Rôle du "B-cell activating factor" (BAFF) et des lymphocites B dans la fibrose pulmonaire et cutanée dans la sclérodermie systémique

Antoine François

▶ **To cite this version:**

Antoine François. Rôle du "B-cell activating factor" (BAFF) et des lymphocites B dans la fibrose pulmonaire et cutanée dans la sclérodermie systémique. Immunologie. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ056 . tel-01124128

HAL Id: tel-01124128

https://theses.hal.science/tel-01124128

Submitted on 6 Mar 2015

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ED414 Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S 1109,
Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie

THÈSE

présé` tée par :

Antoine FRANÇOIS

soute` ue le : **7 juin 2013**

pour obte` ir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipli` e/ Spécialité : Scie` ces de la vie et de la sa` té / Immu` ologie

Rôle du « B-cell activating factor » (BAFF) et des Lymphocytes B dans la fibrose pulmonaire et cutanée dans la sclérodermie systémique

THÈSE dirigée par :
Mr Jacques-Eric Gottenberg Professeur, U` iversité de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mr Carlo Chizzolini Professeur, Hôpitaux U` iversitaires de Ge` ève
Mme Valérie Quesniaux Directeur de recherche, CNRS Orléa` s

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Mr Thierry Martin Professeur, U` iversité de Strasbourg

Remerciements

Je remercie le Professeur *Carlo Chizzolini*, le Docteur *Valérie Quesniaux* ainsi que le Professeur *Thierry Martin* pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur *Jacques-Eric Gottenberg* pour son soutien, ses conseils et son dynamisme dans la direction de cette thèse. Merci d'avoir eu confiance en moi et d'avoir laissé libre court à mes idées durant ces 4 années.

Je tiens ensuite à adresser une pensée particulière au Professeur *Dominique Wachsmann* pour tous les enseignements qu'elle a su me transmettre, tant au niveau scientifique et immunologique que dans la gestion du travail de recherche au quotidien. Vous m'avez accordé votre confiance en ce jour d'Août 2008 où je suis venu vous proposer ma candidature pour mon stage de master 2 et je vous remercie pour ces années passées ensemble au laboratoire.

Je remercie le Professeur *Jean Sibilia* pour son soutien et sa grande gentillesse, ainsi que son accueil au sein du laboratoire à la faculté de pharmacie.

J'aimerais également remercier le Docteur *Pauline Soulas-Sprauel* pour son soutien et son amitié. Merci pour cette année d'ATER où j'ai beaucoup appris à tes côtés (j'espère avoir été à la hauteur !) ainsi que pour tous les coups de pouce à droite à gauche qui font toute la différence.

Je souhaite ensuite remercier toute l'équipe de l'UMR-INEM 7355 du CNRS à Orléans pour son accueil pour les expériences sur les souris bléomycine. Merci au Docteur *Isabelle Couillin* pour avoir coordonné les manips à Orléans et pour sa gentillesse et sa disponibilité ainsi qu'au Docteur *Bernhard Ryffel* pour son accueil toujours chaleureux. *Bérengère* et *Aurélie,* merci pour votre travail et votre investissement sur ces manips qui sont longues et difficiles. Merci également à *Paméla, Louis, Noëlline, Ludivine* et les autres pour leur accueil.

Je tiens à remercier la *Fondation Groupama pour la santé*, pour avoir cru en ce projet de thèse et pour l'avoir financé durant les 3 premières années. Merci à toute l'équipe des « Espoirs de la Fondation » pour leur soutien et leurs encouragements ainsi qu'à *Gabriel de Montfort* pour sa disponibilité.

J'aimerai également remercier les membres de notre équipe :

Ghada, par où commencer ? Tout d'abord un très très grand merci pour ton aide au quotidien, ta présence si réconfortante dans les moments difficiles traversés ces 4 dernières années mais également pour ta joie de vivre que tu as su partager avec nous au laboratoire. Je me souviens encore du premier jour où nous nous sommes rencontrés, j'étais très impressionné par ta maîtrise des techniques de laboratoire que j'ai ensuite eu la chance d'apprendre à tes côtés. Ah oui, également un grand merci pour ta cuisine que j'adore et que j'ai toujours beaucoup de plaisir à découvrir.

Lucas, pour avoir animé le labo durant ces 3 premières années, tu as laissé un grand vide derrière toi ! Ta curiosité, tes compétences et ta rigueur scientifique font de toi un chercheur dans l'âme. J'espère que tu resteras aussi passionné par la recherche tout au long de ta carrière.

Yazhuo, pour ton éternelle positivité et ta bonne humeur ! Comme tu nous dis si souvent : « ah c'est pas grave ! », ton attitude relativiste est si réconfortante. C'est aussi avec chance que nous avons pu découvrir ton univers jour après jour.

Angélique, merci pour ton aide de tous les jours. Ton arrivée au laboratoire nous a réjoui, c'est important pour nous de pouvoir nous concentrer sur nos manips sachant que tu gères beaucoup d'autres choses, merci.

Mes remerciements vont également aux membres passés et présents de notre équipe : *Alain, Etienne, Arnaud, Noha, Cécile, Gaël, Alexandre, Jean-Hugues, Justine, Laurent, Christelle, Quentin, Carole, Alice* et *Nawel*.

Je souhaite également remercier les Professeurs *Siamak Bahram* et *Philippe Georgel* pour leur accueil de sein de l'équipe ImmunoRhumatologie Moléculaire ainsi que tous les membres de l'équipe : *Cécile, Eléonore, Raphael C, Pilar, Véronique, Mirjana, Raphael D, Gaëlle, Aurore, Irina, Louise, Wassila, Pierre, Nicodème, Meiggie, Marion, Laure, Cédric, Amélie, Grégory* et *Nathalie*.

Merci à toute l'équipe d'OpenLab pour les bons moments passés à parcourir les lycées d'Alsace durant ma deuxième année de thèse : *Mélanie*, *Laura*, *Dimitri*, *Ricardos* ainsi que *Laurence* et *Michel*.

J'aimerais également remercier ma famille pour leurs encouragements : *mes grands parents Monique et Henri* et *ma mère Marie-Pierre* pour toute l'aide apportée durant mes études, ma sœur *Bérangère* et mon frère *Damien* ainsi que *Yann, Emilie, Jean-Pierre Mathilde* et ma tante *Hélène* pour leur soutien et leur réconfort. Merci aussi à ma deuxième famille « Alsacienne » : *Sylvie, Marc, Hugo* et *Lola* pour votre présence.

J'aimerais remercier mes amis *Alexandra*, *Mathieu*, *Mélanie*, *Odette* et *Manu*, *Renaud* et *Noémie*, les 2 *Pierre*, *Charlotte*, *Tiffany*, *Salomé*. Mes amis du master de Pharmacologie promotion 2007-2009 : *Céline, Malika, Ismaïl, Sophie, Guillaume, Virginie, Hélène, Gauthier, Mathieu, Arnaud, Asael* et *Laura*. Merci aussi à *Carole* du « labo d'à côté » pour ton soutien dans les moments difficiles et les discussions toujours intéressantes que nous avons pu avoir et à *Gwendal*, pour m'avoir transmis ta passion pour la recherche lors de mes stages de Licence.

Enfin, j'aimerai dédier cette thèse à *Manon*, pour ton amour, ton soutien de tous les jours, ton courage, mais également pour ton aide technique lors de ton stage réalisé au laboratoire et ton aide dans la relecture de ce manuscrit, merci pour tout.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations 4

Liste des figures et tableaux 10

Introduction 12

1 La sclérodermie systémique 12

1.1 Définitions et généralités 12

1.2 Diagnostic de la maladie 14

1.3 Traitements actuels 15

1.4 Physiopathologie 16

2 La fibrose : mécanismes de synthèse et de régulation de la matrice extracellulaire 19

2.1 La matrice extracellulaire 19

2.1.1 Les collagènes 19

2.1.2 L'élastine 21

2.1.3 Les fibronectines 22

2.1.4 La laminine 23

2.1.5 La tenascine-C 23

2.1.6 Les intégrines 24

2.2 Régulation de la dégradation de la MEC : les MMPs et TIMPs 26

3 Les cellules impliquées dans le développement de la fibrose cutanée et pulmonaire 30

3.1 Les fibroblastes dermiques 30

3.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène : ROS 30

3.1.2 La voie Wnt/β-caténine 31

3.1.3 Les cytokines et facteurs de croissance 32

3.2 Implication des lymphocytes B 33

3.2.1 Altérations des LB chez les patients et dans les modèles animaux de ScS 33

3.2.2 Le rôle pathologique des auto-anticorps 36

3.2.3 Les LB : des cellules productrices de cytokines 37

3.3 Implication des lymphocytes T 38

3.3.1 Polarisation des LT 38

3.3.2 Les LT dans la fibrose cutanée et pulmonaire 42

4 Les cytokines impliquées dans la fibrose cutanée et pulmonaire 46
4.1 La famille de l'interleukine 1 46
4.1.1 L'IL-1α 48
4.1.2 L'IL-1β 49
4.1.3 L'IL-33 50
4.2 L'interleukine 6 51
4.3 Les interleukines 4 et 13 53
4.3.1 L'IL-4 53
4.3.2 L'IL-13 54
4.4 La famille de l'interleukine 17 55
4.5 Le « transforming growth factor-β1 » 60
4.6 CCL2/MCP-1 63
4.7 BAFF et APRIL 64
4.7.1 Structure et expression de BAFF et APRIL 64
4.7.2 Les récepteurs de BAFF et APRIL 66
4.7.3 BAFF et pathologie : rôle dans les maladies auto-immunes 70
4.7.4 BAFF dans la ScS 74

5 Le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine 75
5.1 La bléomycine 75
5.2 Le modèle animal 76

6 Les micro-ARNs dans la régulation des processus fibrotiques 78
6.1 Les micro-ARNs : un nouveau mode de régulation de l'expression des gènes 78
6.1.1 La biogénèse des miARNs 78
6.1.2 La voie effectrice des miARNs 80
6.1.2.1 Les protéines Argonaute 80
6.1.2.2 L'appariement 82
6.1.2.3 La répression de la traduction des ARNm 83
6.1.2.4 La dégradation des ARNm par les miARNs 85
6.1.2.5 Mode de régulation non canonique 86
6.2 Les micro-ARNs impliqués dans la fibrose dans la ScS 86

Objectifs de la thèse 90

Résultats 91

1. Interactions cellules résidentes/lymphocytes B et rôle de BAFF dans la PR et la ScS 91
1.1 Etude des interactions synoviocytes rhumatoïdes/lymphocytes B dans la PR 91

1.2 Etude des interactions fibroblastes cutanés/lymphocytes B dans la ScS *102*

2. Implication de BAFF dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine **126**

3. Régulation de l'expression de BAFF dans les synoviocytes rhumatoïdes et les fibroblastes cutanés par les microARNs dans la PR et la ScS **153**

Conclusions et perspectives **182**

Bibliographie **191**

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
ACR	American College of Rheumatology
AGO	Argonaute
AID	Activation-induced (cytidine) deaminase
AIRE	Autoimmune regulator
APRIL	A proliferation inducing ligand
ARNm	Acide ribonucléique messager
BAD	BCL-2-antagonist of cell death
BAFF	B cell activating factor
BCMA	B cell maturation antigen
BIM	BCL-2 interacting mediator of cell death
BLM	Bléomycine
BLP	Bacterial lipoprotein
c-Abl	c-Abelson
CAB	Chromotrope Aniline Blue
CCl4	Tétrachlorure de carbone
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSR	class switch recombination
CTGF	Connective tissue growth factor
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EEA	Early endosome antigen
EGF	Epidermal growth factor
eIF	Eukaryotic translation initiation factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase »
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FLS	Fibroblast-like synoviocyte
FN	Fibronectine
FXR	Farnesoid X receptor
GAG	Glycosaminoglycanes
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HOBr	Acide hypobromeux
HOCl	Acide hypochloreux
HOI	Acide hypoiodeux
HSPG	Heparansulfate proteoglycans
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interféron

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-1Ra	Interleukin 1 receptor antagonist
IL-1RAP	Interleukin-1 receptor accessory protein
*i*NKT	T_H2-like invariant natural killer T cell
IRAK	IL-1RI-associated protein kinase
JAK	Janus kinase
JNK	Jun-N-terminal kinase
KC	CXCL1
KO	Knock-out
LAP	Latency-associated peptide
LB	Lymphocyte B
LB-T	Lymphocyte B transitionnel
LED	Lupus erythémateux disséminé
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTBP	Latent TGF-β binding protein
LT_{FH}	Lymphocyte T follicular helper
LT_H	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
m^7G	7-méthyl-guanosine
MCP	Monocyte-chemoattractant protein

MEC	Matrice extracellulaire
miARN	microARN
miR	microARN
MLE-12	Murine lung epithelial cells
MMP	Matrix-metalloproteinase
MTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD	Myeloid differentiation factor
NaCl	Chlorure de sodium
NF- κB	Nuclear factor κB
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
O_2^-	Radical superoxide
O_3	Ozone
ORF	Open reading frame
PABP	Poly-A binding protein
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI	Phosphatidylinositol

piARN	PIWI-associated RNA
PID	Pneumopathie infiltrante diffuse
PIM	Protein interactions map
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PRR	Pattern Recognition Receptors
RA	Rheumatoïd arthritis
RISC	RNA-induced silencing complex
ROI	Reactive oxygen intermediates
ROR	RAR-related orphan receptor
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
ScS	Sclérodermie systémique
siARN	Small interfering RNA
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor
SMURF	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase
SSp	Syndrome de Sjögren primitif
ST2	Interleukin 1 receptor-like 1 (IL-1RL1)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACI	Transmembrane activator and calcium-modulator cyclophilin ligand interactor
TAK	TGF-β-activated kinase

TCR	T cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TIR	Toll-IL-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
Tn-C	Ténascine-C
TNF	Tumor necrosis factor
TOPO	Topoisomérase
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRBP	Tar Binding Protein
TSK	Tight skin
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
UTR	Untranslated region
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA-4	Very Late Antigen-4 (Integrine $\alpha 4\beta 1$)
WT	Wild-type
α-SMA	Alpha smooth muscle actin

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1	Manifestations vasculaires distales dans la ScS	12
Figure 2	Manifestations cutanéo-muqueuses dans la ScS	13
Figure 3	Structure et clivage du procollagène de type I	20
Figure 4	Structure de la ténascine-C	24
Figure 5	Structure type des MMPs	26
Figure 6	Les voies de signalisation Wnt/β-caténine	31
Figure 7	Perturbations de l'homéostasie des LB chez les patients atteints de ScS	34
Figure 8	Maturation des LT auxiliaires LT_H1, LT_H2, LT_H17	40
Figure 9	Différenciation des LT folliculaires et action sur les LB	41
Figure 10	Mécanismes d'action des LT régulateurs	41
Figure 11	Les différents membres de la famille de l'IL-1, leur processus de maturation, leurs récepteurs et leur mode de régulation	47
Figure 12	Blocage de la signalisation de l'IL-1 par l'IL-1R2	48
Figure 13	Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 14 jours après instillation de NaCl, de bléomycine ou d'IL-1β recombinante	50
Figure 14	Les interactions de l'IL-6 avec ses récepteurs	51
Figure 15	Les récepteurs partagés par l'IL-4 et l'IL-13	53
Figure 16	Les cellules de la lignée lymphoïde productrices d'IL-17A et les interactions entre les cytokines de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs	56
Figure 17	Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 7 jours après instillation de PBS, de bléomycine ou d'IL-17A recombinante	59
Figure 18	La forme latente du TGF-β1	61
Figure 19	La voie de signalisation du TGF-β	62
Figure 20	Structure de BAFF et APRIL et liaison à leurs récepteurs	66
Figure 21	BAFF est indispensable à la maturation des LB	68
Figure 22	Voies de signalisation BAFF/BAFF-R et BAFF/TACI	70

Figure 23	Le rôle potentiel de BAFF dans la survie des cellules B autoréactives	72
Figure 24	Les cellules épithéliales régulent localement la commutation isotypique et la sécrétion d'anticorps	73
Figure 25	Structure chimique de la bléomycine	75
Figure 26	Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 14 jours après instillation de NaCl ou de bléomycine	76
Figure 27	Biogénèse et mode d'action des miARNs	80
Figure 28	Structure et organisation d'une protéine Argonaute	81
Figure 29	Interaction entre l'ARN messager et le miARN	82
Figure 30	Initiation de la traduction et assemblage des sous-unités ribosomales	83
Figure 31	Inhibition de l'initiation de la traduction	84
Figure 32	Inhibition de l'élongation	85
Figure 33	Dégradation des ARNm par déadénylation	86
Figure 34	Implication des LB et de BAFF dans la production de collagène, d'IL-6, de TGF-β1, de CCL2, d'α-SMA, de MMP9 et de TIMP1.	183
Figure 35	Implication de BAFF dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.	185
Figure 36	Régulation de l'expression de BAFF dans les fibroblastes cutanés par les miR-30a*, d* et e*.	188
Figure 37	Interaction possible entre le miR-30d* et la 3'UTR de l'ARNm de BAFF chez la souris.	189
Figure 38	Mécanisme d'action du Miravirsen	190

Tableaux

Tableau 1	Les traitements actuels de la ScS	16
Tableau 2	Les types de collagènes et leur localisation tissulaire	21
Tableau 3	Les interactions de la laminine avec les autres protéines de la MEC	23
Tableau 4	Implications des intégrines dans la physiopathologie de la ScS	25
Tableau 5	Classification des différentes familles de MMP et de leurs inhibiteurs	27
Tableau 6	Les cytokines et facteurs de croissance produits par les fibroblastes et qui stimulent les fibroblastes dans la ScS	33

Introduction

1 La sclérodermie systémique

1.1 Définitions et généralités

La sclérodermie systémique (ScS) est une maladie auto-immune systémique rare, affectant environ 6 000 à 10 000 personnes en France (prévalence estimée à 158 cas/million d'adultes) et appartenant au groupe des connectivites (atteinte diffuse, inflammatoire et chronique du tissu conjonctif). La ScS touche préférentiellement les femmes (3 à 8 femmes pour un homme) et débute habituellement entre 45 et 60 ans (Le Guern et al., 2004). Cette maladie se caractérise par un épaississement localisé ou diffus de la peau dû à une fibrose excessive, souvent associé à des atteintes articulaires, gastro-intestinales, rénales, cardiaques et pulmonaires. Le pronostic vital dépend essentiellement de la présence d'atteintes viscérales et plus particulièrement de la présence d'une pneumopathie infiltrante diffuse (PID) sévère et d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), qui représentent à elles 2, les premières causes de mortalité liée à la ScS. L'extension de la fibrose cutanée est également un élément pronostic important. Le pronostic à 10 ans est de 60% pour les sclérodermies diffuses et de 90% pour les formes limitées (Scussel-Lonzetti et al., 2002).

Le **phénomène de Raynaud** est le signe clinique le plus courant, il est observé chez 95% des patients. C'est un trouble vasomoteur des doigts, souvent déclenché par le froid et caractérisé par une phase ischémique blanche suivie d'une cyanose puis d'une phase de récupération. Le risque essentiel de cette atteinte vasculaire est la survenue d'une ischémie pulpaire prolongée avec ulcération digitale voire de gangrène digitale pouvant conduire à une amputation de la dernière phalange du doigt. (Figure 1)

Figure 1 : Manifestations vasculaires distales dans la ScS. *Phénomène de Raynaud en phase syncopale ; Ulcérations ischémiques de la pulpe du 4ème doigt évoluant depuis 3 semaines chez une patiente atteinte de sclérodermie systémique cutanée limitée avec maladie ulcéreuse sévère ; Amputation de la dernière phalange du 2ème doigt de la main droite chez un patient souffrant de sclérodermie systémique diffuse avec antécédents d'ulcères digitaux multiples*

Les **manifestations digestives** sont diverses, fréquentes et concernent l'ensemble du tube digestif. On peut citer le reflux gastro-œsophagien qui peut s'accompagner d'ulcérations,

une atteinte motrice de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon, ou encore une atteinte fonctionnelle ano-rectale. Ces manifestations sont la conséquence de la microangiopathie et de la fibrose affectant les cellules musculaires lisses.

L'atteinte rénale se manifestant par la crise rénale aigüe sclérodermique est rare mais grave si elle n'est pas traitée. La découverte des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en a complètement modifié le pronostic. Toutefois, le risque de décès reste élevé (de l'ordre de 35% à 5 ans) (Teixeira et al., 2008).

Les **manifestations cutanéo-muqueuses** sont diverses. L'apparition d'une sclérodactylie témoigne de l'entrée dans la maladie. Il s'agit d'une infiltration scléreuse des doigts qui prennent au départ un aspect boudiné et infiltré conduisant ensuite à une rétraction en flexion des doigts. Les calcifications sous-cutanées, « calcinose », touchent les extrémités digitales mais peuvent avoir d'autres localisations comme les coudes, les genoux et peuvent s'ulcérer à la peau. (Figure n°2)

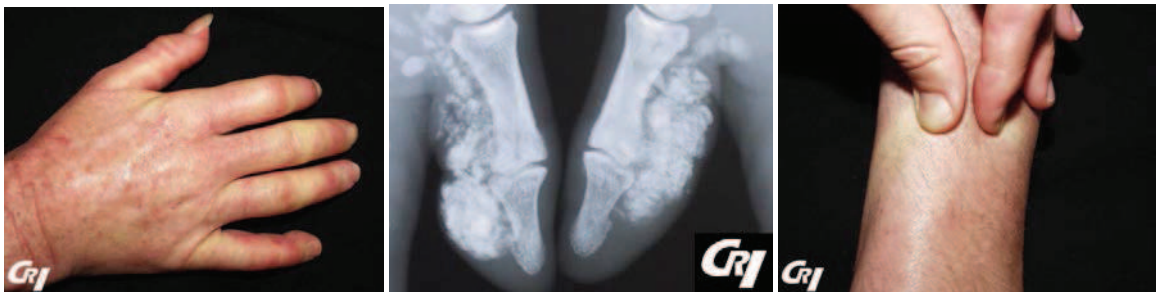

Figure 2 : Manifestations cutanéo-muqueuses dans la ScS. *Sclérodactylie chez un patient atteint de sclérodermie systémique limitée ; Calcinose massive des pouces bilatérale ; Infiltration cutanée sévère de l'avant-bras chez un patient atteint de sclérodermie systémique diffuse*

La sclérose cutanée s'étend de façon centripète des doigts vers la main puis vers les avant-bras. On parle de ScS limitée lorsque la sclérose cutanée reste en aval des coudes et des genoux. Dans ces formes limitées, la sclérose cutanée touche fréquemment le visage et le cou. Les lèvres sont fines, présentent des plis radiés. Le syndrome sec buccal n'est pas rare, soit lié à la microangiopathie organique des glandes salivaires, ou à un syndrome de Gougerot-Sjögren associé. Les ScS diffuses débutent plus souvent par le tronc et s'étendent vers les membres.

L'atteinte pulmonaire, avec son risque d'évolution vers la fibrose pulmonaire et l'insuffisance respiratoire chronique, ainsi que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

constituent les premières causes de décès dans cette maladie. L'atteinte interstitielle pulmonaire a un potentiel évolutif imprévisible. Certaines formes évoluent rapidement durant les trois premières années de la maladie. Dans d'autres cas, la fibrose reste limitée et stable dans le temps avec parfois un potentiel évolutif plus tardif. L'aspect en rayons de miel et la présence de bronchectasies par traction correspondent à une fibrose évoluée, fixée, peu accessible à un traitement et de plus mauvais pronostic. L'HTAP est une complication dramatique par son évolution qui complique de 8 à 12 % des ScS tant limitées que diffuses (Hachulla et al., 2005). A 3 ans, la survie est supérieure à 50%. Trois mécanismes contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires : la vasoconstriction, le remodelage de la paroi du lit vasculaire pulmonaire et des phénomènes de thrombose in situ. Les cellules endothéliales présentent un défaut de production de substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote, la prostacycline (PGI2) avec un excès de libération de médiateurs vasoconstricteurs comme l'endothéline 1. Comme dans l'HTAP idiopathique, les vaisseaux pulmonaires sont le siège d'une hypertrophie de la media des artères de petits calibres avec prolifération des cellules musculaires lisses, fibrose intimale et lésions plexiformes correspondant à une prolifération des cellules endothéliales.

1.2 Diagnostic de la maladie

Les critères diagnostiques ont été définis par la Société Américaine de Rhumatologie en 1980 (Arthritis Rheum, 1980). Il existe des critères majeur et mineurs :

Le critère majeur est la sclérose cutanée proximale se définissant par une modification sclérodermique de la peau qui est tendue, épaissie, indurée, ne prenant pas le godet, touchant la face, le cou, le tronc ou la partie proximale des membres supérieurs ou inférieurs ;

Les critères mineurs sont

- La sclérodactylie
- Les ulcérations de l'extrémité d'un doigt
- La fibrose pulmonaire

Un critère majeur ou au moins deux critères mineurs sont nécessaires pour affirmer le diagnostic.

En 2001, LeRoy et Medsger ont proposé de nouveaux critères de classification pour les ScS limitées (LeRoy and Medsger, 2001). Il pourrait s'agir selon les cas d'une forme particulière ou une forme de début de ScS.

Sclérodermie systémique limitée (ou sine scleroderma)

- Phénomène de Raynaud diagnostiqué par un examen clinique, le test au froid ou le test de Nielsen ou équivalent

plus

- soit une anomalie capillaroscopique (dilatation capillaire et/ou zones avasculaires)
- soit présence d'anticorps spécifiques de la sclérodermie systémique (anticentromère, antitopoisomérase I, antifibrillarine, anti-PM-Scl, antifibrilline ou anti-RNA polymérase I ou III à un titre ≥ 1/100)

Sclérodermie systémique cutanée limitée

En plus des critères précédents, les patients ont une infiltration cutanée distale en aval des coudes et des genoux (l'épaississement de la peau peut toucher les doigts, les mains, les avant-bras, les pieds, les orteils, le cou et la face en l'absence d'infiltration cutanée des bras, du thorax, de l'abdomen, du dos et des cuisses).

La classification utilisée en **pratique clinique** sépare la sclérodermie systémique cutanée diffuse si la sclérose cutanée remonte au dessus des coudes et/ou des genoux, la sclérodermie systémique cutanée limitée si la sclérose cutanée ne dépasse pas les coudes et les genoux et enfin la sclérodermie systémique sine scleroderma en l'absence de sclérose cutanée.

1.3 Traitements actuels

A ce jour, la prise en charge thérapeutique de la SSc s'avère difficile car aucun traitement disponible n'agit simultanément sur chacun des différents mécanismes pathogéniques de la maladie n'est disponible. Le traitement a pour objectif de limiter ou d'arrêter la progression de la maladie ; d'en réduire les séquelles ; d'améliorer la qualité de vie des patients.

Le traitement des atteintes viscérales est l'objectif essentiel. Des exemples de traitements actuellement utilisés sont listés dans le tableau 1.

Manifestation	Traitements
Phénomène de Raynaud	Vasodilatateurs : naftidrofuryl, dihydroergocryptine, extraits de ginkgo biloba Inhibiteurs calciques : nifédipine Analogue de la prostacycline : Iloprost
Pneumopathie infiltrante diffuse	Corticothérapie (discutée) Cyclophosphamide Oxygénothérapie Transplantation monopulmonaire ou bipulmonaire
Hypertension artérielle pulmonaire	Oxygénothérapie Anticoagulants Diurétiques Antagonistes des récepteurs de l'endothéline : bosentan, sitaxentan, ambrisentan Inhibiteurs de la 5-phosphodiestérase : sildenafil Transplantation cardio-pulmonaire
Atteinte Cardiaque	Inhibiteurs calciques Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine Anti-arythmiques : digitaliques Diurétiques
Crise rénale	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine inhibiteurs calciques par voie intraveineuse Epuration extra-rénale Transplantation rénale
Atteinte vasculaire périphérique	Inhibiteurs calciques Analogues de la prostacycline Antagonistes des récepteurs A et B de l'endothéline : bosentan (prévention de la survenue de nouvelles ulcérations digitales)
Atteinte digestive	Œsophage : inhibiteurs de la pompe à protons, prokinétiques (métoclopramide, dompéridone) Estomac : inhibiteurs de la pompe à protons, érythromycine à dose prokinétique Grêle : octréotide à dose prokinétique, antibiotiques (norfloxacine, amoxicilline, métronidazole) Alimentation entérale : en cas de dénutrition sans atteinte motrice gastro-intestinale ou troubles de la déglutition Nutrition parentérale : en cas de dénutrition avec atteinte du grêle ou troubles de la déglutition
Atteinte articulaire	Anti-inflammatoires non stéroïdiens Corticoïdes à faible dose Méthotrexate
Atteinte musculaire	Corticoïdes à forte dose Méthotrexate Immunoglobulines intraveineuses

Tableau 1 : Les traitements actuels de la ScS

1.4 Physiopathologie

La physiopathologie de la ScS est complexe. Les facteurs intervenants dans l'étiologie de la maladie sont encore mal connus mais il existe toutefois un consensus quant à la présence d'une lésion vasculaire comme élément précoce de la maladie. Les causes de cette lésion sont encore inconnues mais elle peut être due à une infection virale, des auto-anticorps, des produits d'oxydation (ROS). L'activation des cellules endothéliales qui en résulte est responsable du déclenchement d'une réaction inflammatoire ainsi que de l'activation des LB, des LT et des macrophages.

Trois types de cellules sont impliqués dans le développement de la ScS : les cellules résidentes des organes cibles (fibroblastes de la peau et du poumon), les cellules de l'immunité (macrophages, LT et B) et les cellules endothéliales.

La fibrose au cours de la ScS résulte d'une synthèse anormale de collagène (essentiellement de type I et III) et d'autres protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). Des études du transcriptome ont montré que les fibroblastes des patients mis en culture ne présentent pas d'anomalies intrinsèques par rapport à des fibroblastes de sujets sains (Whitfield et al., 2003). La synthèse excessive de collagène pourrait être la conséquence de l'activation préalable de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

En effet, l'activation du système immunitaire est très précoce au cours de la ScS et précède l'apparition de la fibrose ; des infiltrats de cellules mononucléées composés de macrophages, de mastocytes et de lymphocytes sont présents dans les lésions et tendent à diminuer au fur et à mesure que la fibrose s'installe (Prescott et al., 1992). Les macrophages sont de puissants inducteurs de la fibrose par la libération de cytokines et de chémokines qui vont favoriser le recrutement et l'activation des lymphocytes B (LB) et T (LT): IL-6, CCL2, TGF-β, PDGF. Par exemple, CCL2 attire les monocytes et induit une polarisation des LT vers un profil LTh2 et le PDGF entraîne une prolifération des fibroblastes (Nabel et al., 1993).

Il est maintenant bien démontré que l'activation de l'immunité innée est une étape cruciale et précoce de la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren primitif ou le lupus érythémateux systémique (Gottenberg et al., 2006; Zeisel et al., 2005). L'immunité innée intègre des cellules impliquées dans la phagocytose, l'activation lymphocytaire comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules résidentes. Ces dernières sont représentées dans la ScS par les fibroblastes de la peau et du poumon. Ces cellules, principales cibles des maladies auto-immunes, expriment des récepteurs de l'immunité innée (appelés Toll-like récepteurs, TLRs), qui peuvent être activés par des stimulants environnementaux (composants d'agents infectieux ou PAMPs). La stimulation de ces TLRs conduit à l'activation des cellules résidentes avec une modification de leurs fonctions (capacité à présenter les auto-antigènes et à co-stimuler les lymphocytes) et à l'expression de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires.

Concernant l'immunité adaptative, qui est activée dans un second temps, les LT et les LB jouent un rôle complémentaire dans la physiopathologie de la ScS.

Les LT sont essentiellement de type Th2 (sécrétion d'IL-4 et d'IL-13) et participent à la fibrose par un effet direct sur les fibroblastes ou indirect en stimulant la synthèse de TGF-β1 par les macrophages. Les lymphocytes Th17 interviennent également dans le développement de la maladie. Ainsi, une expression augmentée d'IL-17 a été observée dans le sérum et la peau des patients ayant une ScS (Kurasawa et al., 2000).

Les lymphocytes B (LB) sont également des acteurs essentiels de la maladie : sécrétion d'auto-anticorps (anti-topoisomérase1, anti-centromère, anti-fibrilline1), mais aussi sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Plus récemment, le rôle des LB dans le développement de la fibrose a été démontré. Il est par exemple impossible d'induire une fibrose hépatique chez des souris dépourvues de LB (Novobrantseva et al., 2005). De même, la fibrose pulmonaire est inhibée chez les souris ayant des LB non fonctionnels dans le modèle de fibrose à la bléomycine (Komura et al., 2008). Chez l'homme, les LB contribuent à la fibrose par la sécrétion d'auto-anticorps tels que les anticorps anti-fibroblastes, anti-cellules endothéliales et anti-récepteurs du PDGF. La sécrétion de cytokines comme l'IL-6 par les LB peut également favoriser la fibrose (Duncan and Berman, 1991).

2 La fibrose : mécanismes de synthèse et de régulation de la matrice extracellulaire

2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une entité structurelle complexe entourant et supportant les cellules qui se trouvent dans les tissus des mammifères. La MEC est souvent désignée comme le tissu conjonctif et est composée de 3 grandes classes de molécules :

1. **Les protéines de structure** : le collagène et l'élastine.

2. **Les protéines spécialisées** : la fibrilline, la fibronectine et la laminine.

3. **Les protéoglycanes** : ceux-ci sont composés d'un noyau protéique sur lequel est fixé de longues chaînes de motifs répétés disaccharidiques appelés des glycosaminoglycanes (GAG) formant des composants de haut poids moléculaire extrêmement complexes de la MEC.

La quantité de MEC présente dans les tissus est régulée par l'intermédiaire d'une balance entre fabrication de la MEC et dégradation par les « matrix metalloproteinases » (MMPs) et les « tissue inhibitor of metalloproteinases » (TIMPs).

2.1.1 Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes dans le règne animal et sont les composants principaux de la MEC. Il existe au moins 30 gènes différents codants pour ces collagènes dispersés dans le génome humain. Ces 30 gènes codent pour des protéines qui se combinent de façon variable afin de créer plus de 20 types différents de fibrilles de collagène. Les types I, II et III sont les plus abondantes et forment des fibrilles de structure similaire. Le collagène de type IV forme un réticulum à deux dimensions et est un composant majeur de la lame basale. Les collagènes sont principalement synthétisés par les fibroblastes, bien que les cellules épithéliales puissent également les synthétiser.

La structure fondamentale des collagènes forme une tige longue de faible diamètre. Par exemple, le collagène de type I fait 300 nm de long, 1,5 nm de diamètre et se compose de 3 sous-unités enroulées composées de deux chaines α1(I) et une chaine α2(I). Trois chaînes se composant chacune de 1050 acides aminés s'assemblent afin de former une triple hélice droite caractéristique. Un tour de l'hélice est composé de 3 acides aminés, le troisième acide aminé étant une glycine. Les collagènes sont également riches en proline et en hydroxyproline.

Les interactions latérales des triples hélices de collagènes forment des fibrilles d'environ 50 nm de diamètre. La structure du collagène est telle que les molécules adjacentes sont décalées d'environ 1/4 de leur longueur (67nm), ce qui produit un effet strié qui peut être observé au microscope électronique.

Les collagènes sont synthétisés sous forme de pro-protéine plus longue appelée procollagène. Le procollagène de type I contient environ 150 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale et 250 acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale. Ces domaines sont pro-globulaires et permettent de former de multiples ponts disulfures intra-chaînes. Ces ponts disulfures stabilisent la pro-protéine et permettent la formation de la triple hélice. (Figure 3)

Les fibres de collagène commencent à se réunir dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La séquence signal est clivée et de nombreuses modifications ont lieu sur les chaînes de collagène. Les résidus proline sont hydroxylés par la prolyl 4-hydroxylase et la prolyl 3-hydroxylase. Les résidus lysine sont également hydroxylés par la lysyl hydroxylase. Les deux prolyl hydroxylases sont dépendantes de leur co-facteur, la vitamine C. La glycosylation des résidus pyrrolysine se produit également lors du transit dans le Golgi. Après l'achèvement des modifications des procollagènes, ils sont sécrétés dans l'espace extracellulaire où des enzymes permettent de cliver les domaines pro-. Ensuite, les molécules de collagène polymérisent pour former des fibrilles de collagène. La formation de ces fibrilles s'accompagne de l'oxydation de certains résidus lysine par la lysyl oxydase formant des aldéhydes réactifs. Ces aldéhydes réactifs forment des liaisons croisées entre les deux chaînes permettant la stabilisation des collagènes dans la fibrille (Kadler et al., 1996).

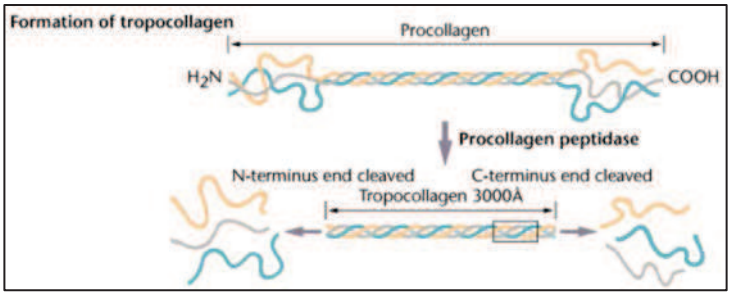

Figure 3 : Structure et clivage du procollagène de type I.

Le tableau 3 énumère les caractéristiques des 12 types de fibrilles de collagènes les plus caractérisés. Comme indiqué ci-dessus, la MEC est composée d'au moins 20 types différents de fibrilles de collagène dans les différents tissus humains.

Type	Composition	Gènes	Détails structurels	Localisation tissulaire
I	$[\alpha1(I)]_2[\alpha(I)]$	COL1A1, COL1A2	300 nm, 67 nm	Peau, tendon, os, etc.
II	$[\alpha1(II)]_3$	COL2A1	300 nm, 67 nm	cartilage, humeur vitrée
III	$[\alpha1(III)]_3$	COL3A1	300 nm, 67 nm	Peau, muscle, fréquemment avec le type I
IV	$[\alpha1(IV)_2[\alpha2(IV)]$	COL4A1 jusqu'a COL4A6	390 nm domaine globulaire C-term, non-fibrillaire	Lame basale
V	$[\alpha1(V)][\alpha2(V)][\alpha3(V)]$	COL5A1, COL5A2, COL5A3	390nm domaine globulaire N-term, petites fibres	Tissus intestinaux, associé avec le type I
VI	$[\alpha1(VI)][\alpha2(VI)][\alpha3(VI)]$	COL6A1, COL6A2, COL6A3	150nm, domaines globulaires N+C term., microfibrilles	Tissus intestinaux, associé avec le type I
VII	$[\alpha1(VII)]_3$	COL7A1	450nm, dimère	épithélium
VIII	$[\alpha1(VIII)]_3$	COL8A1, COL8A2		Cellules endothéliales
IX	$[\alpha1(IX)][\alpha2(IX)][\alpha3(IX)]$	COL9A1, COL9A2, COL9A3	200nm, domaine globulaire N-term, liaison aux protéoglycanes	cartilage, associé avec le type II
X	$[\alpha1(X)]_3$	COL10A1	150nm, domaine globulaire C-term	Cartilage
XI	$[\alpha1(XI)][\alpha2(XI)][\alpha3(XI)]$	COL11A1, COL11A2	300nm, petites fibres	Cartilage
XII	$\alpha1(XII)$	COL12A1		Interagit avec les types I et III

Tableau 2 : Les types de collagènes et leur localisation tissulaire.

Chez les patients atteints de ScS, la prolyl 4-hydroxylase est surexprimée par les fibroblastes et son inhibiteur, le fibrostatin-C, permet de diminuer la production de collagène de type I (Kawaguchi et al., 1992). Des études d'hybridation *in situ* réalisées sur des coupes de biopsies de peau de patients ScS ont permis d'identifier une augmentation de la présence de collagène de type I et III dans la partie basse du derme par rapport à des sujets sains (Perlish et al., 1988). De plus, des cellules mononucléées ont été détectées autour de ces fibroblastes activés, ce qui suggère un rôle important des cellules immunocompétentes dans le déclanchement de la fibrose (Scharffetter et al., 1988).

2.1.2 L'élastine

L'élastine est une protéine élastique et qui permet à de nombreux tissus de l'organisme de reprendre leur forme après étirement ou contraction. L'élastine aide également la peau à retrouver sa position initiale lorsqu'elle est percée ou pincée. Des analyses réalisées sur des biopsies de peau ont montré une augmentation de l'élastine chez les patients ScS par rapport à des sujets sains (Pasquali Ronchetti et al., 1989; Quaglino et al., 1996).

2.1.3 Les fibronectines

Les fibronectines sont une famille de glycoprotéines de haut poids moléculaire dont le rôle est d'attacher les cellules à la MEC. Les fibronectines attachent des cellules à toutes les matrices sauf le collagène de type IV, qui est lié à la MEC par la laminine. Les fibronectines sont des dimères de 2 peptides analogues. Chaque chaîne fait 60-70 nm de long et 2-3 nm d'épaisseur. Au moins 20 chaînes de fibronectines différentes ont été identifiées ; elles sont générées par épissage alternatif de l'ARNm du transcrit primaire du gène de la fibronectine (Labat-Robert, 2012).

Les fibronectines contiennent au moins 6 domaines étroitement repliés, chacun avec une forte affinité pour un substrat différent, tel que le sulfate d'héparane, le collagène (domaines distincts pour les types I, II et III), la fibrine et les récepteurs membranaires. Le domaine de liaison aux récepteurs membranaires contient une séquence d'acides aminés consensus, RGDS (arginine, glycine, acide aspartique et sérine). Une forme plasmatique de la fibronectine sécrétée par les hépatocytes a également été décrite et semble être augmentée dans les pathologies du tissu conjonctif comme la ScS (Ciobanu et al., 1988; Tamkun and Hynes, 1983).

Dans la ScS, l'expression de la fibronectine est augmentée dans des fibroblastes de patients par rapport à des sujets sains et les macrophages alvéolaires de patients sécrètent spontanément plus de fibronectine que des macrophages alvéolaires de sujets sains (Kinsella et al., 1989; Meyringer et al., 2007). Des études histologiques ont montré que la fibronectine était localisée dans la partie basse du derme ainsi que dans le tissu sous-cutané, ce qui suggère que la fibrose débute près des capillaires sanguins (Fleischmajer et al., 1980). Le TGF-β1 a la capacité d'augmenter l'expression de la fibronectine et du collagène de type I et III par les fibroblastes (Mori et al., 2004). L'endothéline-1 ne modifie pas l'expression de la fibronectine, mais augmente le collagène dans les fibroblastes (Shi-Wen et al., 2001). De plus, l'inhibition de la géranylgéranyl transférase I (enzyme impliquée dans la voie de signalisation du TGF-β) diminue l'expression des collagènes de type I et III mais pas la fibronectine, ce qui suggère une voie de régulation différente de ces deux protéines dans la ScS (Rosenbloom et al., 2000). Il a également été décrit que des polymorphismes dans le gène codant pour la fibronectine sont prédictifs du développement d'une fibrose pulmonaire chez des patients atteints de ScS (Avila et al., 1999).

2.1.4 La laminine

Toutes les lames basales contiennent un ensemble commun de protéines et de glycosaminoglycanes composé de collagène de type IV, d'héparane sulfate (protéoglycanes), d'entactine et de laminine. La lame basale est souvent désignée comme la matrice de type IV. Chacun des composants de la lame basale est synthétisé par les cellules qui lui servent de support. Les laminines servent d'ancrage aux surfaces cellulaires à la lame basale. (Tableau 3)

Collagène	Protéine d'ancrage	Protéoglycane	Récepteur membranaire	Cellules
I	fibronectine	chondroïtine et dermatane sulfate	intégrine	fibroblastes
II	fibronectine	chondroïtine sulfate	intégrine	chondrocytes
III	fibronectine	héparane sulfate et héparine	intégrine	hépatocytes quiescents, cellules épithéliales et fibroblastes
IV	laminine	héparane sulfate et héparine	Récepteurs de la laminine	Toutes les cellules épithéliales, cellules endothéliales, hépatocytes
V	fibronectine	héparane sulfate et héparine	intégrine	fibroblastes quiescents
VI	fibronectine	héparane sulfate	intégrine	fibroblastes quiescents

Tableau 3 : Les interactions de la laminine avec les autres protéines de la MEC.

Chez les patients atteints de ScS, les niveaux de fragments P1 de la laminine et NC1 du collagène de type IV circulants sont augmentés et corrélés avec l'activité de la maladie (Gerstmeier et al., 1988; Guseva et al., 1991).

2.1.5 La tenascine-C

La ténascine-C est une grande glycoprotéine extracellulaire hexamérique. C'est le membre fondateur d'une famille de quatre tenascines, il est unique par son modèle d'expression distinct. La ténascine-C est exprimée lors du développement embryonnaire ainsi que lors d'une lésion tissulaire, mais de façon transitoire car son expression est à nouveau diminuée lorsque la réparation du tissu est achevée. Peu ou pas de ténascine-C est détectée dans les tissus adultes sains (Midwood and Orend, 2009). La ténascine-C est une protéine multimodulaire comprenant quatre domaines distincts : un domaine d'assemblage, une série de répétitions d'epidermal growth factor-like (EGF-L), une série de répétitions de fibronectin type III-like (FNIII), et un globe C-terminal fibrinogen-like (FBG) (Figure 4). Chacun de ces domaines peuvent interagir avec un sous-ensemble de ligands différents, y compris des récepteurs de surface cellulaire et d'autres composants extracellulaires comme les intégrines, la fibronectine, le collagène ou encore TLR-4 (Midwood et al., 2011). En vertu de cette organisation en domaine, la ténascine-C est une molécule extrêmement pléiotropique et régule

une large gamme de fonctions lors de la réparation tissulaire, son implication dans la ScS est donc source de recherches en cours.

Figure 4 : Structure de la ténascine-C. (Neri and Bicknell, 2005)

L'expression de la ténascine-C est augmentée dans le derme de patients ScS, uniquement dans les zones cliniquement affectées ainsi que dans le tissu pulmonaire pour les patients ScS atteints d'une fibrose pulmonaire (Brissett et al., 2012; Lacour et al., 1992). L'IL-4, le bFGF et le PDGF induisent l'expression de la ténascine-C par des fibroblastes dermiques, contrairement au TGF-β1, à l'IL-1 ou à l'IL-6 (Makhluf et al., 1996). L'IL-13 augmente également l'expression de la ténascine-C par des fibroblastes dermiques par la voie PI3-K/Akt (Jinnin et al., 2006). La ténascine-C peut également moduler l'apparition de myofibroblastes dans le tissu cardiaque lésé, le domaine FNIII régule positivement l'expression d'α-SMA (Tamaoki et al., 2005). Enfin, les souris Tn-C$^{-/-}$ développent une fibrose pulmonaire atténuée en réponse à la bléomycine, par un mécanisme dépendant du TGF-β1 (Carey et al., 2010).

2.1.6 Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion qui transmettent des signaux de façon bidirectionnelle à travers la membrane plasmique. Ils comprennent deux sous-unités liées de façon non covalente, α et β qui forment une tête et deux longs bras dans l'ectodomaine et traversent la membrane jusqu'au compartiment cytoplasmique. Chez les mammifères, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β se combinent pour donner 24 dimères spécifiques (Labat-Robert, 2012). Les intégrines jouent un rôle important dans les interactions fibroblastes-collagène, leur implication dans la pathogénie de la ScS a donc été étudiée à travers plusieurs publications. Le tableau 4 résume les molécules étudiées, leur différence d'expression chez les patients atteints de ScS ainsi que les effets qui en résultent.

Intégrine	Synonyme	Ligand	Augmenté/diminué	Effets	Localisation	Références
α2		Collagène Laminine	Diminué	Synthèse accrue de collagène ?	Fibroblastes ScS limitée	(Iannone et al., 2005; Kozlowska et al., 1996; Osada et al., 1995)
α3			Diminué		Fibroblastes ScS limitée	(Iannone et al., 2005)
α4	CD49d VLA-4	Fibronectine V-CAM1	Diminué		Fibroblastes ScS limitée	(Iannone et al., 2005)
α5	Récepteur de la fibronectine	Fibronectines et protéines	Diminué		Fibroblastes ScS diffuse	(Iannone et al., 2005)
α6	Récepteur de la laminine	Laminine	Augmenté		Fibroblastes ScS diffuse	(Iannone et al., 2005)
α_V	Récepteur de la vitronectine	Vitronectine, fibronectine, fibrinogène, ostéopontine	Diminué		Fibroblastes ScS diffuse	(Iannone et al., 2005)
$\alpha_V\beta3$		β3 semble avoir la capacité de se lier à protéine de latence du TGF-β1	Augmenté	Augmentation collagène de type I et diminution de MMP1 / implication dans la boucle autocrine du TGF-β1	Fibroblastes ScS	(Asano et al., 2005a)
$\alpha_V\beta5$			Augmenté	Augmentation collagène de type II et de l'activité de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 / induit la différenciation en myofibroblastes par la stimulation de la boucle autocrine du TGF-β1 / recrute et active le TGF-β1 latent et se lie au récepteur du TGF-β1	Fibroblastes ScS	(Asano et al., 2004b, 2005b, 2006a, 2006b)b)

Tableau 4 : Implications des intégrines dans la physiopathologie de la ScS.

L'augmentation de l'expression des sous-unités α1 et α2 par les fibroblastes de patients atteints de ScS semble controversée (Herzhoff et al., 1999). Ceci suggère une fois de plus que les résultats de ces études dépendent de la diversité clinique des patients étudiés.

D'après Iannone *et coll*., il existe des différences dans l'expression de certaines intégrines entre les patients atteints de ScS limitée et diffuse (Iannone et al., 2005). Les autres études ont seulement comparé les patients atteints de ScS aux sujets sains.

2.2 Régulation de la dégradation de la MEC : les MMPs et TIMPs

La formation de MEC est un phénomène physiologique normal, tel que lors du développement, de la morphogénèse et de la cicatrisation. Ceci suggère qu'il existe un problème de régulation de la synthèse/dégradation de la MEC au cours des maladies fibrotiques.

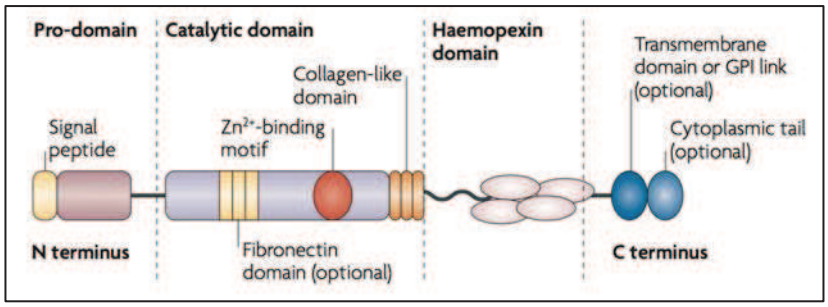

Figure 5 : Structure type des MMPs. (Sorokin, 2010)

Les métalloprotéases matricielles (Matrix metalloproteinases ou MMPs) sont des endopeptidases qui se caractérisent par un motif conservé Zn^{2+} dans le domaine catalytique et plusieurs autres domaines conservés (Figure 5). À l'heure actuelle, ils constituent une famille de 25 membres chez la souris et 24 membres chez l'homme (Tableau 5). L'expression des MMPs est régulée au niveau transcriptionnel par différents facteurs, y compris des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α ou l'IL-17A pour MMP9 (Di Girolamo et al., 2006; Qiu et al., 2009), des facteurs de croissance et des hormones. Cependant, elles sont produites et sécrétées comme pro-enzymes neutres, ou zymogènes, qui requièrent une activation par élimination du pro-domaine amino-terminal dans le tissu. L'activation peut être médiée par d'autres MMPs ou des protéases et certaines sont activées de façon intracellulaire par des furines. En outre, certains produits chimiques, tels que l'urée, certains détergents et des espèces réactives de l'oxygène peuvent agir comme des activateurs de MMPs. De plus, l'activité des MMPs dans les tissus est régulée par des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP1 à TIMP4) qui se lient à la plupart des MMPs pour les inactiver. Par conséquent, l'expression de l'ARNm ou de la protéine ne fournit aucune information sur la localisation in vivo de l'activité des MMPs, qui est évaluée par des études de zymographie *in situ*. Les MMPs sont classées en fonction des substrats qu'elles peuvent cliver.

Des expériences menées sur des souris transgéniques ont permis d'établir que la fonction protéolytique de ces molécules est plus subtile que celle initialement imaginée. Ces études ont fourni une évaluation plus précise du rôle des processus protéolytiques in vivo et suggèrent un rôle plus «complexe» des MMPs plutôt que de les considérer uniquement comme des enzymes de dégradation. Le meilleur exemple est le clivage sélectif de plusieurs chimiokines par des MMPs qui résulte soit par leur inactivation (MMP2 clive CCL7) ou une potentialisation de leurs effets (MMP9 potentialise IL-8/CXCL8). Le processus de contrôle se traduit également par des pools extracellulaires de cytokines inflammatoires, et par le clivage sélectif de domaines de la MEC, ce qui conduit à des fragments bioactifs ayant des fonctions distinctes de la molécule mère. Ces MMPs jouent donc un rôle essentiel dans la régulation de la dégradation de la MEC mais également dans le développement de la réponse inflammatoire. L'utilisation de molécules ciblant les MMPs a été envisagée dans diverses pathologies où celles-ci sont impliquées comme dans la polyarthrite rhumatoïde ou l'athérosclérose (Hu et al., 2007).

Famille	Nom	Synonyme
Collagénases	MMP1	Fibroblast collagenase
	MMP8	Neutrophil collagenase
	MMP13	Collagenase3
Gélatinases	MMP2	Gélatinase A - Collagénase type IV (72kDa)
	MMP9	Gélatinase B - Collagénase type IV (92kDa)
Stromélysines	MMP3	Stromélysine 1
	MMP10	Stromélysine 2
	MMP11	Stromélysine 3
Metalloelastase	MMP12	Macrophage metalloelastase
Enamelysine	MMP20	Email metalloproteinase
Matrilysines	MMP7	Matrilysine 1
	MMP26	Matrilysine 2
MMP liées aux membranes « membrane-type MMP »	MMP14	
	MMP15	
	MMP16	MT-MMP3
	MMP17	
	MMP24	
	MMP25	
Autres	MMP19	
	MMP21	
	MMP23A	
	MMP23B	
	MMP27	
	MMP28	Epilysine
Inhibiteurs « tissue inhibitor of metalloproteinases »	TIMP1	
	TIMP2	
	TIMP3	
	TIMP4	

Tableau 5 : Classification des différentes familles de MMP et de leurs inhibiteurs.

L'implication des MMPs et TIMPs suivants a été étudiée dans des modèles animaux de fibrose induite par la BLM ainsi que dans des sérums ou fibroblastes isolés de patients ScS :

- l'expression des **MMP2** et **MMP9** est augmentée en réponse à la BLM dans les poumons de souris et de rats (Kim et al., 2009; Ouchi et al., 2008). L'activité de MMP2 est augmentée dans le LBA de rats en réponse à la bléomycine après 14 jours (Bakowska and Adamson, 1998). Toutefois, l'implication de MMP9 dans la fibrose pulmonaire chez la souris est remise en question par une étude montrant qu'une augmentation de l'activité de MMP9 provenant des macrophages alvéolaires diminue la fibrose pulmonaire par clivage de TIMP1 (Cabrera et al., 2007). Il semblerait que la présence de MMP9 soit augmentée les premiers jours après bléomycine puis qu'elle diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la production de TIMP1, MMP9 étant un substrat de TIMP1 (Li et al., 2004). Des dosages sériques de patients atteints de ScS montrent une augmentation de la présence de MMP9 et TIMP1 par rapport à des sujets sains, avec une différence significative entre des patients atteints de ScS diffuse et limitée. Les concentrations de MMP9 sont corrélées avec le score de Rodnan. Des fibroblastes de patients atteints de ScS produisent plus de MMP9 en réponse à des stimulation par de l'IL-1β, du TNF-α et du TGF-β (Kim et al., 2005b).
- **MMP3** est augmenté dans les poumons des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Chez les souris MMP3-/-, la fibrose pulmonaire est diminuée par rapport aux souris WT et il a été montré que MMP3 active la voie β-caténine par clivage de la protéine E-cadhérine (Yamashita et al., 2011).
- les souris **MMP7**-/- présentent une diminution de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans les poumons en réponse à la bléomycine (Manicone et al., 2009). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'on ne détecte pas de KC (CXCL1) dans le LBA de ces souris après bléomycine, KC restant complexé à la protéine syndecan-1 (Li et al., 2002). Enfin, ces souris MMP7-/- développent une fibrose pulmonaire diminuée et l'expression de MMP7 a été trouvée augmentée dans des poumons de patients atteints de fibrose pulmonaire (Zuo et al., 2002). MMP7 active également la voie β-caténine par clivage de la protéine E-cadhérine (McGuire et al., 2003). Les concentrations de MMP7 sont plus importantes dans le sérum de patients atteints de ScS comparés à des sérums contrôles et sont également plus importantes chez les patients ScS atteints de fibrose pulmonaire par rapport à ceux qui n'en sont pas atteints (Moinzadeh et al., 2011).

- **MMP8** est augmenté après administration de BLM chez la souris (Manoury et al., 2007). Les souris MMP8-/- développent une fibrose pulmonaire diminuée. Il a été montré que MMP8 a un effet pro-fibrotique par clivage de l'IL10 (García-Prieto et al., 2010).
- L'ARNm et l'activité de **MMP12** sont augmentés après administration de BLM mais les souris MMP12-/- ne sont pas protégées de la fibrose pulmonaire (Manoury et al., 2006a; Swaisgood et al., 2000). Les concentrations sériques de MMP12 sont augmentées chez les patients atteints de ScS (diffus et limités) comparés à des sujets sains et l'augmentation est plus importante chez des sujets ScS atteints de fibrose pulmonaire (Manetti et al., 2012).
- l'expression de **TIMP1** est augmentée dans les poumons de souris 1 jour après administration de bléomycine. TIMP1 semble être exprimé par les macrophages et cellules épithéliales pulmonaires (Manoury et al., 2006b). Toutefois, les souris TIMP1-/- présentent une augmentation du recrutement des neutrophiles dans les LBA, une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une augmentation de l'activité de MMP9 mais aucune modification d'accumulation de collagène dans les poumons (Kim et al., 2005a). Il a également été montré que l'expression de TIMP1 par les fibroblastes de patients est augmentée de 50% comparés à des fibroblastes de sujets sains (Bou-Gharios et al., 1994) et est corrélée à l'expression de l'actine des muscles lisses (α-SMA), ce qui témoigne d'une production augmentée de TIMP1 par les myofibroblastes (Kirk et al., 1995).
- L'expression de **TIMP3** est diminuée en réponse à la bléomycine dans les poumons de souris. Il a été montré dans cette étude que TIMP3 régule l'afflux des neutrophiles dans le LBA en inhibant l'activité des MMPs (Gill et al., 2010). Chez l'homme, l'expression de l'ARNm de TIMP3 est augmentée dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains, et peut être induite par du TGF-β dans des fibroblastes dermiques (Mattila et al., 1998).

3 Les cellules impliquées dans le développement de la fibrose cutanée et pulmonaire

3.1 Les fibroblastes dermiques

La fibrose cutanée est une des caractéristiques fondamentales de la ScS. Bien que les mécanismes aboutissant à la fibrose puissent varier entre différents tissus, il existe un point commun : la transformation de certaines cellules en myofibroblastes producteurs de grandes quantités de MEC et caractérisés par l'expression de l'actine des muscles lisses (α-smooth muscle actin : α-SMA). Ces cellules sont issues des fibroblastes dermiques dans la peau, des astrocytes dans le foie et des cellules mésangiales dans le rein. Les myofibroblastes activés se caractérisent par la surproduction de collagène fibrillaire (type I et III), des collagènes de type V et de type VII ainsi que d'autres composants de la MEC et sont donc responsables de la fibrose. Ces cellules sont activées par des cytokines ou des facteurs de croissance.

3.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène : ROS

Les radicaux libres ont été définis comme « toute espèce capable d'une existence indépendante qui contient un ou plusieurs électrons non appariés dans des orbites atomiques ou moléculaires ». Depuis quelques années, cette définition a été remplacée par le terme plus global d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species* ou ROS). Le terme ROS inclut des réactifs intermédiaires de l'oxygène (*Reactive oxygen intermediates* ou ROI) telles que l'O_2^-, H_2O_2, OH, l'ozone (O_3) ainsi que l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide hypobromeux (HOBr) et l'acide hypoiodeux (HOI) (Halliwell, 1991).

L'excès de ROS est appelé stress oxydatif et peut endommager les structures cellulaires, les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Les radicaux libres semblent avoir des liens particuliers avec les cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la pathogenèse de la ScS. Jobling *et coll*. ont suggéré que la libération du TGF-β (lié à sa protéine de latence (LAP)) permettant son activation est induite par une modification oxydative de LAP et donc à l'intervention de ROS (Jobling et al., 2006). De plus, les radicaux libres peuvent stimuler l'expression et la sécrétion de TGF-β par de nombreux types cellulaires et provoquer la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TGF-β (Cucoranu et al., 2005; Zhao et al., 2008).

Les fibroblastes dermiques isolés de patients ScS produisent plus d'O_2^- et d'H_2O_2 que des fibroblastes isolés de sujets sains et cette production est due à l'activation du complexe NADPH oxydase. La diminution de la production des ROS après traitement avec

l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine diminue la prolifération cellulaire et l'expression de l'ARNm du collagène de type I (Sambo et al., 2001). De plus, le sérum de patients atteints de ScS induit la production d'H_2O_2 par les fibroblastes (Servettaz et al., 2007). La production de ROS est également cytotoxique car il a été démontré que l'administration d'arsenic trioxide (As_2O_3) induit la production de ROS qui détruisent les fibroblastes activés, contenant de faibles quantités de glutathione, un agent antioxydant (Kavian et al., 2012).

3.1.2 La voie Wnt/β-caténine

Les protéines Wnt sont des facteurs de croissance conservés dans l'évolution et riches en cystéine codés par 19 gènes chez l'homme. Ce sont des protéines sécrétées qui stimulent différents récepteurs et vont ainsi activer diverses voies de signalisation en aval. Sur la base d'études préliminaires, ces voies de signalisation ont été classées comme canonique (β-caténine-dépendant) ou non-canonique (β-caténine-indépendant). Cependant, cette classification ne peut servir qu'à titre indicatif, car ces voies de signalisation canoniques et non canoniques varient selon le contexte cellulaire. En effet, il existe 15 récepteurs ou co-récepteurs pour Wnt et leur combinaison particulière avec une protéine Wnt spécifique détermine la voie de signalisation activée (Figure 6) (Niehrs, 2012).

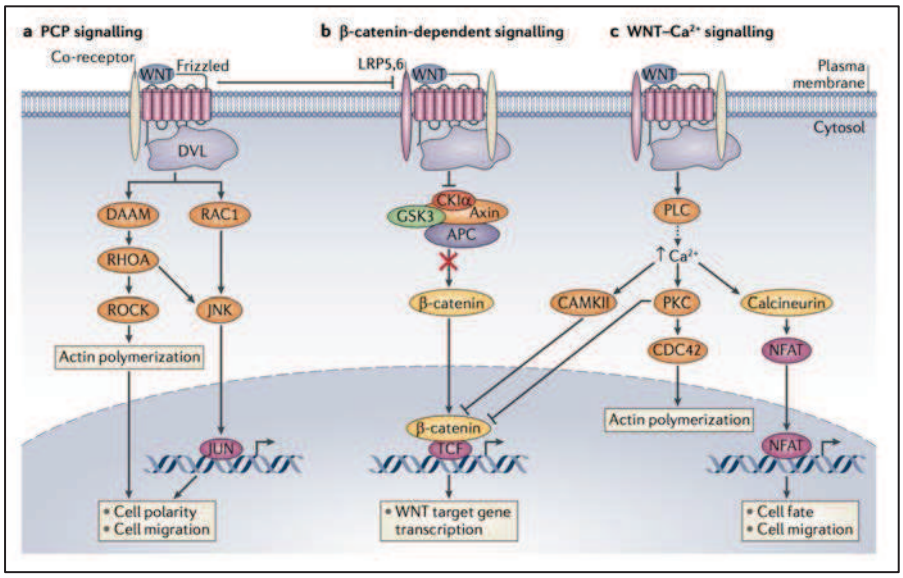

Figure 6 : Les voies de signalisation Wnt/β-caténine. (Niehrs, 2012)

Ces protéines Wnt sont connues pour leur rôle dans l'embryogénèse, le cancer et la stimulation ostéoblastique mais elles font l'objet de recherches récentes dans les processus conduisant à la fibrose. En effet, des études ont montré que les fibroblastes pulmonaires de patients ScS avec atteinte pulmonaire accumulent le facteur de transcription β-caténine au niveau nucléaire, conduisant à une prolifération excessive de ces cellules (Lam et al., 2011).

L'expression de la protéine Wnt10b est augmentée dans les biopsies de peau de patients ScS et dans la peau de souris après injection de bléomycine. Les souris transgéniques sur-exprimant Wnt10b présentent une perte du tissu adipeux sous-cutané accompagnée de fibrose dermique, de dépôts de collagène et d'une augmentation de l'expression de l'actine des muscles lisses (Wei et al., 2011). Il a également été montré que l'inhibition de la GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3β), une kinase qui régule la dégradation de la β-caténine, conduit à une augmentation de la production de collagène par les fibroblastes dermiques humains et augmente la fibrose cutanée induite par la bléomycine chez la souris ainsi que la souris TSK/+ (tight-skin-1) (Bergmann et al., 2011). Une autre étude a montré que dans la peau des patients atteints de ScS, l'accumulation au niveau nucléaire de la β-caténine était due à une surexpression des protéines Wnt1 et Wnt10b (Beyer et al., 2012).

3.1.3 Les cytokines et facteurs de croissance

Certaines études déjà anciennes ont suggéré que des facteurs solubles sécrétés par des cellules mononucléées avaient la capacité d'activer des fibroblastes voire d'induire et de maintenir un phénotype « ScS-like » chez des fibroblastes cutanés isolés de sujets sains (Whiteside et al., 1984; Worrall et al., 1986). Nous citerons ici dans le tableau 6 les cytokines et facteurs de croissance qui sont produits par les fibroblastes et ceux qui les stimulent. L'implication de certaines cytokines dans la fibrose sera détaillée plus loin dans le chapitre 4 : « Les cytokines impliquées dans la fibrose cutanée et pulmonaire ».

Nom	Produit par les fibroblastes dermiques	Stimule les fibroblastes dermiques
TGF-β	(Varga and Pasche, 2009)	(Varga and Pasche, 2009)
IL-1α	(Kawaguchi et al., 1999)	(Hu et al., 2003)
IL-1β	Détection d'ARNm (Chizzolini et al., 2002)	(Kawaguchi et al., 1993)
IL-4	Marquage immunohistochimique sur fibroblastes en culture (Salmon-Ehr et al., 1996)	(Makhluf et al., 1996)
IL-13		(Jinnin et al., 2006)
IL-6	(Khan et al., 2012)	(Feghali et al., 1994)
IL-17A		(Nakashima et al., 2012)
IL-22		Expression de l'IL-22R1 par les fibroblastes dermiques, stimulation par de l'IL-22 induit la phosphorylation de STAT1 et STAT3 (Wolk et al., 2009)
IL-33	(Manetti et al., 2010)	Expression du récepteur ST2 par les myofibroblastes dans les biopsies de peau de patients ScS (Manetti et al., 2010)
IFN-γ		(Serpier et al., 1997)
TNF-α		(Antonelli et al., 2012)
MCP-1/CCL2	(Distler et al., 2001)	(Yamamoto et al., 2001a)1)
CTGF	(Holmes et al., 2001)	(Shi-wen et al., 2000)
PDGF	(Kawaguchi et al., 1999)	(Yamakage et al., 1992)
bFDF		(Denton et al., 1997)
Endothéline-1	(Kawaguchi et al., 1994)	(Waters et al., 2006)

Tableau 6 : Les cytokines et facteurs de croissance produits par les fibroblastes et qui stimulent les fibroblastes dans la ScS.

3.2 Implication des lymphocytes B

3.2.1 Altérations des LB chez les patients et dans les modèles animaux de ScS

Au cours de la ScS, il existe actuellement de nombreux arguments en faveur d'un rôle prépondérant des LB dans le développement de la maladie comme par exemple une hyper-γ-globulinémie ou la production de nombreux auto-anticorps tels les anticorps anticentromère, antitopoisomérase I, antifibrillarine, anti-PM-Scl, antifibrilline ou anti-ARN polymérase I ou III. De par leurs diverses fonctions, les LB peuvent participer au développement de la fibrose par la production d'auto-anticorps ou de cytokines.

Les modifications intrinsèques des LB chez les patients atteints de ScS sont les suivantes. Les patients présentent une augmentation de la présence de LB naïfs ($CD19^{+}CD27^{-}$) et une diminution des LB mémoires ($CD19^{+}CD27^{med}$) et plasmocytes ($CD19^{-}CD27^{high}$) dans le sang. Toutefois, ces LB mémoires expriment de façon élevée des marqueurs d'activation tels que CD80/86 et CD95 et produisent plus d'anticorps lorsqu'ils sont re-stimulés (Sato et al., 2004a). (Figure 7)

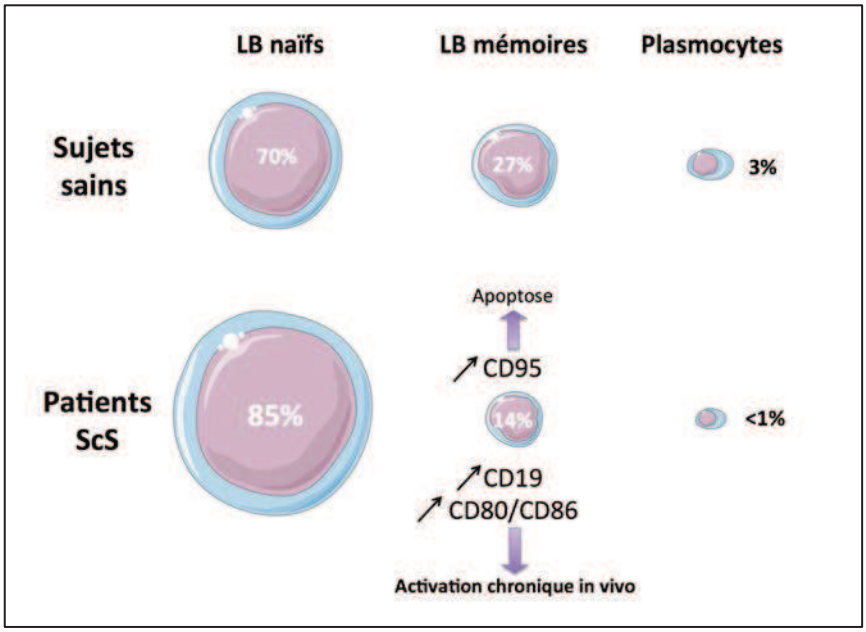

Figure 7 : Perturbations de l'homéostasie des LB chez les patients atteints de ScS, adapté de (Sato et al., 2004b)

De plus, l'expression de **CD19**, un régulateur positif du BCR, est augmentée de 20% sur les LB isolés de patients atteints de ScS et cette surexpression a été détectée sur des LB naïfs et mémoires (Sato et al., 2000, 2004a). L'augmentation de l'expression de CD80/86 par des LB issus de sujets sains ne survient que lorsque ces cellules sont activées car ce sont des signaux critiques de co-stimulation. Dans la ScS, il est possible que les LB soient constamment activés en raison d'une surexpression de CD19. L'expression de CD21, un récepteur des fragments C3 du complément qui est associé au CD19 sur les LB, est également plus élevée chez les patients ScS (Sato et al., 2000). Il a été démontré chez des souris transgéniques (TG-4) qu'une surexpression de CD19 à la surface des LB semblable à celle retrouvée chez les patients ScS conduisait à une rupture de tolérance qui se manifeste par la production spontanée d'auto-anticorps anti-TOPO-I, anti-ADN, anti-histone ainsi que de facteur rhumatoïde (FR) (Asano et al., 2004a; Sato et al., 2000). Un polymorphisme dans le promoteur de CD19 (-499G>T) a été détecté et semble être corrélé à la surexpression de CD19 à la surface des LB chez des patients atteints de ScS par rapport à des sujets sains. Ces études sur la surexpression de CD19 contribuent à l'activation chronique des LB conduisant probablement à la production des auto-anticorps (Tsuchiya et al., 2004).

Chez la souris tight-skin (TSK/+), un modèle murin de ScS, la surexpression de CD19 n'est pas retrouvée mais une augmentation de la phosphorylation constitutive des résidus tyrosine de CD19 a été démontrée par rapport aux souris contrôles. Il en résulte une activation

chronique des LB ainsi qu'une hyper-γ-globulinémie et une production accrue d'auto-anticorps. Ces signes d'activation lymphocytaire B ne sont plus observés chez les souris tight-skin croisées avec des souris $CD19^{-/-}$ (Saito et al., 2002).

Des analyses transcriptomiques permettant d'évaluer l'expression des gènes dans des biopsies de peau de patients atteints de ScS montrent une augmentation de l'expression des gènes codant pour les immunoglobulines et CD53, une glycoprotéine présente à la surface des LB ayant un rôle dans l'adhésion cellulaire, par rapport à des biopsies de sujets sains (Whitfield et al., 2003).

Plusieurs études se sont attachées à caractériser la présence de LB dans des biopsies de peau de patients ScS, et à les caractériser. L'implication des LB dans la fibrose a été suggérée dès qu'a été révélée la présence d'infiltrats cellulaires composés de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages dans 49% des coupes histologiques de peau de patients atteints de ScS (Fleischmajer et al., 1977). La présence de LB (cellules $CD20^{+}$) a été détectée dans des biopsies de peau de patients atteints de ScS (Bosello et al., 2010). Afin de compléter leur étude transcriptomique, Whitfield et coll. ont également effectué des marquages sur des coupes histologiques de biopsies de peau de patients atteints de ScS (dans des zones cliniquement affectées) et ont pu mettre en évidence des cellules positives pour le CD20, un marqueur des LB, chez un des trois patients analysés dans l'étude. Ces cellules n'exprimaient pas le CD138, un marqueur des plasmocytes. Ces auteurs ont également insisté sur l'hétérogénéité de ce marquage d'une biopsie à l'autre sur le même patient, voire dans différentes zones au sein d'une même biopsie. Ceci peut expliquer que, dans certaines études, seule l'expression de CD3, marqueur des LT, est détectée dans les biopsies (Whitfield et al., 2003).

Lafyatis et coll. ont démontré par immunohistochimie la présence de LB ($CD20^{+}$), de LT ($CD3^{+}$) et de macrophages ($CD68^{+}$) dans des biopsies de poumons de patients ScS atteints de fibrose pulmonaire (Lafyatis et al., 2007).

L'implication des LB dans le développement de la fibrose cutanée a été évaluée chez la souris TSK/+. L'administration d'anticorps anti-CD20 diminue la fibrose cutanée, l'hyper-γ-globulinémie ainsi que la concentration d'auto-anticorps dans le sérum des souris mais uniquement lorsque celles-ci ont été traitées 3 jours après la naissance. Le traitement n'a pas eu d'effet sur les souris traitées plus tard (56 jours après la naissance) qui avaient déjà développé la maladie (Hasegawa et al., 2006). Ceci nous indique que les LB seraient potentiellement impliqués dans le début du développement de la fibrose dans la ScS et qu'un

traitement anti-CD20 pourrait être efficace s'il pouvait être administré pendant les phases précoces de la maladie.

3.2.2 Le rôle pathologique des auto-anticorps

Les auto-anticorps produits au cours de la ScS n'ont pas uniquement un rôle diagnostique mais peuvent aussi participer à la pathogénie de la maladie. Dans d'autres pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, il a été démontré dans un modèle murin un rôle direct des auto-anticorps dirigés contre la glucose-6-phosphate isomérase dans le développement de symptômes cliniques et physiopathologiques proches de la maladie humaine. De plus, le transfert de sérum de ces souris arthritiques K/BxN suffit à induire la maladie chez une souris saine (Korganow et al., 1999; Matsumoto et al., 1999).

Dans la ScS, plusieurs études sont en faveur d'un rôle pathogénique des autoanticorps : il a été démontré que les **anticorps anti-fibrilline1** isolés du sérum de patients pouvaient stimuler les fibroblastes dermiques isolés de sujets sains. Des études transcriptomiques ont permis de déterminer que ces auto-anticorps induisent une surexpression de gènes codant pour des protéines de la MEC tels que COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL6A3, MMP3 et TIMP3 ainsi que pour des protéines impliquées dans la voie du TGF-β1 tels que TGFBRII, CTGF, latent TGF-β binding protein 1 (LTBP1), et LTBP3 mais ne modifient pas l'expression du TGF-β1. Les anticorps anti-fibrilline1 ont également la capacité d'induire la phosphorylation et la translocation dans le noyau de Smad3, un facteur de transcription impliqué dans la voie du TGF-β1. Les auteurs de cette étude proposent donc le mécanisme suivant pour expliquer le rôle pathogène de ces anticorps : les anticorps anti-fibrilline1 peuvent reconnaître la fibrilline1 qui est liée à la protéine de latence du TGF-β1, LTBP, ce qui va induire le relargage de TGF-β1 sous sa forme active. Après liaison à son récepteur, le TGF-β1 va induire la phosphorylation de Smad3 et par conséquent la transcription de gènes codant pour des protéines de la MEC (Zhou et al., 2005).

Des **anticorps anti-PDGF-R** de patients atteints de ScS ont la capacité d'induire la production de ROS par des fibroblastes dermiques isolés de sujets sains par la voie Ha-Ras-ERK1/2 ainsi que l'expression des gènes codant pour le collagène de type I (COL1A1 et COL1A2) et l'actine des muscles lisses (α-smooth muscle actin : α-SMA) (Baroni et al., 2006). Une autre étude apporte des résultats contraires indiquant que les anticorps anti-PDGF-R isolés de patients atteints de ScS n'ont pas d'activité agoniste sur les récepteurs du PDGF présents sur des cellules endothéliales aortiques de porc exprimant de manière stable les

récepteurs humains du PDGF (Loizos et al., 2009). Cette divergence peut s'expliquer par la différence du modèle expérimental utilisé par ces 2 équipes.

Les **anticorps anti-fibroblastes** isolés de patients atteints de ScS ont également la capacité de stimuler les fibroblastes dermiques et pulmonaires. Ils sont présents sous forme d'IgG dans 58% et d'IgM dans 48% des patients avec une différence significative entre les patients atteints de ScS diffuse et limitée. Ces anticorps anti-fibroblastes induisent : i) une augmentation de l'adhésion de cellules monocytaires U937 aux fibroblastes dermiques par la surexpression de ICAM-1, ii) une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1α, l'IL-1β et l'IL-6 et iii) une augmentation de la sécrétion d'IL6 dans le surnageant de culture. L'addition dans le surnageant de culture de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1, l'IL-1Ra, a complètement inhibé l'induction de l'expression d'ICAM par les anticorps anti-fibroblastes (Chizzolini et al., 2002). Ces anticorps peuvent également induire la sécrétion de CCL2 et CXCL8 par les fibroblastes dermiques par un mécanisme dépendant de TLR4 et du protéasome (Fineschi et al., 2008).

Les **anticorps anti-cellules endothéliales** peuvent stimuler la surexpression d'ICAM-1, VCAM-1 et la selectine-E par les HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) ce qui va augmenter l'adhésion des cellules monocytaires U937. L'utilisation d'anticorps anti-IL1 inhibe l'expression de ces molécules à la surface des cellules endothéliales ainsi que l'adhésion des cellules monocytaires (Carvalho et al., 1996).

3.2.3 Les LB : des cellules productrices de cytokines

L'implication potentielle de cytokines profibrotiques produites par les LB a été évoquée dans plusieurs études. Les LB pourraient être responsables de la production d'**IL-6** car l'utilisation d'un anticorps anti-CD20 permettant la déplétion en LB chez des patients atteints de ScS a induit une réduction de la concentration sérique d'IL-6 (Bosello et al., 2010). Comme indiqué ci-dessus, les LB de souris TSK/+ sont activés de façon chronique et pourraient donc synthétiser de l'IL-6 participant à la fibrose cutanée. Saito et coll. ont montré que ces LB isolés et stimulés par des anticorps anti-IgM et anti-CD40 produisent plus d'IL-6 que des LB issus de souris WT. De plus, la perte de l'expression de CD19 inhibe la production d'IL-6 par les LB isolés de souris TSK/+ (Saito et al., 2002). Les cellules mononucléées du sang périphérique isolées de patients atteints de ScS sécrètent de manière spontanée plus d'IL-6 que des cellules isolées de sujets sains (Hasegawa et al., 1999). Ces données suggèrent donc que la surexpression de CD19 par les LB de patients atteints de ScS pourrait participer à la fibrose par la surexpression d'IL-6 mais à ce jour aucune étude n'a

démontré que l'IL-6 produite par les LB de patients atteints de ScS induisait la production de MEC par les fibroblastes.

Une autre cytokine pouvant participer à la fibrose par la production massive de MEC par les fibroblastes est le **TGF-β1**. Il a été montré que des LB de souris sauvages stimulés par du LPS pouvaient produire du TGF-β1 (Snapper et al., 1993).

D'autres études ont incriminé les LB dans le développement de la fibrose hépatique ou pulmonaire. En effet, les souris dépourvues de LB développent une fibrose hépatique atténuée en réponse au tétrachlorure de carbone (CCl4) par un mécanisme indépendant des anticorps et des LT (Novobrantseva et al., 2005). Komura et coll ont montré que des souris déficientes pour CD19 développent une fibrose pulmonaire atténuée en réponse à la bléomycine et que des souris surexprimant CD19 développent une fibrose plus importante. Ces auteurs ont suggéré que CD19 pouvait moduler l'infiltration lymphocytaire B dans le poumon en surexprimant CXCR3 (Komura et al., 2008).

En conclusion de cette partie 3.2, il semblerait possible qu'un traitement ciblant les LB puisse être efficace afin de traiter les patients atteints de ScS. A ce jour, quatre études ouvertes ont été réalisées sur des petites cohortes de patients (de 8 à 15). Trois de ces quatre études ont montré que l'utilisation d'un anticorps anti-CD20 pouvait améliorer les symptômes cutanés et musculaires mais n'avaient pas d'impact sur l'atteinte pulmonaire. Ces observations doivent être complétées par des études cliniques randomisées, multicentriques réalisées en double aveugle afin d'établir clairement l'intérêt d'une thérapeutique anti-LB dans la ScS (Bosello et al., 2010; Daoussis et al., 2010; Lafyatis et al., 2009; Smith et al., 2010).

Jusqu'à présent, de nombreux travaux ont étudié les anomalies des LB chez les patients ainsi que le rôle pathogène des auto-anticorps mais l'implication directe des LB dans le développement de la fibrose cutanée chez l'homme n'a pas été explorée, ce qui a été le but d'une partie de notre travail.

3.3 Implication des lymphocytes T

3.3.1 Polarisation des LT

Après reconnaissance de l'antigène porté par les molécules de classe II du CMH et le signal de co-stimulation fourni par les cellules présentatrices d'antigènes, les principaux LT-CD4 effecteurs générés sont au nombre de 5 : LT_H1, LT_H2, LT_H17, LT_{FH} (LT folliculaires), et

LTreg (LT régulateurs). Leur différenciation dépend du contexte cytokinique auquel ils sont exposés (Figure 8) :

Les **LT_H1** sont générés en réponse à l'IFN-γ produit par les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules NK. Le facteur de transcription STAT1 est alors activé et induit un autre facteur de transcription spécifique à la réponse T_H1, T-bet, ainsi que l'expression du récepteur de l'IL-12. L'IL-12 induit STAT4 qui avec T-bet va permettre la transcription du gène de l'IFN-γ et sa synthèse caractéristique de la réponse T_H1. Les autres cytokines produites par les T_H1 sont l'IL-2 et le TNF-α. Les LT_H1 ont la capacité d'activer les macrophages afin de leur permettre de détruire les pathogènes intracellulaires mais ils peuvent également participer à la différenciation des LT-CD8 naïfs en LT-CD8 effecteurs.

La réponse de type **LT_H2** est induite par l'IL-4. Le récepteur à l'IL-4 active STAT6 qui induit l'expression de GATA-3, un facteur de transcription spécifique des LT_H2, favorisant ainsi la synthèse d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-13. Les cytokines de type T_H2 activent les polynucléaires éosinophiles, les mastocytes et les polynucléaires basophiles.

Les cytokines produites par les LT_H1 ont un effet inhibiteur sur la réponse LT_H2 et vice versa.

En l'absence d'IL-12 et d'IL-4, les **LT_H17** sont induits par l'IL-6, l'IL-1 et le TGF-β qui activent le facteur de transcription RORγT ce qui permet la production du récepteur de l'IL-23. Leur développement dépend ensuite de l'IL-23. Ces LT_H17 produisent de l'IL-17A et de l'IL-17F ainsi que de l'IL-22. L'IL-17A/F est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles au niveau du site de l'infection.

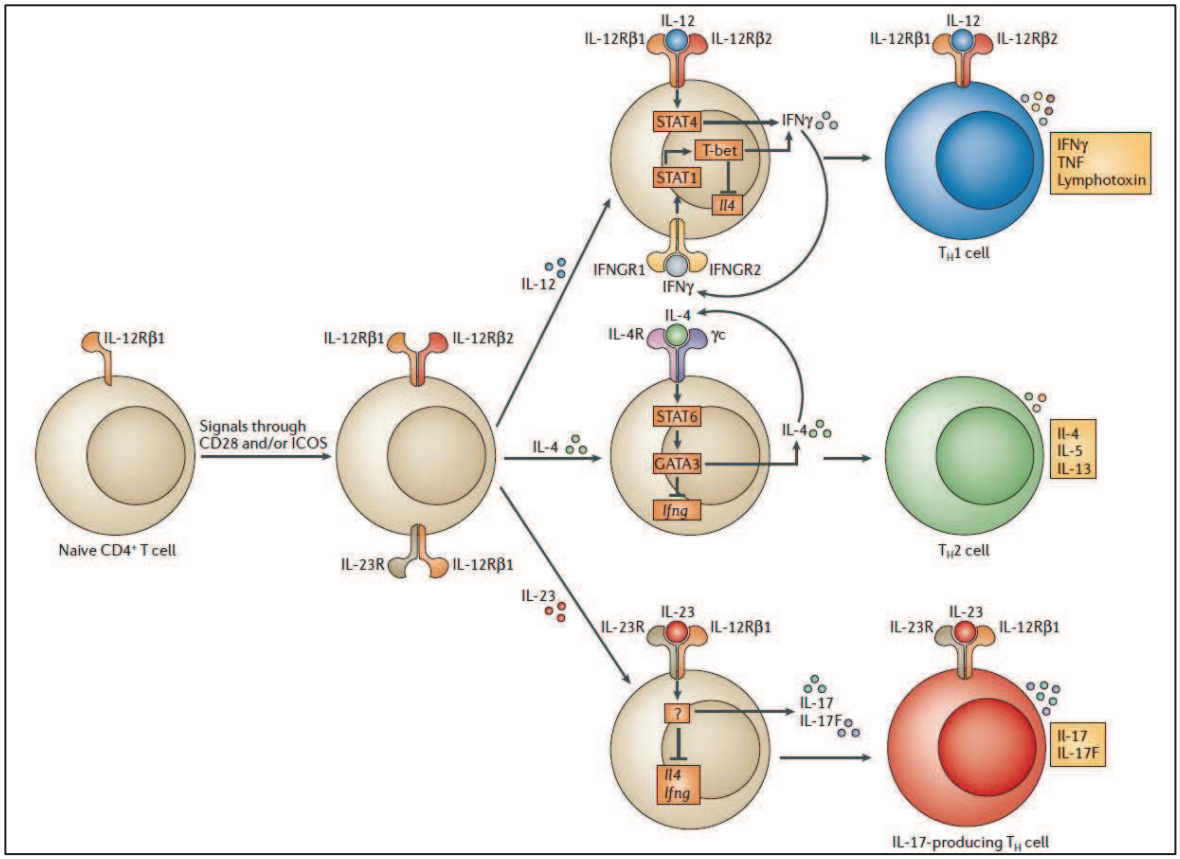

Figure 8 : Maturation des LT auxiliaires LT_H1, LT_H2, LT_H17.(Dong, 2006)

Les **LT_{FH}** se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Bcl6 qui va permettre l'expression de CXCR5, le récepteur de CXCL13, sécrété par les LB dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires. Ceci permettrait la localisation particulière de ces cellules dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires. Leur rôle est particulier car il est restreint à l'activation des LB par la sécrétion d'IL-21 dans les organes lymphoïdes secondaires (Figure 9). Aucune modification des LT_{FH} n'a été décrite à ce jour dans la ScS.

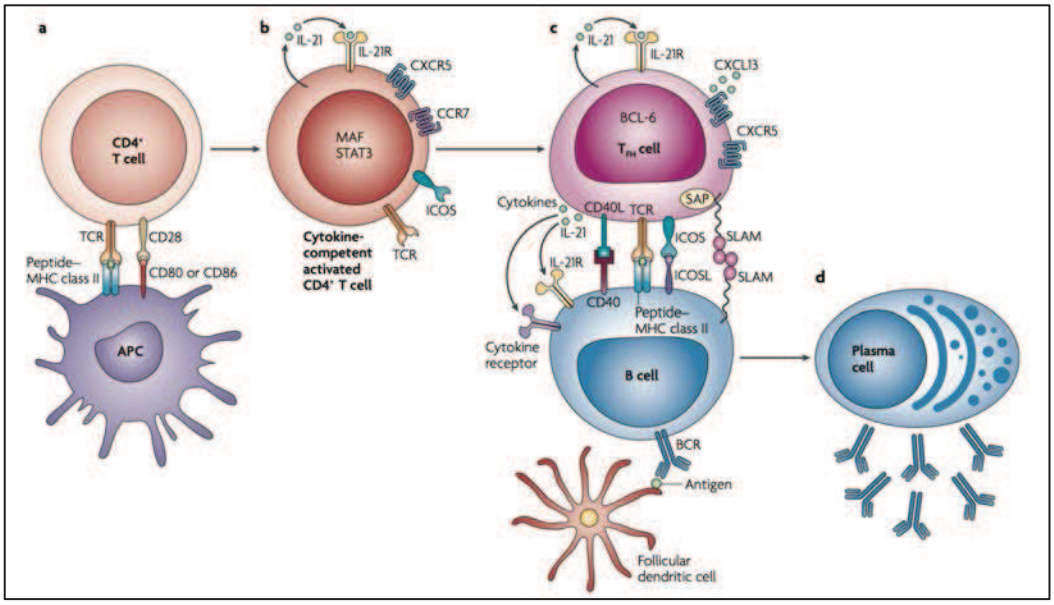

Figure 9 : Différenciation des LT folliculaires et action sur les LB. (King, 2009)

Il existe 2 populations principales de **LTreg** : les LTreg naturels et LTreg induits. Les LTreg induits expriment le facteur de transcription FoxP3 et les marqueurs de surface CD25 et CD4. Ils sont produits lorsqu'un LT naïf est activé en présence de TGF-β et en l'absence d'IL-6. Ils produisent eux-mêmes du TGF-β et de l'IL-10, qui sont des cytokines immunosuppressives. La présence ou l'absence d'IL-6 va donc déterminer la maturation d'un LT naïf en LTreg ou LT_H17. Les mécanismes d'action des LTreg sont résumés dans la figure 10.

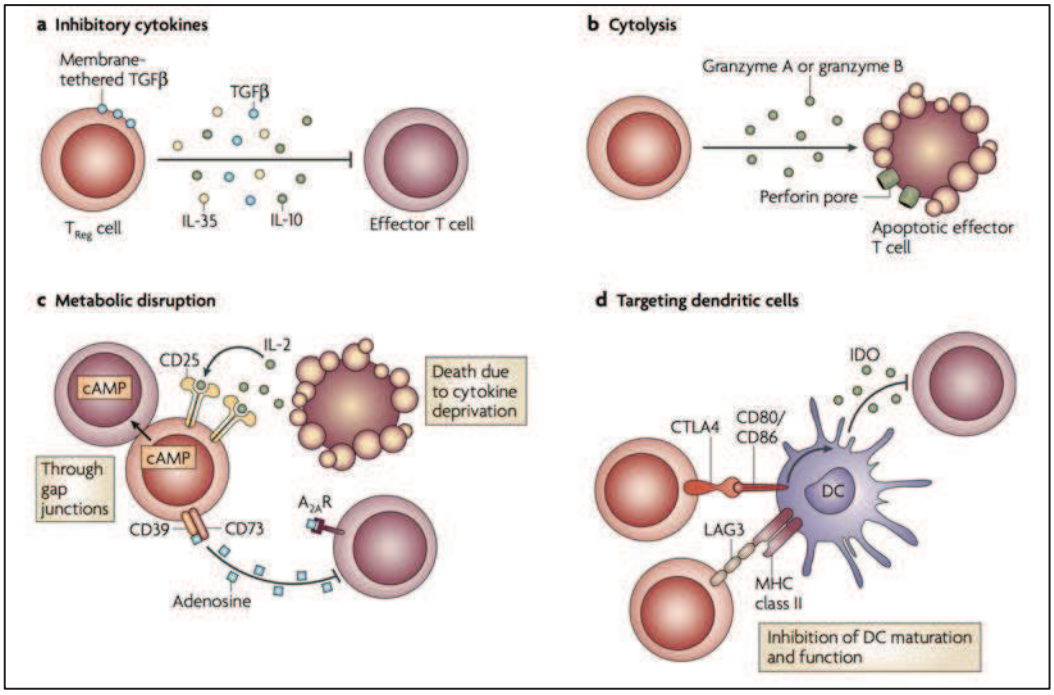

Figure 10 : Mécanismes d'action des LT régulateurs. (Vignali et al., 2008)

3.3.2 Les LT dans la fibrose cutanée et pulmonaire

Chez les patients atteints de ScS, plusieurs études ont montré une orientation vers un profil **T_H2** comme en témoigne la production accrue d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-13 (Mavalia et al., 1997; Truchetet et al., 2011). Le rôle particulier de ces cytokines dans le développement de la fibrose sera détaillé dans le chapitre 4. La polarisation vers une réponse de type T_H2 dans la ScS peut s'expliquer car il a été montré que les réponses T_H2 sont induites dans les processus de réparation tissulaire et de fibrogénèse en réponse à des œufs de *Schistosoma mansoni*, la réponse T_H1 induisant plutôt une réponse inflammatoire destructrice pour le tissu pulmonaire (Sandler et al., 2003).

L'implication des **LTreg** dans le développement de la fibrose semble controversée. Chez les patients atteints de ScS, il a été rapporté que les LTreg $CD4^+CD25^+$ et $CD8^+CD28^-$ du sang périphérique présentent des altérations qualitatives et quantitatives (Fenoglio et al., 2011). Antiga et coll. ont démontré une diminution de la présence de LTreg $FoxP3^+$ et de cellules TGF-β^+ et IL-10^+ dans la peau de patients atteints de ScS comparés à des sujets contrôles. De plus, la concentration sérique de TGF-β et d'IL-10 semble être diminuée chez les patients ScS (Antiga et al., 2010). Ceci peut en partie expliquer la perte de tolérance observée dans la ScS. Toutefois, une autre étude a montré que les LTreg étaient bien moins nombreux dans la peau de patients mais la proportion et l'activité des LTreg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ dans le sang périphérique n'étaient pas modifiées (Klein et al., 2011). Une autre étude montre que les LTreg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ sont augmentés dans le sang périphérique de patients atteints de ScS et que leur présence est corrélée à l'activité et la sévérité de la maladie (Slobodin et al., 2010). Il semblerait que la divergence des résultats obtenus entre ces différentes études soit due à la population de patients sélectionnés, les patients de l'étude de Slobodin et coll. étant traités par immunosuppresseurs. Plus récemment, Mathian et coll. ont décrit que la présence de LTreg activés était diminuée au début de la maladie et mais que les cellules $FoxP3^+$ (incluant des cellules T non régulatrices) étaient présentes en plus grand nombre au niveau périphérique chez les patients atteints de ScS diffuse et active. Toutefois, ces auteurs n'ont pas retrouvé de cellules $CD4^+FoxP3^+$ dans les biopsies de peau de patients et rapportent même que l'expression de l'ARNm de FoxP3 est diminuée dans la peau de patients ScS par rapport aux sujets sains (Mathian et al., 2012). Les LTreg étant producteurs de TGF-β, une cytokine pro-fibrotique, on peut toutefois noter que la diminution de leur présence dans la peau des patients nous indique que les LTreg ne sont pas la source de TGF-β dans la ScS. Chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique,

la présence des LTreg dans le sang périphérique ainsi que la capacité immunosuppressive sur les LT_H1 et LT_H2 des LTreg isolés de lavages broncho-alvéolaires sont diminuées par rapport à des sujets sains (Kotsianidis et al., 2009). L'implication précise des LTreg dans les processus fibrotiques reste à éclaircir.

La présence de **LT_H17** dans le sang périphérique est augmentée chez les patients atteints de ScS (Truchetet et al., 2011). De plus, la stimulation de PBMC de patients par un stimulus polyclonal (anticorps anti-CD3 et anti-CD28) induit une différenciation T_H17 plus importante et une différenciation T_H1 moins importante que celles des sujets sains (Fenoglio et al., 2011). De plus, l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-1, des cytokines induisant la différenciation des LT naïfs en LT_H17, sont toutes augmentées dans le sérum des patients atteints de ScS (Radstake et al., 2009).

La caractérisation des LT présents dans des biopsies de peau de patients atteints de ScS a été effectuée par Parel et coll. Dans les biopsies, ces auteurs ont démontré la présence de cellules « simple positives » (SP) $CD4^+$ et $CD8^+$, portant majoritairement un TCRα/β, mais également la présence de **cellules « double positives » (DP) $CD4^+/CD8^+$** exprimant la molécule CD4, CD8α et CD8β (CD8 en hétérodimère α/β). Les cellules SP $CD8^+$ et DP isolées de patients ScS produisent plus d'IL-4 et moins d'IFN-γ que des cellules saines, ce qui leur confère un profil pro-fibrotique. De plus, après stimulation par un anticorps anti-CD3, les cellules DP produisent plus d'IL-4 que les cellules SP. Ces cellules DP ont également la capacité d'aider les LB à produire des anticorps (rôle de LT auxiliaire) et peuvent aussi avoir une fonction cytolytique. Enfin, la présence de ces cellules DP est augmentée dans le sang de patients atteints de ScS par rapport à des sujets sains (Parel et al., 2007).

La présence d'une autre catégorie de LT auxiliaires produisant spécifiquement de l'IL-22 mais pas d'IL-17, d'IFN-γ ou d'IL-4, appelée **LT_H22** ($IL\text{-}17A^-/IL\text{-}22^+/IFN\text{-}\gamma^-/IL\text{-}4^-$), est également augmentée dans le sang périphérique de patients atteints de ScS. L'IL-22, une cytokine qui semble agir sur les cellules épithéliales, participe à la défense anti-microbienne et au maintien de l'homéostasie de l'épithélium (Wolk et al., 2010). Les patients ScS présentant une atteinte pulmonaire ont une proportion plus importante de cellules $CD4^+IL\text{-}17^+$ et surtout de $CD4^+IL\text{-}22^+$ par rapport aux sujets atteints de ScS sans atteinte pulmonaire, les cellules $CD4^+IL\text{-}4^+$ et $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ étant inchangées entre ces 2 catégories de patients (Truchetet et al., 2011). Ceci suggère que les LT_H22 seraient impliqués dans la fibrose pulmonaire. Une autre étude a démontré que l'expression de l'ARNm de l'IL-22 est augmentée dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains

(Mathian et al., 2012). Chez la souris, il a été montré que l'IL-22 et l'IL-17A agissent de façon synergique et jouent un rôle pro-fibrotique en réponse à la bléomycine alors qu'il semblerait que l'IL-22 présente seule permette de protéger la souris de la réaction inflammatoire pulmonaire induite par la bléomycine (Sonnenberg et al., 2010).

La majorité des LT possèdent un TCR composé d'une chaine α et d'une chaine β mais il existe une minorité de LT possédant un TCRγ/δ qui ont la particularité de ne pas recirculer et dont les fonctions ne sont pas tout à fait établies à ce jour. On distingue 2 catégories de **LTγ/δ** : certains sont présents dans les organes lymphoïdes et possèdent un répertoire TCR diversifié comme les LTα/β et les autres sont localisés au niveau des épithéliums (de la peau, du poumon et de l'appareil reproducteur) et présentent un TCR très peu diversifié. Ce TCR reconnaitrait des molécules exprimées en réponse à une infection mais non spécifiques d'un pathogène comme des protéines de choc thermique, des molécules de classe Ib (non conventionnelles) ou des phospholipides. Il a été montré que lors du développement des LTγ/δ dans le thymus, ils acquièrent la capacité de sécréter soit de l'IFN-γ ou de l'IL-17A suivant s'ils rencontrent ou non un antigène (Jensen et al., 2008). Dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris, il a été montré que les LTγ/δ produisent de l'IL-17A et de l'IL-17F seulement 24h après exposition à la bléomycine (Gasse et al., 2011). Chez les patients atteints de ScS, les LTγ/δ semblent être augmentés dans la peau et les poumons comparés à des sujets sains (Kahaleh et al., 1999). Il a été démontré que le surnageant de culture de LTγ/δ pouvait induire une prolifération des fibroblastes dermiques ainsi qu'une augmentation de la production de collagène dépendante du TGF-β et du bFGF, contrairement au surnageant de LTα/β qui n'a eu aucun effet (Ohtsuka, 2008).

Les LT peuvent également moduler la production de collagène par les fibroblastes dermiques par contact cellule-cellule. En effet, des préparations de membranes de LT_H1 mises en contact avec des fibroblastes dermiques isolés de patients ou de sujets sains diminuent la production de l'ARNm du collagène de type I et augmentent la production de l'ARNm de MMP-1 par un mécanisme dépendant de la présence d'IFN-γ (Chizzolini et al., 1998). L'IFN-γ est une cytokine ayant des propriétés anti-fibrotiques car il diminue leur production de collagène par les fibroblastes *in vitro*. De plus, les membranes de LT_H2 ont également la capacité d'inhiber la production de collagène par les fibroblastes isolés de sujets sains mais pas de patients atteints de ScS par la présence de TNF-α membranaire. Des LT_H1 ou LT_H2 co-cultivés avec des fibroblastes dermiques induisent une diminution de la production de

collagène et une augmentation de la production de MMP-1 lorsqu'ils sont activés par un anticorps anti-CD3 (Chizzolini et al., 2003).

Pour résumer, les LT auxiliaires semblent acquérir un profil T_H2 dans la ScS, comme en témoigne la production accrue de cytokines pro-fibrotiques comme l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL13. Toutefois, les LT_H2 semblent avoir un effet anti-fibrotique par contact direct sur des fibroblastes de sujets sains mais les fibroblastes isolés de patients échappent à cette régulation par les LT_H2. De plus, il semblerait que les LT_H17 ou les LTγ/δ participent à la fibrose par la production d'IL-17A, ce qui semble être controversé aujourd'hui pour les LT_H17 (Cf partie 4.4). Le rôle des LT_H22 reste encore à éclaircir mais il semblerait qu'ils sécrètent de l'IL-22, une cytokine qui agirait en synergie avec l'IL-17A dans la fibrose pulmonaire. L'activité et la présence des LTreg semblent être diminuées dans la ScS, ce qui reste également à confirmer par d'autres études.

4 Les cytokines impliquées dans la fibrose cutanée et pulmonaire

Les cytokines impliquées dans le développement de la fibrose cutanée et pulmonaire sont nombreuses. Leur rôle a été étudié dans le développement de la fibrose cutanée sur des fibroblastes dermiques isolés de sujets atteints de ScS et de sujets sains. Les souris transgéniques et knock-out (KO) pour ces protéines ont également permis d'étudier leur rôle dans divers modèles animaux de fibrose. Certaines de ces cytokines ont un rôle encore peu défini et font toujours actuellement l'objet de travaux. Le développement d'anticorps thérapeutiques permettant de moduler l'action des cytokines représente une des pistes importantes pour le traitement des patients atteints de ScS.

4.1 La famille de l'interleukine 1

La famille de l'IL-1 possède 11 membres : l'IL-1α, l'IL-1β, l'IL-1 récepteur antagoniste (IL-1Ra), l'IL-18, l'IL-33 et les protéines d'IL-1F5 à IL-1F10 (Figure 11). Tous les gènes codant pour les membres de cette famille sont situés sur un locus du chromosome 2, sauf l'IL-18 et l'IL-33. L'IL-18 et l'IL-1β sont caractérisées par la présence d'un domaine « pro- » qui doit être clivé par un assemblage de protéines appelé « inflammasome ». Ce clivage permet la génération de la forme mature et biologiquement active de ces cytokines qui pourront alors être sécrétées. L'IL-1α possède également un domaine pro- qui sera clivé par la calpaïne, une cystéine protéase, ce qui permet sa sécrétion. Toutefois, contrairement à l'IL-1β, ce clivage n'est pas nécessaire à l'activité biologique de l'IL-1α (Sims and Smith, 2010). L'IL-33 est produite sous forme active, elle ne nécessite pas de clivage. Il a même été montré que le clivage de l'IL-33 par des caspases apoptotiques (caspase-3 et -7) conduit à la diminution de son activité biologique (Lüthi et al., 2009).

Les molécules de la famille de l'IL-1 se lient à des récepteurs qui contiennent un domaine TIR intracellulaire (Toll/interleukin-1 receptor). L'IL-1α et β se lient à leur récepteur IL-1R1 induisant alors le recrutement de l'IL-1RAP. La formation de cet hétérodimère IL-1R1/IL-1RAP induit le recrutement de protéines de signalisation intracellulaires telles que MyD88, IRAK4 et TRAF6 conduisant à l'activation du facteur de transcription NFκB.

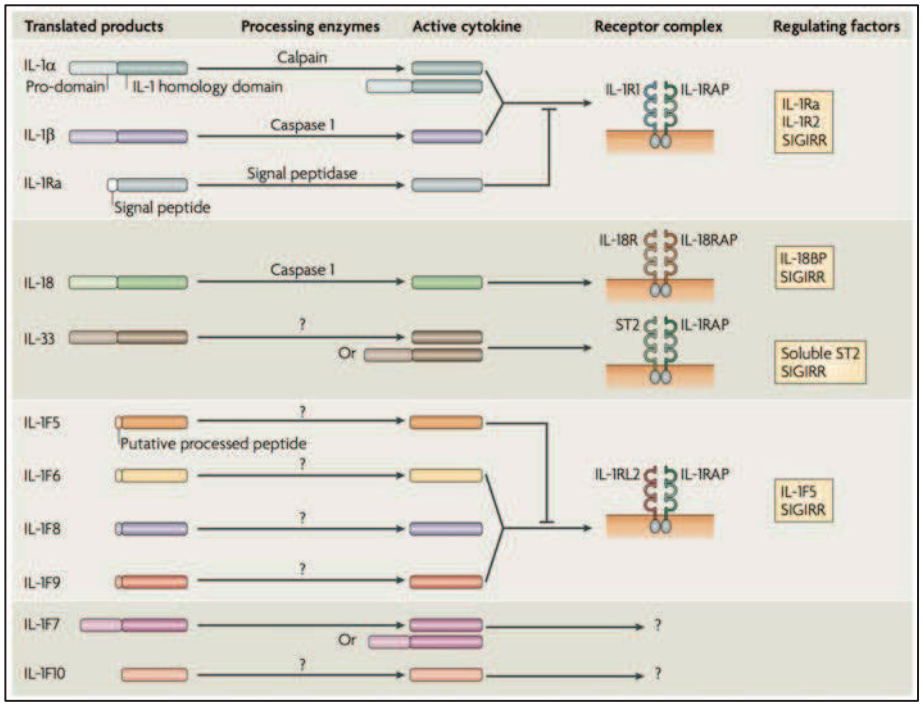

Figure 11 : Les différents membres de la famille de l'IL-1, leur processus de maturation, leurs récepteurs et leur mode de régulation. (Sims and Smith, 2010)

Bien que se liant au même récepteur et ayant donc une activité similaire, l'**IL-1α** et l'**IL-1β** présentent quelques différences. L'IL-1β est une cytokine sécrétée et circulante alors que l'IL-1α est associée à la membrane plasmique et agit localement (Kurt-Jones et al., 1985). De plus, l'IL-1β est principalement produite par les monocytes et les macrophages alors que l'IL-1α est exprimée par une plus grande diversité de cellules comme les kératinocytes ou les cellules endothéliales.

Ces 2 cytokines peuvent être bloquées de 2 façons différentes : soit par l'antagoniste naturel de l'IL-1R1, l'IL-1Ra, qui va donc empêcher la liaison de la cytokine sur son récepteur, soit par la production de l'IL-1R2, un autre récepteur ne possédant pas de domaine TIR intracellulaire et donc pas de capacité de signalisation intracellulaire. L'IL-1R2 peut se lier à l'IL-1RAP, l'empêchant donc de se lier à l'IL-1R1 et l'IL-1R2 peut également exister sous forme de récepteur soluble (Figure 12) (Sims and Smith, 2010). L'IL-1α et β ont des rôles pléiotropiques, elles sont produites lors de la réponse inflammatoire, permettent l'expression de molécules d'adhésion, activent les macrophages et semblent avoir un rôle dans la différenciation des LT_H17 et dans la production d'IL-17 par les LTγδ (Sutton et al., 2006, 2009).

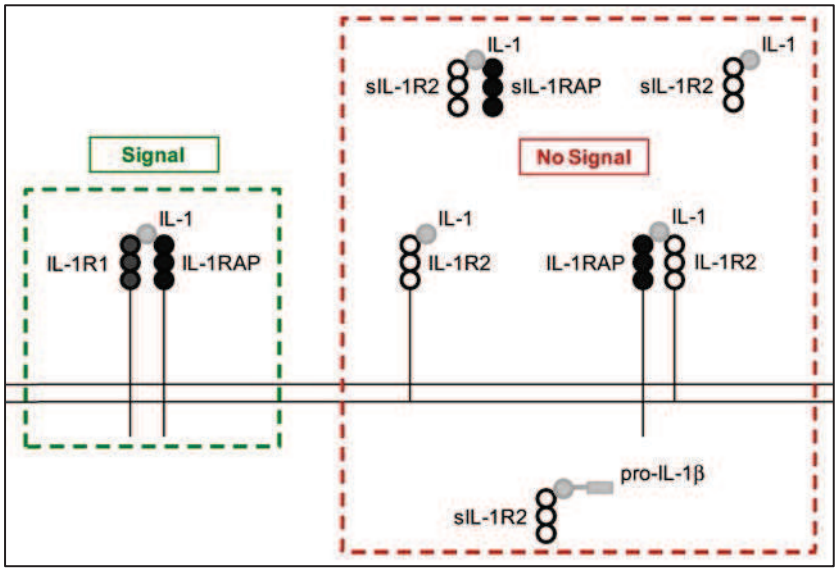

Figure 12 : Blocage de la signalisation de l'IL-1 par l'IL-1R2. (Peters et al., 2012)

L'**IL-33**, une cytokine dont la fonction a été découverte plus récemment, est le ligand du récepteur ST2 présent à la surface de les LT_H2. Le récepteur ST2 recrute l'IL-1RAP afin d'initier la transduction du signal (Schmitz et al., 2005). L'IL-33 peut être clivée par la calpaïne pour générer une forme active de la cytokine mais ce clivage n'est pas obligatoire car la forme complète de la cytokine peut se lier à son récepteur. Comme indiqué auparavant, l'IL-33 peut également être clivée par des caspases pro-apoptotiques, ce qui permet son inactivation lors de la mort de la cellule par apoptose. L'IL-33 n'a pas de rôle dans la différenciation des LT_H2 mais elle induit une production d'IL-5 et d'IL-13 par ces cellules en l'absence de stimulation antigénique (Guo et al., 2009).

4.1.1 L'IL-1α

Dans la ScS, il a été démontré que l'IL-1α est présente en plus grande quantité dans les biopsies de peau de patients comparés à des sujets sains et que l'IL-1α produite par les cellules épithéliales pouvait induire la production de CTGF par les fibroblastes (Aden et al., 2010). Les fibroblastes de peau de patients atteints de ScS expriment constitutivement de l'IL-1α, principalement localisée au niveau nucléaire, qui induit l'expression d'IL-6 et de PDGF (Kawaguchi, 1994; Kawaguchi et al., 1999). Il a en effet été démontré que l'IL-1α pouvait interagir avec la necdin. La necdin est une protéine nucléaire qui inhibe la croissance cellulaire et la production de collagène de type I. Sa liaison avec l'IL-1α reverse cet effet inhibiteur (Hu et al., 2003). De plus, Kawaguchi et coll. ont observé que l'inhibition de l'expression de l'IL-1α dans les fibroblastes de peau de patients atteints de ScS induit une

diminution de la prolifération cellulaire ainsi que de la production d'IL-6 et de collagène (Kawaguchi et al., 2004).

De façon étonnante, les fibroblastes de patients atteints de ScS produisent plus d'IL-1Ra intracellulaire lorsque les fibroblastes sur-expriment l'IL-1α ou en réponse à l'IL-1β et au TNF-α, ce qui suggère qu'il existe un contrôle de l'activité de l'IL-1α dans les fibroblastes (Higgins et al., 1999). Une autre étude de cette équipe a démontré que la surexpression de l'IL-1Ra intracellulaire par des fibroblastes normaux était capable d'induire leur différenciation en myofibroblastes (expression d'α-SMA) (Kanangat et al., 2006). Cependant, la concentration sérique d'IL-1α est inchangée chez les patients atteints de ScS comparés à des sujets contrôles, ce qui confirme bien son rôle au niveau local, voire même intracellulaire comme le suggèrent plusieurs études (Needleman et al., 1992).

4.1.2 L'IL-1β

La concentration d'IL-1β est augmentée dans le liquide broncho-alvéolaire et le sang de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains (Hussein et al., 2005). Il a également été montré que les fibroblastes dermiques de patients atteints de ScS sont plus sensibles à la stimulation par de faibles concentrations d'IL-1β que les fibroblastes sains, ce qui suggère une potentialisation des effets de l'IL-1β dans la ScS (Kawaguchi et al., 1993). De plus, les PBMC de patients atteints de ScS produisent plus d'oxyde nitrique (NO) en réponse à l'IL-1β comparés à des PBMC de sujets sains (Yamamoto et al., 1998).

Le rôle de l'IL-1β dans la fibrose pulmonaire a été évalué dans le modèle murin induit par la bléomycine. En effet, Gasse et coll. ont montré que les souris déficientes pour l'IL-1R1 et pour MyD88 développent une fibrose pulmonaire atténuée par rapport à des souris WT. De plus, l'administration intra-nasale d'IL-1β recombinante induit une fibrose pulmonaire proche de celle induite par la bléomycine (Figure 13). Enfin, l'administration d'IL-1Ra diminue l'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine ainsi que la production de TIMP-1 dans les LBA et les poumons des souris (Gasse et al., 2007). Dans un deuxième temps, Gasse et coll. ont également démontré que l'IL-1β et la bléomycine induisent l'expression d'IL-23/p19 et d'IL-17A et F dans les poumons de souris (Gasse et al., 2011). Les souris déficientes pour l'IL-17A développent une fibrose atténuée en réponse à l'IL-1β comparés à des souris WT ce qui nous indique que la fibrose pulmonaire induite par l'IL-1β est dépendante de l'IL-17A (Wilson et al., 2010). Le rôle de l'IL-17A dans la fibrose sera détaillé dans la partie 4.4.

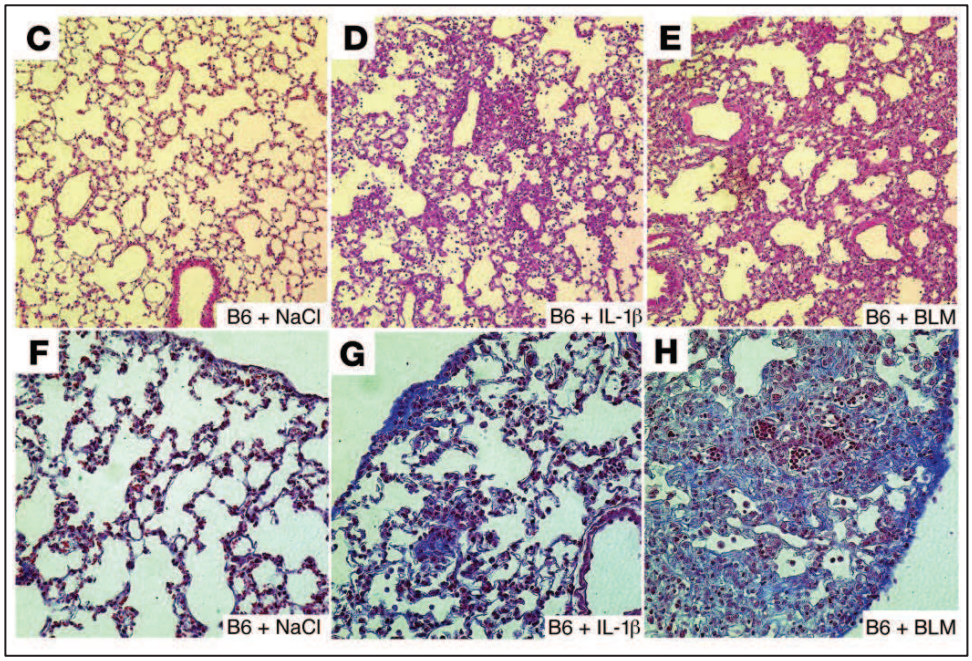

Figure 13 : Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 14 jours après instillation de NaCl, de bléomycine (15mg/kg) ou d'IL-1β recombinante (1µg/souris = 0,05mg/kg) *(400x). C à D : coloration hématoxyline/éosine. F à H : coloration CAB (Chromotrope Aniline Blue)* (Gasse et al., 2007)

4.1.3 L'IL-33

Plusieurs auteurs ont observé que les concentrations sériques d'IL-33 étaient augmentées chez les patients atteints de ScS et corrélées avec l'étendue de la fibrose cutanée, la sévérité de l'atteinte pulmonaire, la présence d'ulcères digitaux ainsi que dans les formes débutantes de la maladie (Manetti et al., 2011; Terras et al., 2013; Yanaba et al., 2011).

Peu d'études ont à ce jour exploré les mécanismes pouvant expliquer le rôle de l'IL-33 dans la ScS. Une étude a montré que l'IL-33 était moins exprimée par les cellules endothéliales de patients atteints de ScS en phase débutante comparés à des patients en phase tardive et des sujets sains (démontré par immunohistochimie et western blot). A l'inverse, l'expression de ST2 est augmentée dans les coupes histologiques de peau de patients en phase débutante et a été détectée à la surface de LB, LT, macrophages, polynucléaires éosinophiles et mastocytes infiltrant la peau (Manetti et al., 2010). Il est donc envisageable que l'IL-33 contenue dans les cellules endothéliales soit sécrétée chez les patients atteints de ScS et permette le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires au niveau de la peau des patients.

L'injection par voie sous cutanée d'IL-33 à des souris induit le recrutement de polynucléaires éosinophiles et de LT ainsi que la production de l'ARNm de l'IL-13. L'IL-33 entraîne la production de collagène de type III et VI et de TIMP-1. La fibrose induite par l'IL-33 est dépendante de l'IL-13 produite par les polynucléaires éosinophiles (Rankin et al., 2010). D'après ces deux études, l'IL-33 semble donc jouer un rôle pro-fibrotique au niveau cutané, ce qui doit être confirmé par d'autres expériences.

4.2 L'interleukine 6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique qui induit la réponse inflammatoire aigüe et régule la réponse immunitaire. Bien que possédant un rôle physiologique important, la production massive d'IL-6 joue un rôle déterminant dans le développement de certaines pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde (Scott et al., 2010). Plusieurs études ont rapporté que l'IL-6 pouvait également être impliquée dans la pathogénie de la ScS.

Les sources d'IL-6 dans la ScS peuvent être extrêmement diverses car la majorité des cellules nucléées sont capables de produire et sécréter de l'IL-6. Au niveau de la cellule cible, l'IL-6 se lie soit à l'IL-6Rm au niveau de la membrane plasmique soit à l'IL-6R soluble, le complexe IL-6/IL-6R pourra alors permettre la transmission du signal via la protéine gp130 (Figure 14). La gp130 induit ensuite la phosphorylation de JAK qui va permettre l'activation de facteurs de transcription tels que STAT-1 ou STAT-3.

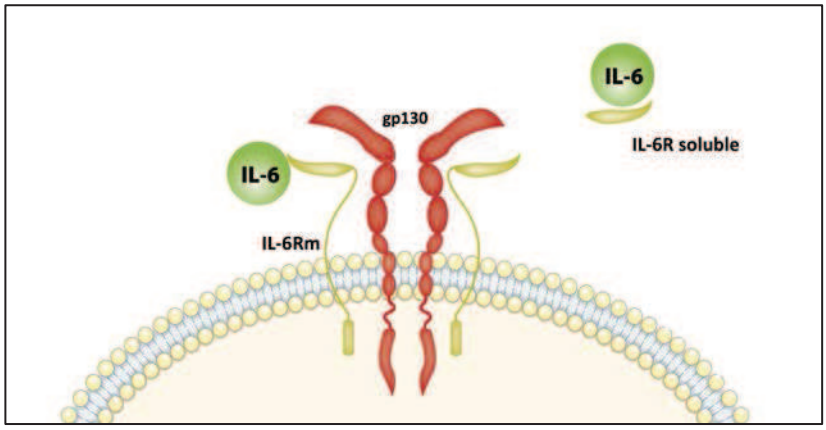

Figure 14 : Les interactions de l'IL-6 avec ses récepteurs.

L'implication de l'IL-6 dans la physiopathologie de la ScS est aujourd'hui bien démontrée. Les PBMCs isolés de patients atteints de ScS produisent spontanément plus d'IL-6 que les cellules de sujets sains et l'expression de l'IL-6R soluble a été corrélé à la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Hasegawa et al., 1999). Les fibroblastes de peau de patients atteints

de ScS produisent également plus d'IL-6 de manière spontanée par rapport aux sujets sains (Feghali et al., 1992; Kadono et al., 1998). Plusieurs études ont établi le lien entre la présence d'IL-6 et la production de collagène par les fibroblastes, ce qui pourrait expliquer la surexpression spontanée de collagène par les cellules isolées de patients atteints de ScS (Duncan and Berman, 1991; Zurita-Salinas et al., 1998). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-IL-6 diminue la production de collagène de type I par des fibroblastes dermiques de patients ScS (Kawaguchi et al., 1999). Il a enfin été montré que la stimulation de fibroblastes avec de l'IL-6 recombinante pouvait induire la production de collagène de type I ainsi que l'expression de l'α-SMA et de CTGF via la voie de signalisation JAK2/STAT3 et ERK (Khan et al., 2012).

La concentration d'IL-6 est plus élevée dans le sérum de patients atteints de ScS par rapport aux sujets sains et est corrélée à l'atteinte cutanée et pulmonaire (Khan et al., 2012; Sato et al., 2001; Scala et al., 2004). Les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de ScS contiennent également plus d'IL-6 que les sujets sains (Gudbjörnsson et al., 1994). Des marquages sur coupes histologiques ont également montré une augmentation de l'expression de l'IL-6 dans la peau de patients atteints de ScS (Khan et al., 2012).

De plus, les souris IL-$6^{-/-}$ développent une fibrose pulmonaire atténuée en réponse à la bléomycine (Saito et al., 2008). Dans le modèle de la réaction sclérodermique chronique du greffon contre l'hôte (graft-versus-host : GvHD-ScD), un modèle murin de ScS, l'utilisation d'un anticorps anti-IL-6R induit une diminution des symptômes cliniques et de la fibrose cutanée et pulmonaire ainsi qu'une augmentation de la présence de LTreg (Le Huu et al., 2012).

Chez l'homme, 2 patients atteints de ScS avec atteinte pulmonaire ont été traités avec du tocilizumab, un anticorps thérapeutique anti-IL-6R utilisé dans le traitement de la PR. Un traitement de six mois à raison d'une injection par mois a montré une diminution de l'épaisseur de la peau ainsi que de la fibrose cutanée (observée par coupes histologiques) mais n'a pas eu d'effet sur l'atteinte pulmonaire (Shima et al., 2010). Il semble aujourd'hui nécessaire d'évaluer l'intérêt thérapeutique du blocage de l'IL-6 dans des études contrôlées randomisées.

4.3 Les interleukines 4 et 13

L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines immuno-régulatrices produites par les LT_H2 et les *i*NKT (T_H2-like invariant natural killer T cell). Le gène de l'IL-4 est situé sur le chromosome 5, proche de celui de l'IL-13. Ces deux cytokines partagent beaucoup de fonctions en commun car elles se lient à la chaine α du récepteur à l'IL-4 (IL-4Rα) qui active le facteur de transcription STAT6(Figure 15). L'IL-4 participe à la commutation isotypique des LB (production d'IgE, IgG_1, IgG_{2A}, IgG_{2B}), augmente la production d'immunoglobulines et induit la différenciation de LT naïfs en LT_H2. L'IL-4 et l'IL-13 ont un rôle très important dans le développement de l'asthme, pathologie dans laquelle un anticorps ciblant l'IL13, le lebrikizumab, a montré son efficacité (Corren et al., 2011). Ces deux cytokines peuvent activer les fibroblastes dermiques car ils expriment l'IL-4Rα et l'IL-13Rα1 (Murata et al., 1998).

Les concentrations sériques d'IL-4 et d'IL-13 sont toutes les deux augmentées chez les patients atteints de ScS (Famularo et al., 1990; Hasegawa et al., 1997; Needleman et al., 1992).

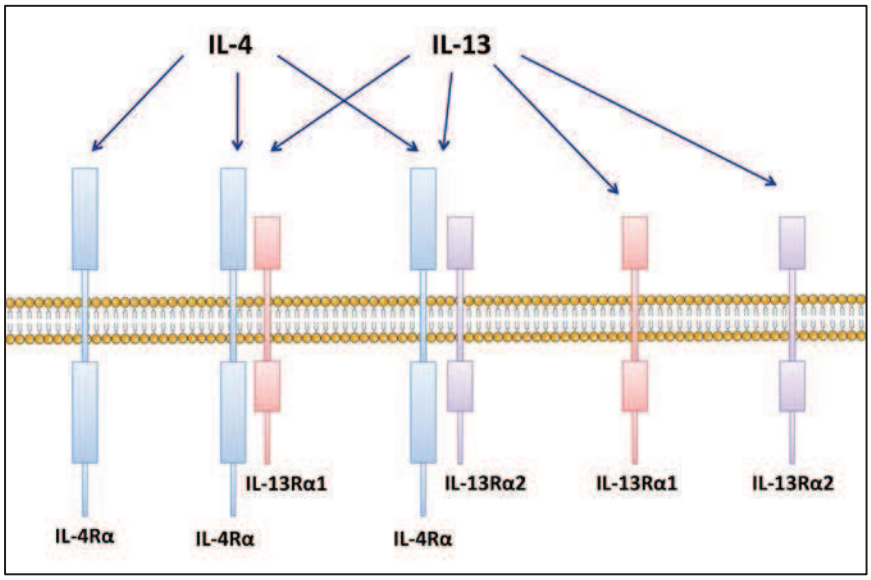

Figure 15 : Les récepteurs partagés par l'IL-4 et l'IL-13.

4.3.1 L'IL-4

L'expression d'IL-4 est augmentée dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS et il semblerait que l'IL-4 soit produite par les fibroblastes dermiques isolés de patients contrairement aux fibroblastes de sujets sains (Salmon-Ehr et al., 1996). La stimulation de fibroblastes dermiques avec de l'IL-4 augmente la production de collagène de type I et III ainsi que de fibronectine (Distler et al., 2006; Postlethwaite et al., 1992).

L'IL-4 semble avoir des liens particuliers avec le TGF-β1 car la stimulation de fibroblastes par l'IL-4 augmente l'expression de l'ARNm du TGF-β1. De plus, les souris IL-$4^{-/-}$ expriment moins d'ARNm du TGF-β1 dans leurs poumons que les souris IL-$4^{+/+}$ (Kodera et al., 2002).

Les souris IL-$4^{-/-}$ développent une fibrose pulmonaire atténuée en réponse à la bléomycine, même si la stimulation de fibroblastes pulmonaires avec de l'IL-4 n'a pas induit de prolifération cellulaire ni de synthèse d'α-SMA ou de collagène de type I (Huaux et al., 2003). Toutefois, dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC = fluorescein isothiocyanate), les souris IL-$4^{-/-}$ ne sont pas protégées de la fibrose (Kolodsick et al., 2004). Les souris IL-$4^{-/-}$ ne présentent pas non plus de modifications du développement de la fibrose cutanée induite par la bléomycine (Okamoto et al., 2012). Le traitement de souris TSK/+ par des anticorps anti-IL-4 permet de prévenir l'apparition de la fibrose cutanée chez ces souris (Ong et al., 1998).

4.3.2 L'IL-13

Certaines études suggèrent que l'IL-13 possède un rôle pro-fibrotique plus marqué que celui de l'IL-4. En effet, il a été démontré que l'IL-4 induisait la production de collagène de type I par des fibroblastes de façon plus transitoire que l'IL-13 (Oriente et al., 2000). De plus, il semblerait que les souris transgéniques surexprimant l'IL-13 développent une fibrose pulmonaire plus marquée que les souris surexprimant l'IL-4 (Rankin et al., 1996; Zhu et al., 1999).

L'IL-13 est fortement exprimée dans les poumons de souris après instillation de bléomycine et le blocage de l'IL-13 par des anticorps atténue la fibrose pulmonaire, contrairement au blocage de l'IL-4 qui n'a pas d'effet (résultat confirmé sur des souris IL-$4^{-/-}$) (Belperio et al., 2002).

Plus récemment, il a toutefois été démontré chez la souris que la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est indépendante de l'IL-13 et de l'IL-13Rα2 alors que la fibrose pulmonaire développée suite à l'administration d'œufs de *Schistosoma mansoni* est dépendente de l'IL-13 mais indépendante de l'IL-13Rα2 (Wilson et al., 2010). En effet, ces auteurs ont démontré que la production d'IL-13 suite à la stimulation des cellules de LBA ou de poumons par un anticorps anti-CD3 n'est détectable qu'à partir de 14 jours après administration de bléomycine, ce qui nous indique que la fibrose induite par la bléomycine se développe avant l'apparition d'une réponse LT_H2.

Toutefois, une étude réalisée par Fichtner-Feigl et coll. a publié des résultats contraires indiquant que l'inhibition de l'expression de l'IL-13Rα2 par siARN protège de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Fichtner-Feigl et al., 2006). De plus, la fibrose induite par le FITC est dépendante de l'IL-13 mais pas de l'IL-4 car les souris IL-$13^{-/-}$ sont protégées de l'apparition de la fibrose pulmonaire dans ce modèle (Kolodsick et al., 2004). Comme indiqué précédemment, la fibrose cutanée induite par l'IL-33 est totalement dépendante de l'IL-13 mais ne dépend pas de l'IL-4 (Rankin et al., 2010).

Chez les patients atteints de ScS, deux polymorphismes dans le gène de l'IL-13 et plusieurs polymorphismes dans le gène de l'IL-13Rα2 ont été associés avec le développement d'une fibrose cutanée diffuse (Granel et al., 2006a, 2006b). Récemment, il a été démontré que les LT $CD8^+$ isolés de patients atteints de ScS surexpriment spontanément GATA-3 qui induit une forte expression d'IL-13 (Medsger et al., 2011). De plus, ces LT $CD8^+$ co-cultivés avec des fibroblastes dermiques induisent la production de MEC par l'intermédiaire de l'IL-13 (Fuschiotti et al., 2013).

Il semblerait donc que chez la souris l'implication de l'IL-13 et de l'IL-4 dans le développement de la fibrose soit controversée dans les différents modèles animaux étudiés mais les expériences menées sur les cellules humaines indiqueraient tout de même que la fibrose dans la ScS est dépendante de la production de ces deux cytokines.

4.4 La famille de l'interleukine 17

A l'heure actuelle, six cytokines ont été identifiées dans la famille de l'IL-17 (IL-17A à IL-17F) et cinq récepteurs dans la famille de l'IL-17R (IL-17RA à IL-17RE). Les interactions ligand/récepteur des différents membres de cette famille sont représentées sur la figure 16. Le récepteur de l'IL-17D n'est pas connu tout comme le ligand de l'IL-17RD (Gaffen, 2009).

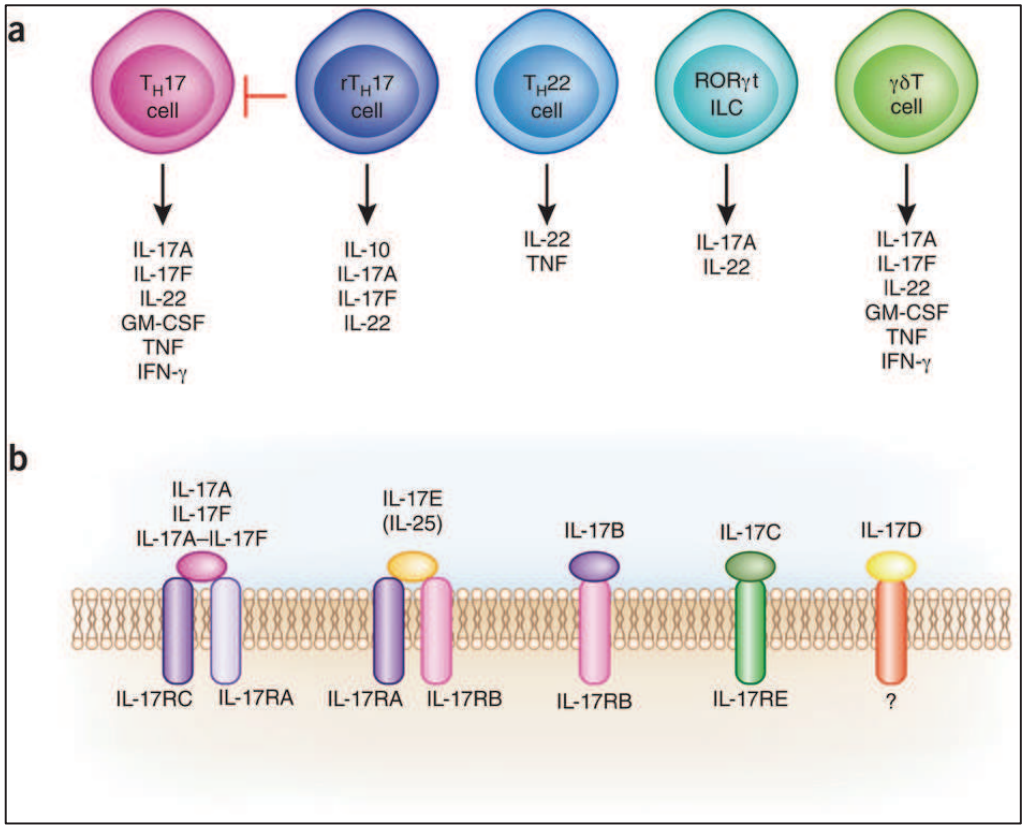

Figure 16 : Les cellules de la lignée lymphoïde productrices d'IL-17A et les interactions entre les cytokines de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs. (Jones et al., 2012)

L'**IL-17A** et l'**IL-17F** sont les cytokines les mieux connues de la famille de l'IL-17. Elles sont toutes les deux produites principalement par des cellules de l'immunité telles que les LT_H17, les LT_H17 régulateurs (LT_H17reg : un sous-type de LT_H17 produisant de l'IL-10 qui inhibe la différenciation des LT_H17) et les LTγδ. Elles peuvent s'assembler en homodimère IL-17A/A et IL-17F/F mais également en hétérodimère IL-17A/F. Toutes ces formes partagent le même récepteur, un hétérodimère composé de l'IL-17RA et l'IL-17RC(Figure n°). Il semblerait toutefois que l'IL-17A et l'IL-17F possèdent des effets biologiques distincts, l'IL-17F semble être peu impliquée dans l'auto-immunité contrairement à l'IL-17A. Ces observations ont été faites suite à des expériences réalisées sur des souris IL-$17A^{-/-}$ et IL-$17F^{-/-}$. Il a en effet été démontré que, contrairement à l'IL-17A, l'IL-17F ne serait pas impliquée dans le développement de maladies auto-immunes chez la souris telles que la polyarthrite induite par le collagène de type II ou dans un modèle de sclérose en plaque, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Au contraire, l'IL-17A et F sont toutes les deux importantes dans la défense contre des infections bactériennes induites par *Staphylococcus aureus* ou *Citrobacter rodentium* car elles induisent la production de β-défensines (Ishigame et al., 2009; Yang et al., 2008).

L'**IL-17E**, également appelée IL-25, est une cytokine qui semble induire la différenciation des LT_H2. De plus, elle pourrait inhiber la différenciation des LT_H17 en induisant la production d'IL-13 par les cellules dendritiques et en inhibant la production d'IL-23 par les macrophages. L'IL-17E se lie à un hétérorécepteur composé de l'IL-17RA et IL-17RB (Gaffen, 2009).

Chez les patients atteints de ScS, les concentrations d'IL-17A sont augmentées comparés à des sujets sains, contrairement à L'IL-17F qui reste inchangée. Plusieurs études ont montré que les concentrations sériques d'IL-17A sont inversement proportionnelles à l'atteinte cutanée évaluée par le score de Rodnan modifié et sont augmentées dans les phases précoces de la maladie (Kurasawa et al., 2000; Murata et al., 2008; Nakashima et al., 2012). Gourh et coll. ont toutefois observé une diminution de la concentration en IL-17A chez les pateints atteints de ScS par rapport aux sujets sains, sans préciser le type d'atteinte ou la durée de la maladie (Gourh et al., 2009).

L'ARNm de l'IL-17A est surexprimé dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains, contrairement à l'IL-17F dont l'ARNm n'a pas été détecté. De façon étonnante, l'expression de l'IL-17RA par les fibroblastes de patients est diminuée due à l'activation intrinsèque de ces fibroblastes par le TGF-β1. Des coupes histologiques de peau de souris révèlent que l'IL-17RA est plus exprimé par les fibroblastes dermiques des souris contrôles que ceux des souris injectées avec de la bléomycine où l'IL-17RA n'a pas été détecté. La stimulation de fibroblastes dermiques de sujets sains par de l'IL-17A diminue la production de CTGF et de collagène de type I, l'IL-17F n'ayant pas eu d'effet sur ces deux protéines. L'IL-17A n'ayant affectée que l'expression protéique du collagène de type I mais pas l'expression de son ARNm, ces auteurs ont également démontré que l'IL-17A pourrait diminuer l'expression du collagène de type I par l'augmentation de l'expression de miR-129-5p (Nakashima et al., 2012).

Une autre étude a rapporté que les LT_H17 étaient plus nombreux dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS par rapport aux sujets sains. Toutefois, ces auteurs ont mis en évidence que les mastocytes étaient les cellules qui produisaient majoritairement l'IL-17A dans la peau des patients. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages étaient également marqués positivement pour l'IL-17A dans ces coupes histologiques. De plus, ces cellules IL-17A+ sont situées à proximité des myofibroblastes, cellules exprimant fortement l'α-SMA. *In vitro*, l'IL-17A bloque partiellement l'expression d'α-SMA induite par le TGF-β1 et augmente la production de MMP-1, sans avoir d'effet sur l'expression du collagène de

type I. Ces auteurs ont également établi que la présence de cellules IL-17^{+} dans la peau était inversement corrélée à l'épaisseur de la peau des patients, évaluée par le score de Rodnan modifié (Truchetet et al., 2013).

Il a également été montré que l'IL-17A induit une augmentation de l'expression d'ICAM-1 à la surface des fibroblastes ainsi qu'une production accrue d'IL-6 et d'IL-8 (Kurasawa et al., 2000; Yao et al., 1995).

Ces études effectuées sur des prélèvements de peau de patients atteints de ScS semblent suggérer que l'IL-17A aurait un rôle protecteur sur le développement de la fibrose cutanée. Toutefois, des études réalisées chez la souris semblent indiquer le contraire.

Chez la souris, les concentrations sériques d'IL-17A sont augmentées après administration sous-cutanée de bléomycine (Yoshizaki et al., 2010). Les souris IL-17$^{-/-}$ développent une fibrose cutanée atténuée en réponse à la bléomycine, contrairement aux souris IL-4$^{-/-}$ ou IFN-$\gamma^{-/-}$ qui ne sont pas protégées. De plus, ces auteurs ont observé une diminution des infiltrats de cellules inflammatoires au niveau de la peau. La stimulation d'une lignée de fibroblastes de souris avec de l'IL-17A a induit une augmentation de la production de collagène soluble, de TGF-β1 et de CTGF. Le croisement de ces souris IL-17$^{-/-}$ avec des souris TSK/+ confirme que la fibrose cutanée est diminuée en l'absence d'IL-17A dans ce deuxième modèle animal (Okamoto et al., 2012).

La stimulation d'une lignée de cellules épithéliales pulmonaires de souris (MLE-12) avec de l'IL-17A induit une production de collagène dépendante du TGF-β1. Il est intéressant de noter que ces cellules ont étés stimulées par toutes les cytokines de famille de l'IL-17 et que seule l'IL-17A a eu un effet sur la production de collagène. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-IL-17A protège les souris de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou la silice (Mi et al., 2011).

D'autres études ont également démontré que l'IL-17A était impliquée dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Premièrement, Wilson et coll. ont montré que l'IL-17A et l'IL-1β étaient augmentées dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique comparés à des sujets sains. Ils ont ensuite isolé des cellules de poumon, de LBA ou de ganglions lymphatiques drainant les poumons de souris ayant été instillées par de la bléomycine et sacrifiées 2, 4, 7, 14 ou 21 jours plus tard. Stimulées ex-vivo avec un anticorps anti-CD3, ces cellules ont sécrété de l'IL-17A (J7, J14 et J21), de l'IFN-γ (J4, J7, J14 et J21) et de l'IL-13 (J7, J14 et surtout J21). Ces auteurs ont également montré

que la production d'IL-17A était augmentée en l'absence d'IL-10 (souris IL-$10^{-/-}$) et très fortement diminuée en absence d'IL-12/23p40 (sous unité commune à l'IL-12 et l'IL-23). Par ailleurs, les souris IL-$17A^{-/-}$ développent une fibrose pulmonaire atténuée comparées à des souris WT. En l'absence d'IL-10 et d'IL-17A (IL-$10^{-/-}$IL-$17A^{-/-}$), les souris présentent une fibrose pulmonaire moins importante que les souris IL-$10^{-/-}$ ce qui nous indique que la fibrose exacerbée des souris IL-$10^{-/-}$ est dépendante de l'IL-17A. La fibrose induite par instillation intranasale d'IL-1β est également dépendante de l'IL-17A. Ces auteurs ont aussi montré que l'instillation d'IL-17A recombinante induit une fibrose pulmonaire dépendante du TGF-β1, tout comme la fibrose induite par la bléomycine(Figure 17) (Wilson et al., 2010). Cette étude suggère donc un rôle tardif de l'IL-17A sur la fibrose induite par la bléomycine mais ne donne aucune information concernant l'implication de l'IL-17A dans la phase inflammatoire qui précède la fibrose dans ce modèle ni sur l'origine cellulaire de l'IL-17A.

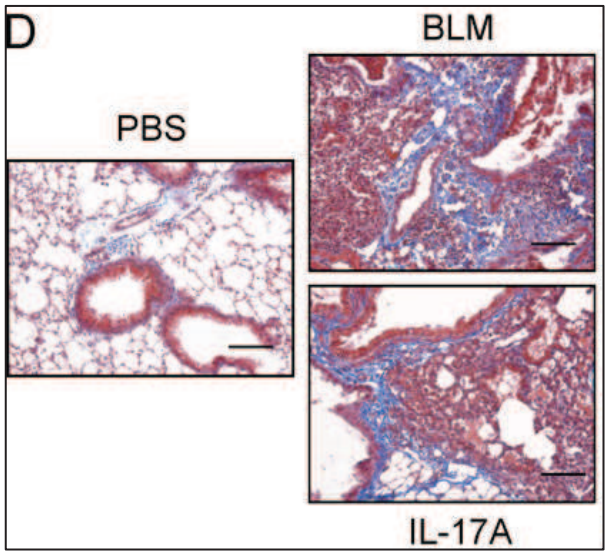

Figure 17 : Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 7 jours après instillation de PBS, de bléomycine (0,15unités/souris) ou d'IL-17A recombinante (1µg/souris) *(200x). Coloration Trichrome de Masson*. (Wilson et al., 2010)

Une deuxième étude réalisée par Gasse et coll. indique cette fois que l'inflammation induite par la bléomycine 24 heures après instillation est dépendante de l'IL-23p19 (sous unité spécifique de l'IL-23) et de la signalisation par l'IL-17RA. L'utilisation d'anticorps anti-IL-17A et anti-IL-17F montre que l'inflammation et le remodelage tissulaire après administration de bléomycine sont dépendants de l'IL-17A mais pas de l'IL-17F. De plus, ces auteurs ont identifié que l'IL-17A et F sont majoritairement produites par les LTγδ, très peu par les LTαβ et pas du tout par les *i*NKT 24 heures après l'administration de bléomycine.

Enfin, des souris traitées par un anticorps anti-IL-17A développent une fibrose pulmonaire atténuée tout comme les souris IL-23p19$^{-/-}$ (Gasse et al., 2011). Cette étude apporte donc des informations complémentaires à la première, identifiant l'IL-17A comme un acteur précoce du développement de la fibrose dans ce modèle.

Il semblerait donc que l'IL-17A module différemment la fibrose chez l'homme et chez la souris. En effet, ces études indiquent que l'IL-17A agit comme une cytokine pro-fibrotique dans divers modèles animaux de fibrose cutanée et pulmonaire alors qu'elle semble plutôt réguler négativement la fibrose cutanée chez les patients atteints de ScS. L'utilisation d'anticorps anti-IL-17A chez patients doit donc être considérée avec prudence. On peut toutefois remarquer que peu de données sont disponibles sur l'implication de l'IL-17A sur la fibrose pulmonaire chez l'homme. Les cytokines de la famille de l'IL-17 doivent donc encore faire l'objet d'études approfondies afin de déterminer si leur modulation pourrait avoir un intérêt thérapeutique pour les patients.

4.5 Le « transforming growth factor-β1 »

La famille du TGF-β inclut 3 membres qui possèdent des structures et des fonctions similaires : le TGF-β1, -β2 et -β3. Le TGF-β1 est une cytokine pléiotropique jouant un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires mais également dans les processus de réparation tissulaire et de fibrogénèse. Elle est produite sous forme de complexe comprenant trois protéines : le TGF-β1 (forme bioactive), la protéine de latence LAP-β1 (latency-associated peptide-β1) et la protéine de liaison à la MEC LTBP1 (latent TGF-β binding protein-1). Le TGF-β1 lié à LAP-β1 de façon non covalente ne peut pas se lier à son récepteur. Ces deux protéines sont liées à la LTBP1 qui est ancrée à la MEC de façon covalente. Cette liaison à la MEC suggère que celle-ci pourrait contrôler l'activité du TGF-β1 et constituer un « compartiment de réserve » de cette cytokine sous sa forme latente. Il a été montré que les intégrines et la thrombospondine-1 étaient capables d'activer le TGF-β1 latent in vivo (Crawford et al., 1998; Munger et al., 1999). En effet, la protéine LAP-β contient un motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) reconnu par les intégrines contenant une partie α_V dont $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, et $\alpha_V\beta_8$ (Asano et al., 2005a). Des études plus récentes démontrent même que le TGF-β1 peut être activé par des ROS ou des MMP (Zhao et al., 2008). (Figure 18)

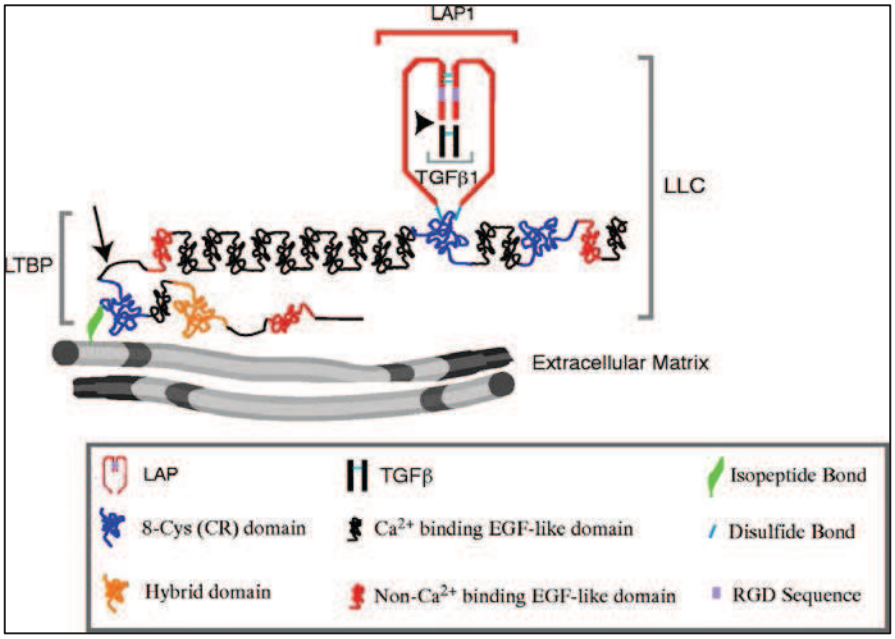

Figure 18 : La forme latente du TGF-β1. (Annes et al., 2003)

Le TGF-β1 est produit par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes et les fibroblastes. Après activation, la forme active du TGF-β1 se lie à son récepteur composé de TGF-βRI/TGF-βRII ce qui provoque une rotation de ces molécules. Ceci permet la phosphorylation de TGF-βRI par le TGF-βRII, qui lui est constitutivement auto-phosphorylé. TGF-βRI phosphoryle SMAD2/3 qui se complexe à SMAD4. Ce complexe est alors transloqué dans le noyau et se lie à d'autres cofacteurs comme p300 afin d'induire la transcription de gènes dont ceux codant pour les protéines de la MEC. SMAD7 est un SMAD inhibiteur induit par le TGF-β1 qui va se lier au TGF-βRI ce qui va interférer avec la phosphorylation de SMAD2/3 (Hayashi et al., 1997). SMAD7 peut également recruter SMURF, une ubiquitine ligase, au niveau du TGF-βRI ce qui va conduire à sa dégradation par le protéasome (Nakao et al., 1997). Le TGF-β1 peut également induire des réponses cellulaires comme la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : epithelial–mesenchymal transition) via des mécanismes indépendants des protéines SMAD impliquant les kinases JNK, p38, PI3K, c-Abl et TAK1 (Varga and Pasche, 2009). (Figure 19)

La durée de l'effet du TGF-β1 est régulée par l'endocytose des complexes TGF-β1/TGF-β1R dans des endosomes. Si ces complexes sont endocytés dans des endosomes bordés de cavéoline, la voie inhibitrice SMAD7 sera induite. Il a été démontré que l'expression de la cavéoline-1 est moins importante dans les biopsies de peau et de poumon ainsi que dans les fibroblastes cutanés des patients atteints de ScS par rapport aux sujets sains. De plus, les souris cavéoline-$1^{-/-}$ développent une fibrose cutanée et pulmonaire de manière

spontanée (Del Galdo et al., 2008). La deuxième voie de régulation du TGF-β1 s'effectue par endocytose dépendante de la clathrine, une protéine impliquée dans l'invagination de la membrane et la formation de vésicules, dans des endosomes contenant la protéine EEA-1 (early endosome antigen-1). Dans ces endosomes, riches en protéines d'ancrage pour SMAD2, la voie de signalisation du TGF-β1 est activée (Di Guglielmo et al., 2003).

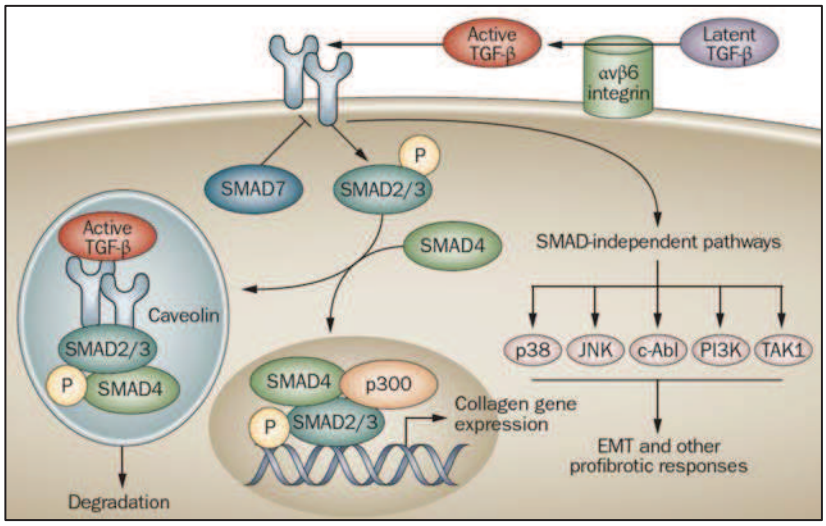

Figure 19 : La voie de signalisation du TGF-β.

c-Abl, c-Abelson; EMT, epithelial–mesenchymal transition; JNK, Jun N-terminal kinase; PI3K, phosphoinositide 3 kinase; TAK1, TGF-β-activated kinase 1. (Varga and Pasche, 2009)

Le TGF-β1 est responsable d'une surproduction de MEC en cas de synthèse excessive de TGF-β1, de dérégulation du trafic intracellulaire du TGF-β1R ou d'une perturbation des protéines de signalisation SMAD.

Il a été montré que le TGF-β1 pouvait induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et augmenter la production de collagène de type I, III, VI, VII et X, de fibronectine et de protéglycanes (Asano et al., 2004c). Chez les patients atteints de ScS, l'expression de TGF-β1 latent et actif est augmentée par les PBMC comparés à des sujets sains (Hasegawa et al., 2004). Les fibroblastes dermiques de patients ne sécrètent pas plus de TGF-β1 mais ils expriment plus de TGF-β1RI et TGF-β1RII ainsi que d'intégrine $\alpha_V\beta_5$ ce qui peut conduire à une suractivation de TGF-β1 latent (Asano et al., 2006a; Ihn et al., 2001). Les patients atteints de ScS présentent également une modification de la régulation négative exercée par SMAD7. En effet, l'expression de SMAD7 est diminuée dans les biopsies de peau de patients ainsi que dans les fibroblastes cutanés, à l'état basal et après stimulation par du TGF-β1 par rapport aux sujets sains. A l'inverse, la phosphorylation de SMAD2/3 est plus

importante dans les fibroblastes de patients après stimulation par du TGF-β1 (Dong et al., 2002).

Plus récemment, il a également été démontré que la stimulation de fibroblastes dermiques par du TGF-β1 active la kinase JAK2 qui serait également responsable d'une surexpression de collagène dans les cellules isolées de patients. L'inhibition de JAK2 restaure une production normale de collagène par les fibroblastes isolés de patients mais n'affecte pas la production de collagène de cellules saines. Dans les modèles murins de fibrose cutanée induite par la bléomycine et TSK/+, l'inhibition de JAK2 protège du développement de la fibrose (Dees et al., 2012).

De plus, le blocage du TGF-β1 par des anticorps neutralisants permet de prévenir l'induction de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et l'IL-17A (Wilson et al., 2010).

Toutefois, une étude clinique randomisée, multicentrique, réalisée contre placébo pour évaluer l'effet d'un anticorps anti-TGF-β1 neutralisant (CAT-192) n'a pas montré d'efficacité sur la fibrose cutanée évaluée par le score de Rodnan modifié (Denton et al., 2007). D'autres pistes d'inhibition de la voie de signalisation du TGF-β1 sont envisagées comme l'inhibition de SMAD3 ou encore l'utilisation d'anticorps anti-TGF-βR (Hasegawa and Takehara, 2012).

4.6 CCL2/MCP-1

Plusieurs chémokines ont été incriminées dans le développement de la ScS mais il semblerait que CCL2 soit la plus importante. CCL2 ou MCP-1 (Monocyte chimoattractant protein 1) est produite principalement par les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales et permet le recrutement et l'activation de monocytes et de LT. Les fibroblastes de patients atteints de ScS expriment plus de CCL2 que les fibroblastes de sujets sains, ce qui augmente la capacité chémoattractante des fibroblastes de patients (Distler et al., 2001). En plus de son activité « traditionnelle » de chémokine, CCL2 semble également stimuler la production de collagène par des fibroblastes. En effet, il a été démontré que des fibroblastes pulmonaires de rat stimulés par CCL2 produisent plus de collagène au bout de 48h par un mécanisme totalement dépendant de la production de TGF-β1 (Gharaee-Kermani et al., 1996). Cet effet n'a pas été retrouvé sur les fibroblastes dermiques isolés de patients ScS ou de sujets sains (Distler et al., 2001). Une autre étude contredit ces derniers résultats en démontrant par northern blot que CCL2 pouvait induire la production de collagène de type I après 24 heures de stimulation (Yamamoto et al., 2001b). Il semblerait que CCL2 puisse

induire la différenciation de LT producteurs d'IL-4 (Distler et al., 2006). CCR2, le récepteur de CCL2, est surexprimé dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS cutanée diffuse en phase active. CCR2 est également surexprimé à la surface des myofibroblastes et semble corrélé à l'expression de l'α-SMA (Carulli et al., 2005).

Chez la souris, l'administration sous-cutanée de bléomycine induit une surexpression de CCL2 et CCR2. L'administration d'un anticorps anti-CCL2 à ces souris diminue la fibrose cutanée et l'expression du collagène de type I dans la peau. Cette étude rapporte également que la stimulation de fibroblastes dermiques humains par CCL2 augmente l'expression du collagène de type I mais ne modifie pas l'expression de la fibronectine (Yamamoto and Nishioka, 2003).

4.7 BAFF et APRIL

4.7.1 Structure et expression de BAFF et APRIL

BAFF est une cytokine de la superfamille du TNF-α. Il s'agit d'une protéine de 285 acides aminés, riche en feuillets β, présente physiologiquement sous forme de trimères dont l'architecture est stabilisée par la présence de deux atomes de magnésium complexés au centre de la structure (Mackay et al., 2003; Schneider and Tschopp, 2003).

Comme les autres cytokines de la famille du TNF-α, BAFF est une protéine transmembranaire de type II pouvant être sécrétée par clivage protéolytique. Elle possède en effet un site de clivage sensible aux protéases telles que la furine ou la subtilisine (Schneider et al., 1999).

La boucle reliant les feuillets D et E est particulièrement longue et forme un creux à l'interface entre les sous-unités. Liu et coll. (2002) ont montré que cette boucle D-E n'est pas indispensable à la formation de trimères ou à l'interaction entre BAFF et ses récepteurs. En revanche, elle permet l'arrangement de BAFF en structures regroupant 60 sous-unités, soit 20 trimères, appelées BAFF-60mer qui semblent induire une signalisation plus importante via les différents récepteurs (Bossen et al., 2008; Liu et al., 2002). (Figure 20)

BAFF peut également former des hétérotrimères avec un variant appelé delta-BAFF (ΔBAFF) qui est issu d'un épissage alternatif de l'ARNm de BAFF permettant d'éliminer l'exon 3. Ces hétérotrimères ne peuvent plus être clivés et sont inactifs à la surface des cellules. Il s'agit donc d'un mécanisme post-transcriptionnel de régulation négative de la synthèse de BAFF (Gavin et al., 2003, 2005).

L'expression de BAFF peut être induite par différentes cytokines telles que les IFN-α et -β et l'IL-10, ou l'activation de TLR4 et TLR9 (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001). Il existe également des régulateurs négatifs de l'expression de BAFF : en cas de déficience du gène AIRE, on observe une augmentation de la production de BAFF par les cellules myéloïdes après stimulation par l'IFN-γ (Lindh et al., 2008). Le PMA (phorbol myristate acetate) inhibe la production de BAFF (Shu et al., 1999).

Une autre cytokine de la même famille, appelée « a proliferation inducing ligand » ou **APRIL**, présente de fortes homologies avec BAFF. Il existe 4 variants d'APRIL dus à des épissages alternatifs sans que l'on connaisse leurs différences fonctionnelles (Daridon et al., 2008). Le gène codant pour APRIL est situé à côté de celui d'un autre ligand de la superfamille du TNF-α appelé « TNF-related weak inducer of apoptosis » ou TWEAK. Un épissage intergènique peut mettre en contact l'exon 6 de TWEAK avec l'exon 2 d'APRIL, générant une protéine de fusion appelée TWE-PRIL (Kolfschoten et al., 2003; Pradet-Balade et al., 2002). APRIL est une protéine de 17 kDa qui forme des trimères comme toutes les protéines de la famille du TNF-α. Il s'agit d'homotrimères ou d'hétérotrimères car APRIL peut s'associer avec BAFF (Daridon et al., 2008). Sa particularité est de n'être exprimée que sous forme soluble en raison du clivage de son domaine transmembranaire dans l'appareil de Golgi alors que TWE-PRIL existe sous forme membranaire et partage les mêmes récepteurs qu'APRIL.

Les premières études avaient montré que BAFF et APRIL sont principalement produites par les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques folliculaires (Nardelli et al., 2001). Les LT activés, les cellules B leucémiques (leucémie lymphoïde chronique = LLC) et les LB de glandes salivaires au cours du syndrome de Sjögren synthétisent également BAFF (Daridon et al., 2007; Huard et al., 2004; Kern et al., 2004). D'autres études ont montré que des cellules non immunes étaient également capables de libérer BAFF : les cellules épithéliales salivaires au cours du syndrome de Sjögren, les synoviocytes rhumatoïdes, les astrocytes, les ostéoclastes de patients atteints de myélome, les adipocytes, les cytotrophoblastes placentaires (Abe et al., 2006; Alsaleh et al., 2007, 2011; Ittah et al., 2006; Krumbholz et al., 2005; Langat et al., 2008; Pelekanou et al., 2008). La production de BAFF favorise l'activation et la survie des LB en dehors des organes lymphoïdes.

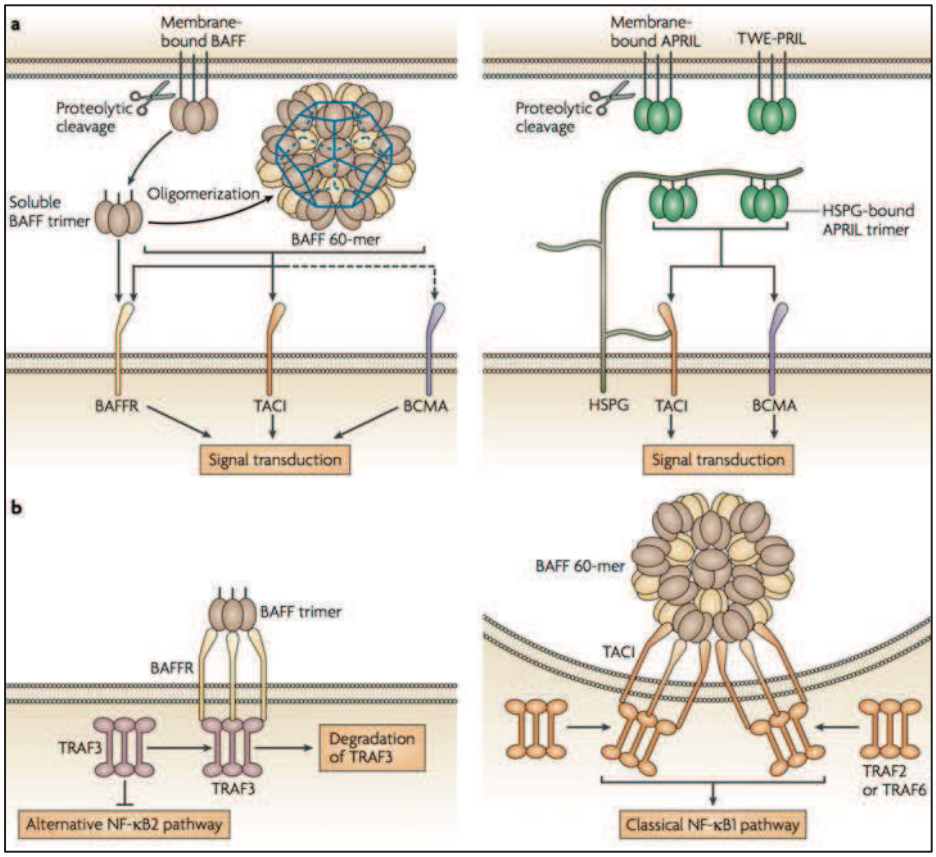

Figure 20 : Structure de BAFF et APRIL et liaison à leurs récepteurs (Mackay and Schneider, 2009)

4.7.2 Les récepteurs de BAFF et APRIL

BAFF et APRIL interagissent avec des récepteurs exprimés essentiellement par les LB (Darce et al., 2007; Ng et al., 2004). Le « B cell maturation antigen » ou BCMA et le « transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor » ou TACI lient BAFF et APRIL. BAFF est le seul ligand du « BAFF Receptor » ou BAFF-R. APRIL interagit également avec les chaines polyosidiques des héparanes sulfates (HSPG) (Huard et al., 2008).

Ces trois récepteurs ont la particularité de ne pas posséder de « death domain », domaine habituellement présent dans cette famille de récepteurs. En revanche, ils interagissent tous avec un « TNF receptor associated factor » ou TRAF. Bien qu'ayant un certain nombre de caractères communs, ces récepteurs diffèrent par de nombreuses propriétés qui rendent compte de la complexité du système BAFF/BAFF récepteur.

En ce qui concerne leur expression cellulaire, **BCMA** est exprimé préférentiellement par les plasmocytes de la rate, des glandes salivaires et de la moelle osseuse où il favorise leur survie ; il a été également retrouvé à la surface des LB mémoires des glandes salivaires et des

LB de centres germinatifs (Gras et al., 1995). Les souris invalidées pour BCMA ne présentent que peu d'anomalies du compartiment lymphocytaire hormis une diminution de la durée de vie des plasmocytes dans la moelle osseuse (O'Connor et al., 2004). BCMA se lie avec une plus grande affinité à APRIL qu'à BAFF et ne reconnaît pas la conformation BAFF-60mer.

BAFF-R est exprimé par tous les LB à l'exception des plasmocytes de la moelle osseuse. Son expression est faible sur les LB immatures nouvellement constitués et augmente au fur et à mesure de la maturation de ces cellules (Darce et al., 2007). BAFF-R est aussi présent sur les LT activés et de manière constitutive sur les LT régulateurs (Ng et al., 2004; Ye et al., 2004). La stimulation de BAFF-R mais pas de TACI à la surface des LT induit la prolifération de ces cellules (Ng et al., 2004). La modulation de l'expression de BAFF-R est peu connue. L'activation du BCR impliquant la voie de la PI3 kinase/Akt ou l'activation de TLR9 augmentent l'expression de BAFF-R rendant ainsi les LB plus sensibles à l'action de BAFF (Henley et al., 2008; Ng et al., 2006). L'expression de BAFF-R est diminuée au cours du lupus érythémateux disséminé ou du syndrôme de Sjögren (Sellam et al., 2007). Cette diminution pourrait être due à l'internalisation du complexe BAFF-BAFF-R (Fu et al., 2009).

TACI existe sous forme de 2 variants résultant d'un épissage alternatif. Il est exprimé par les LB mémoires $CD27^+$ mais il a été également identifié sur des plasmocytes de glandes salivaires et de la moelle osseuse ainsi que sur une population de LB naïfs du sang et des glandes salivaires (Groom et al., 2007; Ng et al., 2004). TACI est aussi exprimé par les monocytes et les cellules dendritiques ce qui indique que BAFF et APRIL pourraient jouer un rôle dans d'autres types cellulaires que les LB.

L'étude des voies de signalisation induites par l'interaction de BAFF avec ses récepteurs est complexe car cette molécule peut se lier à trois récepteurs distincts et les différentes cellules cibles peuvent exprimer un ou plusieurs récepteurs.

La stimulation de BAFF-R active essentiellement la voie NF-kB2 ainsi que la voie de la PI3kinase. Ces deux voies sont indispensables à la survie des LB. Les souris déficientes en BAFF ou BAFF-R montrent un arrêt de maturation au stade transitionnel T1 (pas de LB T2 ni de LB de la zone marginale)(Figure 21). Il a été démontré que BAFF agissait comme facteur de survie des LB pour la transition LB T1 à LB T2 mais qu'il agissait comme un facteur de différenciation pour induire la production de LB extra-folliculaires (de la zone marginale : MZ) (Tardivel et al., 2004). La survie des LB B1 et des LB mémoires n'est pas dépendante de BAFF ou d'APRIL (Mackay and Schneider, 2009). En effet, il a été montré

que ces sous-populations persistent chez des souris lupiques NZB/NZW F1 traitées par un récepteur soluble de BAFF (Ramanujam et al., 2006).

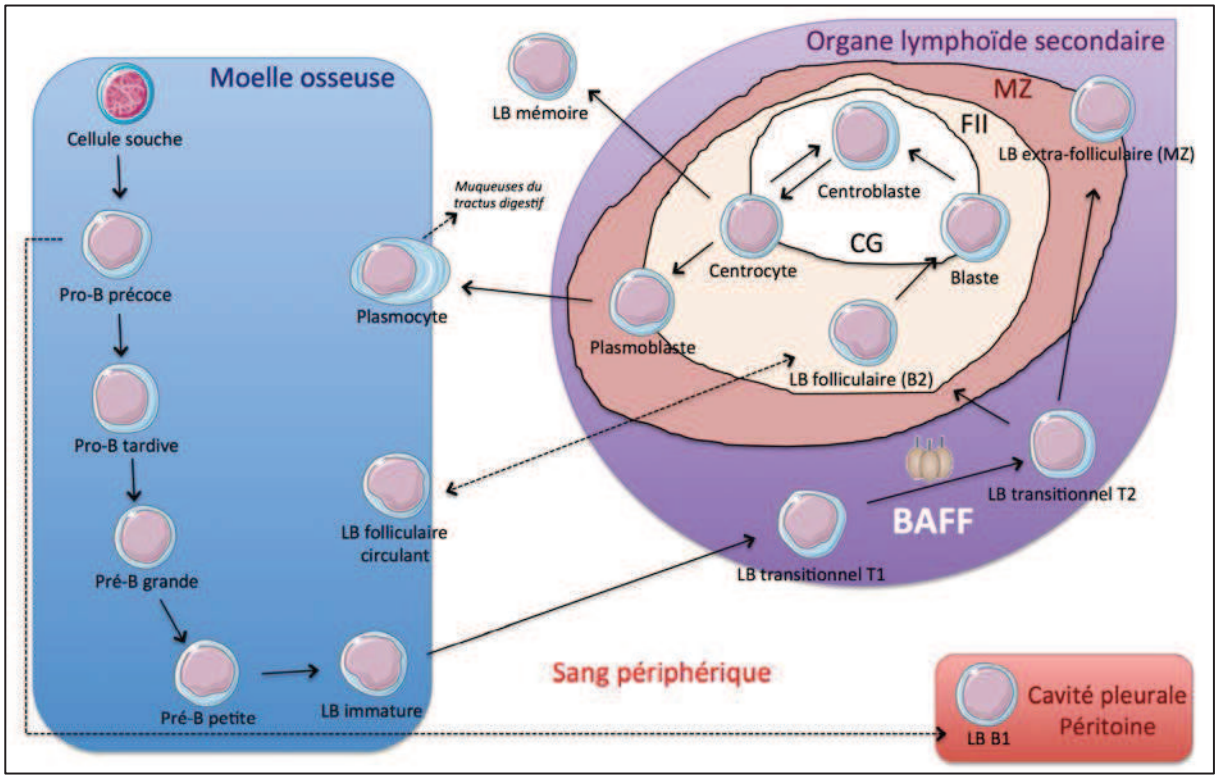

Figure 21 : BAFF est indispensable à la maturation des LB*. MZ : zone marginale, CG : centre germinatif, FII : follicule secondaire.*

La voie de NF-kB2 contrôle l'expression des intégrines sur les LB de la zone marginale ainsi que le switch T-indépendant (switch T1).

L'activation de la PI3kinase permet le recrutement de PDK1 et d'Akt1. Akt1 est phosphorylée par PDK1 (résidu Thr308) puis par PKCβ et/ou mTORC2 (résidu Ser473) et va activer le complexe mTORC1. mTORC1 et PIM2 (activé par la voie NF-kB2) vont permettre la croissance cellulaire. L'inactivation de mTORC1 par la rapamycine conduit à une inhibition de la croissance de LB tumoraux (Woodland et al., 2008). Myc activé par la voie NF-kB1 contribue également à cette croissance et rend les LB résistants à l'atrophie (Mackay and Schneider, 2009).

En parallèle, BAFF permet la survie des LB par la voie PI3K/Akt en induisant la transcription de *Mcl1* qui inhibe le facteur pro-apoptotique « BCL-2 interacting mediator of cell death » ou BIM (Wang et al., 1999). Les cellules B déficientes en MCL1 ne survivent pas en réponse à BAFF (Woodland et al., 2008). Il est à noter également que Akt1 et PIM2

inactivent le facteur pro-apoptotique « BCL-2-antagonist of cell death » ou BAD en le phosphorylant.

BAFF joue donc un rôle essentiel dans la croissance et la survie des LB en activant les voies NF-kB2 et l'axe PI3K/Akt1/mTOR (Mackay and Schneider, 2009).

En ce qui concerne la croissance, BAFF régule l'expression de marqueurs de surface tels CD21, CD23 et CD35 (Gorelik et al., 2004). CD21 est un récepteur du complément, CR2, et fait partie, avec CD19 et CD23, du corécepteur des LB. CD23 est un récepteur des IgE (RFcεII).

L'interaction BAFF/TACI active la voie NF-kB1 (voie classique) par l'intermédiaire de TRAF 2, 5 ou 6. Il est important de noter que seule la conformation BAFF-60mer et non la forme trimérique (BAFF-3mer) peut activer TACI mais que les 2 conformations peuvent stimuler BAFF-R (Bossen et al., 2008). L'utilisation de souris $TACI^{-/-}$ a montré que TACI exerce un rôle à la fois négatif et positif sur le développement des LB : ces souris présentent un nombre très augmenté de LB ce qui indique que TACI exerce un contrôle négatif sur ce type cellulaire. Il a récemment été démontré que TACI module l'expression d'ICOS-L à la surface des LB, régulant ainsi l'activation des LT_{FH} mais peut également moduler la survie des plasmocytes (Ou et al., 2012).

En même temps, TACI est nécessaire aux réponses thymo-indépendantes de type II. Dans ce cas, il permettrait la maturation et la survie des plasmocytes.

La production d'anticorps lors de la réponse immunitaire humorale passe par une commutation isotypique ou « switch ». Cette étape requiert 2 signaux, le premier étant fourni par diverses cytokines (IL-4, IL-10), le deuxième par l'interaction CD40-CD40L dans le cas d'une réponse T-dépendante. BAFF et APRIL sont capables de déclencher un switch des IgM vers les IgG, IgA, et IgE. Les voies de signalisation utilisent BAFF-R ou TACI dans le cas des IgG et IgE, mais le switch IgA est seulement contrôlé par TACI (Castigli and Geha, 2007). Plus récemment, il a été démontré que la protéine adaptatrice MyD88 est indispensable à la régulation de la commutation isotypique des LB par TACI (He et al., 2010).

Les voies de signalisation de BAFF-R et TACI sont représentées dans la figure 22.

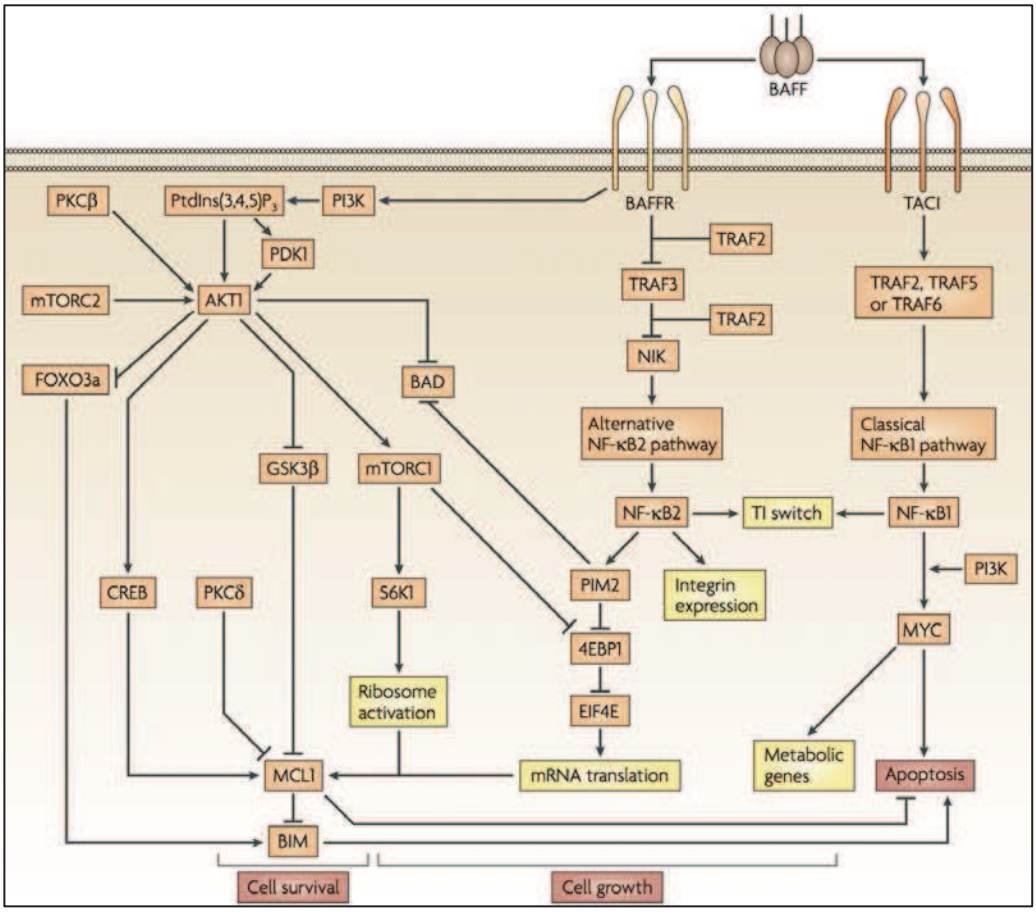

Figure 22 : Voies de signalisation BAFF/BAFF-R et BAFF/TACI (Mackay and Schneider, 2009)

L'interaction **BAFF/BCMA** permettrait la survie des plasmocytes à vie longue. Les souris déficientes en BCMA sont saines mais présentent un déficit en plasmocytes dans la moelle osseuse (O'Connor et al., 2004).

4.7.3 BAFF et pathologie : rôle dans les maladies auto-immunes

Le rôle de BAFF au cours des maladies auto-immunes a été mis en évidence chez des **souris transgéniques pour BAFF** (Groom et al., 2007; Mackay et al., 1999). Ces souris :

- présentent une hyperplasie lymphoïde B dans les ganglions et la rate au delà du stade transitionnel T1
- développent une autoimmunité, indépendante des LT mais dépendante de MyD88, incluant la sécrétion de grandes quantités d'auto-anticorps (facteur rhumatoïde et anticorps anti-ADN), et des signes cliniques évoquant à la fois un lupus érythémateux disséminé (LED) et un syndrome de Sjögren primitif (SSp) : glomérulonéphrite, dépôts de complexes immuns au niveau des reins,

protéinurie, infiltrat au niveau des glandes salivaires, diminution de la production de salive

- présentent une augmentation des LT effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$ et des LTreg mais une diminution des LT naïfs ($CD4^+$ et $CD8^+$)

BAFF jouerait un rôle essentiellement en assurant la survie de cellules auto-réactives présentant une faible affinité pour les antigènes du soi. En effet, au stade T1, les LB auto-réactifs présentant une forte affinité pour des auto-antigènes meurent par sélection négative avant d'exprimer fortement BAFF-R. A l'inverse, les LB auto-réactifs présentant une faible affinité pour les auto-antigènes sont sélectionnés positivement, acquièrent l'expression de BAFF-R et prolifèrent en réponse à la présence massive de BAFF. Ces LB exprimant un BCR reconnaissant de l'ADN ou de l'ARN sont très sensibles à l'activation par TLR9 et TLR7 (Mackay and Schneider, 2009).

L'activation de ces cellules auto-réactives peut être réalisée indépendamment des LT comme cela a été démontré dans le modèle BAFF transgénique après déplétion des LT (Groom et al., 2007). Cependant, cette activation T-indépendante fait intervenir TLR7 et/ou TLR9 et l'activation de MyD88. La différenciation T-indépendante des LB en plasmocytes ne se fait pas chez les souris $TLR7^{-/-}$ ou $TLR9^{-/-}$. Les souris BAFF transgéniques ne développent pas de glomérulonéphrite en l'absence de MyD88. Ces deux voies sont liées. L'activation de TLR7 ou TLR9 induit une surexpression de TACI qui est impliquée dans la maturation et la survie des plasmocytes, ce qui pourrait expliquer le lien entre ces récepteurs.

Après activation des TLRs et de TACI/BAFF-R, ces LB vont produire de grandes quantités d'auto-anticorps qui pourront par exemple former des complexes immuns au niveau rénal dans le cadre d'un LED. (Figure 23)

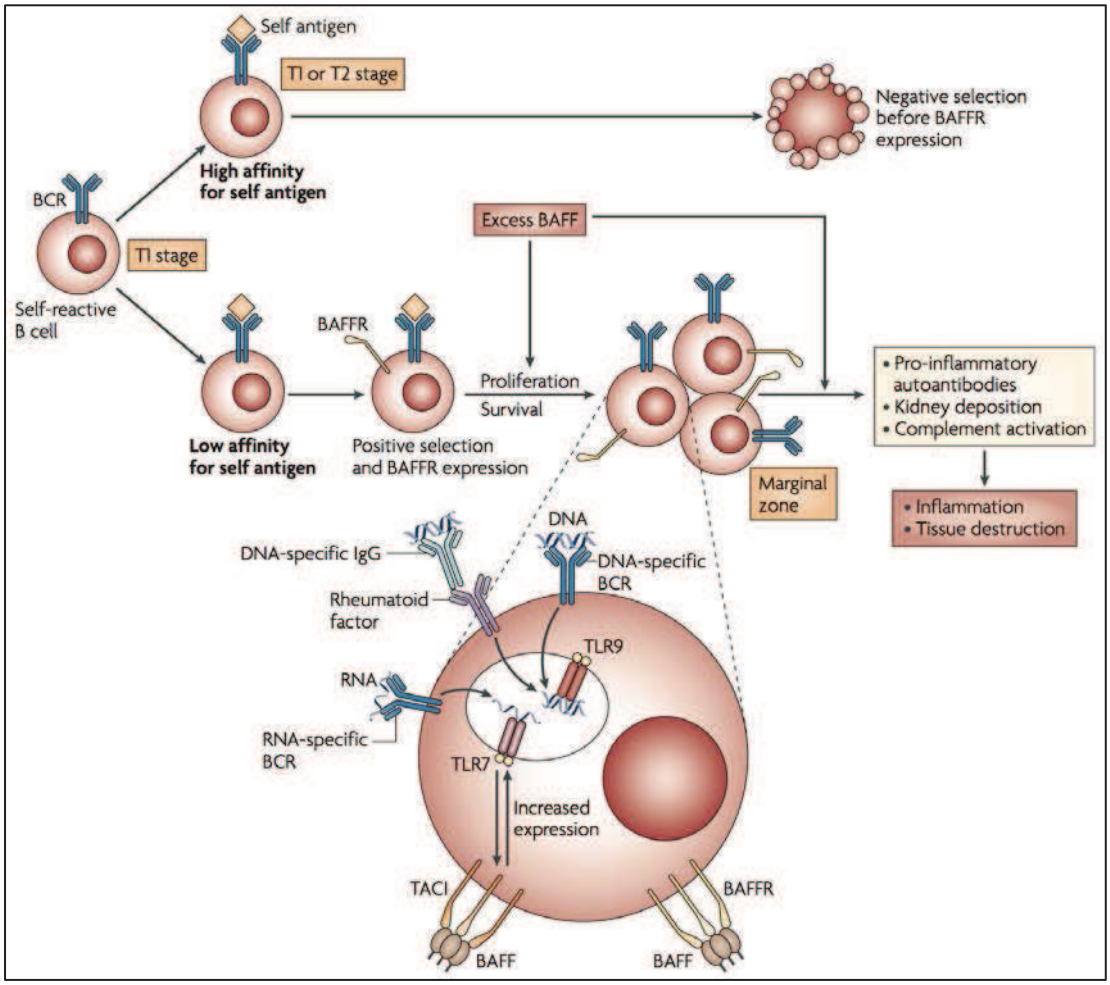

Figure 23 : Le rôle potentiel de BAFF dans la survie des cellules B autoréactives. (Mackay and Schneider, 2009)

D'autres hypothèses mécanistiques sur le rôle de BAFF dans l'autoimmunité pourraient découler des travaux suivants. Des travaux de Xu et coll. ont apporté des arguments nouveaux concernant les réseaux cellulaires impliqués dans l'activation des LB et la production d'anticorps (Xu et al., 2007). Ils ont en effet démontré que les cellules épithéliales qui bordent les cryptes amygdaliennes forment des poches colonisées par les LB. Activées par des PAMPs, en particulier des ligands de TLR3 (ARN viral), ces cellules épithéliales libèrent BAFF et de l'IL-10, cytokines qui vont permettre l'expression de la « activation-induced (cytidine) deaminase » ou AID qui induit notamment le mécanisme de commutation de classe et *in fine* la production d'IgG et d'IgA. Cet effet est augmenté par la libération de la lymphopoïétine stromale thymique ou TSLP par les cellules dendritiques activées par BAFF. Ce système est régulé par la libération de SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor) par les cellules épithéliales activées (Figure 24).

Un mécanisme identique pouvait être envisagé au niveau synovial ce qui a été le but d'une partie de notre travail.

L'ensemble de ces résultats démontre donc qu'en l'absence de LT, le réseau cellules dendritiques, cellules résidentes de l'organe cible et LB pourrait assurer l'activation des LB, leur survie et la production d'anticorps. Impliqué dans la défense contre l'infection, ce réseau pourrait également jouer un rôle essentiel dans le développement de la réponse auto-anticorps *in situ* et le développement de maladies auto-immunes.

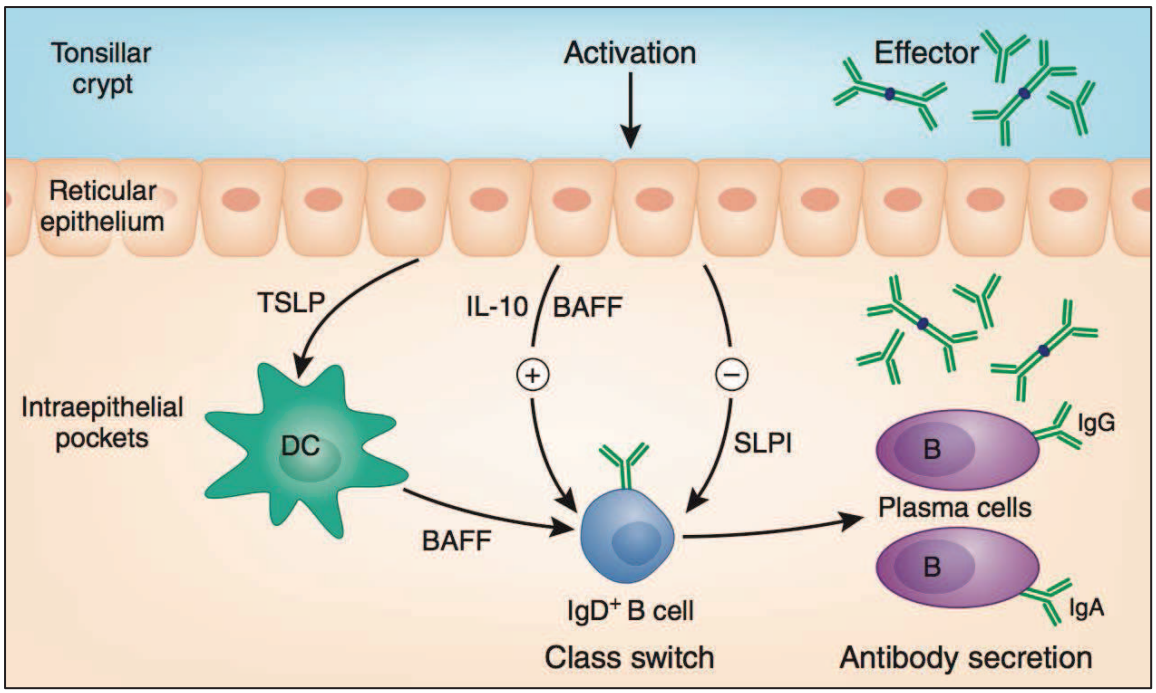

Figure 24 : Les cellules épithéliales régulent localement la commutation isotypique et la sécrétion d'anticorps. (McHeyzer-Williams, 2007)

BAFF semble jouer un rôle important dans certains cancers lymphoïdes mais les observations réalisées chez les souris transgéniques pour BAFF amènent à penser que BAFF est également impliqué dans le développement de maladies auto-immunes comme le LED ou le SSp (Mackay and Tangye, 2004). Chez les patients atteints de LED, de PR ou de SSp, une augmentation du taux sérique de BAFF a été constatée et l'augmentation de ce taux est corrélée à l'activité de la maladie (Mackay et al., 2005). Deux études de phase III ont permis la commercialisation du belimumab, un anticorps monoclonal thérapeutique anti-BAFF, dans le traitement du LED (Furie et al., 2011; Navarra et al., 2011).

4.7.4 BAFF dans la ScS

Une expression élevée de BAFF est observée dans le sérum de patients ayant une ScS et corrélée positivement à l'étendue de l'atteinte cutanée (Matsushita et al., 2006, 2007a). Les taux sériques d'APRIL sont également augmentés chez les patients atteints de ScS mais ne sont pas corrélés aux taux de BAFF. En effet, il semblerait que l'augmentation de la concentration d'APRIL soit corrélée à une atteinte pulmonaire et les taux de BAFF à une atteinte cutanée chez les patients atteints de ScS (Matsushita et al., 2007b). De plus, des patients atteints de ScS traités avec un anticorps anti-CD20 présentent une augmentation des concentrations sériques de BAFF, ce qui peut s'expliquer par la sévère déplétion des LB chez ces patients, et donc l'absence de la principale cellule cible de cette cytokine (Bosello et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou du syndrome de Sjögren (Cambridge et al., 2006; Seror et al., 2007).

Chez la souris TSK/+, les taux sériques de BAFF sont augmentés dès les premières semaines après la naissance et se normalisent au bout de 12 semaines. Un traitement par BAFF-R-Ig, un récepteur soluble de BAFF, diminue la fibrose cutanée ainsi que les taux d'auto-anticorps circulants et l'expression d'IL-6, de TGF-β1 et d'IL-10 dans la peau de ces souris (Matsushita et al., 2007c).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'implication de BAFF dans la fibrose pulmonaire dans le modèle murin induit par la bléomycine.

5 Le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

5.1 La bléomycine

La bléomycine est un antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces verticillus* utilisé comme chimiothérapie anticancéreuse. Son utilisation dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire est basée sur le fait que la fibrose pulmonaire est un des effets secondaires majeurs lors de son administration chez l'homme. La bléomycine est utilisée dans le traitement du lymphome de Hodgkin, du carcinome épidermoïde et des tumeurs des testicules. La bléomycine agit en provoquant des cassures d'ADN simple et double brin par son domaine de liaison à l'ADN, dans les cellules tumorales par production de radicaux libres ce qui interrompt le cycle cellulaire(Figure 25) (Claussen and Long, 1999). La surproduction de ROS conduit au développement d'une réponse inflammatoire provoquant une toxicité pulmonaire et une activation des fibroblastes aboutissant à la fibrose tissulaire.

Tous les tissus ne sont pas affectés de manière identique par la bléomycine car ses effets secondaires dépendent de la présence d'une enzyme inhibitrice, la bléomycine hydrolase. Les poumons ont un taux très faible de cette enzyme, ce qui explique que cet organe soit plus susceptible aux lésions tissulaires induites par la bléomycine (Sebti et al., 1989).

Chez les patients, les effets secondaires de la bléomycine sont dose-dépendants, âge-dépendants et se développent préférentiellement chez les sujets présentant d'autres pathologies pulmonaires ou chez les fumeurs. Environ 10% des patients sous bléomycine vont développer une toxicité pulmonaire et 1% des patients vont développer une fibrose pulmonaire (Moeller et al., 2008).

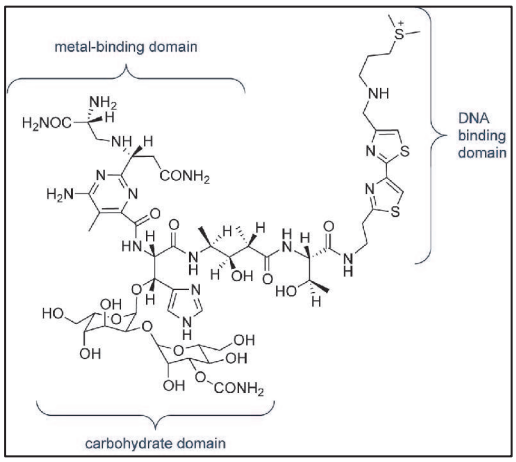

Figure 25 : Structure chimique de la bléomycine. (www.atdbio.com)

5.2 Le modèle animal

L'induction expérimentale de la fibrose pulmonaire par la bléomycine a été réalisée chez la souris en 1974 (Adamson and Bowden, 1974). Chez la souris, la bléomycine provoque une réaction inflammatoire aigüe suivie du développement rapide d'une fibrose pulmonaire. Elle est souvent administrée par voie intra-nasale ou intra-trachéale mais elle peut aussi être délivrée par voie systémique en sous-cutané, intra-péritonéale ou intra-veineuse.

Dans les **24 heures** après instillation intra-nasale, les souris présentent une production massive de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-6 ainsi que KC (CXCL1) ce qui conduit au recrutement massif de cellules inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires, principalement composés de polynucléaires neutrophiles. Les souris présentent également des taux élevés de protéines impliquées dans le remodelage tissulaire comme MMP-9 et TIMP-1 (Gasse et al., 2007).

Les souris sacrifiées **7 jours** après instillation présentent une forte diminution de la quantité de polynucléaires neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires qui sont remplacés par une infiltration massive de lymphocytes. L'expression de l'ARNm de protéines de la MEC comme le collagène de type I et III ainsi que la fibronectine est significativement augmenté dans les poumons. La présence de collagène et de TGF-β1 dans les poumons est également augmentée comparé à des souris recevant du sérum physiologique (NaCl) par voie intra-nasale(données obtenues au laboratoire / (Gasse et al., 2007)).

La fibrose est plus marquée **14 jours** après instillation, les souris présentent des taux de collagène importants dans les poumons et des analyses histologiques confirment la présence de foyers fibrotiques dans les poumons(données obtenues au laboratoire / (Gasse et al., 2007)).(Figure 26)

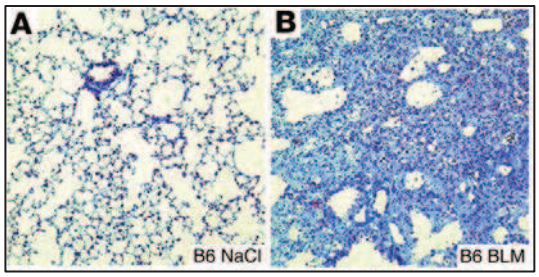

Figure 26 : Coupes histologiques de poumons de souris C57Bl/6 14 jours après instillation de NaCl ou de bléomycine (15mg/kg) *(400x). Coloration CAB (Chromotrope Aniline Blue)* (Gasse et al., 2007)

Quelques limitations dans l'utilisation de ce modèle sont toutefois importantes comme la réaction inflammatoire puissante déclenchée par l'administration de bléomycine, qui ne reflète pas forcément la pathologie humaine. De plus, il semblerait que la fibrose soit en partie réversible 6 semaines après l'instillation des souris. Enfin, certaines souches de souris ne développent qu'une fibrose très modérée après instillation comme les souris Balb/c, contrairement aux souris CBA ou C57Bl/6 qui sont elles très sensibles à la toxicité induite par la bléomycine. Ces différences seraient dues à des taux de bléomycine hydrolase plus élevés chez les souches de souris résistantes (Chung et al., 2003).

Degryse et coll. ont proposé un protocole différent d'instillation intra-trachéale de bléomycine par des administrations répétées. Ces auteurs ont instillé à 8 reprises des souris avec une dose faible de bléomycine (0,04 unités/instillation), en espaçant les instillations de 2 semaines. Ils ont sacrifié les souris 2 semaines après la dernière administration de bléomycine. Leurs résultats montrent que les souris développent une fibrose irréversible, ceci même 10 semaines après la dernière administration. Toutefois, l'utilisation de ce modèle reste pour le moment rare car sa mise en place est plus complexe et le protocole beaucoup plus long (18 semaines avant le sacrifice des souris contre seulement 2 lors d'une instillation unique à J0) (Degryse and Lawson, 2011).

6 Les micro-ARNs dans la régulation des processus fibrotiques

6.1 Les micro-ARNs : un nouveau mode de régulation de l'expression des gènes

6.1.1 La biogénèse des miARNs

Les miARNs sont des petits ARNs de 20 à 24 nucléotides régulant l'expression de gènes de façon post-transcriptionnelle. Ils sont exprimés dans les branches animales et végétales des eucaryotes et codés par un grand nombre de gènes. Actuellement, plus de 1200 miARNs ont été identifiés chez l'homme et plus de 1000 chez la souris. Les prédictions informatiques estiment que 3% du génome correspondent à des séquences attribuées aux miARNs (Bentwich et al., 2005; Berezikov et al., 2005). Un ARNm peut être régulé par plusieurs miARNs et un miARN est prédit pour cibler une centaine d'ARNm, ainsi 30 à 90% du génome pourraient être régulés par des miARNs directement ou indirectement (Engels and Hutvagner, 2006; Griffiths-Jones, 2004; Lewis et al., 2005; Miranda et al., 2006). Cependant une très faible proportion de ces cibles a été validée à ce jour.

Les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II et leurs transcrits sont coiffés et polyadénylés comme ceux d'un ARNm classique (Kim, 2005). Bien que certains miARNs soient produits individuellement, la majorité des miARNs sont issus d'unités de transcription codant pour plusieurs produits (Bartel, 2004). Un transcrit peut ainsi coder pour des groupes de plusieurs miARNs, ou pour un miARN et une protéine. Ce dernier type de transcrit code des miARNs situés dans les séquences introniques.

Le transcrit primaire ou pri-miRNA borde la séquence du miARN en 5' et en 3' et deux étapes de maturation permettent la genèse du miARN mature. Un pri-miARN typique consiste en une tige boucle d'une séquence double brin d'environ 33 paires de base imparfaitement appariées, flanquées de segments d'ARN simple brin (Bartel, 2004). Un seul pri-miARN peut contenir jusqu'à 6 précurseurs de miARNs.

Dans le noyau de la cellule, la **première étape de maturation** consiste en l'excision de la tige boucle et génère un produit appelé pre-miARN. Pour la plupart des miARNs, DROSHA, une RNAse de type III nucléaire, permet la génération du pre-miRNA (Kim, 2005). Ce premier clivage exercé par DROSHA se fait à l'aide d'une protéine à domaine de liaison à l'ARN, appelée DGCR8. DROSHA se fixe à DGCR8 qui interagit directement avec la tige boucle du pri-miRNA et les fragments simple brin bordant (Han et al., 2006).

Cependant, le clivage induit par ce complexe n'est pas le seul mécanisme connu pour produire des pre-miRNAs. L'épissage de pri-miARNs peut aussi libérer des introns

semblables aux structures des pre-miARNs, appelés mirtrons (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Ces mirtrons intègrent alors la voie de la biogénèse des miARNs, indépendamment du complexe DROSHA et DGCR8.

La **seconde étape** consiste en l'excision de la boucle terminale du pre-miRNA et la genèse d'un duplex de miARNs matures de 22 nucléotides de long (Bartel, 2004). Le pre-miARN est d'abord exporté hors du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5, Ran-GTP dépendante, pour être clivé par DICER associé à TRBP dans le cytoplasme (Kim, 2005).

TRBP (Tar Binding Protein) et DICER sont des protéines appartenant à la famille des DRBP pour « dsRNA binding protein ». TRBP est une protéine qui permet le recrutement du complexe DICER à AGO2, permettant la maturation du miARN par DICER et le silencing par le complexe RISC via AGO2 (Chendrimada et al., 2005; Daniels et al., 2009; Haase et al., 2005). TRBP fonctionne ainsi comme une protéine d'interaction à l'ARN et une protéine permettant un lien fonctionnel entre le complexe DICER et le complexe RISC.

La seconde excision médiée par DICER définit l'autre extrémité du duplex miARN mature. DICER peut cliver n'importe où le long d'un ARN double brin mais présente une affinité supérieure pour les extrémités des ARNs double brin (Kim, 2005; Vermeulen et al., 2005). Le domaine PAZ de DICER interagit avec les extrémités 3' terminales et détermine le site de clivage de manière dirigée, le site catalytique étant situé à deux tour d'hélice ARN, soit 22 paires de base du domaine PAZ du complexe DICER-ARN. Cependant, un miARN qui subit une maturation indépendante de DICER mais dépendante de AGO2 a été identifié, il s'agit de miR-451, ce qui ouvre de nouvelles perspectives sur d'autres voies de biogénèse des miARNs (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010).

Les voies de biogénèse classique des miARNs sont résumées figure 27.

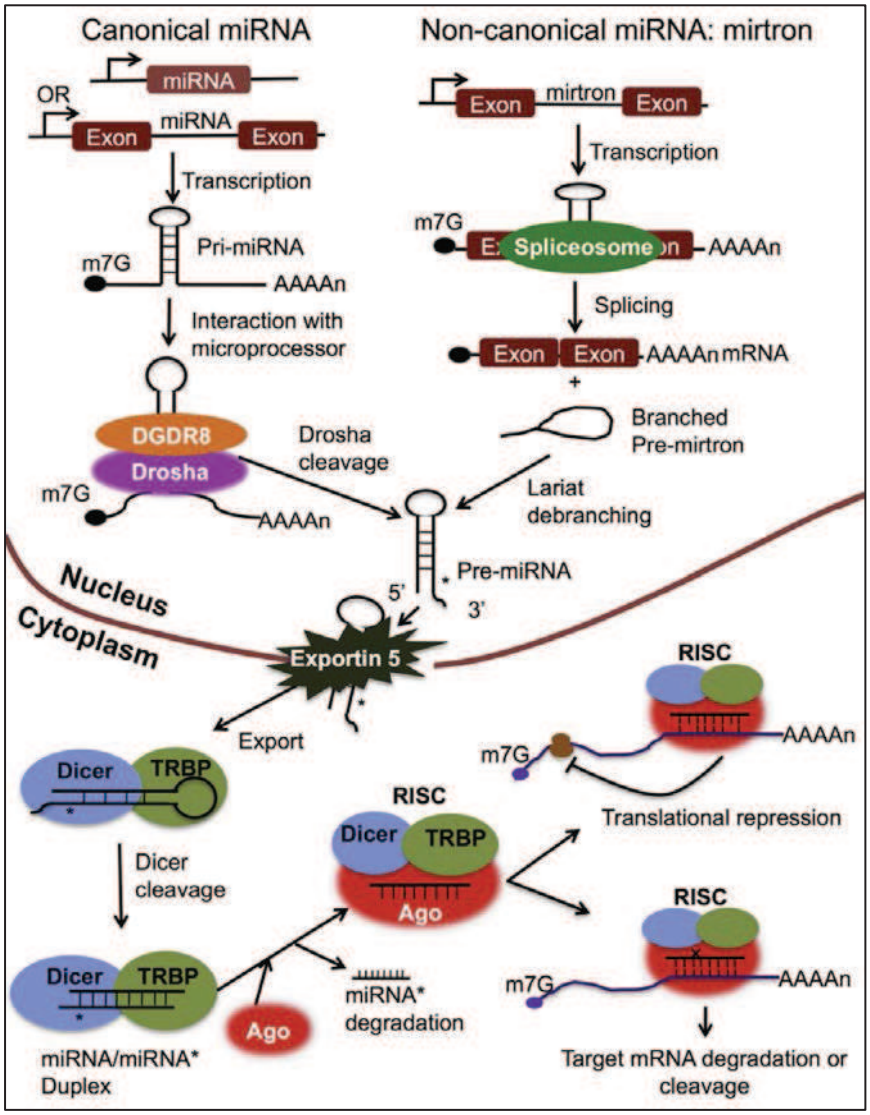

Figure 27 : Biogénèse et mode d'action des miARNs (Dai and Ahmed, 2011)

6.1.2 La voie effectrice des miARNs

6.1.2.1 Les protéines Argonaute

Un duplex de miARNs mature possède une demi-vie assez courte car il est rapidement dissocié par sa liaison avec les protéines AGO. La famille des protéines Argonaute peut être séparée en trois sous-groupes, le groupe des Piwi qui fixent les piRNAs, le groupe des AGO qui fixent les miARNs et les siARNs, et un troisième groupe qui n'a été décrit pour l'instant que chez les nématodes (Yigit et al., 2006). Chez l'homme, cinq des huit protéines AGO s'associent avec des siARNs et des miARNs (Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005).

Les protéines AGO sont définies par quatre domaines : un domaine PAZ, un domaine PIWI et les domaines Mid et N (Figure 28).

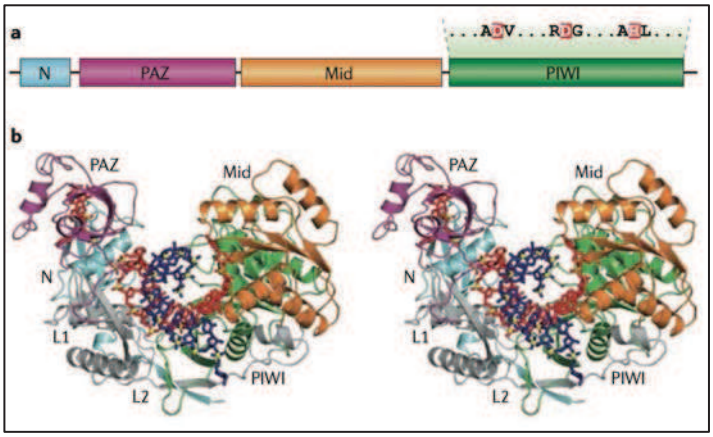

Figure 28 : Structure et organisation d'une protéine Argonaute (Czech and Hannon, 2011).

Le domaine PAZ chez Ago présente un site de fixation des extrémités 3' de l'ARN et des études de co-cristallographie ont permis de montrer que ce domaine était indispensable à la fixation du brin guide. L'extrémité en 5' se fixe au **domaine Mid**, et le reste du brin ARN est lié grâce à des charges positives portées par les deux domaines d'Ago.

Le domaine PIWI adopte une forme analogue à la RNAse-H, capable dans certaines conditions de cliver l'ARNm cible (Parker et al., 2004; Song et al., 2004). Cette étape est un des mécanismes du silencing par déstabilisation de la cible. Chez l'homme, les protéines Ago présentent des différences de régulations et de fonctions qui ne sont encore pas bien définies (Johnston and Hutvagner, 2011).

Les protéines AGO jouent un rôle important dans la formation des complexes RISC. Les miARNs double brin produits par DICER entrent dans le complexe RISC, ce qui nécessite la dissociation du duplex et le recrutement d'un seul des 2 brins en association avec la protéine AGO effectrice (Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005). Le brin recruté, appelé guide, permet la reconnaissance de la cible par appariement Watson-Crick, tandis que l'autre brin est écarté.

Comme pour les siARNs, l'association d'un miARN avec AGO est sélective : un brin est sélectionné tandis que l'autre est en général perdu. Cette sélection est basée sur la stabilité thermodynamique relative de chacune des extrémités du duplex. Le brin retenu est celui qui est le moins solidement apparié en 5' (Kim, 2005). Cependant, cette règle n'est pas générale car le deuxième brin, appelé « star », peut être également recruté dans certaines conditions (Okamura et al., 2007).

6.1.2.2 L'appariement

Au sein du complexe miRISC, les miARNs vont permettre la reconnaissance et la répression d'ARNm ciblés de manière séquence-spécifique. Les sites de fixation des miARN dans les ARNm de mammifères sont en général situés dans les séquences 3'UTR et souvent présents en plusieurs copies. Il existe également des sites de fixation de miARNs en 5'UTR conduisant à la répression des cibles (Lytle et al., 2007).

Ces dernières années, plusieurs études ont décrit une répression de l'expression par des miARNs se fixant dans la région codante. C'est le cas de miR-24 qui cible l'ARNm de p16 ou de la famille let-7 qui cible Dicer. Des dizaines d'autres cibles ont été décrites depuis, ce qui pose un problème en ce qui concerne les algorithmes de prédiction, qui se basent majoritairement sur des sites situés en 3'UTR des ARNm (e.g., TargetScan, PicTar, miRBase, etc.).

La plupart des appariements des miARNs sont incomplets, comportant des appariements imparfaits et des « bulges ». En grande majorité, une séquence nommée « seed » est nécessaire à la fixation d'un miARN. Cette séquence « seed» constitue l'un des critères de sélection des algorithmes de prédiction. Il s'agit d'un appariement de type Watson-Crick du miARN concernant les nucléotides 2 à 8, pouvant tolérer des appariements non canoniques, tels les « wobble pairing », consistant en un appariement uracile/guanine. (Figure 29)

Le degré d'appariement miARN-ARNm a longtemps été considéré comme un facteur déterminant du mécanisme de régulation. Un appariement parfait va conduire au clivage de la cible par Ago, alors que des appariements imparfaits entre les nucléotides 9 et 12 ne permettent pas le clivage et conduisent à la répression traductionnelle des ARNm.

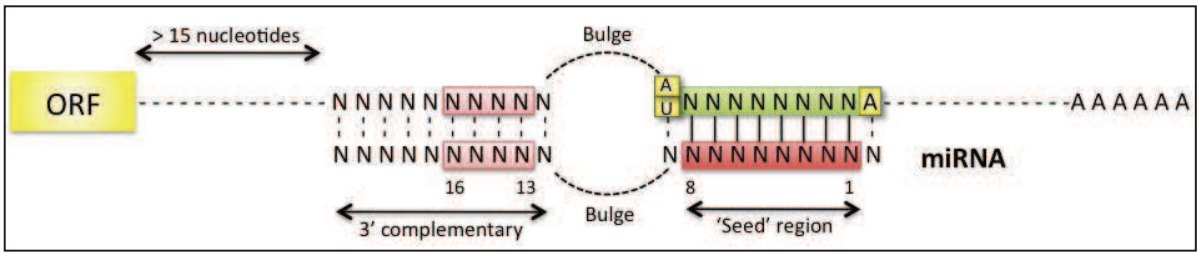

Figure 29 : Interaction entre l'ARN messager et le miARN. Adapté de (Filipowicz et al., 2008). Rouge foncé : séquence « seed », jaune : A en position 1 et A ou U en position 9 augmente l'efficacité de l'interaction, le « bulge » présent au milieu de la séquence permet le clivage médié par AGO, Rouge clair : interaction permettant la stabilité du complexe entre les positions 13 et 16.

6.1.2.3 La répression de la traduction des ARNm

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'arguments permettant d'affirmer que la répression de la traduction se fait lors de l'initiation de la traduction de la protéine ou après l'initiation. L'initiation de la traduction démarre lors de la reconnaissance de la coiffe fixée sur la 7-méthyl-guanosine (m^7G, en rouge sur la figure 30) en 5' par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F. Ce complexe comporte aussi eIF4A et eIF4G. L'interaction de eIF4G avec eIF3 va permettre le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le complexe de pré-initiation 40s interagit avec la sous unité 60S au niveau du codon AUG pour initier l'élongation. eIF4G interagit également avec les protéines PABP-1 (poly-A binding protein 1) fixées en 3' des ARNm. La capacité d'eIF4G à interagir avec eIF4E et PABP-1 va permettre la circularisation de l'ARNm, ce qui accroît considérablement l'efficacité de traduction de la protéine. (Figure 30)

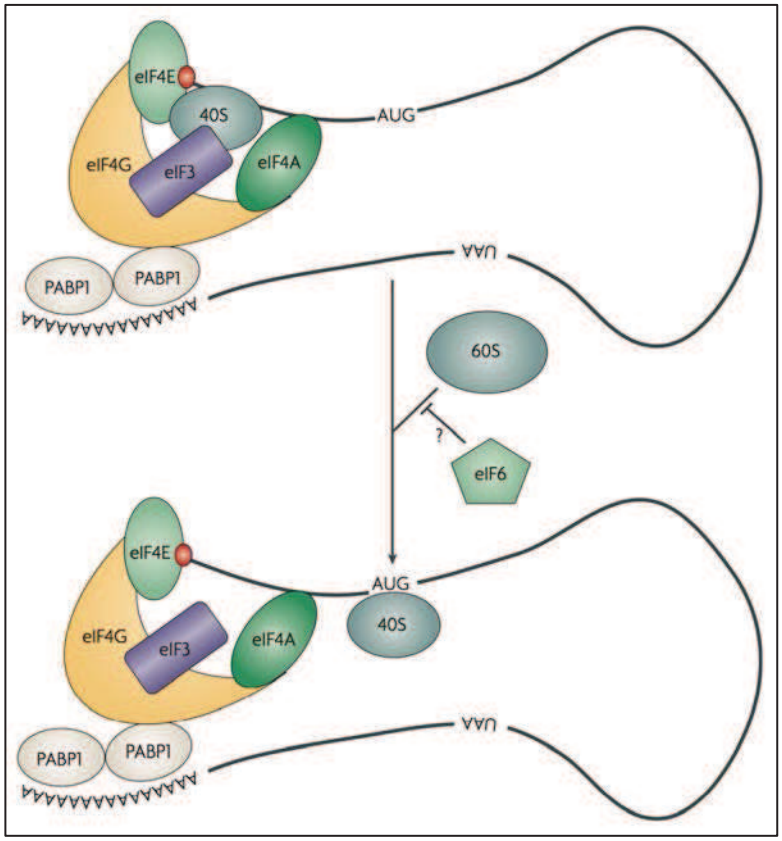

Figure 30 : Initiation de la traduction et assemblage des sous-unités ribosomales.

(Filipowicz et al., 2008). *eIF : eukaryotic translation initiation factor*

6.1.2.3.1 Inhibition de l'initiation de la traduction

Pour certains auteurs, l'inhibition de la traduction pourrait se faire au niveau de l'initiation (Ding and Grosshans, 2009; Humphreys et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2004; Wakiyama et al., 2007). (Figure 31)

Un premier modèle propose une compétition entre miRISC et eI4FE pour l'interaction avec la coiffe en 5'. eIF4E se fixe à la base méthylée de la coiffe entre deux résidus tryptophane (Mathonnet et al., 2007). L'hypothèse serait qu'il existe une analogie de structure entre le domaine Mid de la protéine Ago2 et eI4FE. En effet, deux résidus phénylalanine dans le domaine Mid adoptent des positions équivalentes aux résidus tryptophane d'eI4FE (Kiriakidou et al., 2007).

Un second modèle proposé est la stimulation de la déadénylation de la queue des ARNm. Dans ce modèle, la traduction est inhibée car la coiffe et la queue déadenylée donc dépourvue de PABP-1 ne permettent plus la circularisation de l'ARNm (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006).

Ce modèle reste controversé car plusieurs auteurs ont montré que les ARN polyadénylés sont aussi réprimés par les miARNs (Eulalio et al., 2008; Pillai et al., 2004; Wu et al., 2006).

Un dernier modèle proposé est le blocage par miRISC de l'association entre la sous-unité ribosomale 60S et le complexe de pré-initiation 40S. La protéine AGO2 s'associe avec eIF6 et la sous-unité ribosomale 60S *in vitro* (Chendrimada et al., 2007). eIF6 est impliquée dans la biogénèse et la maturation des sous-unités 60S ribosomiques et prévient l'association des sous-unités 60S immatures au complexe 40S. La régulation des ARNm par les miRNAs est perdue dans des cellules déficientes pour eIF6 chez l'homme (Eulalio et al., 2008). Dans un milieu enrichi en réticulocytes, Wang et al. ont montré que les ARNm cibles étaient purifiés avec des sous-unités ribosomiques 40S et non 60S (Wang et al., 2008). Ainsi, le recrutement d'eIF6 par le complexe miRISC pourrait inhiber la traduction en empêchant l'association des ribosomes au codon d'initiation.

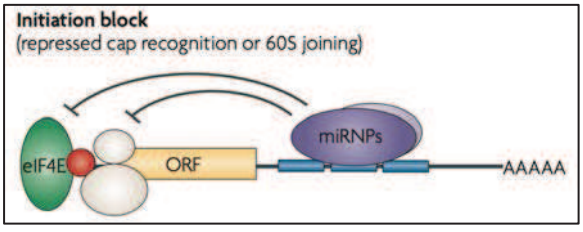

Figure 31 : Inhibition de l'initiation de la traduction. (Filipowicz et al., 2008)

6.1.2.3.2 Inhibition de l'élongation

Pour d'autres, le complexe RISC agirait plus tardivement après l'initiation (Mathonnet et al., 2007; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006; Seggerson et al., 2002). Petersen et coll. ont ainsi proposé un modèle de répression par le complexe miRISC, suggérant que les miARNs induisent une dissociation prématurée des ARNm des ribosomes. Le blocage rapide de l'initiation de la traduction par l'hippuristanol conduit à une dissociation rapide des ribosomes de façon miRNA-dépendante. (Figure 32)

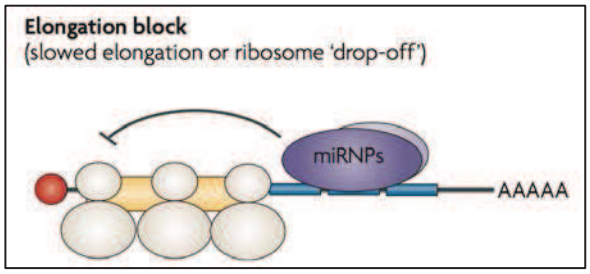

Figure 32 : Inhibition de l'élongation. (Filipowicz et al., 2008)

6.1.2.4 *La dégradation des ARNm par les miARNs*

Les premières études concernant les miARNs indiquaient que la répression de la traduction des ARNm n'était pas accompagnée d'une déstabilisation des ARNm. Cependant, pour certains appariements miARN-ARNm, la quantité des ARNm est significativement réduite probablement en raison de leur dégradation (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Lim et al., 2005; Wu et al., 2006). Cette dégradation est provoquée par une déadénylation, une dégradation de la coiffe et des digestions exonucléolytiques plutôt que par un clivage dépendant des protéines AGO. (Figure 33)

Certaines études montrent que la dégradation peut être couplée à la traduction des ARNm en question. Les messagers dont la traduction est bloquée sont déadénylés par un mécanisme dépendant des miARNs (Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006). Cette déadénylation miARN-dépendante peut s'observer *in vitro* sans engager les mécanismes de la traduction, ce qui suggère que la dégradation et la répression de la traduction sont deux mécanismes indépendants (Wakiyama et al., 2007).

Le fait que certaines cibles soient dégradées et d'autres non n'est pas parfaitement expliqué. Aleman et coll. ont suggéré que le nombre, le type et les positionnements des « mismatch » dans les duplex miARNs/ARNm pourraient intervenir, ce qui souligne l'importance de l'appariement dans le déclenchement de la dégradation (Alemán et al., 2007).

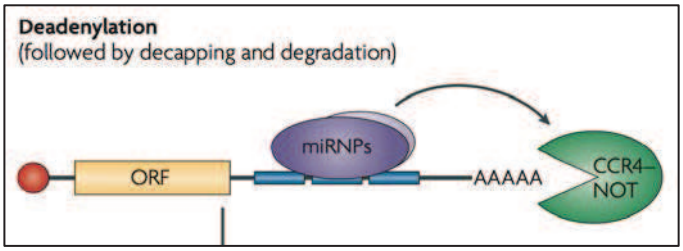

Figure 33 : Dégradation des ARNm par déadénylation. (Filipowicz et al., 2008)

6.1.2.5 Mode de régulation non canonique

Il a été récemment démontré que certains miARNs ont un rôle activateur qui dépend de leur positionnement sur l'ARNm cible. Ainsi, l'interaction de miR-10a avec les séquences 5'UTR des ARNm de certaines sous unités ribosomiques conduit à l'activation de leur expression, tandis que sa fixation en 3'UTR conduit à la répression (Ørom et al., 2008). Plusieurs autres miARNs régulent leurs cibles par ce même mécanisme : la fixation de miR-122 sur la région 5'UTR des ARNm du virus de l'hépatite C augmente leur expression alors qu'il joue un rôle inhibiteur en se liant à leur région 3'UTR (Jopling et al., 2008).

A l'inverse, mir-34a inhibe Axin2 en se fixant en 5'UTR ou en 3'UTR (Lee et al., 2009). De même miR-365-3 active la traduction de l'ARNm du TNF-α en se fixant en 3'UTR et en recrutant la protéine FXR1 (Vasudevan and Steitz, 2007; Vasudevan et al., 2007).

Les études concernant les miARNs ont permis de déterminer certaines de leurs fonctions physiologiques et plus particulièrement en ce qui concerne la réponse immunitaire (Baltimore et al., 2008; Gantier et al., 2007; Lodish et al., 2008; Sonkoly et al., 2008; Taganov et al., 2007; Xiao and Rajewsky, 2009). Il a été également montré qu'une modulation de leur expression peut être associée au développement de pathologies variées : cancer, maladies métaboliques, neurodégénératives, infectieuses, inflammatoires ou auto-immunes (Eacker et al., 2009; Krützfeldt and Stoffel, 2006; Pauley et al., 2009; Zhang and Farwell, 2008; Zhang et al., 2007).

6.2 Les micro-ARNs impliqués dans la fibrose dans la ScS

Leurs larges spectres d'action font des microARNs des cibles d'intérêt pour étudier les mécanismes physiopathologiques, mais expliquent aussi les difficultés d'analyse et de compréhension de leurs rôles. Des données récentes suggèrent leur implication dans le développement de maladies auto-immunes comme la ScS.

Li H. et coll. ont utilisé une puce à ADN contenant 924 séquences de miRs à fin de déterminer les miRs impliqués dans le développement de la ScS. 24 miRs ont un profil

d'expression différent dans les biopsies de peau de patients ScS comparés à des sujets sains dont 9 étant surexprimés et 15 sous-exprimés. Parmi les 24 miRs, **miR-206, miR-133a, miR-125b, miR-140-5p et miR-23b** cibleraient des protéines fortement et spécifiquement associées à la pathogénèse de la ScS (Li et al., 2012).

Dans des biopsies de peau, d'autres miRs ont été identifiés comme étant étroitement associés à la fibrose cutanée observée chez des patients ScS : **miR-21, miR-31, miR-146, miR-503, miR-145 et miR-29**. Cette étude confirme que l'expression de miR-21 est augmentée alors que l'expression de miR-145 et miR-29b est diminuée dans les biopsies de peau et les fibroblastes de patients comparés à des sujets sains. Ces trois miRs sont connus pour réguler des gènes impliqués dans la fibrose observée chez des patients atteints de ScS tels que SMAD7, SMAD3 et COL1A1 (Zhu et al., 2012).

En 2010, Liu et coll. ont démontré une augmentation de l'expression de **miR-21** dans les poumons de souris instillées par la bléomycine et dans les poumons de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. La production de miR-21 est localisée au niveau des myofibroblastes pulmonaires. L'administration d'antisens du miR-21 diminue la sévérité de la fibrose pulmonaire : elle empêche la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et diminue l'expression de l'ARNm de fibronectine, Col1A1, Col1A2 ainsi que le taux de collagène soluble dans les poumons. Le TGF-β1 induirait une augmentation de l'expression de miR-21 dans une lignée de fibroblastes pulmonaires humains. En retour, miR-21 augmenterait l'activité profibrotique induite par TGF-β1 en inhibant l'expression de Smad7 (cible directe du miR-21) (Liu et al., 2010). Selon Zhu et coll., l'expression de miR-21 est augmentée et l'expression de SMAD7 est diminuée dans les biopsies de peau et dans les fibroblastes cutanés de patients atteints de ScS cutanée limitée ou diffuse par rapport aux sujets sains (Zhu et al., 2012).

Plusieurs études portant sur le rôle du **miR-29** dans la ScS ont été réalisées. Par exemple, Maurer et coll. ont identifié le miR-29 comme un régulateur clé de l'expression du collagène. Ils ont observé une diminution de l'expression de miR-29a, miR-29b et miR-29c dans les fibroblastes et dans les biopsies de peau de patients atteints de ScS par rapport aux sujets sains. La stimulation de fibroblastes cutanés avec du TGF-β1, de l'IL-4 ou du PDGF diminue l'expression de miR-29a et la transfection de pré-miR-29 bloque la synthèse du collagène induite par ces trois stimuli et diminue la synthèse de collagène sans stimulation. L'expression de ces trois miRs diminue également dans la peau de souris après injection sous-

cutanée de bléomycine. Enfin, ces auteurs ont démontré que ces trois miRs ciblent directement l'ARNm du collagène de type III (Maurer et al., 2010).

Xiao J et coll. ont étudié le potentiel thérapeutique du miR-29 dans le modèle murin de fibrose pulmonaire à la bléomycine. L'administration de miR-29b 24 heures avant administration de bléomycine atténue la fibrose pulmonaire, la synthèse de collagène de type I et III ainsi que de fibronectine (sacrifice à J14). De plus, l'administration de miR-29b 14 jours après bléomycine réduit également le développement de la fibrose pulmonaire (sacrifice à J28) (Xiao et al., 2012).

D'autres miRs joueraient un rôle important dans la physiopathologie de la ScS tels que miR-196a, miR-7, miR-142-3p, miR-92a et miR-129-5p. Honda et coll., ont démontré que **miR-196a** est sous-exprimé dans des fibroblastes de sujets sains stimulés par du TGF-β et dans des fibroblastes de patients atteints de ScS comparés à des fibroblastes de sujets sains non stimulés. L'inhibition de miR-196a conduit à la surexpression de collagène de type I dans les fibroblastes de sujets sains alors qu'une surexpression de ce miR conduit à une diminution du collagène de type I dans les fibroblastes de patients. De plus, le miR-196a est détectable et quantifiable dans le sérum de patients atteints de ScS. Les patients avec une concentration sérique faible de miR-196a présentent un score de Rodnan modifié supérieur aux patients avec un taux plus élevé (Honda et al., 2012).

Etoh et coll. ont montré que **miR-7** est sous-exprimé dans la peau de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains et que la transfection d'anti-miR-7 augmente la production de collagène de type I par les fibroblastes dermiques. Contrairement à miR-29a, les concentrations sériques de miR-7 sont diminuées chez les patients comparés à des sujets sains et pourraient être utilisées comme marqueur de la maladie (Etoh et al., 2013).

Les concentrations sériques du **miR-142-3p** sont significativement plus élevées chez des patients atteints de ScS que chez des patients atteints de LED ou de dermatomyosite, ce qui suggère également que ces concentrations pourraient être utilisées comme marqueur diagnostic dans la ScS (Makino et al., 2012).

L'expression de **miR-92a** est également augmentée dans les fibroblastes de patients atteints de ScS et semble réguler négativement l'expression de MMP-1. La diminution de MMP-1 a été rapportée chez des patients atteints de ScS et pourrait favoriser l'accumulation excessive de collagène en diminuant sa dégradation (Bujor et al., 2008). L'utilisation d'un siARN ciblant le TGF-β1 diminue l'expression de miR-92a ce qui suggère que

l'augmentation de miR-92a dans les fibroblastes de patients atteints de ScS pourrait être due à l'activation intrinsèque du TGF-β1 (Sing et al., 2012).

Nakashima et coll. ont démontré que le **miR-129-5p** est sous-exprimé dans les fibroblastes de patients atteints de ScS comparés à des sujets sains. De plus, la transfection de mimique de miR-129-5p diminue la production de collagène de type I par les fibroblastes. La stimulation de ces fibroblastes avec de l'IL-17A augmente l'expression de miR-129-5p. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation de l'IL17A a un effet anti-fibrotique par augmentation de l'expression de miR-129-5p (Nakashima et al., 2012).

Ces données montrent que certains miRs sont potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la ScS. Au cours de notre travail, nous avons étudié la régulation de l'expression de BAFF par des miRs dans les fibroblastes cutanés de patients atteints de ScS.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Le lymphocyte B semble être un acteur important du développement de la fibrose dans la ScS. Comme énoncé dans l'introduction de cette thèse, de très nombreuses études ont été consacrées à la compréhension du rôle des fibroblastes dermiques, des cytokines et des lymphocytes dans la physiopathologie de la ScS et dans la fibrose pulmonaire dans divers modèles animaux. BAFF et APRIL sont deux cytokines qui semblent contribuer à la physiopathologie de maladies auto-immunes comme la PR, le LED et le SSp mais leur rôle dans la fibrose reste peu étudié à ce jour.

L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle de BAFF et APRIL dans la fibrose dans un modèle animal de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ainsi que d'évaluer l'implication des LB et de BAFF dans un modèle de co-culture de cellules humaines composé de fibroblastes dermiques et de lymphocytes B, et d'envisager leur intérêt comme cible thérapeutique. Nous avons également étudié la régulation de l'expression de BAFF par les microARNs, plus particulièrement les miR-30a*, 30d* et 30e* dans les fibroblastes dermiques isolés de sujets sains et de patients atteints de ScS.

Les travaux portent sur 3 aspects principaux :

1) Interactions cellules résidentes/lymphocytes B et rôle de BAFF dans la PR et la ScS
2) Implication de BAFF dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine
3) Régulation de l'expression de BAFF dans les synoviocytes rhumatoïdes et les fibroblastes cutanés par les microARNs dans la PR et la ScS

Publication 1

1) Interactions cellules résidentes/lymphocytes B et rôle de BAFF dans la PR et la ScS

Publication 1 : Induction de la commutation isotypique des LB par les fibroblastes synoviaux isolés de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par un mécanisme dépendant de BAFF.

Nous avons participé à un travail concernant l'étude des interactions synoviocyte rhumatoïde/LB pour induire la réponse auto-immune spécifique impliquée dans la chronicité de la maladie. La PR est caractérisée par la production d'autoanticorps circulants (facteurs rhumatoïdes, autoanticorps anti-peptides citrullinés) dont la pathogénicité ainsi que le mécanisme de production sont encore mal connus. La présence et la persistance des autoanticorps chez des patients atteints de PR suggèrent une activation chronique des LB autoréactifs. Il a été démontré que la sécrétion de BAFF par des cellules épithéliales amygdaliennes humaines et d'APRIL par les cellules épithéliales intestinales, était capable d'activer et d'induire la commutation isotypique des LB en l'absence des LT. Sous la direction du Docteur Pauline SOULAS-SPRAUEL, nous avons étudié la capacité des FLS rhumatoïdes à interagir directement ou indirectement avec les LB et à induire la synthèse d'anticorps.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans L'European Journal of Immunology (2011) : « Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF »

Ghada Alsaleh, **Antoine François**, Anne-Marie Knapp, Jean-Nicolas Schickel, Jean Sibilia, Jean-Louis Pasquali, Jacques-Eric Gottenberg, Dominique Wachsmann and Pauline Soulas-Sprauel. Eur. J. Immunol. 2011. 41: 2113–2122

European Journal of Immunology

Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF

Ghada Alsaleh[1,2], Antoine François[1,2], Anne-Marie Knapp[3,4], Jean-Nicolas Schickel[3,4], Jean Sibilia[1,2], Jean-Louis Pasquali[3,4], Jacques-Eric Gottenberg[1,2], Dominique Wachsmann[1,2] and Pauline Soulas-Sprauel[3,4]

[1] Laboratoire Physiopathologie des Arthrites, Université de Strasbourg, UFR Sciences Pharmaceutiques, Illkirch, France
[2] Departement de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg Hautepierre, France
[3] CNRS UPR9021, IBMC, Strasbourg, France
[4] Department of Clinical Immunology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) are important actors in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. The autoimmune nature of RA is attributed to autoantibody production, which confers to B cells a predominant role in RA. Several arguments support an induction of class switch recombination (CSR) in RA synovium, causing – in conjunction with somatic hypermutation – the production of potentially pathogenic IgG. To determine whether RA FLSs can directly promote CSR and to analyze the role of external factors like TLR signals and BAFF (B cell activating factor) family cytokines in this FLS-B cell crosstalk, we performed cocultures of blood B cells (from normal individuals or RA patients) with RA FLSs and analyzed CSR induction by quantification of *AICDA* (encoding activation-induced cytidine deaminase, AID) and switch circular transcripts expression, and IgG secretion. RA FLSs – and to a lesser extent osteoarthritis or control FLSs – promoted CSR, and TLR3 stimulation potentialized it. In addition, induction of CSR by RA FLSs was totally dependent on cell–cell contact in basal conditions, and partially dependent in the case of TLR3 stimulation. Finally, we showed that the mechanism by which RA FLSs induce CSR is mostly BAFF-dependent. Our results support the hypothesis that CSR can be induced outside the ectopic lymphoid structures in RA.

Key words: BAFF · Class switching · Rheumatoid arthritis · Synoviocytes

Supporting Information available online

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe inflammatory joint disease with a polymorphic infiltration of the synovium, leading to a destructive pannus [1]. Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) are one of the predominant cell types in the terminal layer of hyperplasic synovium in RA, and drive inflammation and destruction of the joint [2]. RA is characterized by an activation of innate immunity in the synovium, followed by induction of adaptive immunity. This leads to osteoclast activation and joint destruction [3]. Autoimmune features of RA consist in the production of autoantibodies, including rheumatoid factor (RF)

Correspondence: Dr. Pauline Soulas-Sprauel
e-mail: Pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

and autoantibodies specific to citrullinated protein antigens (anti-CCP) [4]. B cells seem to play an important role, reinforced by the efficacy of rituximab (anti-B-cell antibody) in patient treatment [5]. B cells can be involved as antigen presenting cells [6, 7] and as producers of a variety of cytokines, which are found in the inflammatory environment (TNF, lymphotoxin, IL-6) [8]. In addition, the levels of the B-cell survival cytokines BAFF (B cell activating factor) and APRIL (a proliferation-inducing ligand) are elevated in RA [9, 10], and BAFF/APRIL seem to play an important role in the development of synovitis [11]. Finally and most importantly, B cells produce the autoantibodies characteristic of RA. The pathogenic role of autoantibodies has been proved in several murine models of RA [12, 13].

How do these autoreactive B cells emerge? RA is characterized by a breakdown in central and peripheral B-cell tolerance [14]. In the periphery, B cells can gain affinity of their BCR through the mechanism of somatic hypermutation (SHM) and diverse the functionality of Ig by a switch from IgM to other Ig isotypes (class switch recombination, CSR). The repertoire of V genes in RF+ B cells from RA synovial tissues shows a restricted VH usage, in favor of VH3, with accumulation of mutations in the VH segment [15]. A repertoire of mutated Humkv325 (a VκIII segment frequently associated with autoantibody reactivity, notably RF), produced by clones likely arisen from the same B-cell progenitor, has also been described in RA synovium [16]. Additional studies have described oligoclonal RF+ B-cell populations in the RA synovium [17], and a high number of mutations in Ig heavy and light chain V regions, in a limited number of clones directly isolated from synovial tissue [18]. The expansion of autoreactive B cells in RA could therefore result from a local antigen receptor-driven selection. A clonal relationship between IgM and IgA RF in RA synovium suggests that a mechanism of CSR has also locally occurred [17]. In addition, AID (activation-induced cytidine deaminase, essential enzyme for SHM and CSR) positive B cells are detected in RA synovium, AID expression is higher in PBMCs of RA patients and is correlated to seric levels of anti-CCP IgG [19]. Thus SHM and CSR could occur in autoreactive B cells in the RA synovium, although in other studies antigen-driven clonal expansion with affinity maturation of B cells could not be detected [20]. The clinical significance of SHM and CSR in RA synovium is today unknown.

In secondary lymphoid organs, SHM and CSR mechanisms take place in organizations called GCs, resulting from an intense proliferation of B cells, surrounded by helper T cells in a network of follicular dendritic cells. Does GC development arise in an ectopic manner in RA synovitis? RA synovitis presents different types of infiltrates, depending on the patients, the most frequent being a diffuse infiltrate of T and B cells, and of macrophages, without a high level of organization. In the remaining 40–50% patients, synovitis is organized into lymphoid follicles but only 25–30% are characterized by ectopic lymphoid neogenesis with real GC formation [21, 22]. Therefore, the majority (75%) of RA patients do not present any sign of GC formation in the synovial membrane. Moreover, synovial lymphoid neogenesis seems to be not restricted to RA and rather related to the degree of inflammation, and is not correlated to anti-CCP or RF production [20, 23]. Are the potentially pathogenic and autoreactive B cells generated in situ, or do they migrate in the synovium after being generated in the periphery? In case of an in situ genesis, in a GC-independent mechanism, how are they generated?

In this study we decided to analyze the potential role of FLSs in the differentiation of naive B lymphocytes to switched B cells. Dechanet et al. have shown that FLSs promote tonsillar B-cell differentiation to CD38+plasma cells in vitro, but they did not detect any IgG production characteristic of switching, unless adding staphylococcus aureus Cowan particles or cytokines, and showed that this process is not specific to RA FLSs [24]. Moreover, a recent study described anti-CCP and AID-positive B cells surrounding GC-like structures [25]. Considering these data, the question of the role of GC-independent cells of the synovium, like FLSs, in B-cell differentiation into IgG secreting cells in RA remains opened. In order to answer this question, we developed an in vitro coculture of FLSs from normal, RA or osteoarthritis (OA) individuals with B cells and studied the B-cell response in terms of CSR by the analysis of AID and switch circular transcript (CT) expression, and IgG secretion. In order to evaluate if extrinsic factors influence the crosstalk between FLSs and B cells, we also analyzed the role of TLR signals and BAFF in the induction of CSR by FLSs.

Results

RA FLSs induce CSR in B cells from non-treated RA patients or normal individuals

In order to study the role of FLSs in the induction of CSR in RA, we cocultured purified RA FLSs and purified blood-naive B cells. The yield of total B-cell isolation was 95%, isolated B cells being composed of 99% $CD19^+/CD27^-$ naive B cells and 1% $CD19^+/CD27^+$ non-naive B cells (Supporting Information Fig. 1). We used B cells from untreated RA patients to avoid effects of immunosuppressive drugs on the response of B cells, and compared their response to that of B cells from normal individuals. FLSs do not produce neither markers of CSR nor IgG in the supernatant, attesting for the absence of contaminating B cells in FLSs cultures (data not shown). B cells from non-treated RA patients showed a higher expression of *AICDA* (encoding AID) transcript and of Iγ1/2-Cμ and Iγ3-Cμ CSR CTs (molecular byproducts of IgG1/2 and IgG3 CSR, respectively) when cultured for 4 days in presence of FLSs from RA, than did B cells cultured alone (white bars, Fig. 1A–C, respectively). This induction of CSR machinery leads to an increase of IgG secretion after 8 days of culture (white bars, Fig. 1D). RA FLSs induced CSR in B cells from normal individuals, in the same extent as in B cells from non-treated RA patients (black bars, Fig. 1A–D).

In order to evaluate the role of extrinsic factors in the crosstalk between FLSs and B cells, we analyzed the role of TLR signals, notably TLR3. Indeed, it has been shown that myeloid dendritic cells and epithelial cells induce class switching in B cells, by a mechanism potentialized by TLR3 [26, 27]. The addition of TLR3 agonist poly(I:C) to purified naive B cells without FLSs leads to a higher expression of *AICDA* transcript,

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

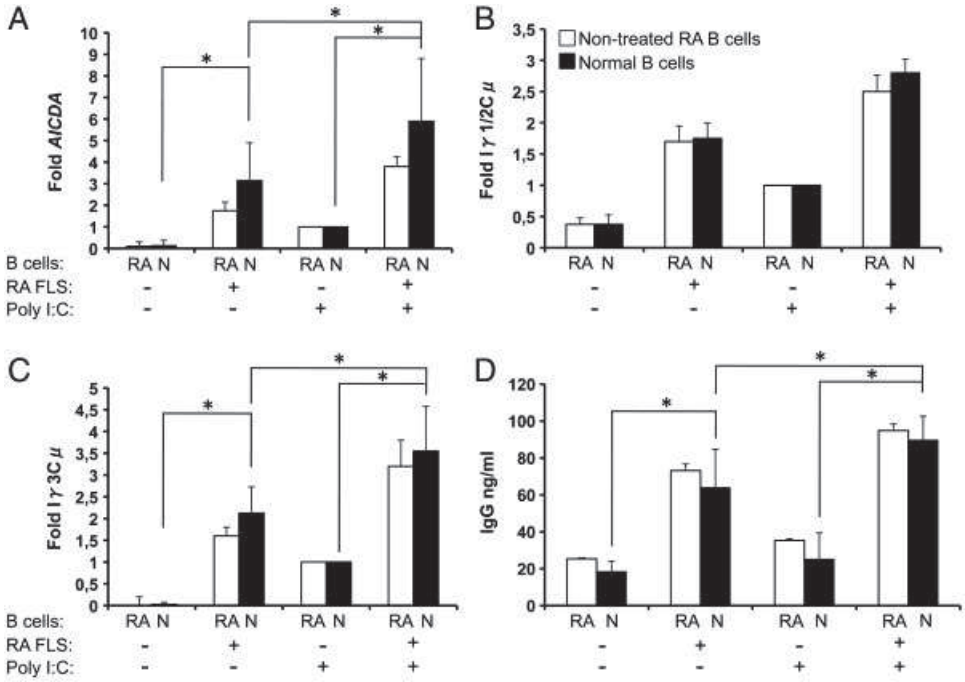

Figure 1. RA FLSs induce CSR in B cells from non-treated RA patients or from normal individuals, in a TLR3-potentiated manner. (A–C) Quantitative real-time RT-PCR of *AICDA* (A), Iγ1/2-Cμ (B) and Iγ3-Cμ (C) CTs (day 4) in peripheral blood B cells after incubation with or without poly(I:C) at 10 μg/mL, with or without RA FLSs. Naive B cells were isolated from non-treated RA patients (white bars) or normal individuals (black bars). The indicated mRNAs were normalized to *CD19* mRNA (constitutively expressed in B cells). Results are expressed as fold change compared with samples from B cells cultures with poly(I:C). (D) IgG release was determined by ELISA in 8-day culture supernatants. Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of three (or four for B cells from normal individuals, in Fig. 1A, C, D) independent experiments, made by using FLSs from three different RA patients. *$p<0.05$, two-tailed Mann and Whitney test.

CSR CT expression and IgG secretion (Fig. 1A–D, white and black bars), as already described [27]. Moreover, the addition of poly(I:C) to the FLS/B-cell cocultures increased the induction of CSR machinery and IgG secretion (Fig. 1A–D, white and black bars), as compared to cocultures without poly(I:C). Once again, the response was not different between untreated RA patients and normal individuals.

From these results we can conclude that FLSs from RA patients induce CSR, by a mechanism potentialized by TLR3 signal. The capacity of B cells to switch in response to FLSs was not the consequence of a B-cell disorder in RA, at least in untreated patients. Because there was no difference in the response of B cells between untreated RA patients and normal individuals, we decided to use B cells from normal individuals in the rest of the experiments.

As tested at day 2 in B cells in the absence or presence of FLSs, *AICDA* transcript and CSR CT expression was already detectable and higher in the presence of RA FLSs, but the differential expression of *AICDA* and CT transcripts in B cells in the presence or absence of FLSs was not attributable to a equivalent difference in cell viability (Fig. 2A–D).

Induction of CSR by FLSs could be specific to RA

To test if the induction of CSR in B cells by FLSs is specific of RA, we compared the response of B cells to signals provided by FLSs from RA patients, OA patients and from normal individuals. FLSs from OA patients or normal individuals induced only a slight increase of *AICDA* transcript and CSR CT expression, and of IgG secretion, in the presence or absence of poly(I:C) (Fig. 3A–D). We can therefore conclude that the induction of CSR by FLSs in B cells seems specific to RA.

RA FLSs induce CSR through cell surface and soluble factors, depending on TLR3 activation status

To determine if the induction of CSR in B cells by RA FLSs is dependent on a soluble or a cell surface factor, we analyzed CSR process in transwell experiments, with or without a preincubation of FLSs with poly(I:C), before addition of B cells. FLS/B-cell coculture in the absence of poly(I:C) does not induce any increase of IgG secretion in transwell experiments, compared to B cells alone (Fig. 4A). This means that the blockade of cell–cell contact almost completely inhibits the induction of CSR by FLSs (96% inhibition for IgG secretion, compared to cultures without transwell). FLSs stimulated by poly(I:C) partially keep their capacity to increase IgG secretion when cell–cell contacts are prevented (the induction of IgG secretion is inhibited by 63%) (Fig. 4A). To confirm these results, we incubated RA FLSs with poly(I:C) or medium alone for 3 days, then stimulated B cells with the supernatant for 8 days. While the supernatant from unstimulated FLSs only slightly increased IgG secretion by

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

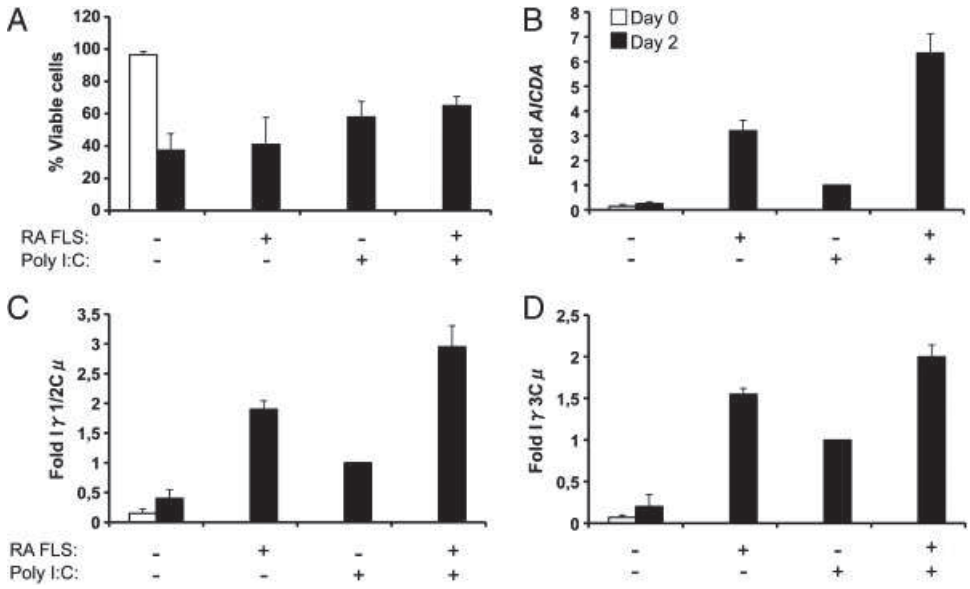

Figure 2. The differential expression of CSR markers in B cells in the presence or absence of FLSs is not attributable to a difference in cell viability. Peripheral blood B cells isolated from normal individuals were cultured with or without poly(I:C) at 10 μg/mL, and with or without RA FLSs, for 2 days. (A) Viability of B cells was determined by flow cytometry at days 0 and 2, by calculating the proportion of $CD19^+$ B cells impermeable to propidium iodide. (B–D) Quantitative real-time RT-PCR of *AICDA* (B), Iγ1/2-Cμ (C) and Iγ3-Cμ (D) CTs (day 0 and day 2). The indicated mRNAs were normalized to *CD19* mRNA (constitutively expressed in B cells). Results are expressed as fold change compared with samples from B cells cultures with poly(I:C). Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of two independent experiments, made by using FLSs from two different RA patients.

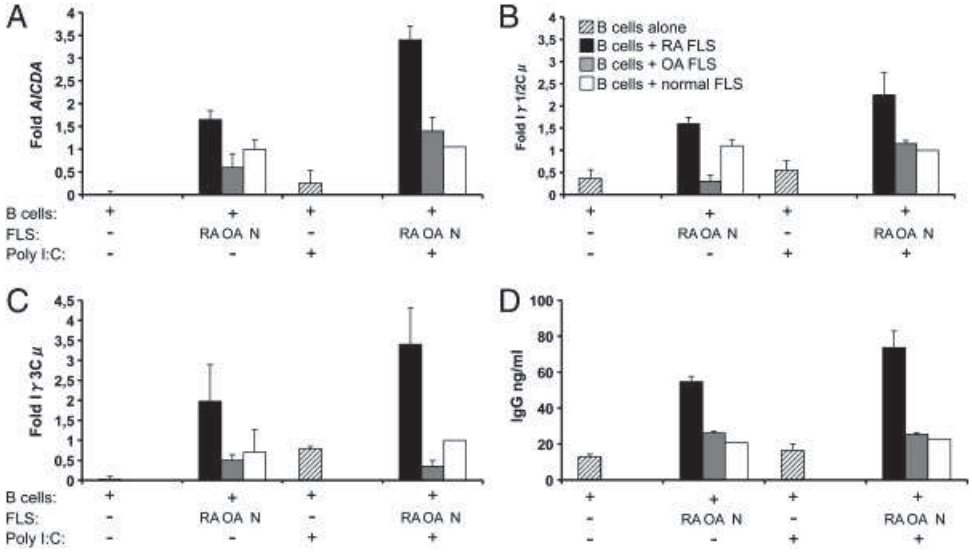

Figure 3. Induction of CSR in B cells by FLSs is specific of RA. (A–C) Quantitative real-time RT-PCR of *AICDA* (A), Iγ1/2-Cμ (B) and Iγ3-Cμ (C) CTs (day 4) in peripheral blood B cells from normal individuals, after incubation with or without poly(I:C) at 10 μg/mL, alone (hatched bars) or in the presence of FLSs from RA (black bars), or OA (grey bars) patients, or normal individuals (white bars). The indicated mRNAs were normalized to *CD19* mRNA (constitutively expressed in B cells). Results are expressed as fold change compared with samples from cocultures of B cells and normal FLSs, with poly(I:C). (D) IgG release was determined by ELISA in 8-day culture supernatants. Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of two independent experiments, made by using FLSs from two different RA patients, two different OA patients and two different normal donors.

B cells, the supernatant from stimulated FLSs increased it (Fig. 4B), with a ratio similar to that observed in transwell experiments. We can therefore propose that the induction of CSR by FLSs is dependent of a cell surface factor in basal conditions of culture, to which a soluble factor is added when FLSs are stimulated with poly(I:C).

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

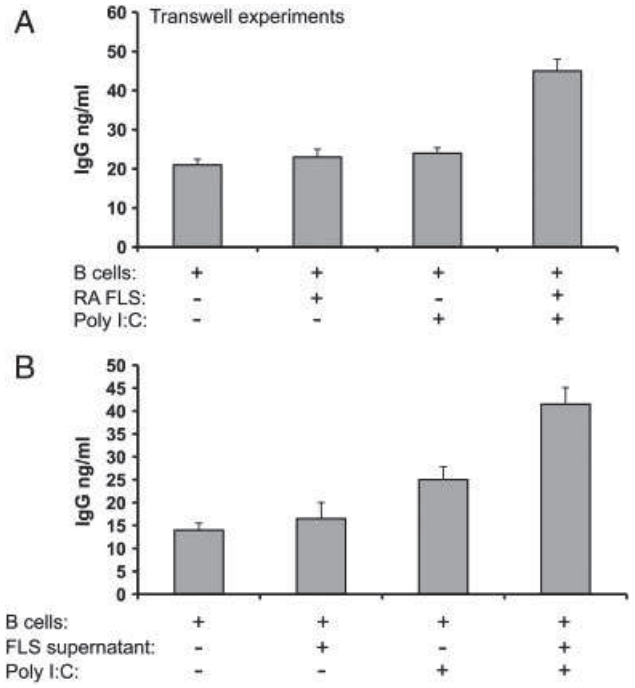

Figure 4. Induction of CSR by RA FLSs is dependent on cell surface factors, supplemented by soluble factors in the case of TLR3 stimulation. (A) FLSs and B cells were seeded in the upper and lower chambers, respectively, of a membrane transwell. RA FLSs were preincubated for 5 h with poly(I:C) at 10 μg/mL or with medium alone, before the addition of B cells. Levels of secreted IgG were determined by ELISA in 8-day supernatants. Data shown are mean+SD of three independent experiments. (B) RA FLSs were incubated for 3 days with poly(I:C) at 10 μg/mL, the supernatant was then harvested and incubated with B cells. As a control, B cells were incubated with poly(I:C) at 10 μg/mL. Levels of secreted IgG were determined by ELISA in 8-day supernatants. Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of two independent experiments, made by using FLSs from two different RA patients.

Expression of cell surface BAFF/APRIL and secretion of BAFF on/in RA FLSs

The property of RA FLSs to induce CSR in B cells could be the consequence of an increased production of cell surface/soluble cytokines like BAFF/APRIL, which are known to induce CSR in human [26–28] and in mouse [29] B cells. Therefore, we analyzed the production of BAFF and APRIL mRNA (by real-time quantitative RT-PCR), the expression of the protein on the surface and the secretion of the soluble form (by ELISA) in/on FLSs from RA and OA patients, compared to FLSs from normal individuals and skin fibroblasts. Our results showed that, in basal conditions, RA FLSs produce BAFF and APRIL mRNA (Fig. 5A and D) and express cell surface BAFF and APRIL (Fig. 5B and E) at a higher level than OA and normal FLSs. We also detected a slight secretion of BAFF in culture supernatants, which was not strongly different between RA and OA FLSs (Fig. 5C). Finally, we could not detect any secretion of APRIL by FLSs (Fig. 5F). Stimulation of FLSs by poly(I:C) increased the production of BAFF and APRIL mRNA (Fig. 5A and D), cell surface expression of BAFF and APRIL (Fig. 5B and E) and finally secretion of BAFF (Fig. 5C), without any increase of secretion of APRIL (Fig. 5F). In this case, the higher differences between RA and OA FLSs were detected for BAFF mRNA production and BAFF secretion. In conclusion, the cell surface factor responsible for the induction of CSR by FLSs in basal conditions of culture could be BAFF and/or APRIL, and the soluble factor responsible (in conjunction with a cell surface factor) for CSR induction after poly(I:C) stimulation could be BAFF, but not APRIL.

The induction of CSR by FLSs is blocked by an anti-BAFF antibody

In order to explore the role of BAFF in the induction of CSR by FLSs, we have tested the expression of *AICDA* transcript and CSR CT in B cells, and the secretion of IgG in supernatants of cocultures of FLSs and B cells, in the presence or absence of a blocking anti-BAFF antibody. In the absence of any available blocking anti-APRIL antibody (which binds to APRIL and specifically blocks the binding of APRIL to APRIL receptors), we did not test the role of APRIL in this process. The induction of *AICDA* transcript and CSR CT expression, and of IgG secretion, by unstimulated or stimulated RA FLSs, is partially inhibited by an anti-BAFF antibody (Fig. 6A–D, white bars). In addition, in transwell experiments, the anti-BAFF antibody almost completely inhibited the secretion of IgG in the presence of poly(I:C) (data not shown).

The higher induction of CSR by FLSs in the presence of poly(I:C) was not the consequence of an increased expression of BAFF-R on B cells after TLR3 activation, as tested by flow cytometry (data not shown).

In conclusion, BAFF is one of the cell surface factors responsible for the induction of CSR by RA FLSs, and the most important soluble factor, in the condition of TLR3 activation.

Induction of CSR by FLSs is blocked in B cells from RA patients treated with immunosuppressive drugs

We thought it would be interesting to see if induction of CSR in B cells from RA patients is dependent on the current treatment of the disease. Interestingly, we did not detect any induction of AID and CSR CT expression, nor any increased IgG secretion in coculture of RA FLSs and naive B cells isolated from RA patients who are otherwise treated by immunosuppressive drugs (Fig. 7). These results could indicate that the treatment administrated to the patients blocks the induction of CSR in B cells by FLSs. This mechanism could partly account for the efficacy of these treatments in RA.

Discussion

Our results provide the first evidence that RA FLSs induce CSR in peripheral blood B cells, as assessed by the increased expression

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

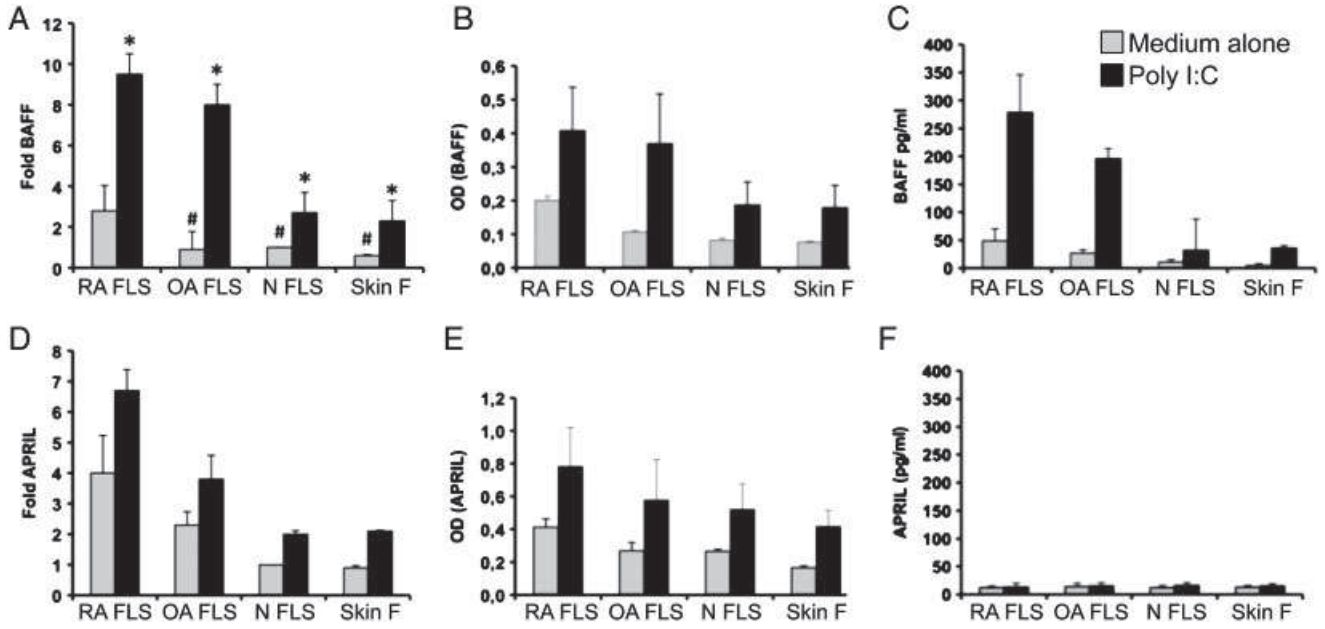

Figure 5. BAFF and APRIL expression and production in FLSs from RA patients. BAFF (A) and APRIL (D) mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR in FLSs from patients with RA or OA, FLSs from normal individuals or skin fibroblasts (skinF, NHDFs) as a negative control, cultured for 72 h with poly(I:C) at 10 μg/mL (black bars) or medium alone (grey bars). Results were normalized to GAPDH and expressed as the fold change compared with samples from normal FLSs incubated in medium alone. Differences were statistically significant when comparing (1) in each group (RA, OA and control FLSs, skinF), poly(I:C) stimulated cells to unstimulated cells ($^{*}p<0.001$, two-tailed Mann and Whitney test), (2) unstimulated OA FLSs or control FLSs or skinF to unstimulated RA FLSs ($^{\#}p<0.001$, two-tailed Mann and Whitney test). Cell surface expression of BAFF (B) and APRIL (E), as determined by ELISA on cells cultured as in (A). ELISA of soluble BAFF (C) and APRIL (F) from cells cultured as in (A). Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of three independent experiments, made by using FLSs from three different RA patients and three different OA patients.

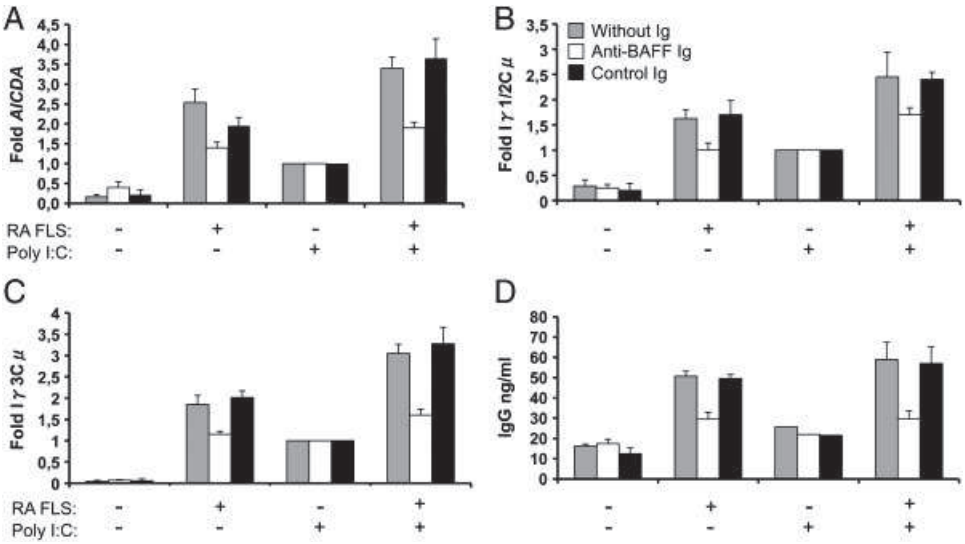

Figure 6. BAFF is one of the factors responsible for induction of CSR by RA FLSs. (A–C) Quantitative real-time RT-PCR of *AICDA* (A), Iγ1/2-Cμ (B) and Iγ3-Cμ (C) CTs (day 4) from peripheral blood B cells after incubation with or without poly(I:C) at 10 μg/mL, with or without RA FLSs, and with anti-BAFF antibody (white bars), or control IgG (black bars), or medium alone (grey bars). The indicated mRNAs were normalized to *CD19* mRNA (constitutively expressed in B cells). (D) IgG release was determined by ELISA in 8-day supernatants. Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of three independent experiments, made by using FLSs from three different RA patients.

of *AICDA* transcript and CSR CT. Interestingly, this induction of CSR by FLSs seems specific of RA. Previous studies supported evidence that RA FLSs enhance survival of peripheral blood B cells in vitro, although this was more evident with FLSs conditioned with IFN-γ and TNF-α [30]. In addition, FLSs can protect B cells from spontaneous apoptosis in vitro, in an RA-specific manner [31]. An expression of AID in association with follicular dendritic cell networks has recently been detected in RA

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

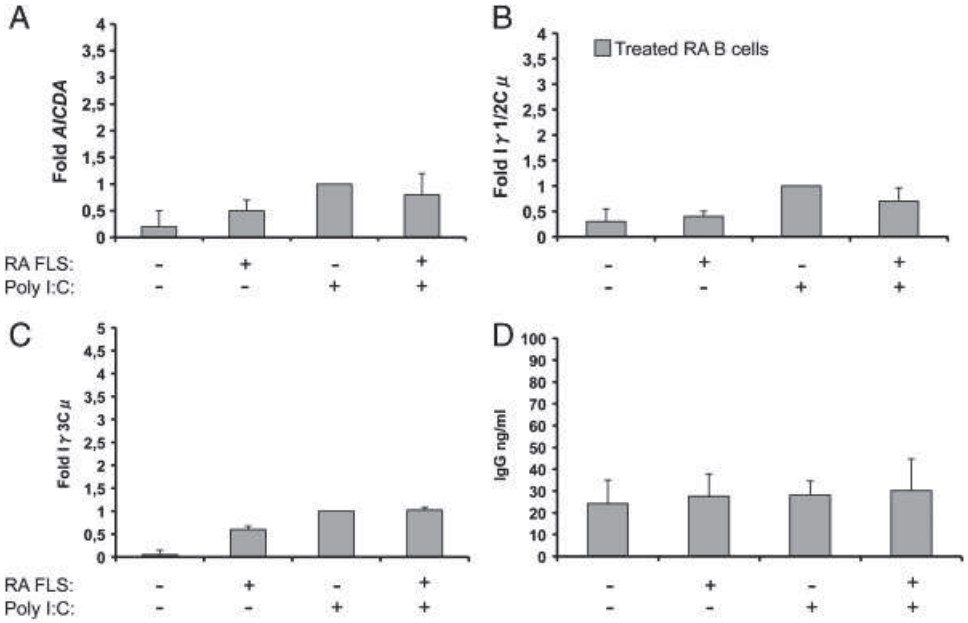

Figure 7. RA FLSs do not induce CSR in B cells from RA patients who are treated with immunosuppressive drugs. (A–C) Quantitative real-time RT-PCR of *AICDA* (A), Iγ1/2-Cμ (B) and Iγ3-Cμ (C) CTs (day 4) in peripheral blood B cells after incubation with or without poly(I:C) at 10 μg/mL, with or without RA FLSs. Naive B cells were isolated from RA patients treated with immunosuppressive drugs (grey bars). The indicated mRNAs were normalized to *CD19* mRNA (constitutively expressed in B cells). Results are expressed as the fold change compared with samples from B cells cultures with poly(I:C). (D) IgG release was determined by ELISA in 8-day supernatants. Data are expressed as the mean of duplicate samples+SD and are representative of three independent experiments, made by using FLSs from three different RA patients.

synovial membrane. Anti-CCP B cells were localized around AID-positive/follicular dendritic cell networks [25]. Although demonstrating that GC-like structures in RA synovium contain the molecular machinery necessary for CSR, it did not directly prove that these ectopic lymphoid structures allow for the differentiation of autoantibody-producing B cells and did not exclude that other cells of RA synovium could also promote it. In conclusion, our results propose that FLSs can promote CSR, in a mechanism independent of ectopic lymphoid structures. Considering that the majority of RA patients do not present any sign of GC-like structures in synovial membranes, we could imagine that both processes of CSR induction, follicular dendritic cell/GC-dependent and independent, coexist in RA synovium.

We studied the role of extrinsic factors, as TLR signals, in the cooperation between FLSs and B cells. The addition of poly(I:C) to B cells cultured without FLSs increased the CSR process. These results could be explained by an upregulation of TLR3 on peripheral blood B cells after exposure to poly(I:C) [27]. We demonstrated that the addition of poly(I:C) to FLS/B-cell cocultures increased the induction of CSR. These data are in concordance with the study by Xu et al., which showed that primary oral epithelial cells and myeloid dendritic cells stimulate CSR in peripheral blood and in tonsillar IgD+B cells, respectively, by a BAFF-dependent mechanism, and that it is enhanced in the presence of poly(I:C) [26, 27]. The levels of IgG secretion in our FLS/B-cell cocultures were not lower to that observed in coculture of primary oral epithelial cells and tonsillar IgD+B cells in the study by Xu et al. [27]. The reinforcement of CSR induction by FLSs in the presence of poly(I:C) could be explained by a higher production by FLSs of a factor (as BAFF for example), which could be a direct inducer of CSR or which could upregulate TLR3 transcripts expression in B cells, making them more responsive to poly(I:C), as already demonstrated with tonsillar IgD+B cells exposed to BAFF [26]. In conclusion, signals through TLRs increase cooperation between FLSs and B cells in RA. TLR3 being the receptor for viral dsRNA, this could be linked to the detection of EBV in RA synovium [32]. In addition, this is consistent with the role played by TLRs in autoimmunity, as illustrated in the AM14 RF transgenic murine model [33].

What could be the factors responsible for CSR induction by FLSs in RA? The induction of CSR by FLSs seems to be dependent on a cell surface factor, to which a soluble factor is added when FLSs are stimulated by poly(I:C). Considering the well-described role of BAFF/APRIL cytokines in the induction of CSR [26, 28, 29], we wondered whether these cell surface and soluble factors could be BAFF/APRIL. Indeed, we have shown that BAFF is expressed in RA FLSs in basal conditions, as already demonstrated by Ohata et al. [30]. The expression of BAFF in RA FLSs is upregulated after poly(I:C) stimulation. In addition, the secretion of BAFF by FLSs is increased after TLR3 stimulation. This is in contrast with the absence of effect of TLR2, TLR4 and TLR9 ligands on BAFF expression and secretion by RA FLSs [34]. We detected a cell surface expression of APRIL on FLSs, increased after TLR3 activation, without any secretion of APRIL in any conditions. The comparative analysis of BAFF/APRIL expression/secretion by RA and OA FLSs could not definitely lead to conclude that BAFF and APRIL could be the factors responsible for the potential specificity of CSR induction by RA FLSs in B cells. The involvement of BAFF in FLS-induced CSR was further supported by the partial inhibition of

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

IgG secretion by unstimulated and TLR3-stimulated FLSs after incubation with a blocking anti-BAFF antibody. Our overall data are consistent with the model proposed by Cerutti's team, demonstrating a direct role of epithelial cells or dendritic cells in CSR, in a BAFF-dependent manner [26–28].

Elevated seric BAFF levels have been detected in patients with various autoimmune conditions, including RA, strongly suggesting a role for BAFF in the pathogenesis of autoimmune diseases [35]. In addition, Seyler et al. have detected an expression of BAFF in synovial membranes from patients with RA, in GC-like structures in T cell-B cell aggregates or in diffuse infiltrates [11].

RA FLSss induce CSR through cell surface factor(s) in basal conditions, and the inhibition of induction of CSR is not complete in the presence of an anti-BAFF antibody. We can therefore not exclude that other factors besides BAFF could also be responsible for this process: the role of cell-surface APRIL could not be tested in the absence of any specific available anti-APRIL-blocking antibody. In the presence of TLR3 agonist, RA FLSs induce CSR through cell surface and soluble factor(s). In this case, the inhibition of induction of CSR is also not complete in the presence of an anti-BAFF antibody, but is complete in transwell experiments. This means that the soluble factor is most probably BAFF, but that other cell surface factors could be implicated. It seems not to be APRIL, because our experiments showed that the stimulation of RA FLSs with poly(I:C) does not lead to a secretion of APRIL. IL-6 could be considered as a good candidate: RA FLSs can induce Rag expression in peripheral blood B cells (which could induce a revision of the BCR genes, with the emergence of a potential autoreactivity), by a mechanism that is BAFF and IL6 dependent [36]; a proposed hypothesis is that IL-6 increases the expression of BAFF-R on B cells, as demonstrated with other cytokines like IL-4 [37]. Further experiments will be needed to further explore this point.

According to our results, CSR is induced by RA FLSs in B cells from normal individuals, in the same extent as in B cells from non-treated RA patients. However, we did not detect any induction of CSR by RA FLSs in B cells sorted from RA patients who were otherwise treated by immunosuppressive drugs, the common treatment between the patients being a methotrexate therapy. The immunosuppressive treatment administrated to the patients could block the induction of CSR in B cells by FLSs. In particular, it has been shown that the levels of BAFF are reduced in methotrexate-treated early RA patients [38].

In conclusion, our results suggest that FLSs can induce CSR through a BAFF-dependent mechanism, and that TLR3 signal play a role in this FLS/B-cell cooperation. Our results give new opportunities for the investigation of FLS/B-cell crosstalk in RA pathogenesis, and for the role of BAFF in this crosstalk.

Materials and methods

Patients and cells

FLSs were isolated from synovial tissues of three different RA and three different OA patients, at the time of knee joint arthroscopic synovectomy, as described earlier [39]. Blood mononuclear cells were isolated from three non-treated, three treated RA patients and six healthy donors. Diagnosis of RA conformed to the American College of Rheumatology criteria [40]. Normal FLSs were isolated from synovial tissues (arthroscopic biopsy of knee). RA patients were either untreated, or treated with methotrexate, alone or associated to anti-TNF$\pm$ corticosteroids. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki and obtained from all patients. Approval by the ethical committee of the Hopitaux Universitaires de Strasbourg was obtained. FLS cultures were performed as described earlier [41]. FLS cultures contained a homogeneous population of fibroblastic cells, (i) negative for CD16 (Supporting Information Fig. 2), (ii) capable of IL-6 secretion after LPS stimulation (Supporting Information Fig. 3A), (iii) incapable of TNF-α secretion, in opposition to monocytic THP1 cells (Supporting Information Fig. 3B and C). Cell number and viability were checked by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test [42]. Blood mononuclear cells were isolated by Ficoll centrifugation. Naive B cells were then selected by a negative sorting (Naive B cell isolation kit II, Miltenyi Biotec) and used for all experiments. Normal human dermal fibroblasts (NHDFs) (Promocell) were used as control fibroblasts.

Cultures and reagents

Cells were cultured in RPMI1640 for B cells and B cell-FLS cocultures, and M199/RPMI media for maintenance of FLSs and NHDFs in culture. Medium was supplemented with FCS, penicillin, streptomycin, amphotericin B (Invitrogen). Poly I:C (Invivogen) was used at 10 μg/mL, anti-human BAFF IgG or control IgG (R&D Systems) at 10 ng/mL. FLSs (2.10^5 cells) alone, B cells (1.10^6 cells) alone, or cocultures were seeded in 24-well plates. FLSs were preincubated for 5 h with poly(I:C) at 10 μg/mL, or with medium alone, and with or without anti-human BAFF IgG or control IgG (in the case of blocking experiments), before the addition of B cells. For transwell experiments, FLSs (2.10^5 cells) and B cells (1.10^6 cells) were seeded in the upper and lower chambers, respectively, of a 3.0 μm PET membrane transwell (Nuck) and preincubated for 5 h with poly(I:C) at 10 μg/mL or with medium alone, before addition of B cells. For experiments with FLS supernatant, FLSs (2.10^5 cells) were incubated for 3 days with poly(I:C) at 10 μg/mL or with medium alone, then supernatants were harvested and incubated on B cells (1.10^6 cells) for 8 days. B-cell viability was measured by flow cytometry using anti-CD19 antibody and propidium iodide.

Real-time quantitative RT-PCR of AICDA and CSR CTs

Total RNA was extracted from cells using the Nucleospin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel); then reverse transcribed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

was performed in a volume of 20 μL using SensiMix Plus SYBR kit (Quantace, Corbett Life Science). After an initial incubation at 96°C for 10 min, samples were subjected to 40 rounds of amplification for 10 s at 95°C, 15 s at 60°C and 25 s at 72°C using a Rotor-Gene™ 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products. The fold of a specific gene was calculated according to the equation fold = $2^{-}(\Delta^{Ct2-}\Delta^{Ct1})$, where ΔCt is the cycle threshold of the test gene minus the cycle threshold of CD19 (for samples containing B cells + FLSs) or GAPDH (for samples containing FLSs alone), 2 is a specific sample and 1 is the control sample. Primers used for *AICDA*, and Iγ1/2-Cμ, Iγ3-Cμ, Iα1/2-Cμ CT were described elsewhere [27]. The other primers used are CD19 forward (5′-CGAGTTCTATGA-GAACGACTC-3′) and reverse (5′-ACTGGAAGTGTCACTGGCATG-3′); GAPDH forward (5′-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3′) and reverse (5′-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3′); BAFF forward (5′-TGAAACACCAACTATACAAAAAG-3′) and reverse (5′-TCAATT-CATCCCCAAAGACAT-3′); APRIL forward (5′- CTCTGCTGACCCAA-CAAACA-3′) and reverse (5′- CTCCTTTTCCGGGATCTCTC-3′).

ELISA

Total human IgG and IgM antibodies were measured using goat anti-human IgG or IgM, peroxidase-conjugated goat anti-human IgG or IgM (all from Jackson Immunoresearch), and were quantified by comparison with a standard curve using purified IgG or IgM (Sigma-Aldrich). Human BAFF and APRIL were detected with a standard ELISA kit (R&D Systems, PINDER MEDSysteme respectively). For detection of cell surface BAFF and APRIL on FLSs, 2×10^4 FLSs were seeded into 96-well plates and incubated in 200 μL of complete medium containing the different activators for 3 days. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 20 min. Free aldehyde groups were quenched with NH_4Cl 50 mM in PBS, pH 7.4, for 20 min. Non-specific binding was blocked by incubation in PBS containing 0.2% bovine serum albumin for 30 min at 37°C. The cells were then incubated with biotinylated anti-BAFF or anti-APRIL antibodies (R&D Systems) for 2 h and then with TMB for 20 min. Absorbance was measured at 450 nm.

Statistical analysis

Values were reported as the mean ± SEM and statistical significance with a two-tailed Mann and Whitney test.

Acknowledgements: We thank R. Alles for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Université de Strasbourg (UdS) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

1 **Klareskog, L., Catrina, A. I. and Paget, S.,** Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009. **373**: 659–672.

2 **Muller-Ladner, U., Ospelt, C., Gay, S., Distler, O. and Pap, T.,** Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* 2007. **9**: 223.

3 **Firestein, G. S.,** Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003. **423**: 356–361.

4 **Steiner, G.,** Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2007. **32**: 23–36.

5 **Quartuccio, L., Lombardi, S., Fabris, M., Masolini, P., Saracco, M., Pellerito, R. and De Vita, S.,** Long-term effects of rituximab in rheumatoid arthritis: clinical, biologic, and pharmacogenetic aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. **1173**: 692–700.

6 **Newton, J. L., Harney, S. M., Wordsworth, B. P. and Brown, M. A.,** A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2004. **5**: 151–157.

7 **Roosnek, E. and Lanzavecchia, A.,** Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J. Exp. Med.* 1991. **173**: 487–489.

8 **Gorman, C. L. and Cope, A. P.,** Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2008. **22**: 221–238.

9 **Cheema, G. S., Roschke, V., Hilbert, D. M. and Stohl, W.,** Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2001. **44**: 1313–1319.

10 **Roschke, V., Sosnovtseva, S., Ward, C. D., Hong, J. S., Smith, R., Albert, V., Stohl, W. et al.,** BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J. Immunol.* 2002. **169**: 4314–4321.

11 **Seyler, T. M., Park, Y. W., Takemura, S., Bram, R. J., Kurtin, P. J., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M.,** BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2005. **115**: 3083–3092.

12 **Taylor, P. C., Plater-Zyberk, C. and Maini, R. N.,** The role of the B cells in the adoptive transfer of collagen-induced arthritis from DBA/1 (H-2q) to SCID (H-2d) mice. *Eur. J. Immunol.* 1995. **25**: 763–769.

13 **Maccioni, M., Zeder-Lutz, G., Huang, H., Ebel, C., Gerber, P., Hergueux, J., Marchal, P. et al.,** Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 1071–1077.

14 **Samuels, J., Ng, Y. S., Coupillaud, C., Paget, D. and Meffre, E.,** Human B cell tolerance and its failure in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. **1062**: 116–126.

15 **Thompson, K. M., Borretzen, M., Randen, I., Forre, O. and Natvig, J. B.,** V-gene repertoire and hypermutation of rheumatoid factors produced in rheumatoid synovial inflammation and immunized healthy donors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995. **764**: 440–449.

16 **Lee, S. K., Bridges, S. L. Jr., Kirkham, P. M., Koopman, W. J. and Schroeder, H. W., Jr.,** Evidence of antigen receptor-influenced oligoclonal B lymphocyte expansion in the synovium of a patient with longstanding rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 1994. **93**: 361–370.

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

17 **Williams, D. G., Moyes, S. P. and Mageed, R. A.,** Rheumatoid factor isotype switch and somatic mutation variants within rheumatoid arthritis synovium. *Immunology* 1999. **98**: 123–136.

18 **Schroder, A. E., Greiner, A., Seyfert, C. and Berek, C.,** Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996. **93**: 221–225.

19 **Xu, X., Hsu, H. C., Chen, J., Grizzle, W. E., Chatham, W. W., Stockard, C. R., Wu, Q. et al.,** Increased expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with anti-CCP and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 2009. **70**: 309–316.

20 **Cantaert, T., Kolln, J., Timmer, T., van der Pouw Kraan, T. C., Vandooren, B., Thurlings, R. M., Canete, J. D. et al.,** B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 2008. **181**: 785–794.

21 **Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P. J., Cofield, R. H., O'Fallon, W. M., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M.,** Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* 2001. **167**: 1072–1080.

22 **Randen, I., Mellbye, O. J., Forre, O. and Natvig, J. B.,** The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand. J. Immunol.* 1995. **41**: 481–486.

23 **Thurlings, R. M., Wijbrandts, C. A., Mebius, R. E., Cantaert, T., Dinant, H. J., van der Pouw-Kraan, T. C., Verweij, C. L. et al.,** Synovial lymphoid neogenesis does not define a specific clinical rheumatoid arthritis phenotype. *Arthritis Rheum.* 2008. **58**: 1582–1589.

24 **Dechanet, J., Merville, P., Durand, I., Banchereau, J. and Miossec, P.,** The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J. Clin. Invest.* 1995. **95**: 456–463.

25 **Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M. C., Kirkham, B., Spencer, J. and Pitzalis, C.,** Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* 2009. **6**: e1.

26 **Xu, W., Santini, P. A., Matthews, A. J., Chiu, A., Plebani, A., He, B., Chen, K. and Cerutti, A.,** Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J. Immunol.* 2008. **181**: 276–287.

27 **Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A. et al.,** Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 294–303.

28 **Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P. and Cerutti, A.,** DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 822–829.

29 **Castigli, E., Wilson, S. A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K. P., Bram, R. J. et al.,** TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 35–39.

30 **Ohata, J., Zvaifler, N. J., Nishio, M., Boyle, D. L., Kalled, S. L., Carson, D. A. and Kipps, T. J.,** Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 2005. **174**: 864–870.

31 **Lindhout, E., van Eijk, M., van Pel, M., Lindeman, J., Dinant, H. J. and de Groot, C.,** Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 1999. **162**: 5949–5956.

32 **Takei, M., Mitamura, K., Fujiwara, S., Horie, T., Ryu, J., Osaka, S., Yoshino, S. and Sawada, S.,** Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunol.* 1997. **9**: 739–743.

33 **Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A.,** Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002. **416**: 603–607.

34 **Alsaleh, G., Messer, L., Semaan, N., Boulanger, N., Gottenberg, J. E., Sibilia, J. and Wachsmann, D.,** BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis Rheum.* 2007. **56**: 3202–3214.

35 **Mackay, F. and Schneider, P.,** Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. **9**: 491–502.

36 **Rochas, C., Hillion, S., Saraux, A., Mageed, R. A., Youinou, P., Jamin, C. and Devauchelle, V.,** Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-activating gene in B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 2009. **60**: 1261–1271.

37 **Darce, J. R., Arendt, B. K., Wu, X. and Jelinek, D. F.,** Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J. Immunol.* 2007. **179**: 7276–7286.

38 **Bosello, S., Youinou, P., Daridon, C., Tolusso, B., Bendaoud, B., Pietrapertosa, D., Morelli, A. and Ferraccioli, G.,** Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2008. **35**: 1256–1264.

39 **Dechanet, J., Taupin, J. L., Chomarat, P., Rissoan, M. C., Moreau, J. F., Banchereau, J. and Miossec, P.,** Interleukin-4 but not interleukin-10 inhibits the production of leukemia inhibitory factor by rheumatoid synovium and synoviocytes. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 3222–3228.

40 **Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A. et al.,** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988. **31**: 315–324.

41 **Neff, L., Zeisel, M., Sibilia, J., Scholler-Guinard, M., Klein, J. P. and Wachsmann, D.,** NF-kappaB and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell Microbiol.* 2001. **3**: 703–712.

42 **Mosmann, T.,** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983. **65**: 55–63.

Abbreviations: **AID:** activation-induced cytidine deaminase · **anti-CCP:** anti-citrullinated protein · **APRIL:** a proliferation-inducing ligand · **BAFF:** B-cell activating factor · **CSR:** class switch recombination · **CTs:** circular transcripts · **FLSs:** fibroblast-like synoviocytes · **NHDF:** normal human dermal fibroblast · **OA:** osteoarthritis · **RA:** rheumatoid arthritis · **RF:** rheumatoid factor · **SHM:** somatic hypermutation

Full correspondence: Dr. Pauline Soulas-Sprauel, CNRS UPR9021, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France
Fax: +33-3-88-61-06-80
e-mail: Pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr

Received: 25/10/2010
Revised: 17/2/2011
Accepted: 31/3/2011
Accepted article online: 10/5/2011

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Publication 2

1) Interactions cellules résidentes/lymphocytes B et rôle de BAFF dans la PR et la ScS

Publication 2 : Induction de la production de collagène, de cytokines et de marqueurs profibrotiques par les LB et BAFF dans un modèle de co-culture fibroblastes dermiques/LB *in vitro*.

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé que les LB pourraient jouer un rôle dans le déclenchement des processus de fibrogénèse dans la ScS en stimulant les fibroblastes dermiques. En effet, la présence de LB dans les biopsies de peau, la suractivation des LB chez les patients atteints de ScS et l'implication des LB dans des modèles murins de fibrose sont des arguments en faveur de l'implication des LB dans le déclenchement de la fibrose cutanée chez l'homme. Afin d'évaluer cette implication, nous avons réalisé des co-cultures de LB/fibroblastes dermiques stimulés ou non par BAFF et évalué la production de collagène, de cytokines ainsi que l'expression de protéines impliquées dans le remodelage tissulaire.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication soumise dans Arthritis Research & Therapy (2013) : « B lymphocytes and BAFF promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis »

Antoine François, Emmanuel Chatelus, Dominique Wachsmann, Jean Sibilia, Seiamak Bahram, Ghada Alsaleh* and Jacques-Eric Gottenberg*

* *Shared senior co-authorship*.

Publication 3

2) Implication de BAFF dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

Publication 3 : Rôle pathogène de BAFF dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris : liens particuliers avec l'IL-1β et l'IL-17A.

Le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est très largement utilisé dans la littérature. Il est considéré comme un modèle d'inflammation pulmonaire aigue conduisant à un remodelage tissulaire se manifestant par une production accrue de cytokines et de matrice extracellulaire. Il est considéré comme un modèle de fibrose pulmonaire idiopathique mais également comme un modèle de ScS suivant les études car les souris développent des auto-anticorps anti-nucléaires et une fibrose cutanée en cas d'injection sous-cutanée de bléomycine (Avouac et al., 2013; Yamamoto et al., 1999).

Nous avons étudié ici l'implication de BAFF et APRIL dans la fibrose pulmonaire induite par instillation intranasale de bléomycine chez la souris. Nous avons également disposé de lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique dans lesquels nous avons pu doser BAFF. L'IL-1β et l'IL-17A étant des cytokines ayant un rôle majeur dans ce modèle, nous avons ensuite évalué les boucles de régulation entre BAFF et ces deux cytokines. Enfin, nous avons évalué l'efficacité d'un traitement permettant d'inhiber BAFF chez ces souris, le BAFF-R-Ig.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication actuellement en cours de préparation : « Pathogenic involvement of BAFF in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice »

Cette version de l'article n'est pas définitive car les dernières expériences sont en cours de réalisation.

Antoine François (Premier auteur), liste des auteurs par ordre alphabétique (ordre à définir) : Sylvain Marchand Adam, Isabelle Couillin, Paméla Gasse, Aurélie Gombault, Jacques-Eric Gottenberg, Bernhard Ryffel, Pascal Schneider, Jean Sibilia, Bérengère Villeret, Dominique Wachsmann

Publication 4

3) Régulation de l'expression de BAFF dans les synoviocytes rhumatoïdes et les fibroblastes cutanés par les microARNs dans la PR et la ScS

Publication 4 : Régulation de l'expression de BAFF dans les synoviocytes rhumatoïdes et les fibroblastes cutanés par miR-30a*, d*, e* dans la PR et la ScS.

BAFF étant une cible intéressante dans les maladies auto-immunes, nous nous sommes intéressés à la régulation de son expression par les miARNs. Les miARNs sont des oligonucléotides simple brin, d'une vingtaine de nucléotides et de séquence partiellement complémentaire aux régions 3'-UTR de certains ARNm. Ils sont actuellement considérés comme des régulateurs importants de l'expression des gènes.

Nous avons évalué l'expression et la sécrétion de BAFF par les synoviocytes rhumatoïdes (FLS) et les fibroblastes cutanés (HDF) isolés de patients atteints de PR et de ScS ainsi que l'expression de miR-30a*, d*, e* (prédits pour cibler l'ARNm de BAFF) en réponse au Poly (I:C) et à l'IFN-γ. Nous avons ensuite déterminé si ces miRs pouvaient réguler l'expression de BAFF dans les FLS et les HDF de patients et la survie des LB induite par BAFF, sécrété par les fibroblastes. Enfin, nous avons évalué la régulation directe de la 3'-UTR de BAFF par ces miRs (cible directe) et la régulation de l'expression de BAFF par ces miRs par les cellules de sujets sains.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication actuellement en cours de préparation : « microRNA-30a*, d* and e* negatively regulate BAFF synthesis in Systemic Sclerosis and Rheumatoid Arthritis »

Cette version de l'article n'est pas définitive car les dernières expériences sont en cours de réalisation.

Antoine François*, Ghada Alsaleh*, Lucas Philippe, Ya-zhuo Gong, Seiamak Barham, Philippe Georgel, Sebastien Pfeffer, Jacques-Eric Gottenberg, Dominique Wachsmann and Jean Sibilia

* *Ghada Alsaleh and Antoine François contributed equally.*

Conclusions et perspectives

Bibliographie

Bibliographie

A

Abe, M., Kido, S., Hiasa, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., and Matsumoto, T. (2006). BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. Leukemia *20*, 1313–1315.

Adamson, I.Y., and Bowden, D.H. (1974). The pathogenesis of bloemycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am. J. Pathol. *77*, 185–197.

Aden, N., Nuttall, A., Shiwen, X., De Winter, P., Leask, A., Black, C.M., Denton, C.P., Abraham, D.J., and Stratton, R.J. (2010). Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. J. Invest. Dermatol. *130*, 2191–2200.

Alemán, L.M., Doench, J., and Sharp, P.A. (2007). Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. RNA *13*, 385–395.

Alsaleh, G., Messer, L., Semaan, N., Boulanger, N., Gottenberg, J.-E., Sibilia, J., and Wachsmann, D. (2007). BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. Arthritis Rheum. *56*, 3202–3214.

Alsaleh, G., François, A., Knapp, A.-M., Schickel, J.-N., Sibilia, J., Pasquali, J.-L., Gottenberg, J.-E., Wachsmann, D., and Soulas-Sprauel, P. (2011). Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF. Eur. J. Immunol. *41*, 2113–2122.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. J. Cell. Sci. *116*, 217–224.

Antiga, E., Quaglino, P., Bellandi, S., Volpi, W., Del Bianco, E., Comessatti, A., Osella-Abate, S., De Simone, C., Marzano, A., Bernengo, M.G., et al. (2010). Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. Br. J. Dermatol. *162*, 1056–1063.

Antonelli, A., Fallahi, P., Ferrari, S.M., Giuggioli, D., Colaci, M., Di Domenicantonio, A., and Ferri, C. (2012). Systemic sclerosis fibroblasts show specific alterations of interferon-γ and tumor necrosis factor-α-induced modulation of interleukin 6 and chemokine ligand 2. J. Rheumatol. *39*, 979–985.

Asano, N., Fujimoto, M., Yazawa, N., Shirasawa, S., Hasegawa, M., Okochi, H., Tamaki, K., Tedder, T.F., and Sato, S. (2004a). B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. Am. J. Pathol. *165*, 641–650.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., and Tamaki, K. (2004b). Increased expression levels of integrin alphavbeta5 on scleroderma fibroblasts. Am. J. Pathol. *164*, 1275–1292.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., and Tamaki, K. (2004c). Impaired Smad7-Smurf-

mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. J. Clin. Invest. *113*, 253–264.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y., and Tamaki, K. (2005a). Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. J. Immunol. *175*, 7708–7718.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y., and Tamaki, K. (2005b). Involvement of alphavbeta5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta1 in autocrine transforming growth factor beta signaling in systemic sclerosis fibroblasts. Arthritis Rheum. *52*, 2897–2905.

Asano, Y., Ihn, H., Jinnin, M., Mimura, Y., and Tamaki, K. (2006a). Involvement of alphavbeta5 integrin in the establishment of autocrine TGF-beta signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. J. Invest. Dermatol. *126*, 1761–1769.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., and Tamaki, K. (2006b). Increased expression of integrin alphavbeta5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. Am. J. Pathol. *168*, 499–510.

Avila, J.J., Lympany, P.A., Pantelidis, P., Welsh, K.I., Black, C.M., and Du Bois, R.M. (1999). Fibronectin gene polymorphisms associated with fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *20*, 106–112.

Avouac, J., Elhai, M., and Allanore, Y. (2013). Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. Joint Bone Spine *80*, 23–28.

B

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. Cell *122*, 553–563.

Bakowska, J., and Adamson, I.Y. (1998). Collagenase and gelatinase activities in bronchoalveolar lavage fluids during bleomycin-induced lung injury. J. Pathol. *185*, 319–323.

Baltimore, D., Boldin, M.P., O'Connell, R.M., Rao, D.S., and Taganov, K.D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. Nat. Immunol. *9*, 839–845.

Baroni, S.S., Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., et al. (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N. Engl. J. Med. *354*, 2667–2676.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell *116*, 281–297.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. (2006). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *71*, 523–530.

Belperio, J.A., Dy, M., Burdick, M.D., Xue, Y.Y., Li, K., Elias, J.A., and Keane, M.P. (2002). Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *27*, 419–427.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. Nat. Genet. *37*, 766–770.

Berezikov, E., Guryev, V., Van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H.A., and Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell *120*, 21–24.

Bergmann, C., Akhmetshina, A., Dees, C., Palumbo, K., Zerr, P., Beyer, C., Zwerina, J., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H.W. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase 3β induces dermal fibrosis by activation of the canonical Wnt pathway. Ann. Rheum. Dis. *70*, 2191–2198.

Beyer, C., Schramm, A., Akhmetshina, A., Dees, C., Kireva, T., Gelse, K., Sonnylal, S., De Crombrugghe, B., Taketo, M.M., Distler, O., et al. (2012). β-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *71*, 761–767.

Bosello, S., De Santis, M., Lama, G., Spanò, C., Angelucci, C., Tolusso, B., Sica, G., and Ferraccioli, G. (2010). B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. Arthritis Research & Therapy *12*, R54.

Bossen, C., Cachero, T.G., Tardivel, A., Ingold, K., Willen, L., Dobles, M., Scott, M.L., Maquelin, A., Belnoue, E., Siegrist, C.-A., et al. (2008). TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. Blood *111*, 1004–1012.

Bou-Gharios, G., Osman, J., Black, C., and Olsen, I. (1994). Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. Clin. Chim. Acta *231*, 69–78.

Brissett, M., Veraldi, K.L., Pilewski, J.M., Medsger, T.A., Jr, and Feghali-Bostwick, C.A. (2012). Localized expression of tenascin in systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and its regulation by insulin-like growth factor binding protein 3. Arthritis Rheum. *64*, 272–280.

Bujor, A.M., Pannu, J., Bu, S., Smith, E.A., Muise-Helmericks, R.C., and Trojanowska, M. (2008). Akt blockade downregulates collagen and upregulates MMP1 in human dermal fibroblasts. J. Invest. Dermatol. *128*, 1906–1914.

C

Cabrera, S., Gaxiola, M., Arreola, J.L., Ramírez, R., Jara, P., D'Armiento, J., Richards, T., Selman, M., and Pardo, A. (2007). Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. Int. J. Biochem. Cell Biol. *39*, 2324–2338.

Cambridge, G., Stohl, W., Leandro, M.J., Migone, T.-S., Hilbert, D.M., and Edwards, J.C.W. (2006). Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. Arthritis Rheum. *54*, 723–732.

Carey, W.A., Taylor, G.D., Dean, W.B., and Bristow, J.D. (2010). Tenascin-C deficiency attenuates TGF-ß-mediated fibrosis following murine lung injury. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. *299*, L785–793.

Carulli, M.T., Ong, V.H., Ponticos, M., Shiwen, X., Abraham, D.J., Black, C.M., and Denton, C.P. (2005). Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. Arthritis Rheum. *52*, 3772–3782.

Carvalho, D., Savage, C.O., Black, C.M., and Pearson, J.D. (1996). IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J. Clin. Invest. *97*, 111–119.

Castigli, E., and Geha, R.S. (2007). TACI, isotype switching, CVID and IgAD. Immunol. Res. *38*, 102–111.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature *465*, 584–589.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature *436*, 740–744.

Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature *447*, 823–828.

Chizzolini, C., Rezzonico, R., Ribbens, C., Burger, D., Wollheim, F.A., and Dayer, J.M. (1998). Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. Arthritis Rheum. *41*, 2039–2047.

Chizzolini, C., Raschi, E., Rezzonico, R., Testoni, C., Mallone, R., Gabrielli, A., Facchini, A., Del Papa, N., Borghi, M.O., Dayer, J.M., et al. (2002). Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *46*, 1602–1613.

Chizzolini, C., Parel, Y., De Luca, C., Tyndall, A., Akesson, A., Scheja, A., and Dayer, J.-M. (2003). Systemic sclerosis Th2 cells inhibit collagen production by dermal fibroblasts via membrane-associated tumor necrosis factor alpha. Arthritis Rheum. *48*, 2593–2604.

Chung, M.P., Monick, M.M., Hamzeh, N.Y., Butler, N.S., Powers, L.S., and Hunninghake, G.W. (2003). Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *29*, 375–380.

Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S.,

Hannon, G.J., Lawson, N.D., et al. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. Science *328*, 1694–1698.

Ciobanu, V., Popescu, D., Bălună, R., Belascu, I., Barac, D., Tarnavschi, R., and Caralicea, M. (1988). Plasma fibronectin level in patients with connective tissue diseases. Med Interne *26*, 267–271.

Claussen, C.A., and Long, E.C. (1999). Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. Chem. Rev. *99*, 2797–2816.

Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., et al. (2011). Lebrikizumab treatment in adults with asthma. N. Engl. J. Med. *365*, 1088–1098.

Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. Cell *93*, 1159–1170.

Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P.J., Ariyan, S., Dikalov, S., and Sorescu, D. (2005). NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. Circ. Res. *97*, 900–907.

Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. Nat. Rev. Genet. *12*, 19–31.

D

Dai, R., and Ahmed, S.A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. Transl Res *157*, 163–179.

Daniels, S.M., Melendez-Peña, C.E., Scarborough, R.J., Daher, A., Christensen, H.S., El Far, M., Purcell, D.F.J., Lainé, S., and Gatignol, A. (2009). Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference. BMC Mol. Biol. *10*, 38.

Daoussis, D., Liossis, S.-N.C., Tsamandas, A.C., Kalogeropoulou, C., Kazantzi, A., Sirinian, C., Karampetsou, M., Yiannopoulos, G., and Andonopoulos, A.P. (2010). Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. Rheumatology (Oxford) *49*, 271–280.

Darce, J.R., Arendt, B.K., Wu, X., and Jelinek, D.F. (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. J. Immunol. *179*, 7276–7286.

Daridon, C., Devauchelle, V., Hutin, P., Le Berre, R., Martins-Carvalho, C., Bendaoud, B., Dueymes, M., Saraux, A., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2007). Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. *56*, 1134–1144.

Daridon, C., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2008). BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who? Autoimmun Rev *7*, 267–271.

Dees, C., Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Distler, A., Beyer, C., Lang, V., Horn, A., Zerr, P.,

Zwerina, J., Gelse, K., et al. (2012). JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor β in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *64*, 3006–3015.

Degryse, A.L., and Lawson, W.E. (2011). Progress Toward Improving Animal Models for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The American Journal of the Medical Sciences *341*, 444–449.

Denton, C.P., Xu, S., Black, C.M., and Pearson, J.D. (1997). Scleroderma fibroblasts show increased responsiveness to endothelial cell-derived IL-1 and bFGF. J. Invest. Dermatol. *108*, 269–274.

Denton, C.P., Merkel, P.A., Furst, D.E., Khanna, D., Emery, P., Hsu, V.M., Silliman, N., Streisand, J., Powell, J., Akesson, A., et al. (2007). Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. Arthritis Rheum. *56*, 323–333.

Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of C. elegans microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. EMBO J. *28*, 213–222.

Distler, J.H.W., Jüngel, A., Caretto, D., Schulze-Horsel, U., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Müller-Ladner, U., Kalden, J.R., Gay, S., et al. (2006). Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. Arthritis Rheum. *54*, 214–225.

Distler, O., Pap, T., Kowal-Bielecka, O., Meyringer, R., Guiducci, S., Landthaler, M., Schölmerich, J., Michel, B.A., Gay, R.E., Matucci-Cerinic, M., et al. (2001). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. Arthritis Rheum. *44*, 2665–2678.

Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. Nat. Rev. Immunol. *6*, 329–333.

Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., Ten Dijke, P., White, B., Wigley, F.M., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2002). Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 3908–3913.

Duncan, M.R., and Berman, B. (1991). Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. J. Invest. Dermatol. *97*, 686–692.

E

Eacker, S.M., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2009). Understanding microRNAs in neurodegeneration. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 837–841.

Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. Oncogene *25*, 6163–6169.

Etoh, M., Jinnin, M., Makino, K., Yamane, K., Nakayama, W., Aoi, J., Honda, N., Kajihara, I.,

Makino, T., Fukushima, S., et al. (2013). microRNA-7 down-regulation mediates excessive collagen expression in localized scleroderma. Arch. Dermatol. Res. *305*, 9–15.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. Cell *132*, 9–14.

F

Famularo, G., Procopio, A., Giacomelli, R., Danese, C., Sacchetti, S., Perego, M.A., Santoni, A., and Tonietti, G. (1990). Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-2 and interleukin-4 in sera and supernatants from patients with progressive systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol. *81*, 368–372.

Feghali, C.A., Bost, K.L., Boulware, D.W., and Levy, L.S. (1992). Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. J. Rheumatol. *19*, 1207–1211.

Feghali, C.A., Bost, K.L., Boulware, D.W., and Levy, L.S. (1994). Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Autoimmunity *17*, 309–318.

Fenoglio, D., Battaglia, F., Parodi, A., Stringara, S., Negrini, S., Panico, N., Rizzi, M., Kalli, F., Conteduca, G., Ghio, M., et al. (2011). Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. Clin. Immunol. *139*, 249–257.

Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K., and Kitani, A. (2006). IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. Nat. Med. *12*, 99–106.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat. Rev. Genet. *9*, 102–114.

Fineschi, S., Goffin, L., Rezzonico, R., Cozzi, F., Dayer, J.-M., Meroni, P.L., and Chizzolini, C. (2008). Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. Arthritis Rheum. *58*, 3913–3923.

Fleischmajer, R., Perlish, J.S., and Reeves, J.R. (1977). Cellular infiltrates in scleroderma skin. Arthritis Rheum. *20*, 975–984.

Fleischmajer, R., Dessau, W., Timpl, R., Krieg, T., Luderschmidt, C., and Wiestner, M. (1980). Immunofluorescence analysis of collagen, fibronectin, and basement membrane protein in scleroderma skin. J. Invest. Dermatol. *75*, 270–274.

Fu, L., Lin-Lee, Y.-C., Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., and Ford, R.J. (2009). BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKKbeta and NF-kappaB/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells. Blood *113*, 4627–4636.

Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D.J., Tegzová, D., Sanchez-Guerrero, J.,

Schwarting, A., Merrill, J.T., Chatham, W.W., et al. (2011). A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. *63*, 3918–3930.

Fuschiotti, P., Larregina, A.T., Ho, J., Feghali-Bostwick, C., and Medsger, T.A., Jr (2013). Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *65*, 236–246.

G

Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nature Reviews Immunology *9*, 556–567.

Del Galdo, F., Sotgia, F., De Almeida, C.J., Jasmin, J.-F., Musick, M., Lisanti, M.P., and Jiménez, S.A. (2008). Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. Arthritis Rheum. *58*, 2854–2865.

Gantier, M.P., Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2007). Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. Immunol. Cell Biol. *85*, 458–462.

García-Prieto, E., González-López, A., Cabrera, S., Astudillo, A., Gutiérrez-Fernández, A., Fanjul-Fernandez, M., Batalla-Solís, E., Puente, X.S., Fueyo, A., López-Otín, C., et al. (2010). Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. PLoS ONE *5*, e13242.

Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F.J., Lagente, V., et al. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. J. Clin. Invest. *117*, 3786–3799.

Gasse, P., Riteau, N., Vacher, R., Michel, M.-L., Fautrel, A., Di Padova, F., Fick, L., Charron, S., Lagente, V., Eberl, G., et al. (2011). IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. PLoS ONE *6*, e23185.

Gavin, A.L., Aït-Azzouzene, D., Ware, C.F., and Nemazee, D. (2003). DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. J. Biol. Chem. *278*, 38220–38228.

Gavin, A.L., Duong, B., Skog, P., Aït-Azzouzene, D., Greaves, D.R., Scott, M.L., and Nemazee, D. (2005). deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. J. Immunol. *175*, 319–328.

Gerstmeier, H., Gabrielli, A., Meurer, M., Brocks, D., Braun-Falco, O., and Krieg, T. (1988). Levels of type IV collagen and laminin fragments in serum from patients with progressive systemic sclerosis. J. Rheumatol. *15*, 969–972.

Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., and Phan, S.H. (1996). Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte

chemoattractant protein-1 via specific receptors. J. Biol. Chem. *271*, 17779–17784.

Gill, S.E., Huizar, I., Bench, E.M., Sussman, S.W., Wang, Y., Khokha, R., and Parks, W.C. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinases 3 regulates resolution of inflammation following acute lung injury. Am. J. Pathol. *176*, 64–73.

Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. Science *312*, 75–79.

Di Girolamo, N., Indoh, I., Jackson, N., Wakefield, D., McNeil, H.P., Yan, W., Geczy, C., Arm, J.P., and Tedla, N. (2006). Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. J. Immunol. *177*, 2638–2650.

Gorelik, L., Cutler, A.H., Thill, G., Miklasz, S.D., Shea, D.E., Ambrose, C., Bixler, S.A., Su, L., Scott, M.L., and Kalled, S.L. (2004). Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. J. Immunol. *172*, 762–766.

Gottenberg, J.-E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., et al. (2006). Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 2770–2775.

Gourh, P., Arnett, F.C., Assassi, S., Tan, F.K., Huang, M., Diekman, L., Mayes, M.D., Reveille, J.D., and Agarwal, S.K. (2009). Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. Arthritis Res. Ther. *11*, R147.

Granel, B., Chevillard, C., Allanore, Y., Arnaud, V., Cabantous, S., Marquet, S., Weiller, P.-J., Durand, J.-M., Harlé, J.-R., Grange, C., et al. (2006a). Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. Immunogenetics *58*, 693–699.

Granel, B., Allanore, Y., Chevillard, C., Arnaud, V., Marquet, S., Weiller, P.-J., Durand, J.-M., Harlé, J.-R., Grange, C., Frances, Y., et al. (2006b). IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis. J. Rheumatol. *33*, 2015–2019.

Gras, M.P., Laâbi, Y., Linares-Cruz, G., Blondel, M.O., Rigaut, J.P., Brouet, J.C., Leca, G., Haguenauer-Tsapis, R., and Tsapis, A. (1995). BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. Int. Immunol. *7*, 1093–1106.

Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. Nucleic Acids Res. *32*, D109–111.

Groom, J.R., Fletcher, C.A., Walters, S.N., Grey, S.T., Watt, S.V., Sweet, M.J., Smyth, M.J., Mackay, C.R., and Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. J. Exp. Med. *204*, 1959–1971.

Gudbjörnsson, B., Hällgren, R., Nettelbladt, O., Gustafsson, R., Mattsson, A., Af Geijerstam, E., and Tötterman, T.H. (1994). Phenotypic and functional activation of alveolar macrophages, T lymphocytes and NK cells in patients with systemic sclerosis and primary Sjögren's syndrome. Ann. Rheum. Dis. *53*, 574–579.

Le Guern, V., Mahr, A., Mouthon, L., Jeanneret, D., Carzon, M., and Guillevin, L. (2004).

Prevalence of systemic sclerosis in a French multi-ethnic county. Rheumatology (Oxford) *43*, 1129–1137.

Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nat. Cell Biol. *5*, 410–421.

Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W.J., Zhao, K., and Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 13463–13468.

Guseva, N.G., Anikina, N.V., Myllylä, R., Risteli, L., Risteli, J., Chochlova, J.V., Kivirikko, K.I., and Nassonova, V.A. (1991). Markers of collagen and basement membrane metabolism in sera of patients with progressive systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *50*, 481–486.

H

Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Rep. *6*, 961–967.

Hachulla, E., Gressin, V., Guillevin, L., Carpentier, P., Diot, E., Sibilia, J., Kahan, A., Cabane, J., Francès, C., Launay, D., et al. (2005). Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. Arthritis Rheum. *52*, 3792–3800.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am. J. Med. *91*, 14S–22S.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell *125*, 887–901.

Hasegawa, M., and Takehara, K. (2012). Potential immunologic targets for treating fibrosis in systemic sclerosis: a review focused on leukocytes and cytokines. Semin. Arthritis Rheum. *42*, 281–296.

Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K., and Takehara, K. (1997). Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. J. Rheumatol. *24*, 328–332.

Hasegawa, M., Sato, S., Ihn, H., and Takehara, K. (1999). Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford) *38*, 612–617.

Hasegawa, M., Sato, S., and Takehara, K. (2004). Augmented production of transforming growth factor-beta by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. Arch. Dermatol. Res. *296*, 89–93.

Hasegawa, M., Hamaguchi, Y., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Uchida, J., Fujimoto, M., Matsushita, T., Matsushita, Y., Horikawa, M., Komura, K., et al. (2006). B-lymphocyte

depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. Am. J. Pathol. *169*, 954–966.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr, Wrana, J.L., et al. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell *89*, 1165–1173.

He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussel, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. Nat. Immunol. *11*, 836–845.

Henley, T., Kovesdi, D., and Turner, M. (2008). B-cell responses to B-cell activation factor of the TNF family (BAFF) are impaired in the absence of PI3K delta. Eur. J. Immunol. *38*, 3543–3548.

Herzhoff, K., Sollberg, S., Huerkamp, C., Krieg, T., and Eckes, B. (1999). Fibroblast expression of collagen integrin receptors alpha1beta1 and alpha2beta1 is not changed in systemic scleroderma. Br. J. Dermatol. *141*, 218–223.

Higgins, G.C., Wu, Y., and Postlethwaite, A.E. (1999). Intracellular IL-1 receptor antagonist is elevated in human dermal fibroblasts that overexpress intracellular precursor IL-1 alpha. J. Immunol. *163*, 3969–3975.

Holmes, A., Abraham, D.J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C.M., and Leask, A. (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. J. Biol. Chem. *276*, 10594–10601.

Honda, N., Jinnin, M., Kajihara, I., Makino, T., Makino, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Okamoto, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., et al. (2012). TGF-β-mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. J. Immunol. *188*, 3323–3331.

Hu, B., Wang, S., Zhang, Y., Feghali, C.A., Dingman, J.R., and Wright, T.M. (2003). A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 10008–10013.

Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.-X.A., and Opdenakker, G. (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat Rev Drug Discov *6*, 480–498.

Huard, B., Arlettaz, L., Ambrose, C., Kindler, V., Mauri, D., Roosnek, E., Tschopp, J., Schneider, P., and French, L.E. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. Int. Immunol. *16*, 467–475.

Huard, B., McKee, T., Bosshard, C., Durual, S., Matthes, T., Myit, S., Donze, O., Frossard, C., Chizzolini, C., Favre, C., et al. (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. J. Clin. Invest. *118*, 2887–2895.

Huaux, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., and Phan, S.H. (2003). Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. J. Immunol. *170*, 2083–2092.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 16961–16966.

Hussein, M.R., Hassan, H.I., Hofny, E.R.M., Elkholy, M., Fatehy, N.A., Abd Elmoniem, A.E.A., Ezz El-Din, A.M., Afifi, O.A., and Rashed, H.G. (2005). Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. J. Clin. Pathol. *58*, 178–184.

Le Huu, D., Matsushita, T., Jin, G., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., and Fujimoto, M. (2012). IL-6 blockade attenuates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. J. Invest. Dermatol. *132*, 2752–2761.

I

Iannone, F., Matucci-Cerinic, M., Falappone, P.C.F., Guiducci, S., Cinelli, M., Distler, O., and Lapadula, G. (2005). Distinct expression of adhesion molecules on skin fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis. A pilot study. J. Rheumatol. *32*, 1893–1898.

Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M., and Tamaki, K. (2001). Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. Arthritis Rheum. *44*, 474–480.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., et al. (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. Immunity *30*, 108–119.

Ittah, M., Miceli-Richard, C., Eric Gottenberg, J.-, Lavie, F., Lazure, T., Ba, N., Sellam, J., Lepajolec, C., and Mariette, X. (2006). B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Res. Ther. *8*, R51.

J

Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., Van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. N. Engl. J. Med.

Jensen, K.D.C., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R.M., Davis, M.M., et al. (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. Immunity *29*, 90–100.

Jinnin, M., Ihn, H., Asano, Y., Yamane, K., Trojanowska, M., and Tamaki, K. (2006).

Upregulation of tenascin-C expression by IL-13 in human dermal fibroblasts via the phosphoinositide 3-kinase/Akt and the protein kinase C signaling pathways. J. Invest. Dermatol. *126*, 551–560.

Jobling, M.F., Mott, J.D., Finnegan, M.T., Jurukovski, V., Erickson, A.C., Walian, P.J., Taylor, S.E., Ledbetter, S., Lawrence, C.M., Rifkin, D.B., et al. (2006). Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. Radiat. Res. *166*, 839–848.

Johnston, M., and Hutvagner, G. (2011). Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation. Silence *2*, 5.

Jones, S.A., Sutton, C.E., Cua, D., and Mills, K.H.G. (2012). Therapeutic potential of targeting IL-17. Nat. Immunol. *13*, 1022–1025.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science *309*, 1577–1581.

Jopling, C.L., Schütz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. Cell Host Microbe *4*, 77–85.

K

Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., and Chapman, J.A. (1996). Collagen fibril formation. Biochem. J. *316 (Pt 1)*, 1–11.

Kadono, T., Kikuchi, K., Ihn, H., Takehara, K., and Tamaki, K. (1998). Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. J. Rheumatol. *25*, 296–301.

Kahaleh, M.B., Fan, P.S., and Otsuka, T. (1999). Gammadelta receptor bearing T cells in scleroderma: enhanced interaction with vascular endothelial cells in vitro. Clin. Immunol. *91*, 188–195.

Kanangat, S., Postlethwaite, A.E., Higgins, G.C., and Hasty, K.A. (2006). Novel functions of intracellular IL-1ra in human dermal fibroblasts: implications in the pathogenesis of fibrosis. J. Invest. Dermatol. *126*, 756–765.

Kavian, N., Marut, W., Servettaz, A., Nicco, C., Chéreau, C., Lemaréchal, H., Borderie, D., Dupin, N., Weill, B., and Batteux, F. (2012). Reactive oxygen species-mediated killing of activated fibroblasts by arsenic trioxide ameliorates fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *64*, 3430–3440.

Kawaguchi, Y. (1994). IL-1 alpha gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Clin. Exp. Immunol. *97*, 445–450.

Kawaguchi, Y., Harigai, M., Kitani, A., Suzuki, K., Kawakami, M., Ishizuka, T., Hidaka, T., Hara, M., Kawagoe, M., and Nakamura, H. (1992). Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production in vitro: an approach to the treatment of systemic sclerosis. J. Rheumatol. *19*, 1710–1715.

Kawaguchi, Y., Harigai, M., Suzuki, K., Hara, M., Kobayashi, K., Ishizuka, T., Matsuki, Y., Tanaka, N., and Nakamura, H. (1993). Interleukin 1 receptor on fibroblasts from systemic sclerosis patients induces excessive functional responses to interleukin 1 beta. Biochem. Biophys. Res. Commun. *190*, 154–161.

Kawaguchi, Y., Suzuki, K., Hara, M., Hidaka, T., Ishizuka, T., Kawagoe, M., and Nakamura, H. (1994). Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *53*, 506–510.

Kawaguchi, Y., Hara, M., and Wright, T.M. (1999). Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. J. Clin. Invest. *103*, 1253–1260.

Kawaguchi, Y., McCarthy, S.A., Watkins, S.C., and Wright, T.M. (2004). Autocrine activation by interleukin 1alpha induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts. J. Rheumatol. *31*, 1946–1954.

Kern, C., Cornuel, J.-F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.-Y., Feldblum, S., et al. (2004). Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. Blood *103*, 679–688.

Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C.P., and Ong, V.H. (2012). Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *71*, 1235–1242.

Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 376–385.

Kim, J.Y., Choeng, H.C., Ahn, C., and Cho, S.-H. (2009). Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Yonsei Med. J. *50*, 68–77.

Kim, K.-H., Burkhart, K., Chen, P., Frevert, C.W., Randolph-Habecker, J., Hackman, R.C., Soloway, P.D., and Madtes, D.K. (2005a). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *33*, 271–279.

Kim, W.-U., Min, S.-Y., Cho, M.-L., Hong, K.-H., Shin, Y.-J., Park, S.-H., and Cho, C.-S. (2005b). Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis. Arthritis Res. Ther. *7*, R71–79.

King, C. (2009). New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. Nat. Rev. Immunol. *9*, 757–766.

Kinsella, M.B., Smith, E.A., Miller, K.S., LeRoy, E.C., and Silver, R.M. (1989). Spontaneous production of fibronectin by alveolar macrophages in patients with scleroderma. Arthritis Rheum. *32*, 577–583.

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell *129*, 1141–1151.

Kirk, T.Z., Mark, M.E., Chua, C.C., Chua, B.H., and Mayes, M.D. (1995). Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of

metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. J. Biol. Chem. *270*, 3423–3428.

Klein, S., Kretz, C.C., Ruland, V., Stumpf, C., Haust, M., Hartschuh, W., Hartmann, M., Enk, A., Suri-Payer, E., Oberle, N., et al. (2011). Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma. Ann. Rheum. Dis. *70*, 1475–1481.

Kodera, T., McGaha, T.L., Phelps, R., Paul, W.E., and Bona, C.A. (2002). Disrupting the IL-4 gene rescues mice homozygous for the tight-skin mutation from embryonic death and diminishes TGF-beta production by fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 3800–3805.

Kolfschoten, G.M., Pradet-Balade, B., Hahne, M., and Medema, J.P. (2003). TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL. Biochem. Pharmacol. *66*, 1427–1432.

Kolodsick, J.E., Toews, G.B., Jakubzick, C., Hogaboam, C., Moore, T.A., McKenzie, A., Wilke, C.A., Chrisman, C.J., and Moore, B.B. (2004). Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. J. Immunol. *172*, 4068–4076.

Komura, K., Yanaba, K., Horikawa, M., Ogawa, F., Fujimoto, M., Tedder, T.F., and Sato, S. (2008). CD19 regulates the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model. Arthritis Rheum. *58*, 3574–3584.

Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., et al. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. Immunity *10*, 451–461.

Kotsianidis, I., Nakou, E., Bouchliou, I., Tzouvelekis, A., Spanoudakis, E., Steiropoulos, P., Sotiriou, I., Aidinis, V., Margaritis, D., Tsatalas, C., et al. (2009). Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *179*, 1121–1130.

Kozlowska, E., Sollberg, S., Mauch, C., Eckes, B., Klein, C.E., and Krieg, T. (1996). Decreased expression of alpha 2 beta 1 integrin in scleroderma fibroblasts. Exp. Dermatol. *5*, 57–63.

Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.-M., Kalled, S.L., Hess, D.M., Serafini, B., Aloisi, F., et al. (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. J. Exp. Med. *201*, 195–200.

Krützfeldt, J., and Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. Cell Metab. *4*, 9–12.

Kurasawa, K., Hirose, K., Sano, H., Endo, H., Shinkai, H., Nawata, Y., Takabayashi, K., and Iwamoto, I. (2000). Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *43*, 2455–2463.

Kurt-Jones, E.A., Beller, D.I., Mizel, S.B., and Unanue, E.R. (1985). Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *82*, 1204–1208.

L

Labat-Robert, J. (2012). Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. Pathol. Biol. *60*, 15–19.

Lacour, J.P., Vitetta, A., Chiquet-Ehrismann, R., Pisani, A., and Ortonne, J.P. (1992). Increased expression of tenascin in the dermis in scleroderma. Br. J. Dermatol. *127*, 328–334.

Lafyatis, R., O'Hara, C., Feghali-Bostwick, C.A., and Matteson, E. (2007). B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Arthritis Rheum. *56*, 3167–3168.

Lafyatis, R., Kissin, E., York, M., Farina, G., Viger, K., Fritzler, M.J., Merkel, P.A., and Simms, R.W. (2009). B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *60*, 578–583.

Lam, A.P., Flozak, A.S., Russell, S., Wei, J., Jain, M., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Feghali-Bostwick, C.A., Varga, J., and Gottardi, C.J. (2011). Nuclear β-catenin is increased in systemic sclerosis pulmonary fibrosis and promotes lung fibroblast migration and proliferation. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *45*, 915–922.

Langat, D.L., Wheaton, D.A., Platt, J.S., Sifers, T., and Hunt, J.S. (2008). Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. Am. J. Pathol. *172*, 1303–1311.

Lee, I., Ajay, S.S., Yook, J.I., Kim, H.S., Hong, S.H., Kim, N.H., Dhanasekaran, S.M., Chinnaiyan, A.M., and Athey, B.D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. Genome Res. *19*, 1175–1183.

LeRoy, E.C., and Medsger, T.A., Jr (2001). Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J. Rheumatol. *28*, 1573–1576.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell *120*, 15–20.

Li, H., Yang, R., Fan, X., Gu, T., Zhao, Z., Chang, D., Wang, W., and Wang, C. (2012). MicroRNA array analysis of microRNAs related to systemic scleroderma. Rheumatol. Int. *32*, 307–313.

Li, Q., Park, P.W., Wilson, C.L., and Parks, W.C. (2002). Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. Cell *111*, 635–646.

Li, S., Zhang, J., Li, Z., Li, H., and Qi, H. (2004). [The changes of expression level of matrix metalloprotease 9 and its inhibitor (TIMP-1) in murine pulmonary fibrosis model]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi *20*, 723–726.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs

downregulate large numbers of target mRNAs. Nature *433*, 769–773.

Lindh, E., Lind, S.M., Lindmark, E., Hässler, S., Perheentupa, J., Peltonen, L., Winqvist, O., and Karlsson, M.C.I. (2008). AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 18466–18471.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. *3*, 822–829.

Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V.J., Kaminski, N., and Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. J. Exp. Med. *207*, 1589–1597.

Liu, Y., Xu, L., Opalka, N., Kappler, J., Shu, H.B., and Zhang, G. (2002). Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. Cell *108*, 383–394.

Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., and Chen, C.-Z. (2008). Micromanagement of the immune system by microRNAs. Nat. Rev. Immunol. *8*, 120–130.

Loizos, N., Lariccia, L., Weiner, J., Griffith, H., Boin, F., Hummers, L., Wigley, F., and Kussie, P. (2009). Lack of detection of agonist activity by antibodies to platelet-derived growth factor receptor alpha in a subset of normal and systemic sclerosis patient sera. Arthritis Rheum. *60*, 1145–1151.

Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. Immunity *31*, 84–98.

Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 9667–9672.

M

Mackay, F., and Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. Nat. Rev. Immunol. *9*, 491–502.

Mackay, F., and Tangye, S.G. (2004). The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. Curr Opin Pharmacol *4*, 347–354.

Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J.L. (1999). Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations. Journal of Experimental Medicine *190*, 1697–1710.

Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu. Rev. Immunol. *21*, 231–264.

Mackay, F., Sierro, F., Grey, S.T., and Gordon, T.P. (2005). The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. Curr. Dir. Autoimmun. *8*, 243–265.

Makhluf, H.A., Stepniakowska, J., Hoffman, S., Smith, E., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M. (1996). IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. J. Invest. Dermatol. *107*, 856–859.

Makino, K., Jinnin, M., Kajihara, I., Honda, N., Sakai, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Inoue, Y., and Ihn, H. (2012). Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis. Clin. Exp. Dermatol. *37*, 34–39.

Manetti, M., Ibba-Manneschi, L., Liakouli, V., Guiducci, S., Milia, A.F., Benelli, G., Marrelli, A., Conforti, M.L., Romano, E., Giacomelli, R., et al. (2010). The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *69*, 598–605.

Manetti, M., Guiducci, S., Ceccarelli, C., Romano, E., Bellando-Randone, S., Conforti, M.L., Ibba-Manneschi, L., and Matucci-Cerinic, M. (2011). Increased circulating levels of interleukin 33 in systemic sclerosis correlate with early disease stage and microvascular involvement. Ann. Rheum. Dis. *70*, 1876–1878.

Manetti, M., Guiducci, S., Romano, E., Bellando-Randone, S., Conforti, M.L., Ibba-Manneschi, L., and Matucci-Cerinic, M. (2012). Increased serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase-12 in patients with systemic sclerosis: correlation with severity of skin and pulmonary fibrosis and vascular damage. Ann. Rheum. Dis. *71*, 1064–1072.

Manicone, A.M., Huizar, I., and McGuire, J.K. (2009). Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) regulates anti-inflammatory and antifibrotic pulmonary dendritic cells that express CD103 (alpha(E)beta(7)-integrin). Am. J. Pathol. *175*, 2319–2331.

Manoury, B., Nenan, S., Guenon, I., Boichot, E., Planquois, J.-M., Bertrand, C.P., and Lagente, V. (2006a). Macrophage metalloelastase (MMP-12) deficiency does not alter bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Inflamm (Lond) *3*, 2.

Manoury, B., Caulet-Maugendre, S., Guénon, I., Lagente, V., and Boichot, E. (2006b). TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin in mouse lung. Int J Immunopathol Pharmacol *19*, 471–487.

Manoury, B., Nénan, S., Guénon, I., Lagente, V., and Boichot, E. (2007). Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis. Int. Immunopharmacol. *7*, 900–911.

Mathian, A., Parizot, C., Dorgham, K., Trad, S., Arnaud, L., Larsen, M., Miyara, M., Hié, M., Piette, J.-C., Frances, C., et al. (2012). Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. Ann. Rheum. Dis. *71*, 1227–1234.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science *317*, 1764–1767.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. Science *286*, 1732–1735.

Matsushita, T., Hasegawa, M., Yanaba, K., Kodera, M., Takehara, K., and Sato, S. (2006). Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. Arthritis Rheum. *54*, 192–201.

Matsushita, T., Hasegawa, M., Matsushita, Y., Echigo, T., Wayaku, T., Horikawa, M., Ogawa, F., Takehara, K., and Sato, S. (2007a). Elevated serum BAFF levels in patients with localized scleroderma in contrast to other organ-specific autoimmune diseases. Exp. Dermatol. *16*, 87–93.

Matsushita, T., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Tanaka, C., Kumada, S., Ogawa, F., Takehara, K., and Sato, S. (2007b). Elevated serum APRIL levels in patients with systemic sclerosis: distinct profiles of systemic sclerosis categorized by APRIL and BAFF. J. Rheumatol. *34*, 2056–2062.

Matsushita, T., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Matsushita, Y., Komura, K., Ogawa, F., Watanabe, R., Takehara, K., and Sato, S. (2007c). BAFF antagonist attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. J. Invest. Dermatol. *127*, 2772–2780.

Mattila, L., Airola, K., Ahonen, M., Hietarinta, M., Black, C., Saarialho-Kere, U., and Kähäri, V.M. (1998). Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. J. Invest. Dermatol. *110*, 416–421.

Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Distler, J.H.W., et al. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *62*, 1733–1743.

Mavalia, C., Scaletti, C., Romagnani, P., Carossino, A.M., Pignone, A., Emmi, L., Pupilli, C., Pizzolo, G., Maggi, E., and Romagnani, S. (1997). Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. Am. J. Pathol. *151*, 1751–1758.

McGuire, J.K., Li, Q., and Parks, W.C. (2003). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. Am. J. Pathol. *162*, 1831–1843.

McHeyzer-Williams, M. (2007). Local sentries for class switching. Nat. Immunol. *8*, 230–232.

Medsger, T.A., Jr, Ivanco, D.E., Kardava, L., Morel, P.A., Lucas, M.R., and Fuschiotti, P. (2011). GATA-3 up-regulation in CD8+ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. Arthritis Rheum. *63*, 1738–1747.

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature *431*, 343–349.

Meyringer, R., Neumann, E., Judex, M., Landthaler, M., Kullmann, F., Scholmerich, J., Gay, S., Tarner, I.H., Distler, O., and Müller-Ladner, U. (2007). Analysis of gene expression patterns in systemic sclerosis fibroblasts using RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction for differential display. J. Rheumatol. *34*, 747–753.

Mi, S., Li, Z., Yang, H.-Z., Liu, H., Wang, J.-P., Ma, Y.-G., Wang, X.-X., Liu, H.-Z., Sun, W., and Hu, Z.-W. (2011). Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. J. Immunol. *187*,

3003–3014.

Midwood, K.S., and Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. J Cell Commun Signal *3*, 287–310.

Midwood, K.S., Hussenet, T., Langlois, B., and Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. Cell. Mol. Life Sci. *68*, 3175–3199.

Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.-S., Tam, W.-L., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. Cell *126*, 1203–1217.

Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., and Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *40*, 362–382.

Moinzadeh, P., Krieg, T., Hellmich, M., Brinckmann, J., Neumann, E., Müller-Ladner, U., Kreuter, A., Dumitrescu, D., Rosenkranz, S., and Hunzelmann, N. (2011). Elevated MMP-7 levels in patients with systemic sclerosis: correlation with pulmonary involvement. Exp. Dermatol. *20*, 770–773.

Mori, Y., Ishida, W., Bhattacharyya, S., Li, Y., Platanias, L.C., and Varga, J. (2004). Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts. Arthritis Rheum. *50*, 4008–4021.

Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. Cell *96*, 319–328.

Murata, M., Fujimoto, M., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Komura, K., and Sato, S. (2008). Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J. Dermatol. Sci. *50*, 240–242.

Murata, T., Husain, S.R., Mohri, H., and Puri, R.K. (1998). Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway. Int. Immunol. *10*, 1103–1110.

N

Nabel, E.G., Shum, L., Pompili, V.J., Yang, Z.Y., San, H., Shu, H.B., Liptay, S., Gold, L., Gordon, D., and Derynck, R. (1993). Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 10759–10763.

Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., et al. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. Nature *389*, 631–635.

Nakashima, T., Jinnin, M., Yamane, K., Honda, N., Kajihara, I., Makino, T., Masuguchi, S., Fukushima, S., Okamoto, Y., Hasegawa, M., et al. (2012). Impaired IL-17 signaling

pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. J. Immunol. *188*, 3573–3583.

Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P.A., Olsen, H.S., Migone, T.S., Sosnovtseva, S., Carrell, J.A., Feng, P., Giri, J.G., et al. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood *97*, 198–204.

Navarra, S.V., Guzmán, R.M., Gallacher, A.E., Hall, S., Levy, R.A., Jimenez, R.E., Li, E.K.-M., Thomas, M., Kim, H.-Y., León, M.G., et al. (2011). Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet *377*, 721–731.

Needleman, B.W., Wigley, F.M., and Stair, R.W. (1992). Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. Arthritis Rheum. *35*, 67–72.

Neri, D., and Bicknell, R. (2005). Tumour vascular targeting. Nat. Rev. Cancer *5*, 436–446.

Ng, L.G., Sutherland, A.P.R., Newton, R., Qian, F., Cachero, T.G., Scott, M.L., Thompson, J.S., Wheway, J., Chtanova, T., Groom, J., et al. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. J. Immunol. *173*, 807–817.

Ng, L.G., Ng, C.-H., Woehl, B., Sutherland, A.P.R., Huo, J., Xu, S., Mackay, F., and Lam, K.-P. (2006). BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. Eur. J. Immunol. *36*, 1837–1846.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 767–779.

Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 1108–1114.

Novobrantseva, T.I., Majeau, G.R., Amatucci, A., Kogan, S., Brenner, I., Casola, S., Shlomchik, M.J., Koteliansky, V., Hochman, P.S., and Ibraghimov, A. (2005). Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. J. Clin. Invest. *115*, 3072–3082.

O

O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J. Exp. Med. *199*, 91–98.

Ohtsuka, T. (2008). Effect of gammadelta T cell supernatant on human skin fibroblast proliferation and collagen production--possible role of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. Int. J. Dermatol. *47*, 1135–1140.

Okamoto, Y., Hasegawa, M., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Huu, D.L., Iwakura, Y., Fujimoto, M., and Takehara, K. (2012). Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. Arthritis Rheum. *64*, 3726–3735.

Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. Cell *130*, 89–100.

Ong, C., Wong, C., Roberts, C.R., Teh, H.S., and Jirik, F.R. (1998). Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. Eur. J. Immunol. *28*, 2619–2629.

Oriente, A., Fedarko, N.S., Pacocha, S.E., Huang, S.K., Lichtenstein, L.M., and Essayan, D.M. (2000). Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. J. Pharmacol. Exp. Ther. *292*, 988–994.

Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol. Cell *30*, 460–471.

Osada, K., Seishima, M., Kitajima, Y., Yaoita, H., and Mori, S. (1995). Decreased integrin alpha 2, but normal response to TGF-beta in scleroderma fibroblasts. J. Dermatol. Sci. *9*, 169–175.

Ou, X., Xu, S., and Lam, K.-P. (2012). Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 15401–15406.

Ouchi, H., Fujita, M., Ikegame, S., Ye, Q., Inoshima, I., Harada, E., Kuwano, K., and Nakanishi, Y. (2008). The role of collagenases in experimental pulmonary fibrosis. Pulm Pharmacol Ther *21*, 401–408.

P

Parel, Y., Aurrand-Lions, M., Scheja, A., Dayer, J.-M., Roosnek, E., and Chizzolini, C. (2007). Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *56*, 3459–3467.

Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. EMBO J. *23*, 4727–4737.

Pasquali Ronchetti, I., Guerra, D., Quaglino, D., Jr, Vincenzi, D., Manzini, E., Canossi, B., and Manzini, C.U. (1989). Dermal elastin and collagen in systemic sclerosis. Effect of D-penicillamine treatment. Clin. Exp. Rheumatol. *7*, 373–383.

Pauley, K.M., Cha, S., and Chan, E.K.L. (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. J. Autoimmun. *32*, 189–194.

Pelekanou, V., Kampa, M., Kafousi, M., Darivianaki, K., Sanidas, E., Tsiftsis, D.D., Stathopoulos, E.N., Tsapis, A., and Castanas, E. (2008). Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. BMC Cancer *8*, 76.

Perlish, J.S., Lemlich, G., and Fleischmajer, R. (1988). Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. J. Invest. Dermatol. *90*, 48–54.

Peters, V.A., Joesting, J.J., and Freund, G.G. (2012). IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. Brain, Behavior, and Immunity.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. Mol. Cell *21*, 533–542.

Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. RNA *10*, 1518–1525.

Postlethwaite, A.E., Holness, M.A., Katai, H., and Raghow, R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. J. Clin. Invest. *90*, 1479–1485.

Pradet-Balade, B., Medema, J.P., López-Fraga, M., Lozano, J.C., Kolfschoten, G.M., Picard, A., Martínez-A, C., Garcia-Sanz, J.A., and Hahne, M. (2002). An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. EMBO J. *21*, 5711–5720.

Prescott, R.J., Freemont, A.J., Jones, C.J., Hoyland, J., and Fielding, P. (1992). Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. J. Pathol. *166*, 255–263.

Q

Qiu, Z., Dillen, C., Hu, J., Verbeke, H., Struyf, S., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2009). Interleukin-17 regulates chemokine and gelatinase B expression in fibroblasts to recruit both neutrophils and monocytes. Immunobiology *214*, 835–842.

Quaglino, D., Jr, Bergamini, G., Boraldi, F., Manzini, E., Davidson, J.M., and Pasquali Ronchetti, I. (1996). Connective tissue in skin biopsies from patients suffering systemic sclerosis. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. *28*, 287–296.

R

Radstake, T.R.D.J., Van Bon, L., Broen, J., Hussiani, A., Hesselstrand, R., Wuttge, D.M., Deng, Y., Simms, R., Lubberts, E., and Lafyatis, R. (2009). The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. PLoS ONE *4*, e5903.

Ramanujam, M., Wang, X., Huang, W., Liu, Z., Schiffer, L., Tao, H., Frank, D., Rice, J., Diamond, B., Yu, K.O.A., et al. (2006). Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. J. Clin. Invest. *116*, 724–734.

Rankin, A.L., Mumm, J.B., Murphy, E., Turner, S., Yu, N., McClanahan, T.K., Bourne, P.A., Pierce, R.H., Kastelein, R., and Pflanz, S. (2010). IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. J. Immunol. *184*, 1526–1535.

Rankin, J.A., Picarella, D.E., Geba, G.P., Temann, U.A., Prasad, B., DiCosmo, B., Tarallo, A., Stripp, B., Whitsett, J., and Flavell, R.A. (1996). Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *93*, 7821–7825.

Rosenbloom, J., Saitta, B., Gaidarova, S., Sandorfi, N., Rosenbloom, J.C., Abrams, W.R., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., Kucich, U., and Jimenez, S.A. (2000). Inhibition of type I collagen gene expression in normal and systemic sclerosis fibroblasts by a specific inhibitor of geranylgeranyl transferase I. Arthritis Rheum. *43*, 1624–1632.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature *448*, 83–86.

S

Saito, E., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Komura, K., Hamaguchi, Y., Kaburagi, Y., Nagaoka, T., Takehara, K., Tedder, T.F., and Sato, S. (2002). CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. J. Clin. Invest. *109*, 1453–1462.

Saito, F., Tasaka, S., Inoue, K.-I., Miyamoto, K., Nakano, Y., Ogawa, Y., Yamada, W., Shiraishi, Y., Hasegawa, N., Fujishima, S., et al. (2008). Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *38*, 566–571.

Salmon-Ehr, V., Serpier, H., Nawrocki, B., Gillery, P., Clavel, C., Kalis, B., Birembaut, P., and Maquart, F.X. (1996). Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. Arch Dermatol *132*, 802–806.

Sambo, P., Baroni, S.S., Luchetti, M., Paroncini, P., Dusi, S., Orlandini, G., and Gabrielli, A. (2001). Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. Arthritis Rheum. *44*, 2653–2664.

Sandler, N.G., Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2003). Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. J. Immunol. *171*, 3655–3667.

Sato, S., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Tedder, T.F., and Takehara, K. (2000). Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. J. Immunol. *165*, 6635–6643.

Sato, S., Hasegawa, M., and Takehara, K. (2001). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. J. Dermatol. Sci. *27*, 140–146.

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

Sato, S., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Takehara, K., and Tedder, T.F. (2004b). Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. Mol. Immunol. *41*, 1123–1133.

Scala, E., Pallotta, S., Frezzolini, A., Abeni, D., Barbieri, C., Sampogna, F., De Pità, O., Puddu, P., Paganelli, R., and Russo, G. (2004). Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. Clin. Exp. Immunol. *138*, 540–546.

Scharffetter, K., Lankat-Buttgereit, B., and Krieg, T. (1988). Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. Eur. J. Clin. Invest. *18*, 9–17.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity *23*, 479–490.

Schneider, P., and Tschopp, J. (2003). BAFF and the regulation of B cell survival. Immunol. Lett. *88*, 57–62.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., et al. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J. Exp. Med. *189*, 1747–1756.

Scott, D.L., Wolfe, F., and Huizinga, T.W.J. (2010). Rheumatoid arthritis. Lancet *376*, 1094–1108.

Scussel-Lonzetti, L., Joyal, F., Raynauld, J.-P., Roussin, A., Rich, E., Goulet, J.-R., Raymond, Y., and Senécal, J.-L. (2002). Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. Medicine (Baltimore) *81*, 154–167.

Sebti, S.M., Mignano, J.E., Jani, J.P., Srimatkandada, S., and Lazo, J.S. (1989). Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. Biochemistry *28*, 6544–6548.

Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. Dev. Biol. *243*, 215–225.

Sellam, J., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J.-E., Ittah, M., Lavie, F., Lacabaratz, C., Gestermann, N., Proust, A., Lambotte, O., and Mariette, X. (2007). Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. *66*, 790–797.

Seror, R., Sordet, C., Guillevin, L., Hachulla, E., Masson, C., Ittah, M., Candon, S., Le Guern, V., Aouba, A., Sibilia, J., et al. (2007). Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjögren's syndrome. Ann. Rheum. Dis. *66*, 351–357.

Serpier, H., Gillery, P., Salmon-Ehr, V., Garnotel, R., Georges, N., Kalis, B., and Maquart,

F.X. (1997). Antagonistic effects of interferon-gamma and interleukin-4 on fibroblast cultures. J. Invest. Dermatol. *109*, 158–162.

Servettaz, A., Guilpain, P., Goulvestre, C., Chéreau, C., Hercend, C., Nicco, C., Guillevin, L., Weill, B., Mouthon, L., and Batteux, F. (2007). Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *66*, 1202–1209.

Shi-wen, X., Pennington, D., Holmes, A., Leask, A., Bradham, D., Beauchamp, J.R., Fonseca, C., Du Bois, R.M., Martin, G.R., Black, C.M., et al. (2000). Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. Exp. Cell Res. *259*, 213–224.

Shi-Wen, X., Denton, C.P., Dashwood, M.R., Holmes, A.M., Bou-Gharios, G., Pearson, J.D., Black, C.M., and Abraham, D.J. (2001). Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. J. Invest. Dermatol. *116*, 417–425.

Shima, Y., Kuwahara, Y., Murota, H., Kitaba, S., Kawai, M., Hirano, T., Arimitsu, J., Narazaki, M., Hagihara, K., Ogata, A., et al. (2010). The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. Rheumatology (Oxford) *49*, 2408–2412.

Shu, H.B., Hu, W.H., and Johnson, H. (1999). TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. J. Leukoc. Biol. *65*, 680–683.

Sims, J.E., and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol. *10*, 89–102.

Sing, T., Jinnin, M., Yamane, K., Honda, N., Makino, K., Kajihara, I., Makino, T., Sakai, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., et al. (2012). microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. Rheumatology (Oxford) *51*, 1550–1556.

Slobodin, G., Ahmad, M.S., Rosner, I., Peri, R., Rozenbaum, M., Kessel, A., Toubi, E., and Odeh, M. (2010). Regulatory T cells (CD4(+)CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. Cell. Immunol. *261*, 77–80.

Smith, V., Van Praet, J.T., Vandooren, B., Van der Cruyssen, B., Naeyaert, J.-M., Decuman, S., Elewaut, D., and De Keyser, F. (2010). Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: an open-label clinical and histopathological study. Ann. Rheum. Dis. *69*, 193–197.

Snapper, C.M., Waegell, W., Beernink, H., and Dasch, J.R. (1993). Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. J. Immunol. *151*, 4625–4636.

Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science *305*, 1434–1437.

Sonkoly, E., Ståhle, M., and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. Semin. Cancer Biol. *18*, 131–140.

Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kirn, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. J. Exp. Med. *207*, 1293–1305.

Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. Nat. Rev. Immunol. *10*, 712–723.

Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H.G., and Lavelle, E.C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. *203*, 1685–1691.

Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., and Mills, K.H.G. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity *31*, 331–341.

Swaisgood, C.M., French, E.L., Noga, C., Simon, R.H., and Ploplis, V.A. (2000). The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. Am. J. Pathol. *157*, 177–187.

$\mathcal{T}$

Taganov, K.D., Boldin, M.P., and Baltimore, D. (2007). MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. Immunity *26*, 133–137.

Tamaoki, M., Imanaka-Yoshida, K., Yokoyama, K., Nishioka, T., Inada, H., Hiroe, M., Sakakura, T., and Yoshida, T. (2005). Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. Am. J. Pathol. *167*, 71–80.

Tamkun, J.W., and Hynes, R.O. (1983). Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. J. Biol. Chem. *258*, 4641–4647.

Tardivel, A., Tinel, A., Lens, S., Steiner, Q.-G., Sauberli, E., Wilson, A., Mackay, F., Rolink, A.G., Beermann, F., Tschopp, J., et al. (2004). The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF. Eur. J. Immunol. *34*, 509–518.

Teixeira, L., Mouthon, L., Mahr, A., Berezné, A., Agard, C., Mehrenberger, M., Noël, L.-H., Trolliet, P., Frances, C., Cabane, J., et al. (2008). Mortality and risk factors of scleroderma renal crisis: a French retrospective study of 50 patients. Ann. Rheum. Dis. *67*, 110–116.

Terras, S., Opitz, E., Moritz, R.K.C., Höxtermann, S., Gambichler, T., and Kreuter, A. (2013). Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. *72*, 144–145.

Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. Genes Dev. *19*, 517–529.

Truchetet, M.-E., Brembilla, N.C., Montanari, E., Allanore, Y., and Chizzolini, C. (2011). Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. Arthritis Res. Ther. *13*, R166.

Truchetet, M.-E., Brembilla, N.-C., Montanari, E., Lonati, P., Raschi, E., Zeni, S., Fontao, L., Meroni, P.-L., and Chizzolini, C. (2013). Interleukin-17A+ cells are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated to the extent of skin involvement. Arthritis Rheum.

Tsuchiya, N., Kuroki, K., Fujimoto, M., Murakami, Y., Tedder, T.F., Tokunaga, K., Takehara, K., and Sato, S. (2004). Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. Arthritis Rheum. *50*, 4002–4007.

V

Varga, J., and Pasche, B. (2009). Transforming growth factor β as a therapeutic target in systemic sclerosis. Nature Reviews Rheumatology *5*, 200–206.

Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. Cell *128*, 1105–1118.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science *318*, 1931–1934.

Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W.S., Karpilow, J., and Khvorova, A. (2005). The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. RNA *11*, 674–682.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. Nat. Rev. Immunol. *8*, 523–532.

W

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. Genes Dev. *21*, 1857–1862.

Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 5343–5348.

Wang, J.M., Chao, J.R., Chen, W., Kuo, M.L., Yen, J.J., and Yang-Yen, H.F. (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. Mol. Cell. Biol. *19*, 6195–6206.

Waters, C.E., Shi-Wen, X., Denton, C.P., Abraham, D.J., and Pearson, J.D. (2006). Signaling pathways regulating intercellular adhesion molecule 1 expression by endothelin 1: comparison with interleukin-1beta in normal and scleroderma dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. *54*, 649–660.

Wei, J., Melichian, D., Komura, K., Hinchcliff, M., Lam, A.P., Lafyatis, R., Gottardi, C.J., MacDougald, O.A., and Varga, J. (2011). Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis

and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? Arthritis Rheum. *63*, 1707–1717.

Whiteside, T.L., Buckingham, R.B., Prince, R.K., and Rodnan, G.P. (1984). Products of activated mononuclear cells modulate accumulation of collagen by normal dermal and scleroderma fibroblasts in culture. J. Lab. Clin. Med. *104*, 355–369.

Whitfield, M.L., Finlay, D.R., Murray, J.I., Troyanskaya, O.G., Chi, J.-T., Pergamenschikov, A., McCalmont, T.H., Brown, P.O., Botstein, D., and Connolly, M.K. (2003). Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 12319–12324.

Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. J. Exp. Med. *207*, 535–552.

Wolk, K., Haugen, H.S., Xu, W., Witte, E., Waggie, K., Anderson, M., Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., et al. (2009). IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-γ are not. Journal of Molecular Medicine *87*, 523–536.

Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010). Biology of interleukin-22. Semin Immunopathol *32*, 17–31.

Woodland, R.T., Fox, C.J., Schmidt, M.R., Hammerman, P.S., Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J., Hilbert, D.M., and Thompson, C.B. (2008). Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. Blood *111*, 750–760.

Worrall, J.G., Whiteside, T.L., Prince, R.K., Buckingham, R.B., Stachura, I., and Rodnan, G.P. (1986). Persistence of scleroderma-like phenotype in normal fibroblasts after prolonged exposure to soluble mediators from mononuclear cells. Arthritis Rheum. *29*, 54–64.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 4034–4039.

χ

Xiao, C., and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. Cell *136*, 26–36.

Xiao, J., Meng, X.-M., Huang, X.R., Chung, A.C., Feng, Y.-L., Hui, D.S., Yu, C.-M., Sung, J.J., and Lan, H.Y. (2012). miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Mol. Ther. *20*, 1251–1260.

Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. Nat. Immunol. *8*, 294–303.

Y

Yamakage, A., Kikuchi, K., Smith, E.A., LeRoy, E.C., and Trojanowska, M. (1992). Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. J. Exp. Med. *175*, 1227–1234.

Yamamoto, T., and Nishioka, K. (2003). Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor,CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. J. Invest. Dermatol. *121*, 510–516.

Yamamoto, T., Sawada, Y., Katayama, I., and Nishioka, K. (1998). Increased production of nitric oxide stimulated by interleukin-1beta in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic sclerosis. Br. J. Rheumatol. *37*, 1123–1125.

Yamamoto, T., Takagawa, S., Katayama, I., Yamazaki, K., Hamazaki, Y., Shinkai, H., and Nishioka, K. (1999). Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. J. Invest. Dermatol. *112*, 456–462.

Yamamoto, T., Eckes, B., and Krieg, T. (2001a). High expression and autoinduction of monocyte chemoattractant protein-1 in scleroderma fibroblasts. Eur. J. Immunol. *31*, 2936–2941.

Yamamoto, T., Eckes, B., and Krieg, T. (2001b). Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *281*, 200–205.

Yamashita, C.M., Dolgonos, L., Zemans, R.L., Young, S.K., Robertson, J., Briones, N., Suzuki, T., Campbell, M.N., Gauldie, J., Radisky, D.C., et al. (2011). Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. Am. J. Pathol. *179*, 1733–1745.

Yanaba, K., Yoshizaki, A., Asano, Y., Kadono, T., and Sato, S. (2011). Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. Clin. Rheumatol. *30*, 825–830.

Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.-H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., et al. (2008). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. J. Exp. Med. *205*, 1063–1075.

Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., and Armitage, R.J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. J. Immunol. *155*, 5483–5486.

Ye, Q., Wang, L., Wells, A.D., Tao, R., Han, R., Davidson, A., Scott, M.L., and Hancock, W.W. (2004). BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. Eur. J. Immunol. *34*, 2750–2759.

Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.-C.G., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. (2006). Analysis of the C. elegans Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. Cell *127*, 747–757.

Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., Komura, K., Ogawa, A., Akiyama, Y., Muroi, E., Hara, T., Ogawa, F., Takenaka, M., et al. (2010). Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. J. Immunol. *185*, 2502–2515.

Z

Zeisel, M.B., Druet, V.A., Sibilia, J., Klein, J.-P., Quesniaux, V., and Wachsmann, D. (2005). Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. J. Immunol. *174*, 7393–7397.

Zhang, B., and Farwell, M.A. (2008). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. J. Cell. Mol. Med. *12*, 3–21.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev. Biol. *302*, 1–12.

Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y., Ahokas, R.A., and Sun, Y. (2008). Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. Mol. Cell. Biochem. *317*, 43–50.

Zhou, X., Tan, F.K., Milewicz, D.M., Guo, X., Bona, C.A., and Arnett, F.C. (2005). Autoantibodies to fibrillin-1 activate normal human fibroblasts in culture through the TGF-beta pathway to recapitulate the “scleroderma phenotype”. J. Immunol. *175*, 4555–4560.

Zhu, H., Li, Y., Qu, S., Luo, H., Zhou, Y., Wang, Y., Zhao, H., You, Y., Xiao, X., and Zuo, X. (2012). MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. J. Clin. Immunol. *32*, 514–522.

Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., and Elias, J.A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J. Clin. Invest. *103*, 779–788.

Zuo, F., Kaminski, N., Eugui, E., Allard, J., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Lollini, L., Morris, D., Kim, Y., DeLustro, B., et al. (2002). Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 6292–6297.

Zurita-Salinas, C.S., Richaud-Patin, Y., Krötzsch-Gómez, E., Llorente, L., Alcocer-Varela, J., Díaz-de-León, L., and Palacios-Boix, A. (1998). Spontaneous cytokine gene expression by cultured skin fibroblasts of systemic sclerosis. Correlation with collagen synthesis. Rev. Invest. Clin. *50*, 97–104.

(1980). Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum. *23*, 581–590.

Antoine FRANCOIS

Rôle du « B-cell activating factor » (BAFF) et des Lymphocytes B dans la fibrose pulmonaire et cutanée dans la sclérodermie systémique

Résumé

La sclérodermie systémique (ScS) est une maladie autoimmune rare qui se caractérise par une fibrose cutanée et parfois pulmonaire. Nous avons tout d'abord évalué le rôle de BAFF, une cytokine impliquée dans le développement des lymphocytes B (LB), dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Nous avons démontré que BAFF était augmenté en réponse à la bléomycine et que les souris BAFF-/- ou traitées par le BAFF-R-Ig sont protégées de la fibrose pulmonaire. Ensuite, nous avons évalué si les LB et BAFF pouvaient moduler la production de collagène par des fibroblastes de peau isolés de patients atteints de ScS. Nous avons démontré que les LB augmentent la production de collagène et de cytokines impliquées dans la fibrose cutanée et l'ajout de BAFF augmente cet effet des LB sur les fibroblastes. Enfin, nous avons étudié la régulation de l'expression de BAFF par les microARNs. Nos résultats montrent que les miR-30a*, d* et e* ciblent directement l'ARNm de BAFF.

Mots clés :

Sclérodermie, Fibrose, BAFF, Poumon, Lymphocyte B, Immunologie, Auto-immunité, MicroARN

Résumé en anglais

Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disease characterized by skin fibrosis and occasionally pulmonary fibrosis. We first assessed the role of BAFF, a cytokine involved in B cell maturation, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. We showed that BAFF was increased in response to bleomycin and that BAFF-/- mice or BAFF-R-Ig-treated mice are protected from pulmonary fibrosis. Then, we assessed whether B cells and BAFF could regulate collagen production by skin fibroblasts isolated from SSc patients. We demonstrated that B cells increase collagen production and cytokines involved in skin fibrosis. The addition of BAFF increases the effect of B cells on fibroblasts. Lastly, we studied the regulation of BAFF expression by microRNAs. Our results show that miR-30a*, d* and e* directly target the BAFF mRNA.

Keywords:

Systemic sclerosis, Fibrosis, BAFF, Lung, B cell, Immunology, Auto-immunity, MicroRNA