in pro-inflammatory macrophage density in muscle, through iNOS expression correlated with a high expression of macrophage

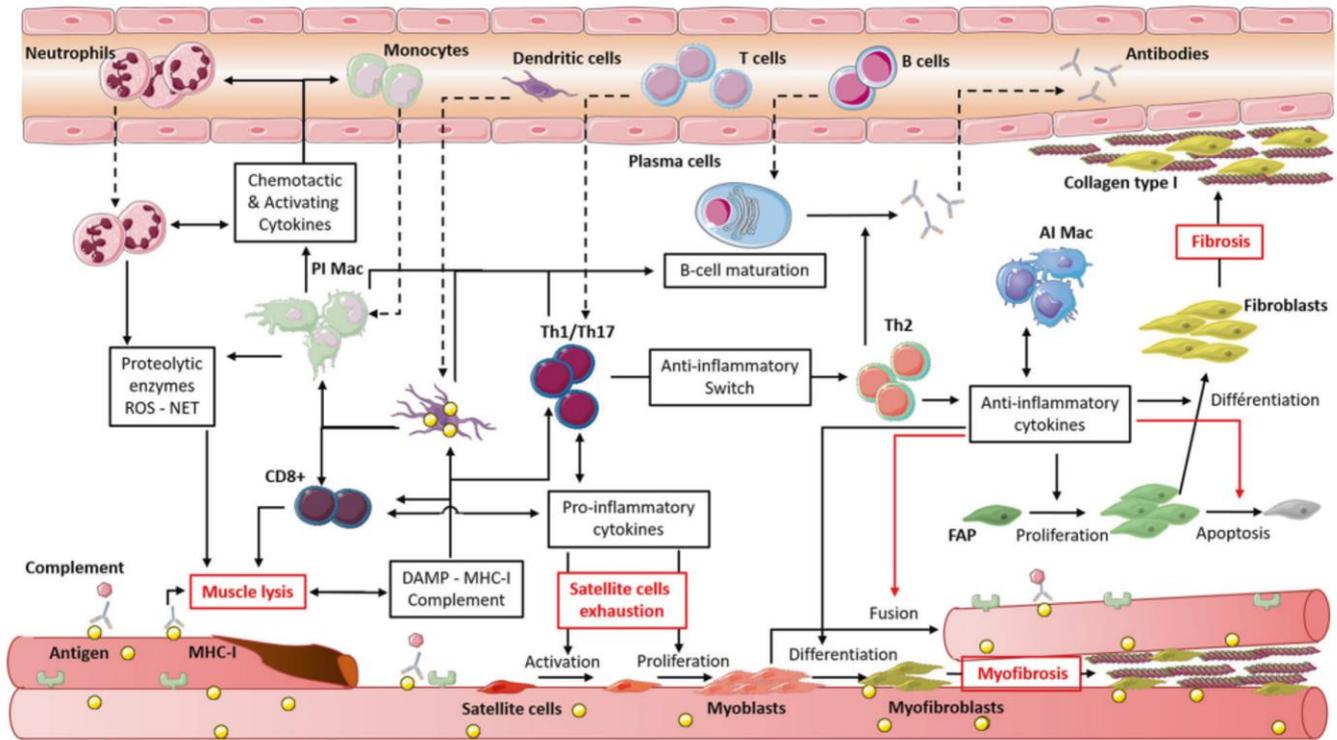


Fig. 1 Skeletal muscle degeneration in myositis is dependent on both pro- and anti-inflammatory cells. Depending on the muscle area, adaptive immune cells maintain a pro- or anti-inflammatory environment through cytokine secretion. The pro-inflammatory environment leads to an accumulation of myeloid cells, mostly neutrophils and macrophages, which secrete proteolytic enzymes and ROS by iNOS overexpression. These molecules degrade myotubes which release signals that stoke pro-inflammatory cells (DAMP). Moreover, myofibres over express muscular antigen and MHC class I, which stimulate even more adaptive cells, directly or via specific antibodies and/or complement system. Plasma cells are activated by a B-cell maturation environment generated by BAFF expression by DC and T cells and secrete specific auto-antibodies. Pro-inflammatory cytokines also stimulate proliferation and activation of satellite cells, until exhaustion. The anti-inflammatory environment replaces pro-inflammatory macrophages (PI Mac) with anti-inflammatory macrophages (AI Mac), which secrete large amounts of TGF β and other anti-inflammatory cytokines. These cytokines induce myofibrosis through myoblast differentiation into myofibroblast, by inhibiting myotube fusion, and fibrosis through fibroblast differentiation from FAP, by inhibiting TNF α -induced apoptosis of these cells. Fibrosis accumulation leads to muscular and vascular disturbance, and to a loss of strength.

migration inhibitory factor, a cytokine with anti-apoptotic, proliferative and chemotactic effects secreted by macrophages, T cells and muscle fibres [47]. Myositis patients present a strong Th1 response, with an increased expression of IFN γ , IL-1 β and TNF α [48, 49]. This Th1 response leads to the induction and maintenance of pro-inflammatory macrophages and thus amplifies muscle destruction [50]. A type 1 IFN signature was observed in the blood of patients with DM or PM and correlated with disease activity [51]. A recent study showed that the activation of type 1 IFN pathway in muscle cells *in vitro* induced myotube atrophy and impaired endothelial cell angiogenesis, features that were observed in DM [52]. Muscle destruction is also due to the abnormal expression of Major Histocompatibility Complex type I (MHC-I) on the myocyte surface, induced by IFN γ and IL-1 β [53]. This expression is also induced by IL-17, produced by Th17 cells, which potentiates the effects of IL-1 β . Some studies have shown that overexpression of MHC-I in muscle can induce myopathy through both immunological, with CD8 $^{+}$ -mediated cytotoxicity, and nonimmunological mechanisms [54, 55]. Thereby, both CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells can be activated by muscle cells, which act directly as antigen presenting cells, but also indirectly through dendritic cells (DC) detected in muscular infiltrate during myositis [56], or TLR stimulation by DAMP [16, 57]. The activation and differentiation of T cells by these cells lead to the formation of a permissive environment for B-cell maturation, evidenced by the presence of CD19 $^{+}$ or CD20 $^{+}$ B cells and CD138 $^{+}$ plasma cells and by the expression of B-cell activating factor [58]. Myositis specific antibodies were identified in more than half of patients [2], and a recent study associated Th1 and Th17 cytokine expression with

B-cell aggregation and maturation, through the formation of ectopic lymphoid structures in myositis muscle [59]. The pathogenicity of these antibodies has not always been demonstrated, however they are often correlated with the severity of the myositis and the underlying diseases, like ILD, Raynaud syndrome or cancer [60]. Furthermore for some of them, the mechanism of action has been identified, notably in IMNM, wherein anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) and anti-signal recognition protein (SRP) induce myofibre atrophy by increasing IL-6, TNF α and ROS secretion. They also reduce myotube formation by decreasing IL-4 and IL-13 production [61]. This pathogenic effect seems also to involve complement system [62].

Anti-inflammatory cells are also present in myositis muscle and some of them take part in the pathomechanism. If the Th2 cytokine IL-4 overexpressed in myositis seems inversely correlated with the severity of muscular destruction, as evidenced by muscular enzyme levels in the sera [63], anti-inflammatory macrophage cytokines (TGF β and IL-10) are also highly expressed in myositis and seem to be involved in the pathogenesis [47, 64]. Prolonged exposure to TGF β and IL-10 is correlated with the duration of myositis via their association with other cytokines, especially in IBM [50, 65]. Prolonged TGF β 1 exposure, for example, is strongly involved in the dysregulation of muscle regeneration in different myopathies, by inhibiting satellite cell activation and differentiation and myocyte fusion, but also by increasing myofibroblast accumulation and fibrosis [66–68]. Muscle fibrosis is also generated by the accumulation of FAP, which escape TNF-induced apoptosis and differentiate into collagen type-1 producing cells (fibroblasts) under TGF β 1 high expression by anti-

inflammatory macrophages [41, 69]. This escape from apoptosis could also be due to the expression of immune checkpoint factors (PD-L1, PD-L2 and CD47) by FAP, as shown in a murine model of myositis [70]. Fibrosis can lead, like in IBM, to tissue and capillary architecture disruption and to an increased distance between muscle fibres and capillaries, responsible for hypoxia and oxidative stress [71]. Treg cell functions are also altered in myositis, which leads to the dysregulation of immune response and to the impairment of muscle regeneration. Indeed, Treg dysfunctions have been evidenced in both DM and PM and in several myositis models, which present a more severe disease when Treg cells are depleted. Conversely, the injection of functional Treg cells at the time of immunisation blocked disease progression [72]. On the other hand, Treg cells seem to be fully functional in IBM despite a decreased frequency observed in circulation and muscle [49].

If the pathogenic triggers of myositis have not yet been identified, partially due to a lack of spontaneous animal models, the hypothesis of an immune system defect which is solely responsible or even at the origin of the disease is controversial, especially in IBM [73, 74]. Muscle cells participate in the pathogenesis and aggravation of the disease, through the activation of several deleterious and not fully understood mechanisms, involving endoplasmic reticulum and/or mitochondrial defects. If MHC-I expression on muscle cell surface is often linked to leucocyte infiltration, it has been shown that it can be induced by endoplasmic reticulum stress, and that its presence can be detected before infiltrate and can affect muscle fibre contractibility [75]. Beyond muscle destruction, which stays chronically blocked in pro- and/or anti-inflammatory state without resolution, the impairment of satellite cell capacities to activate and proliferate is also involved in the disease. Myoblasts from IBM patients also present reduced proliferation rate and clonogenicity capacity *in vitro* when compared to myoblasts from healthy donors, probably due to replicative exhaustion and senescence [76]. This observation was confirmed *in vivo*, with a lower expression of MyoD [71]. Moreover, the persistence of myogenin expression observed in these patients might reflect an impairment of both myoblast differentiation and muscle fibre maturation.

Myositis represents a heterogeneous group of diseases which involve immune and non-immune mechanisms. In these diseases, the immune system acts on both muscle degeneration and regeneration, with muscle progenitor cell stimulation by cytokines. While suppressing myositis may appear as an effective solution to stop or to slow down the disease, this can be insufficient or even aggravating sometimes, due to non-immune mechanisms or regenerative defects.

Current therapeutics for myositis patients

Most of the treatments used in myositis target the inflammatory actors. Glucocorticoids are the most current therapeutic approach, alone as a first-line treatment or associated with other immunosuppressive molecules in refractory patients [77]. These associations are more efficient to improve muscle function, and act on myositis-associated diseases like ILD. Moreover, they allow to reduce the corticosteroid effective dose, leading to fewer side effects, especially on muscle [78]. Nevertheless, the use of immunosuppressive molecules is also limited by their own adverse effects, including toxicities on various organs (liver, lung, kidney, heart), risk of infection and metabolic disorders (diabetes, dyslipidemia) [79]. These various side effects are even more problematic in elderly subjects who suffer from numerous comorbidities. Biological agents have also been tested in myositis: at first, Intravenous (IV) immunoglobulins, considered to present immunomodulatory properties, and then monoclonal antibodies, such as Rituximab (anti-CD20), Tocilizumab (anti-IL-6), Infliximab (anti-TNF α), Alemtuzumab (anti-CD52), Basiliximab (anti-IL-2R) or Sifalimumab (anti-IFN α), or even receptor antagonist Anakinra (anti-IL-1R), JAK inhibitor Tofacitinib and fusion proteins Abatacept

or Etanercept, which block CTLA-4 or TNF α pathways, respectively [6, 80, 81]. If these treatments are efficient in most of first- and second-lines refractory to DM and PM, some patients stay refractory or relapse to all of them. Complement inhibition has also been tested in IMNM, with a preventive effect in animals but no significant improvement in management in humans [82, 83]. Further, these treatments seem to bring no benefit and even to exacerbate the disease in IBM patients, who remain in a therapeutic deadlock [4]. In this myositis subtype, new molecules are under evaluation, like Arimocloamol, a Heat Shock Factor 1 activation amplifier, which increases chaperone protein activity and thus misfolding protein repair pathway, or follistatin, a myostatin antagonist, with an adeno-associated virus coding for it injected Intramuscularly (IM) [84]. New monoclonal antibodies targeting myostatin or activin A, which both negatively regulate myogenesis, have been developed but clinical trials in IBM have been recently withdrawn or cancelled for these treatments [85].

Cell therapies are occasionally used to treat patients with refractory PM or DM, but very few cases have been reported. As stated above, hematopoietic stem cell autologous transplantation, used to replace auto-reactive immune system after its depletion, has shown benefits but with a high risk of side effects [7–10]. MSC transplantations, for which no myeloablative treatment is required, have also been tested (Table 1).

The first clinical study using MSC was published in 2011 by Wang et al. and reported the case of 10 patients with refractory PM or DM, according to Bohan and Peter criteria [86]. After treatment by IV allogeneic BM- or UC-MSC, they observed an improvement in muscle strength and clinical score and a reduction of inflammation and muscle degeneration [87]. Transplanted cells were also effective on associated symptoms, notably ILD and skin ulcer, and allowed the reduction of immunosuppressive baseline treatments for all patients. However, three patients relapsed and two patients died from aggravation of a respiratory tract infection. This cohort was followed-up and has grown overtime to thirty patients and safety data were published in 2018. They showed a low frequency of hyperacute adverse events, but reported the death of 11 patients from their underlying diseases, mostly ILD [11].

Lai et al. published the only controlled clinical trial, comparing conventional therapy (6 months of corticosteroids and immunosuppressors) with ($n = 37$ patients) or without ($n = 44$ patients) allogeneic UC-MSC injections in patients with PM or DM [88]. After a follow-up of 6–12 months, the authors demonstrated an improved efficacy of conventional therapy by MSC infusion on both clinical features and muscle strength (MMT score), confirmed by a decrease in plasma creatine kinase level. They also showed an effect on associated ILD, with a reduction of interstitial pulmonary lesions on high resolution CT scan. Clinical and biological controls at 1, 3 and 6 months after transplantation did not reveal any complications.

Only one study reported the case of a patient with refractory and disabling PM treated by four ADSC infusions, leading to an improvement in muscle strength (MMT score) and mobility 3 months after treatment, but no significant change in blood laboratory values [89]. The patient continued corticosteroid treatment at a lower dose.

Pharmaceutical and biological treatments have evolved and now allow to treat most of patients with myositis. After multiple lines and associations of treatment, some patients with PM or DM remain refractory and more often those with IBM. In the latter case, new treatments under evaluation target more specifically muscle degeneration, through metabolic or regulatory pathways, but the expected effect is not always obtained. Conversely, MSC therapies have shown interesting results in myositis, but their harvest and preparation are not simple and clinical studies remain rare. SVF, which has similar effects, could be an alternative, provided its clinical efficacy is proved through robust clinical trials.

Table 1. Summaries of clinical reports of myositis treat by MSC.

Study	Treatment	Follow-up	Efficacy	safety
Wang et al. (2011) [85]	IV Allogeneic BM or UC-MSC (n = 10) (uncontrolled)	1, 2, 3, 6, 12, 18 and 24 months Clinic: Severity (VAS score), manual muscle test (MMT score) and adverse events (AEs) Biologic: CK, CK-MB	MMT and VAS improved Inflammation reduced on MRI (n = 2) Associated symptom improved (ILD, skin ulcers) CK and CK-MB decreased significantly Baseline treatments reduced Relapses (n = 3) at 6 or 8 months, second MSC transplant (n = 2), with second relapse (n = 1) at 3 months	AEs (n = 0) Death (n = 2) starting by respiratory tract infection, disease deterioration and heart failure or severe myocarditis
Ra et al. (2011) [87]	IV autologous ADSC (n = 1) (uncontrolled)	3 months Clinic: MMT, quality of life (SF-36) Biologic: in blood (not detailed)	Muscle strength and quality of life improved, allowing patient to step up stairs, to walk holding handrail, to drive by herself No significant change was detected in blood Baseline treatment reduced	Not specified
Lai et al. (2015) [86]	Conventional therapy (n = 44) IV Allogeneic UC-MSC (n = 37)	1, 3 and 6 months Clinic: Muscle force grade, lung imaging Biologic: CK	Muscle force grade increased in both groups, but higher in UC-MSC group Lung imaging improved CK reduced in both groups, but lower in UC-MSC group	Not specified
Liang et al. (2018) [11]	IV Allogeneic BM or UC-MSC (n = 30) (uncontrolled)	From 2007 to 2016 Clinic: AEs	Not specified	Hyperacute AEs (n = 6): fever, headache, palpitation, facial redness, insomnia, stomach discomfort. Death (n = 11): underlying disease (ILD)

Two of them are about to start to study the safety of SVF in IBM (NCT04975841, NCT05032131).

Stromal vascular fraction in clinical practice

SVF isolation consists in adipocyte elimination through enzymatic or mechanical procedures [90, 91]. Due to the variety of isolation methods, the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) have released a joint statement that defines phenotypic and functional criteria for the identification of adipose-derived cells, and proposes a general composition for SVF [12]: MSC (15–30%), Endothelial Progenitor Cells (EPC) (10–20%), Pericytes (3–5%) and leucocytes (25–45%) (Fig. 2A). According to the SVF isolation method used, two types of SVF can be defined: cellular SVF, which can be obtained by enzymatic procedure, and tissular SVF, which is mechanically isolated and preserves cell-cell contact and extracellular matrix [92, 93]. Recently, another intermediate type has been described: adipose-derived microvascular fraction which consists in lipoaspirate cells enzymatically digested for a shorter time than cellular SVF, and which contains intact arteriolar, capillary and venous vessel segments [94].

Today, SVF is widely used and frequently compared to ADSC in both regenerative medicine and immune/inflammatory disorders and presents significant advantages. Indeed, SVF extraction is simpler and quicker than ADSC expansion and does not present the risks associated with long-term cell culture (bacterial or fungal contaminations, muta- or tumorigenesis). Combined with a permissive regulatory framework in some countries, the use of SVF has regrettably been diverted by private clinics with little interest in studying the efficacy and mechanisms of action of this therapy, which has slowed its development. This was particularly observed in the United States, which had an unusually low number of publications on the topic [95] whereas a very large number of clinics offer these unproven therapies [96, 97]. However, this situation is about to change, with the end of the Food and Drug Administration discretion policy period which should enforce manufacturers, clinics, and health care practitioners compliance with the new guidance on the regulatory framework for regenerative medicine therapies and ensure a greater safety for the use of these therapies [98].

The use of SVF has been reported in many indications and it may represent a promising adjunctive therapy for patients with diseases for which current and conventional therapies are inadequate. The variety of these indications was recently reviewed by Andia et al. who analysed 71 published clinical studies evaluating SVF [99]. However, more than 65% of them were case series with a low level of evidence, and only 16% of them were randomised clinical trials. To confirm this analysis, we searched for clinical trials on clinicaltrials.gov database in May 2023 (search strategy with the key words: Stromal vascular fraction OR SVF OR ADSVF OR ADRC OR ADSC), which allowed us to identify 169 clinical trials evaluating SVF injection (Fig. 2B). The most common indications, according to these studies, were orthopaedic disorders (50.7% and 28.9% for published studies and clinical trials, respectively), then chronic wounds (14% and 24.1%) and cardiovascular and pulmonary diseases (12.6% and 13.9%) (Fig. 2B). Other frequent indications were urogenital (5.6% and 9.6%), neurological (5.6% and 4.8%), and autoimmune diseases (5.6% and 11%), which often overlapped with chronic wound treatment. These data are consistent with those from other studies [14, 99] and demonstrate the increasing interest of SVF for the treatment of inflammatory, degenerative or non-regenerative, autoimmune or cardiovascular diseases. Local sites of injection were more frequent than intravascular, with a predominance of sub-cutaneous, intra-articular, intra-fistula and intramuscular injection (Fig. 2D). Nevertheless, SVF is still a new therapy under development and clinical trials were mostly pilot studies in phase I (73% versus 32.9% for all clinical trials), and phase II and III

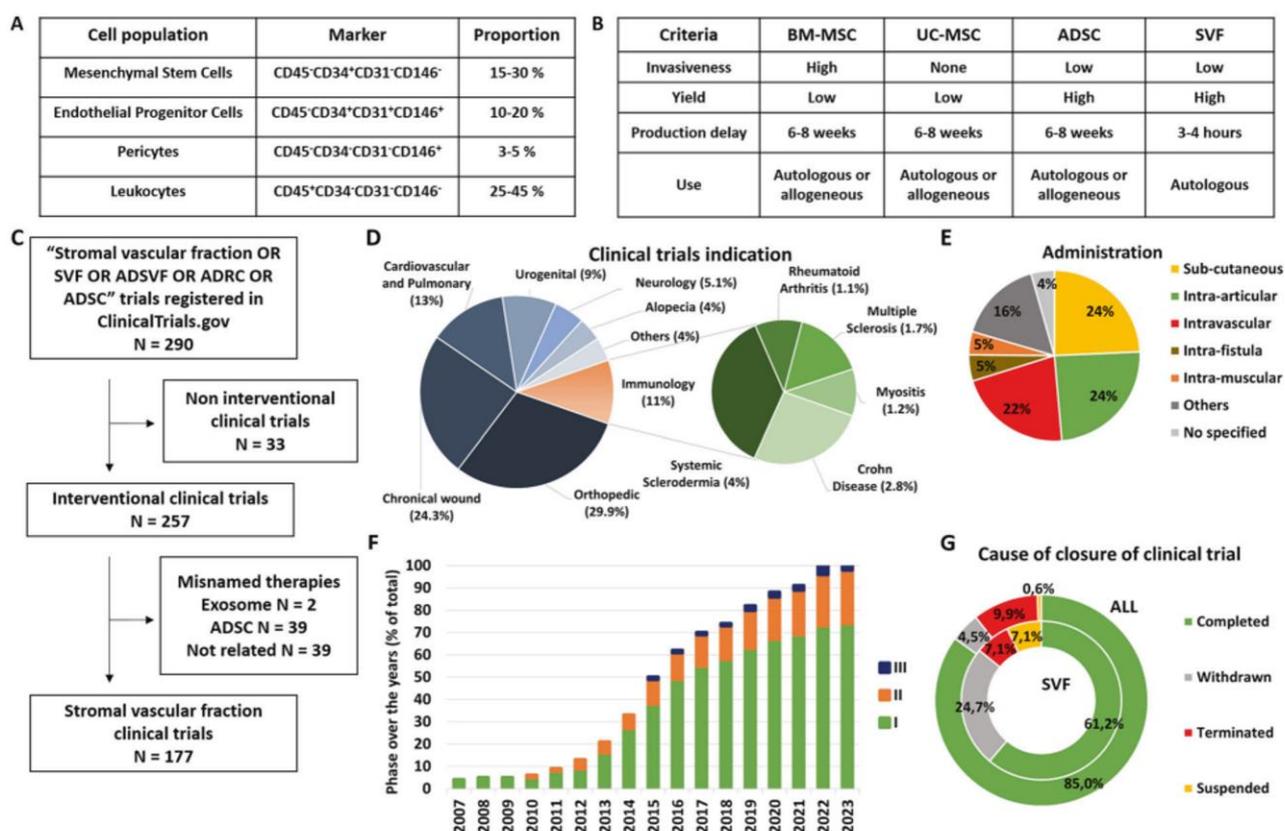


Fig. 2 Stromal vascular fraction description and clinical trials. **A** Description of stromal vascular fraction cell population and main molecular marker. **B** Advantages and disadvantages of stromal vascular fraction compared to ADSC or others MSC. **C** Flow diagram research and selection of ClinicalTrial using SVF. Representation of the distribution of clinical trials **D** by indication and sub-indication for immunology, **E** by way or localisation of administration, **F** by phase over the years and **G** by cause of closure.

appeared only recently (23% versus 42.4% and 4% versus 24.7%, respectively) (Fig. 2E). Furthermore, several SVF clinical trials were not completed (39% versus 15%), closed prematurely or withdrawn (23.3% versus 4.3%) (Fig. 2F). None of these closures were due to a safety issue.

Some recent studies reviewed adverse events in patients receiving “unproven or unapproved” stem cell therapies reported in scientific publications, clinical case reports and also mass media publications, and showed an increased number of severe complications and hospitalisations compared to conventional therapies [100, 101]. Conversely, very few treatment-related adverse events were noted during clinical trials, demonstrating the safety of this procedure. Recently, clinical study results published for both SVF and ADSC were reviewed and showed that the most frequent and severe adverse events were immunological and thromboembolic. They concerned predominantly ADSC, which were more frequently used in an allogeneic context and via IV injection than SVF [95]. Indeed, the in vitro expansion of ADSC led to an increase in cell size, which significantly increased the risk of vascular obstruction and cerebral or myocardial stroke [102]. The injection of SVF directly at the lesion site or within organs seems to be a safer way to use this therapy.

Intramuscular injections of SVF were clinically used as a local route for the treatment of muscle sequelae [103, 104], allowing an improvement in muscle strength, or for the treatment of limb ischaemia [105, 106], highlighting its proangiogenic effects. In these studies, the safety of this route was confirmed. Furthermore, IM injection led to the release of paracrine effectors in blood circulation and could be an alternative to other injection sites (intrathecal, intra-articular) [107]. Another advantage of this route was the increased dwell time of the injected cells, increasing from

days to months the persistence in the body of these cells [108]. Even if they remained in the muscle, they still responded to distant inflammatory signals and acted on distant sites [109]. IM injection of SVF could lead to prolonged clinical efficacy compared to other routes, in both injected and non-injected muscles.

Potential mechanisms of action of stromal vascular fraction in myositis

As seen above, intramuscular injection of SVF is known to be safe and has promising clinical effects in both autoimmune and muscular diseases. Its potential interest in myositis treatment is based on four properties, but mechanisms of action are not fully known (Fig. 3).

First, the immunomodulatory effect of SVF is supported mainly by three cell populations: AD-MSC, macrophages and Treg cells. AD-MSC immunomodulatory capacities are similar or higher to those of BM-MSC according to different studies [110, 111] and have already been tested in vitro [112] and in many in vivo models [113]. Even if the mechanisms involved are not fully understood for these cells, several studies support their effects on T-cell activation, proliferation and differentiation from Th1 cells into Th2 cells, through soluble factors like PGE2 and IDO [114–116] and direct interactions via CD54/CD2 and CD58/CD11a, which increase IL-10 production [117]. They also induce Treg proliferation, via TGFβ and IL-33 secretion [118, 119], and few adipose tissue Tregs are present in SVF. MSC also act on macrophage anti-inflammatory switch, in part by the secretion of PGE2 and IDO [120] and the interaction of CD90 and CD11b trapping monocytes and macrophages into an anti-inflammatory niche [121]. Recent studies have shown that the interactions between MSC and pro-inflammatory cells enhance the immunosuppressive capacities of MSC. Indeed, these authors observed that IFNγ and TNFα secreted

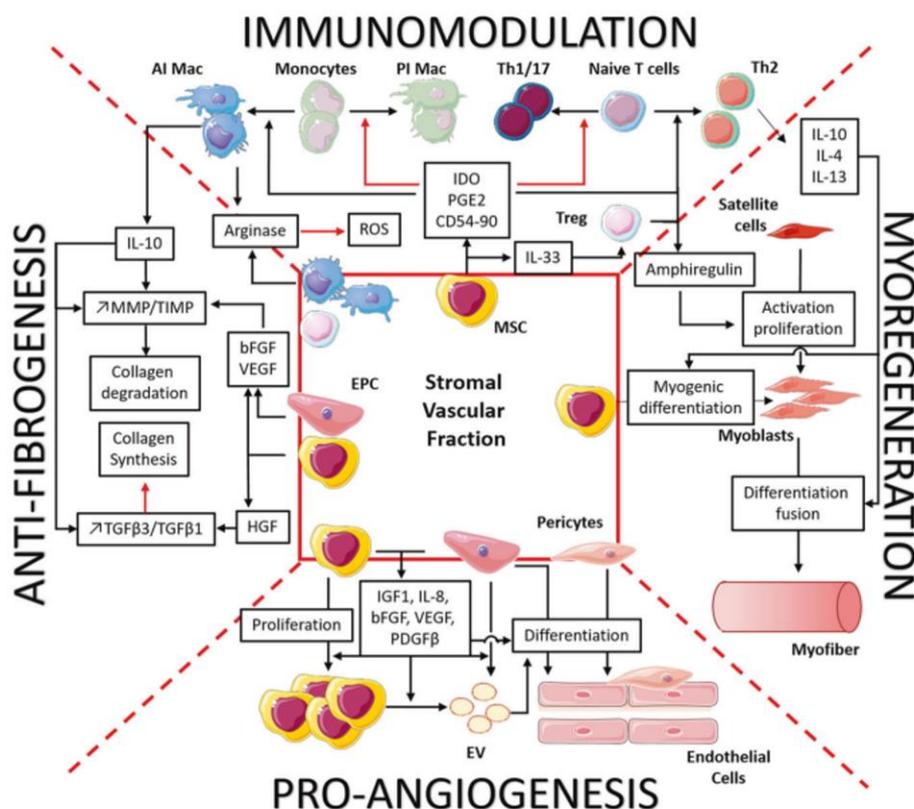


Fig. 3 Stromal vascular fraction induces immunomodulatory, myoregenerative, anti-fibrotic and proangiogenic effects by different cell types. Immunomodulatory capacity is mostly mediated by MSC, through reduction of Th1/Th17 cells, by inhibiting their differentiation from naive T cells and increasing differentiation to Th2 cells via IDO, PGE2, CD54-CD2 interaction. MSC also differentiate monocytes into anti-inflammatory macrophages (AI Mac) by trapping them into an anti-inflammatory environment through CD90-CD11b interaction. Adipose tissue Treg and Macs add themselves to immune cells present in the muscle to reduce inflammation. These cells also release IL-10, which changes the MMP/TIMP balance in favour of collagen degradation. This ratio is also changed by bFGF and VEGF, release by EPC and MSC. MSC also release HGF which changes, like IL-10, the TGF β 3/1 balance to reduce collagen synthesis. Along with EPC, they also release IGF1, bFGF, VEGF, PDGF β and extracellular vesicles (EV), which act at different levels to differentiate EPC and pericytes into endothelial cells and thus reinforce the vascular network. Finally, MSC could differentiate themselves into myoblasts and replenish the muscle cell supply, exhausted by chronic inflammation. Amphiregulin and anti-inflammatory cytokines IL-10, IL-4 and IL-13 released by immune cells participate in the proliferation, differentiation and fusion of these cells.

by Th1 lymphocytes or CD54 expressed by pro-inflammatory macrophages increased IDO activities [122, 123]. SVF also contains macrophages which exhibit anti-inflammatory activities through the secretion of high levels of IL-10 and IL-1 decoy receptors [124] that attenuate TNF α inflammatory signals via activation of STAT3 [125, 126], and modulation of inflammatory gene transcription rates [127]. The modification of the balance between Arg-1 and iNOS activities, which both use L-arginine as a substrate, leads to decreased ROS production, and thus to reduced oxidative stress and destruction of myofibers.

ADSC and SVF can also act on fibrosis via their immunomodulatory effects. Indeed, by reprogramming immune cells into anti-inflammatory cells, they increase the expression of IL-10, which presents several anti-fibrotic properties: inhibition of neutrophil and macrophage invasion and ROS release [128], down-regulation of TGF β 1 expression [129], up-regulation of MMP and down-regulation of collagen expression [130]. Preclinical and clinical studies suggest that SVF anti-fibrotic effects are strongly related to the secretion of HGF by MSC during inflammatory responses, as evidenced by clinical and histological parameters [131, 132]. Indeed, through the paracrine effect of this factor, SVF and ADSC reduce the expression of TGF β 1 and thus the differentiation of collagen type I/III producing cells (fibroblasts) and alpha-Smooth Muscle Actin producing cells (myofibroblasts). ADSC also induce a significant increase in TGF β 3, which reduces the expression of these genes, and stimulates MMP-1, -2 and -3 expressions, which increase fibrotic molecule degradation. The change in the TGF β 1/

TGF β 3 and MMP-2/TIMP-2 ratio tips the scales in favour of an anti-fibrotic effect [133, 134]. MMP expression is also stimulated by proangiogenic factors, like bFGF or VEGF, to degrade extracellular matrix and prepare neo-angiogenesis [135].

Indeed, SVF is known to express high levels of IGF1, IL-8, Platelet-Derived Growth Factor-beta (PDGF β), bFGF and VEGF, and to have robust angiogenic and vasculogenic activities demonstrated both in vitro and in vivo in a hind limb ischaemia model [136]. These growth factors help to maintain a vascular-like micro-environment that supports MSC differentiation into endothelial cells, and thus participate in angiogenesis and vascular repair during muscular regeneration [137]. Traktuev et al. demonstrated that VEGF helps the migration of MSC and promotes the secretion of PDGF β by EPC, which enable MSC to proliferate [138, 139]. PDGF β is well-known for its action during vascular development [140] but also plays a role in the proangiogenic properties of SVF, by inducing the secretion of proangiogenic extracellular vesicles by both MSC and EPC [141, 142]. These extracellular vesicles contain proangiogenic molecules such as c-KIT and Stem cell factor, which participate in the recruitment of EPC and their differentiation into endothelial cells [143]. PDGF β secretion by EPC also induces pericyte recruitment [144] which is known to play an essential role in angiogenesis regulation [145].

SVF, through its immunomodulatory properties, acts on both chronic inflammation and muscle repair via cytokine release (mainly IL-4 and IL-13). Moreover, growth factors secreted by stromal cells may have a positive effect on muscle regeneration,

and some of them are currently under evaluation in the management of muscle disorders, such as sarcopenia [146]. But one advantage to using cell therapy, rather than hormones or cytokines, could be its ability to differentiate in situ depending on its cellular environment. This could strengthen and help satellite cells to replace defective cells. The conversion of ADSC or SVF to a myogenic phenotype has been obtained in vitro by addition of inductive media, containing horse serum and hydrocortisone. This leads to the expression of the myogenic transcription factors MyoD1 and myogenin and then the fusion and formation of multinucleated cells expressing the myosin heavy chain [147–149]. Based on histological evidence, ADSC fuse to form multinucleated myotubes in vitro. In their study, Di Rocco et al. showed that ADSC and SVF cells were able to differentiate into skeletal muscle cells when cultured in the presence of differentiating primary myoblasts [150]. Furthermore, the conversion of SVF to a myogenic phenotype is enhanced by myogenic environment in the absence of cell-cell contacts (transwell culture) and even in absence of muscle cells but to a lesser extent. This myogenic conversion has also been demonstrated in vivo by several studies. In a lagomorph model of muscular injury induced by cardiotoxin, the intramuscular injection of short-term cultured (3 days) SVF cells induced an increase in muscle mass and functional capacities [151]. The myogenic differentiation of SVF and fusion with muscular cells have been demonstrated using SVF genetically modified to express β -galactosidase or GFP, showing evidence of the contribution of SVF cells to muscular regeneration in vivo with 20% of GFP-positive fibres in the total area of sections from treated hind limbs [150, 151]. This contribution could be enhanced by pretreating SVF with anti-inflammatory cytokine IL-4 or SDF1 before use to increase the myogenic capacity of ADSC in vitro and in vivo [152]. To finish, it has also been reported that injection of human ADSC into immunocompetent mdx mice resulted in a substantial expression of human dystrophin in both injected and adjacent muscle, revealing the spread of cells to other muscles [153].

CONCLUSION

MSC-based therapies have shown interesting effects in the treatment of refractory myositis, but their clinical use remains limited, especially for those extracted from adipose tissue. However, SVF, easily harvested from this tissue, could be beneficial for patients thanks to its properties combining an immunomodulatory effect and a response to the main muscular complications of myositis. While published cases report only IV infusion of MSC in myositis treatment, IM injection of SVF seems to be an interesting alternative, providing both local and systemic effects. Taken together, the evidence reviewed here seems to predict a potential benefit of SVF in myositis treatment. However, these findings also highlight the need for preclinical studies and clinical trials to better understand the mechanisms of this therapy and to optimise the practical modalities to ensure its safety and efficacy.

REFERENCES

- Yang W, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Transl.* 2018;13:25–32.
- Allenbach Y, Benveniste O, Goebel H-H, Stenzel W. Integrated classification of inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43:62–81.
- Meyer A, Lannes B, Goetz J, Echaniz-Laguna A, Lipsker D, Arnaud L, et al. Inflammatory myopathies: a new landscape. *Jt Bone Spine.* 2018;85:23–33.
- Benveniste O, Guiguet M, Freebody J, Dubourg O, Squier W, Maissonobe T, et al. Long-term observational study of sporadic inclusion body myositis. *Brain J Neurol.* 2011;134:3176–84.
- Jabari D, Vedanarayanan VV, Barohn RJ, Dimachkie MM. Update on inclusion body myositis. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20:52.
- Oddis CV, Aggarwal R. Treatment in myositis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14:279–89.
- Baron F, Ribbens C, Kaye O, Fillet G, Malaise M, Beguin Y. Effective treatment of Jo-1-associated polymyositis with T-cell-depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2000;110:339–42.
- Zhu J, Su G, Lai J, Dong B, Kang M, Li S, et al. Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for refractory juvenile dermatomyositis: a case-series study. *Pediatr Rheumatol.* 2018;16:72.
- Henes JC, Heinzelmann F, Wacker A, Seelig HP, Klein R, Bornemann A, et al. Anti-signal recognition particle-positive polymyositis successfully treated with myeloablative autologous stem cell transplantation. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:447–8.
- Salvador FB, Isenberg DA. Use of autologous stem cell transplantation in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: a case-report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:979.
- Liang J, Zhang H, Kong W, Deng W, Wang D, Feng X, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:312.
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15:641–8.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211–28.
- Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:145.
- Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN, Fussell MA, Rodriguez NR. Divergent roles of inflammation in skeletal muscle recovery from injury. *Front Physiol.* 2020;11:87.
- Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:35–46.
- Gorospe JR, Nishikawa BK, Hoffman EP. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci.* 1996;135:10–17.
- Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265:R166–72.
- Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train.* 2006;41:457–65.
- Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.
- Cheng M, Nguyen M-H, Fantuzzi G, Koh TJ. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294:C1183–91.
- Zhang J, Xiao Z, Qu C, Cui W, Wang X, Du J. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1(high) macrophage infiltration. *J Immunol.* 2014;193:5149–60.
- Madaro L, Bouché M. From innate to adaptive immune response in muscular dystrophies and skeletal muscle regeneration: the role of lymphocytes. *BioMed Res Int.* 2014;2014:438675.
- Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, et al. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res.* 2015;25:655–73.
- Peterson JM, Bakkar N, Guttridge DC. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2011;96:85–119.
- Chen S-E, Jin B, Li Y-P. TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C1660–71.
- Chen S-E, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, et al. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C1179–87.
- Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 2002;16:1630–2.
- Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 2013;280:4131–48.
- Chawweewannakorn C, Tsuchiya M, Koide M, Hatakeyama H, Tanaka Y, Yoshida S, et al. Roles of IL-1 α / β in regeneration of cardiotoxin-injured muscle and satellite cell function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018;315:R90–103.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23–35.
- Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell.* 2013;153:376–88.
- Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* 2016;23:927–37.

34. Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, et al. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci.* 2008;121:2939–50.
35. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7:33–44.
36. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell.* 2013;155:1282–95.
37. Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, et al. Poor repair of skeletal muscle in aging mice reflects a defect in local, interleukin-33-dependent, accumulation of regulatory T cells. *Immunity.* 2016;44:355–67.
38. Wu J, Ren B, Wang D, Lin H. Regulatory T cells in skeletal muscle repair and regeneration: recent insights. *Cell Death Dis.* 2022;13:680.
39. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76:509–13.
40. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, et al. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:17475–80.
41. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang C-K, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* 2015;21:786–94.
42. Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304:E453–65.
43. Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier F-J, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell.* 2007;18:1397–409.
44. Fang J, Feng C, Chen W, Hou P, Liu Z, Zuo M, et al. Redressing the interactions between stem cells and immune system in tissue regeneration. *Biol Direct.* 2021;16:18.
45. Seto N, Torres-Ruiz JJ, Carmona-Rivera C, Pinal-Fernandez I, Pak K, Purmalek MM, et al. Neutrophil dysregulation is pathogenic in idiopathic inflammatory myopathies. *JCI Insight.* 2020;5:e134189.
46. Gao S, Zuo X, Liu D, Xiao Y, Zhu H, Zhang H, et al. The roles of neutrophil serine proteinases in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther.* 2018;20:134.
47. Reimann J, Schnell S, Schwartz S, Kappes-Horn K, Dodel R, Bacher M. Macrophage migration inhibitory factor in normal human skeletal muscle and inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69:654–62.
48. Preuß C, Goebel HH, Held J, Wengert O, Scheibe F, Irlbacher K, et al. Immune-mediated necrotizing myopathy is characterized by a specific Th1-M1 polarized immune profile. *Am J Pathol.* 2012;181:2161–71.
49. Allenbach Y, Chaara W, Rosenzweig M, Six A, Prevel N, Mingozzi F, et al. Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis. *PLoS ONE.* 2014;9:e88788.
50. Moran EM, Mastaglia FL. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications. *Clin Exp Immunol.* 2014;178:405–15.
51. Greenberg SA, Higgs BW, Morehouse C, Walsh RJ, Kong SW, Brohawn P, et al. Relationship between disease activity and type 1 interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and polymyositis. *Genes Immun.* 2012;13:207–13.
52. Ladislau L, Suárez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M, et al. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain J Neurol.* 2018;141:1609–21.
53. Chevrel G, Page G, Granet C, Streichenberger N, Varennes A, Miossec P. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J Neuroimmunol.* 2003;137:125–33.
54. Fréret M, Drouot L, Obry A, Ahmed-Lacheheb S, Daully C, Adriouch S, et al. Overexpression of MHC class I in muscle of lymphocyte-deficient mice causes a severe myopathy with induction of the unfolded protein response. *Am J Pathol.* 2013;183:893–904.
55. Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, Rawat R, Cutting S, Thapliyal R, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheumatol.* 2005;52:1824–35.
56. Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheumatol.* 2004;50:199–208.
57. Wang S, Wang H, Feng C, Li C, Li Z, He J, et al. The regulatory role and therapeutic application of pyroptosis in musculoskeletal diseases. *Cell Death Discov.* 2022;8:492.
58. Salajegheh M, Pinkus JL, Amato AA, Morehouse C, Jallal B, Yao Y, et al. Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve.* 2010;42:576–83.
59. Radke J, Koll R, Preuß C, Pehl D, Todorova K, Schönemann C, et al. Architectural B-cell organization in skeletal muscle identifies subtypes of dermatomyositis. *Neuro Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5:e451.
60. Stuhlmüller B, Schneider U, González-González J-B, Feist E. Disease specific autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies. *Front Neurol.* 2019;10:438.
61. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, Preusse C, Mouly V, Mauhin W, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann Neurol.* 2017;81:538–48.
62. Bergua C, Chiavelli H, Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Arnoult C, Bourdenet G, et al. In vivo pathogenicity of IgG from patients with anti-SRP or anti-HMGCR autoantibodies in immune-mediated necrotising myopathy. *Ann Rheum Dis.* 2019;78:131–9.
63. Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H. Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol.* 2014;177:110–20.
64. Rostasy KM, Schmidt J, Bahn E, Pfander T, Piepkorn M, Wilichowski E, et al. Distinct inflammatory properties of late-activated macrophages in inflammatory myopathies. *Acta Myol.* 2008;27:49–53.
65. Noda S, Koike H, Maeshima S, Nakanishi H, Iijima M, Matsuo K, et al. Transforming growth factor-β signaling is upregulated in sporadic inclusion body myositis. *Muscle Nerve.* 2017;55:741–7.
66. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF-β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal Muscle.* 2011;1:19.
67. Confalonieri P, Bernasconi P, Cornelio F, Mantegazza R. Transforming growth factor-beta 1 in polymyositis and dermatomyositis correlates with fibrosis but not with mononuclear cell infiltrate. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:479–84.
68. Girardi F, Taleb A, Ebrahimi M, Datye A, Gamage DG, Peccate C, et al. TGFβ signaling curbs cell fusion and muscle regeneration. *Nat Commun.* 2021;12:750.
69. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124:3654–64.
70. Saito Y, Chikenji TS, Matsumura T, Nakano M, Fujimiya M. Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. *Nat Commun.* 2020;11:889.
71. Wanschitz JV, Dubourg O, Lacene E, Fischer MB, Höftberger R, Budka H, et al. Expression of myogenic regulatory factors and myo-endothelial remodeling in sporadic inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord.* 2013;23:75–83.
72. Schiaffino S, Pereira MG, Ciciliot S, Rovere-Querini P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 2017;284:517–24.
73. Henriques-Pons A, Nagaraju K. Nonimmune mechanisms of muscle damage in myositis: role of the endoplasmic reticulum stress response and autophagy in the disease pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21:581–7.
74. Benveniste O, Stenzel W, Hilton-Jones D, Sandri M, Boyer O, van Engelen BGM. Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol.* 2015;129:611–24.
75. Loell I, Lundberg IE. Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies? *J Intern Med.* 2011;269:243–57.
76. Morosetti R, Broccolini A, Sancricca C, Gliubizzi C, Gidaro T, Tonalì PA, et al. Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol Aging.* 2010;31:1205–14.
77. Barsotti S, Lundberg IE. Current treatment for myositis. *Curr Treat Options Rheumatol.* 2018;4:299–315.
78. Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:2163–72.
79. Ponticelli C, Glassock RJ. Prevention of complications from use of conventional immunosuppressants: a critical review. *J Nephrol.* 2019;32:851–70.
80. Khoo T, Limaye V. Biologic therapy in the idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatol Int.* 2020;40:191–205.
81. Paik JJ, Casciola-Rosen L, Shin JY, Albayda J, Tiniakou E, Leung DG, et al. Study of tofacitinib in refractory dermatomyositis (STIR): an open label pilot study of 10 patients. *Arthritis Rheumatol.* 2020. <https://doi.org/10.1002/art.41602>.
82. Julien S, Vadysirisack D, Sayegh C, Ragnathan S, Tang Y, Briand E, et al. Prevention of anti-HMGCR immune-mediated necrotising myopathy by C5 complement inhibition in a humanised mouse model. *Biomedicines.* 2022;10:2036.
83. Mammen AL, Amato AA, Dimachkie MM, Chinoy H, Hussain Y, Lilleker JB, et al. Zilucoplan in immune-mediated necrotising myopathy: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Rheumatol.* 2023;5:e67–76.

84. Schmidt K, Schmidt J. Inclusion body myositis: advancements in diagnosis, pathomechanisms, and treatment. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29:632–8.
85. Dao T, Green AE, Kim YA, Bae S-J, Ha K-T, Gariani K, et al. Sarcopenia and muscle aging: a brief overview. *Endocrinol Metab*. 2020;35:716–32.
86. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975;292:403–7.
87. Wang D, Zhang H, Cao M, Tang Y, Liang J, Feng X, et al. Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in patients with drug-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1285–8.
88. Lai Q, Yu L, Qiu Y, Chen L, Huang J, Li Y, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells transplantation for polymyositis/dermatomyositis: variation of Th cytokines. *Chin J Tissue Eng Res*. 2015;14:2186–91.
89. Ra JC, Kang SK, Shin IS, Park HG, Joo SA, Kim JG, et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2011;9:181.
90. Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, Manzotti S, Gagliardi G, Papalia GF, et al. Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:88.
91. Condé-Green A, Kotamarti VS, Sherman LS, Keith JD, Lee ES, Granick MS, et al. Shift toward mechanical isolation of adipose-derived stromal vascular fraction: review of upcoming techniques. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016;4:e1017.
92. van Dongen JA, Tuin AJ, Spiekman M, Jansma J, van der Lei B, Harmsen MC. Comparison of intraoperative procedures for isolation of clinical grade stromal vascular fraction for regenerative purposes: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:e261–74.
93. Yao Y, Dong Z, Liao Y, Zhang P, Ma J, Gao J, et al. Adipose extracellular matrix/stromal vascular fraction gel: a novel adipose tissue-derived injectable for stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2017;139:867–79.
94. Laschke MW, Menger MD. Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol*. 2015;33:442–8.
95. Toyserkani NM, Jørgensen MG, Tabatabaeifar S, Jensen CH, Sheikh SP, Sørensen JA. Concise review: a safety assessment of adipose-derived cell therapy in clinical trials: a systematic review of reported adverse events. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6:1786–94.
96. Murdoch B, Zarzecny A, Caulfield T. Exploiting science? A systematic analysis of complementary and alternative medicine clinic websites' marketing of stem cell therapies. *BMJ Open*. 2018;8:e019414.
97. Knoepfler PS. Rapid change of a cohort of 570 unproven stem cell clinics in the USA over 3 years. *Regen Med*. 2019;14:735–40.
98. Commissioner, O of the. Innovative regenerative medicine therapies – patient safety comes first. FDA. 2021. <https://www.fda.gov/news-events/fda-voices/innovative-regenerative-medicine-therapies-patient-safety-comes-first>.
99. Andia I, Maffulli N, Burgos-Alonso N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19:1289–305.
100. Bauer G, Elsallab M, Abou-El-Enain M. Concise review: a comprehensive analysis of reported adverse events in patients receiving unproven stem cell-based interventions. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7:676–85.
101. Pritchett JW. The debit side of stem-cell joint injections: a prospective cohort study. *Curr Orthop Pract*. 2021;32:118–23.
102. Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, Zhao RCH, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev Rep*. 2014;10:295–303.
103. Monreal J. Functional and aesthetic recovery of congenital muscular torticollis with intramuscular stromal vascular fraction enriched fat grafting. *Cureus*. 2017;9:e975.
104. Lee H-B, Park S-W, Kim J, Hwang K-C, Kim I-K, Sun H-M, et al. Intramuscular injection of adipose tissue derived stromal vascular fraction in subjects with poliomyelitis: case reports. *Int J Stem Cell Res Ther*. 2019;1:20–27.
105. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre J-S, Gross F, Grolleau J-L, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16:245–57.
106. Lee HC, An SG, Lee HW, Park J-S, Cha KS, Hong TJ, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J Jpn Circ Soc*. 2012;76:1750–60.
107. Hamidian Jahromi S, Davies JE. Concise review: skeletal muscle as a delivery route for mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8:456–65.
108. Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy*. 2018;20:232–44.
109. Hamidian Jahromi S, Estrada C, Li Y, Cheng E, Davies JE. Human umbilical cord perivascular cells and human bone marrow mesenchymal stromal cells transplanted intramuscularly respond to a distant source of inflammation. *Stem Cells Dev*. 2018;27:415–29.
110. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129:118–29.
111. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, et al. Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. *Int Immunopharmacol*. 2013;15:693–702.
112. Ketterl N, Brachtl G, Schuh C, Bieback K, Schallmoser K, Reinisch A, et al. A robust potency assay highlights significant donor variation of human mesenchymal stem/progenitor cell immune modulatory capacity and extended radioresistance. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:236.
113. Bowles AC, Strong AL, Wise RM, Thomas RC, Gerstein BY, Dutreil MF, et al. Adipose stromal vascular fraction-mediated improvements at late-stage disease in a murine model of multiple sclerosis. *Stem Cells*. 2017;35:532–44.
114. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*. 2007;13:1185–95.
115. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2795–806.
116. Menta R, Mancheño-Corvo P, Del Río B, Ramirez C, DelaRosa O, Dalemans W, et al. Tryptophan concentration is the main mediator of the capacity of adipose mesenchymal stromal cells to inhibit T-lymphocyte proliferation in vitro. *Cytotherapy*. 2014;16:1679–91.
117. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells induce proliferative, cytokinetic and molecular changes during the T cell response: the importance of the IL-10/CD210 axis. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11:442–52.
118. Cho K-S, Park M-K, Kang S-A, Park H-Y, Hong S-L, Park H-K, et al. Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:436476.
119. Zeng Q, Sun X, Xiao L, Xie Z, Bettini M, Deng T. A unique population: adipose-resident regulatory T cells. *Front Immunol*. 2018;9:2075.
120. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15:42–9.
121. Shi J, Lu P, Shen W, He R, Yang M-W, Fang Y, et al. CD90 highly expressed population harbors a stemness signature and creates an immunosuppressive niche in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2019;453:158–69.
122. Ménard C, Dulong J, Roulois D, Hébraud B, Verdière L, Pangault C, et al. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2020;38:146–59.
123. Espagnol N, Balguerie A, Arnaud E, Sensebé L, Varin A. CD54-mediated interaction with pro-inflammatory macrophages increases the immunosuppressive function of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rep*. 2017;8:961–76.
124. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–84.
125. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol*. 2004;172:567–76.
126. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genom*. 2013;12:489–98.
127. Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated anti-inflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:8686–91.
128. Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265:194–9.
129. Shi J-H, Guan H, Shi S, Cai W-X, Bai X-Z, Hu X-L, et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:341–52.
130. Shi J, Li J, Guan H, Cai W, Bai X, Fang X, et al. Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PLoS ONE*. 2014;9:e98228.
131. Serratrice N, Bruzzese L, Magalon J, Vèran J, Giraud L, Aboudou H, et al. New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5:138.
132. Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Grimaud F, Revis J, Velier M, et al. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:202.

133. Domergue S, Bony C, Maumus M, Toupet K, Frouin E, Rigau V, et al. Comparison between stromal vascular fraction and adipose mesenchymal stem cells in remodeling hypertrophic scars. *PLoS ONE*. 2016;11:e0156161.
134. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int*. 2014;2014:340257.
135. Burbridge MF, Cogé F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis*. 2002;5:215–26.
136. Jin E, Chae D-S, Son M, Kim S-W. Angiogenic characteristics of human stromal vascular fraction in ischemic hindlimb. *Int J Cardiol*. 2017;234:38–47.
137. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656–63.
138. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*. 2008;102:77–85.
139. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res*. 2009;104:1410–20.
140. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF- β and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126:3047–55.
141. Lopatina T, Bruno S, Tetta C, Kalinina N, Porta M, Camussi G. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell Commun Signal*. 2014;12:26.
142. Zhou L, Xia J, Qiu X, Wang P, Jia R, Chen Y, et al. In vitro evaluation of endothelial progenitor cells from adipose tissue as potential angiogenic cell sources for bladder angiogenesis. *PLoS ONE*. 2015;10:e0117644.
143. Matsui J, Wakabayashi T, Asada M, Yoshimatsu K, Okada M. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279:18600–7.
144. Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J Vasc Res*. 2014;51:163–74.
145. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF- β -deficient mice. *Science*. 1997;277:242–5.
146. Ascenzi F, Barberi L, Dobrowolny G, Villa Nova Bacurau A, Nicoletti C, Rizzuto E, et al. Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell*. 2019;18:e12954.
147. Lee J-H, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:882–8.
148. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109:199–209.
149. Goudenege S, Pisani DF, Wdziekonski B, Di Santo JP, Bagnis C, Dani C, et al. Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2009;17:1064–72.
150. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*. 2006;119:2945–52.
151. Bacou F, Andaloussi RBE, Daussin P-A, Micallef J-P, Levin JM, Chammas M, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transpl*. 2004;13:103–11.
152. Zimowska M, Archacka K, Brzoska E, Bem J, Czerwinska AM, Grabowska I, et al. IL-4 and SDF-1 increase adipose tissue-derived stromal cell ability to improve rat skeletal muscle regeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21:3302.
153. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*. 2005;201:1397–405.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (grant # FDM201806006523). The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SG and BP were the manuscript's principal authors. LD, ID, IA, and JM participated in manuscript writing and editing. All authors approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Correspondence and requests for materials should be addressed to B. Pileyre.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Annexe 2 : Liste des communications

Congrès ISCT 2020 - Communication orale : *Fast and serious : comparative study of the impact of accelerated procedure designations on market access for advance therapy medicinal products*

Congrès SFI 2021 – Poster : *Therapeutic effect of cell therapies derived from adipose tissue in the NOD Icos-/- mouse model of myositis.*

Ma thèse en 180 secondes, édition 2020 : 1^{er} prix du jury Normandie

Annexe 3 : Liste des enseignements

Bases de l'immunologie et des techniques d'analyses immunologiques - ESITECH Université de Rouen

Inflammation – IFMK CHU de Rouen

Thérapies cellulaires et Règlementation des médicaments de thérapie innovante - Master Sciences du Médicament et des Produits de Santé, Industrialisation en Biotechnologies Université de Rouen

Médicaments dérivés du sang – IFSI CHU de Rouen

Étude préclinique évaluant l'utilisation de la fraction vasculaire stromale et les cellules souches dérivées du tissu adipeux dans le traitement des myosites

Résumé

Les myosites représentent un ensemble de maladies musculaires auto-immunes touchant les muscles squelettiques et conduisant à des atteintes graves. Si la plupart des patients répondent aux traitements conventionnels, certains restent réfractaires. La fraction vasculaire stromale (FVS), fraîchement extraite du tissu adipeux, ou les cellules souches en dérivant (ADSC) par culture d'amplification ont montré des résultats prometteurs dans différentes pathologies auto-immunes et pourraient permettre la prise en charge de ces patients. Afin d'évaluer leur potentiel et d'étudier les mécanismes d'action de ces thérapies, nous avons réalisé des études précliniques *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons caractérisé et utilisé un modèle murin de myosites, la souris NOD Icos^{-/-}, présentant des atteintes musculaires spontanées associées à des infiltrats leucocytaires importants. Afin de se rapprocher de l'utilisation autologue de ces thérapies, nous avons réalisé des greffes syngéniques de FVS et d'ADSC dans ce modèle. Nous avons pu observer un ralentissement de l'évolution de la symptomatologie, une réduction de la perte de force musculaire ainsi qu'une diminution de l'atrophie musculaire *in vivo*. Nous avons mis en évidence une meilleure efficacité des ADSC, en particulier lors des tests *in vitro*. Ces tests réalisés avec des cellules de donneurs, évaluant l'efficacité de la régénération (test de formation de colonies fibroblastiques) et l'effet immunomodulateur (test d'inhibition de la prolifération lymphocytaire), ont permis de démontrer l'effet dose-dépendant de ces thérapies ainsi que la supériorité des ADSC à la fois en termes d'efficacité maximale et de dose inhibitrice de 50% de l'effet immunomodulateur. Ils nous ont aussi permis d'identifier des marqueurs prédictifs des effets prolifératif (CD90, CD105 ou encore le taux élevé de cellules souches hématopoïétiques) et immunomodulateur (CD73 ou le taux de macrophages) de ces thérapies. L'ensemble de ces éléments démontrent le potentiel de ces thérapies dans le traitement des myosites et l'intérêt d'investiguer leur effet au travers d'essais cliniques.

Mots clés

Myosites – Thérapie cellulaire – Fraction vasculaire stromale – Immunomodulation – Modèle murin

Preclinical study evaluating the use of stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells in the treatment of myositis

Abstract

Myositis is a group of autoimmune muscular diseases affecting skeletal muscles, leading to severe damage. While most patients respond to conventional treatments, some remain refractory. The stromal vascular fraction (SVF), freshly extracted from adipose tissue, or stem cells derived from it (ADSC) by expansive culture have shown promising results in various autoimmune pathologies and could enable the management of these patients. To assess their potential and study the mechanisms of action of these therapies, we carried out preclinical studies in vitro and in vivo. To this end, we characterized and used a mouse model of myositis, the Icos^{-/-} NOD mouse, showing spontaneous muscle damage associated with extensive leukocyte infiltrates. To be closer of the autologous use of these therapies, we performed syngeneic transplants of FVS and ADSC in this model. We observed a slowdown in the progression of symptoms, a reduction in the loss of muscle strength and a decrease in muscle atrophy in vivo. We have demonstrated a greater efficacy of ADSCs, particularly in in vitro assays. These tests, carried out with donor cells and assessing regenerative efficacy (fibroblast colony forming unit assay) and immunomodulatory effect (lymphocyte proliferation inhibition assay), demonstrated the dose-dependent effect of these therapies, as well as the superiority of ADSCs in terms of both maximum efficacy and 50% inhibitory dose of the immunomodulatory effect. They also enabled us to identify markers predictive of the proliferative (CD90, CD105 or high hematopoietic stem cell count) and immunomodulatory (CD73 or macrophage count) effects of these therapies. All these elements demonstrate the potential of these therapies in the treatment of myositis, and the interest of investigating their effect through clinical trials.

Key words

Myositis – Cell therapies – Stromal vascular fraction – Immunodulation – Murine model