

> Le Prix Master de la Société Française de Myologie (SFM) est une des actions marquantes de cette société savante. Créé depuis 2006, ce prix récompense chaque année un(e) jeune chercheur(euse) pour la qualité de son travail de Master en Biologie en recherche clinique, physiopathologique ou fondamentale dans le domaine de la Myologie. <

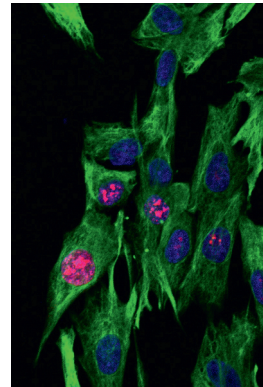
15^{es} JSFM : Prix Master 2017

Effet de l'interféron- gamma sur la biologie des cellules musculaires squelettiques

Cyrielle Hou^{1,2}, Yasmine Baba-Amer²,
Maximilien Benceze², Frédéric Relaix²,
François Jérôme Authier^{2,3}

Contexte et hypothèses

Le muscle squelettique possède de grandes capacités d'adaptation lui permettant de détecter et de s'accommoder aux changements d'activité contractile. Cette plasticité du tissu musculaire répond de manière spécifique à différents changements ou conditions tels que l'exercice physique, les facteurs de croissance, les apports nutritionnels, le stress et certaines pathologies. Cette plasticité est possible par la complémentarité de deux phénomènes : la myogenèse et l'angiogenèse, toutes deux essentielles pour le maintien de l'homéostasie du muscle squelettique [1]. Ce tissu contient en effet une population de progéniteurs musculaires, également nommés cellules satellites, présents dans un microenvironnement particulier, la niche satellitaire [2]. Les cellules satellites sont localisées entre la lame basale et le sarcolemme et sont majoritairement à l'état quiescent dans un muscle sain. A la suite d'une lésion musculaire, les cellules satellites s'activent, prolifèrent puis se différencient et fusionnent pour former de nouvelles fibres musculaires (Figure 1A, 1B). Une partie des cellules satellites activées (*i.e.* myoblastes) ne se différencient pas mais retournent en position satellite, permettant ainsi de reconstituer le *pool* de cellules souches [2]. La cellule musculaire et son microenvironnement sont perturbés en cas de pathologies neuromusculaires, qu'elles soient acquises (inflammatoires/dysimmunitaires ou toxiques) ou non-acquises (génétiques). Les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires (DIMs) idiopathiques résultant d'un dysfonctionnement du système immunitaire sont classées en quatre groupes selon des critères histopatholo-



¹ED402, Paris Est-Créteil University, Créteil, France.

²Inserm U955 Team 10, Paris Est-Créteil University, Créteil, France. cyrielle.hou@hotmail.fr

giques : (1) polymyosites (PM) / myosites à inclusion (*inclusion body myositis*, IBM), (2) dermatomyosites (DM), (3) myopathies nécrosantes auto-immunes (*immune-mediated necrotizing myopathies*, IMNM) et (4) myosites de chevauchement comprenant le syndrome anti-synthétase (*antisynthetase myopathy*, ASM) (Tableau 1) [3].

Les signatures interférons dans le sang et dans le muscle permettent de mieux analyser les mécanismes physiopathologiques à l'origine des lésions musculaires au cours des DIMs. Ainsi, la DM se distingue des autres DIMs par une signature interféron (IFN) de type 1 (IFN α et β) corrélée à la sévérité de la maladie [4]. À l'inverse, le syndrome anti-synthétase (ASM) et les myosites à inclusions (IBM) se caractérisent par une signature IFN de type 2 (IFN γ) [5]. Dans le cas des PM/IBM, les complexes majeurs d'histocompatibilité de types 1 et 2 (CMH1 ; CMH2) sont surexprimés dans les fibres musculaires tandis que les fibres musculaires de sujets sains n'expriment pas le CMH [6]. L'IFN γ est un puissant inducteur du CMH2 par l'intermédiaire du transactivateur CIITA via la phosphorylation de STAT1 [7].

Les effets de l'IFN γ sur les cellules musculaires squelettiques sont mal connus, les effets réels sur la régénération musculaire restant encore controversés. Après une lésion musculaire, l'inflammation induite est associée à une production d'IFN γ . L'IFN γ est essentielle pour obtenir une réparation efficace du muscle squelettique grâce à son implication dans la régulation du système immunitaire telle que l'activation



Myopathies inflammatoires et dysimmunitaires	Caractéristiques histopathologiques	Caractéristiques immunopathologiques
Myopathies nécrosantes auto-immunes (IMNM)	<ul style="list-style-type: none"> • Nécrose myocytaire de répartition aléatoire, sans inflammation (ou minime) 	<ul style="list-style-type: none"> • Activation du complément avec dépôts sarcolemmiques
Dermatomyosites (DM)	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation polymorphe à prédominance septale et périvasculaire • Atrophie périfasciculaire, myosinolyse, micro-infarctus • Microangiopathie avec activation du complément 	<ul style="list-style-type: none"> • Dépôt de C5b9 dans les capillaires • Infiltrat périvasculaire (lymphocytes B, CD4+, CD8+) • Signature Interféron de type I (IFNα et β)
Myosites de chevauchement dont le syndrome anti-synthétase (ASM)	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation à prédominance périmysiale et endomysiale périfasciculaire • Lésions myocytaires périfasciculaires (atrophie, nécrose) • Collagénolyse septale 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression diffuse du CMH-I et périfasciculaire du CMH-II • Infiltrats inflammatoires de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et de macrophages • Signature Interféron de type II (IFNγ) • Auto-anticorps anti-synthétase
Polymyosites (PM) Myosites à inclusion (IBM)	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrat inflammatoire endomysial • Agression myocytaire focale par des cellules inflammatoires Pour l'IBM : <ul style="list-style-type: none"> • Atrophie myocytaire et anomalies mitochondriales • Vacuoles bordées • Accumulations protéiques et inclusions filamenteuses de 15-18 nm 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression diffuse du CMH-I et CMH-II • Infiltrats inflammatoires de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et de macrophages • Signature Interféron de type II (IFNγ)

Tableau I. Principales caractéristiques immuno-histopathologiques des myopathies inflammatoires et dysimmunitaires.

des macrophages [8]. *In vitro*, l'IFN γ stimule la prolifération des cellules myogéniques murines [9] et inhibe leur différenciation [7,9]. Dans les ASM et les IBM, le niveau d'expression d'IFN γ pourrait avoir un effet direct sur les cellules myogéniques, et/ou indirect par l'activation des cellules inflammatoires résidentes, et ainsi contribuer à la physiopathologie de ces maladies.

Caractérisation de l'effet de l'IFN γ dans la physiopathologie musculaire

Mon travail de thèse a pour objectif d'étudier le rôle de l'IFN γ sur la biologie des cellules musculaires à l'état normal et dans les myopathies inflammatoires. La première partie du travail est l'analyse *in vitro* des effets de l'IFN γ sur la prolifération et la différenciation des myoblastes (Figure 1A, 1B) (cultures primaires humaines et murines). Des cultures primaires de cellules myogéniques humaines ont été obtenues à partir de biopsies musculaires de patients avec un muscle histologiquement normal ou présentant une DIMs. Après dissociation mécanique, digestion enzymatique et tri sur billes magnétiques, la myogénicité de la population cellulaire isolée a été déterminée par

l'expression de desmine (Figure 1C). Les myoblastes isolés ont été exposés à l'IFN γ humain (exposition unique ou répétée) en condition de prolifération ou de différenciation. Nos résultats préliminaires montrent que le traitement par IFN γ active fortement la voie de signalisation de l'IFN γ (Figure 1D). L'exposition à une dose unique d'IFN γ (≥ 1 ng/ml) induit également une réponse cellulaire dès 24 h avec une induction génique encore présente 72 h après traitement pour une dose supérieure à 5ng/mL. Ces protocoles nous permettent de caractériser l'effet sur la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques.

La seconde partie de mon travail portera sur l'étude *in vivo* de différents modèles murins de pathologie musculaire en analysant notamment l'effet de l'IFN γ endogène. En particulier, je réaliserai l'étude qualitative et quantitative des effets de l'IFN γ sur le développement musculaire en analysant notamment les facteurs de régulation myogénique : Pax7 pour les cellules satellites, MyoD pour les myoblastes et myogénine (MyoG)

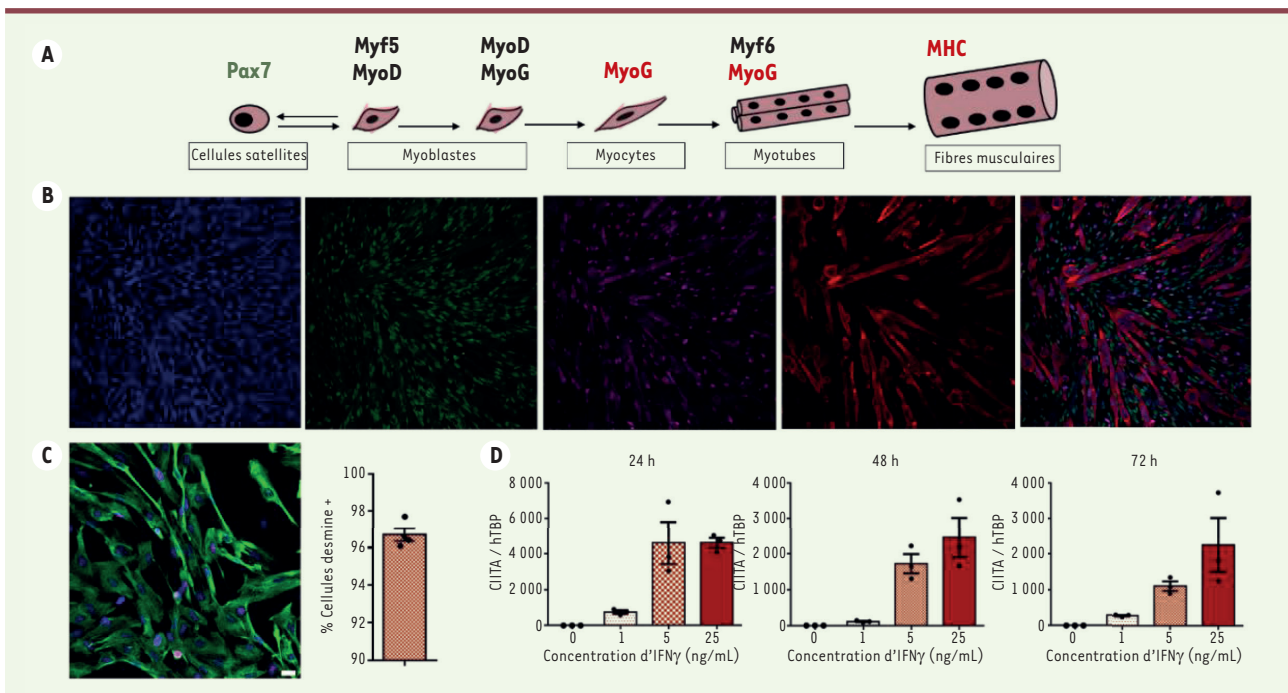


Figure 1. A. Schématisation des principales étapes de la différenciation musculaire et expression des facteurs de transcription myogénique correspondants. B. Immuno-marquages de myotubes (8 jours de culture primaire de cellules musculaires murines issues du modèle murin transgénique Pax7-GFP) *in vitro* marqués pour les noyaux au Hoesch (bleu), myogénine MyoG (rose) et la myosine (rouge). C. Immuno-marquage de myoblastes humains après un double tri CD56+ (n = 4), desmine (vert), ki67 (rouge) : 96,7 % des cellules triées étaient desmine-positives, ce qui suggère une prépondérance de progéniteurs musculaires dans nos cultures primaires de muscles humains. D. Quantification par qPCR de l'expression de CIITA par les cellules myogéniques humaines suite au traitement d'IFN γ à J0 (n = 1 en triplicat). hTBP utilisé comme gène de référence.

pour les myocytes, puis les deux chaînes lourdes de myosine pour les myotubes (Figure 1A, 1B).

Cette approche vise à caractériser les effets de l'IFN γ sur les myoblastes et les fibres musculaires, en conditions normale et pathologique. Ceci est d'autant plus important que pour certaines myopathies il n'existe pas de thérapie efficace sur le long terme. De plus, le rôle des interférons est de plus en plus étudié dans la physiopathologie des maladies auto-immunes [10] incluant des approches spécifiques basées sur leur neutralisation *in vivo*. ♦

RÉSUMÉ

Les myopathies inflammatoires et dysimmunitaires (DIMs) touchent 14/100 000 personnes dans le monde. Ces pathologies sont classées par des critères immunopathologiques en quatre groupes : (1) polymyosites (PM)/ myosites à inclusions (IBM), (2) dermatomyosites, (3) myopathies nécrosantes auto-immunes et (4) myosites de chevauchement comprenant le syndrome anti-synthétase (ASS). Les ASS et PM/IBM sont caractérisées par la présence d'infiltrats inflammatoires mononucléés. Récemment, nous avons mis en évidence une expression myocytaire du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH2) dans les muscles de patients atteints d'ASS et d'IBM. L'expression du CMH2 est connue pour être induite par l'interféron-gamma (IFN γ) dans les cellules myogéniques. Or, les lymphocytes T CD8 (LTCD8), cellules productrices d'IFN γ

sont retrouvés à proximité des fibres musculaires CMH2 positives. Cette cytokine inhibe la différenciation musculaire *in vitro* par l'interaction CIITA-myogénine (CIITA : *major histocompatibility complex class II transactivator*). Les mécanismes impliquant une toxicité musculaire médiée par les lymphocytes dans les DIMs restent inconnus. Les objectifs de ce projet sont dans un premier temps de caractériser les effets de l'IFN γ sur la biologie des cellules musculaires par des approches morphologiques, moléculaires et cellulaires. Puis, d'identifier le rôle de l'IFN γ dans ces myopathies et son impact au cours de la régénération musculaire. Des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées sur des myoblastes humains et murins exposés ou non à l'IFN γ . Nos résultats devraient permettre d'obtenir de meilleures connaissances sur la physiopathologie des DIMs et d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. ♦

SUMMARY

The effect of interferon-gamma on skeletal muscle cell biology

Dysimmune and inflammatory myopathies (DIMs) affect around 14/100,000 people worldwide. Based on immu-

Prix Master de la Société Française de Myologie

L'objectif du Prix Master de la SFM est double : reconnaître la qualité d'un travail réalisé au sein d'une équipe de recherche en Myologie ; être une force d'incitation à la continuité de ce travail scientifique en doctorat d'État et ainsi faciliter l'orientation de jeunes scientifiques vers la recherche appliquée aux maladies du muscle.

Le prix Master est de 1 000 €. Il est versé directement au récipiendaire en récompense du travail réalisé pendant son Master jugé sur la présentation de son mémoire. Le candidat primé poursuivra ses recherches par une thèse d'université dans le domaine de la Myologie.

Ce prix donne accès au versement d'une subvention de 9 000 € d'1 an, éventuellement renouvelable 1 fois. La subvention est attribuée au laboratoire d'accueil.

Pour tout renseignement sur les conditions de soumission au Prix Master de la SFM, consulter le site www.sfmyologie.org

nopathological criteria, DIMs are divided in four groups: (1) polymyositis (PM)/inclusion body myositis (IBM), (2) dermatomyositis (DM), (3) immune-mediated necrotizing myopathies (IMNM) and (iv) overlapping myositis including anti-synthetase syndrome (ASS). ASS and PM/IBM are characterized by the activation of inflammation with lymphocytic infiltrations. Recently, we showed that an expression of the major histocompatibility complex class 2 (MHC2) was present in myofibers from ASS and IBM muscle biopsies. Interestingly, MHC2 expression is known to be stimulated by Interferon-gamma (IFN γ) in myogenic cells. LTCD8 cells, which are well-known producers of IFN γ , are commonly found in close vicinity to MHC2 positive myofibers. This inflammatory cytokine also inhibits myogenic differentiation *in vitro* by CIITA-myogenin interaction. The mechanisms involved in the lymphocyte-driven muscle toxicity in DIMs are unclear. The objectives of this project are to characterize IFN γ effects on the biology of human myogenic cells by morphological, molecular and cellular approaches. Then, we aim to investigate the role of IFN γ in these myopathies and its impact during muscular regeneration. *In vitro* preliminary studies have been performed using human and mouse myoblasts treated or not with

IFN γ . Our results should lead to a better understanding of the role of IFN γ in the pathophysiology of DIMs, and would hopefully help identify new therapeutic targets. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Kostallari E, Baba-Amer Y, Alonso-Martin S, et al. Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence. *Development* 2015 ; 142 : 1242-53.
2. Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 2012 ; 139 : 2845-56.
3. De Bleecker JL, Lundberg IE, de Visser M. 193rd ENMC international workshop pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies 30 November-2 December 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2013 ; 23 : 945-51.
4. Gitiaux C, Latroche C, Weiss-Gayet M, et al. Myogenic progenitor cells exhibit type I interferon-driven proangiogenic properties and molecular signature during juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2018 ; 70 : 134-45.
5. Rigolet M, Hou C, Baba Amer Y, et al. Distinct interferon signatures stratify inflammatory and dysimmune myopathies. 2018 (soumis pour publication).
6. Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2014 ; 2 : 154.
7. Londhe P, Davie JK. Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol Cell Biol* 2011 ; 31 : 2854-66.
8. Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, et al. Endogenous interferon is required for efficient skeletal muscle regeneration. *AJP Cell Physiol* 2008 ; 294 : C1183-91.
9. Grzelkowska-Kowalczyk K, Wicik Z, Majewska A, et al. Transcriptional regulation of important cellular processes in skeletal myogenesis through interferon-g. *J Interferon Cytokine Res* 2015 ; 35 : 89-99.
10. Higgs BW, Zhu W, Morehouse C, et al. A phase 1b clinical trial evaluating sifalimumab, an anti-IFN- α monoclonal antibody, shows target neutralisation of a type I IFN signature in blood of dermatomyositis and polymyositis patients. *Ann Rheum Dis* 2014 ; 73 : 256-62.

TIRÉS À PART

C. Hou

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie
sur les sites de :

la Société Française de Myologie

www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire FILNEMUS

www.filmemus.fr



Filnemus
Filière Neuromusculaire